

CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM CITÔMETRO DE FLUXO
MONOPARAMÉTRICO

Hatus Vianna Wanderley

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO
DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Aprovada por:

Prof. Márcio Nogueira de Souza, D.Sc.

Prof. Marco Antonio von Krüger, Ph.D.

Prof. Pedro Lopes de Melo, D.Sc.

Prof. Álvaro Luiz Bertho dos Santos, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2006

WANDERLEY, HATUS VIANNA

Construção e validação de um citômetro de fluxo monoparamétrico [Rio de Janeiro] 2006.

XV, 104 p., 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Biomédica, 2006)

Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

1. Princípios tecnológicos da citometria de fluxo.
2. Classificação de micropartículas a *laser*.

I. COPPE/UFRJ II. Título (série).

”Não tenho fé suficiente para ser um ateu.”

Peter James Cousins

À minha amada esposa, Ana Cecília,
com quem compartilho os meus sonhos.

Agradeço a Deus pela minha vida com saúde, pelo seu cuidado e providência e pelas oportunidades dadas que vieram junto com capacidade de aproveitá-las. Agradeço aos meus pais, Uziel e Albertina, pelo amor e admiração e pelo suporte. Agradeço à minha esposa, Ana Cecília, pelo amor e dedicação. Agradeço aos meus tios Waldair e Gilda por terem me acolhido com carinho. E aos meus primos, Rildo, Roberto e Sérgio e suas esposas pelo apoio que me deram. Agradeço ao Prof. Márcio pela orientação impecável, pela amizade, pelo respeito com que me tratou, pela confiança depositada em mim e pela sua honestidade e transparência na sua conduta profissional. Agradeço aos meus amigos de turma que transformaram meus dias de trabalho em boas lembranças para serem guardadas, em especial a Adelson Lucena. Agradeço aos meus amigos conterrâneos que sempre torceram por mim. Agradeço ao meu amigo russo Iwan Schie que veio da Alemanha para aprender e ajudar. Agradeço a Jocimar da Oficina de Hialotecnia do Instituto de Química da UFRJ pela construção do capilar de vidro. Também merecem meu agradecimento pelas suas contribuições: Amauri Xavier, Leonel dos Santos, Cláudio Paleólogo, Marli Sidoni e Rodrigo Brindeiro. E por fim, às agências de fomento à pesquisa CNPq e Faperj pelo suporte financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM CITÔMETRO DE FLUXO
MONOPARAMÉTRICO

Hatus Vianna Wanderley

Março/2006

Orientador: Márcio Nogueira de Souza

Programa: Engenharia Biomédica

A citometria de fluxo, que é uma técnica relevante para o desenvolvimento de pesquisas em ciências de saúde e para o diagnóstico clínico de enfermidades importantes como AIDS e câncer, consiste na análise de células de uma amostra enquanto estas estão em movimento, sendo a focalização hidrodinâmica fundamental neste processo para permitir o estudo individual de cada célula.

É apresentada a construção e validação de um citômetro de fluxo capaz de perceber o espalhamento frontal de luz e de diferenciar partículas com diâmetros desiguais. Para tal, desenvolveu-se: sistema óptico, compreendendo um circuito de controle de potência do *laser*; sistema de detecção e condicionamento dos sinais, notadamente os circuitos pré-amplificadores; e sistema de condução de fluidos, incluindo o projeto e a construção de uma câmara de focalização hidrodinâmica (CFH), dispositivo fundamental para permitir a análise individual de cada célula.

Os resultados dos experimentos, utilizando amostras com microesferas de poliestireno com $4\mu m$ e $15\mu m$ de diâmetro, apontam para a eficácia do equipamento em classificar partículas com tamanhos diferentes, onde obteve-se resoluções $r|_4 = 40,7\%$ e $r|_{15} = 49,8\%$ em relação às microesferas estudadas, respectivamente.

Abstract of the Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

CONSTRUCTION AND VALIDATION OF A MONOPARAMETRIC FLOW CYTOMETER

Hatus Vianna Wanderley

March/2006

Advisor: Márcio Nogueira de Souza

Department: Biomedical Engineering

The flow cytometry, that is a relevant technique for the development of health science research and for clinical diagnosis of important diseases as AIDS and cancer, consists on cells analysis of a sample while these are in movement, in which the hydrodynamic focusing is fundamental in this process to allow the individual study of each cell.

This work presents the construction and validation of a flow cytometer capable to perceive the forward light scattering and then differentiate particles with unequal diameter. For such, it was developed: optical system, involving a laser power control circuit; detection and signal conditioning system, outstandingly the pre-amplifiers circuits; and fluid conduction system, including the design and manufacturing of a flow cell, cardinal device to allow the individual study of each cell.

The experiments results, using samples with $4\ \mu m$ and $15\ \mu m$ diameter polystyrene microspheres, point to the equipment efficacy in classifying particles with different sizes, obtaining resolutions of $r|_4 = 40,7\%$ and $r|_{15} = 49,8\%$ related to the studied microspheres, respectively.

Sumário

I	Introdução	1
I.1	Objetivos	6
II	Fundamentos teóricos e estado da arte	8
II.1	Visão geral de um citômetro de fluxo	11
II.1.1	Câmara de focalização hidrodinâmica	11
II.1.2	Sistema ótico	13
II.1.3	Condicionadores de sinais e sistema de aquisição	25
II.1.4	Apresentação de dados	29
III	Materiais e métodos	32
III.1	Concepção do projeto do citômetro de fluxo monoparamétrico	32
III.2	Corpo do citômetro de fluxo	32
III.3	Sistema ótico	35
III.3.1	Lentes	35
III.3.2	Excitação	37
III.4	Sistema de condução dos fluidos	39
III.4.1	Câmara de focalização hidrodinâmica	43
III.4.2	Avaliação da focalização hidrodinâmica	48
III.5	Detecção de sinais	49
III.5.1	Espalhamento direto (<i>forward scatter</i>)	50
III.5.2	Espalhamento lateral (<i>side scatter</i>)	50
III.5.3	Condicionamento de sinais	51

III.5.4	Caracterização dos circuitos condicionadores de sinal	53
III.6	Aquisição	60
III.7	Validação do citômetro de fluxo monoparamétrico	61
III.7.1	Avaliação do ruído de fundo	61
III.7.2	Experimento com homopolímero de PVC	61
III.7.3	Experimento com microesferas de poliestireno	61
IV	Resultados	63
IV.1	Focalização hidrodinâmica	63
IV.2	Pré-amplificador de carga do sinal do fotodiodo	65
IV.2.1	Resposta em frequência do filtro e amplificador linear do sinal do fotodiodo	67
IV.2.2	Condicionador do sinal do tubo fotomultiplicador	70
IV.3	Validação do citômetro de fluxo monoparamétrico	72
IV.3.1	Avaliação do ruído de fundo	72
IV.3.2	Experimento usando homopolímero de PVC	73
IV.3.3	Experimento com microesferas de poliestireno	73
V	Discussões	77
VI	Conclusões	79
	Referências Bibliográficas	82
A	Desenhos das peças do corpo do citômetro	88
B	Ilustrações complementares	96
C	Protocolo para injeção de amostra	102

Lista de Figuras

II.1	Diagrama esquemático de um citômetro de fluxo.	11
II.2	Câmara de focalização hidrodinâmica, apresentando os condutos que carregam o líquido de revestimento (exterior) e a amostra (interior).	12
II.3	Regiões do espectro eletromagnético.	17
II.4	Esquema dos níveis de energia do átomo. Extraído de Ewing (1914, p. 8).	18
II.5	Esquema dos níveis energéticos moleculares, singlete e triplete. Extraído de Ewing (1914, p. 10).	19
II.6	Ilustração de um tubo fotomultiplicador.	23
II.7	Divisor de tensão para um tubo fotomultiplicador. Cada R é uma resistência ôhmica, RL é a resistência de carga, $d1$ a dn são os dinodos, a é o anodo, k é o fotocatodo e $-HT$ é a alta tensão negativa em relação à referência.	24
II.8	Diagrama esquemático de um circuito detector de pico.	28
II.9	Representação monoparamétrica dos dados obtidos por um citômetro de fluxo. A abscissa representa os canais do PHA e a ordenada a contagem de eventos. Extraído de Bertho <i>et al.</i> (2000b).	30
II.10	Representação multiparamétrica dos dados obtidos por um citômetro de fluxo. Os dois eixos representam os canais dos PHAs. Cada ponto representa um evento. Extraído de Lu <i>et al.</i> (2006).	30

II.11	Representação em curvas de níveis dos dados obtidos por um citômetro de fluxo. Extraído de Neves-Souza <i>et al.</i> (2005).	31
III.1	Diagrama esquemático do citômetro de fluxo proposto.	33
III.2	Diagrama do arranjo das lentes.	35
III.3	Lente utilizada em leitores de CD.	36
III.4	Lentes objetivas utilizadas no sistema ótico.	37
III.5	Diagrama elétrico do <i>laser</i> Sanyo DL-3148-025. (D_L) diodo laser; (P_D) fotodiodo.	38
III.6	Diagrama elétrico da fonte de alimentação do diodo <i>laser</i>	38
III.7	Diagrama esquemático do sistema de condução de fluidos.	40
III.8	Montagem da tampa do vaso de pressão e do vaso do fluido de revestimento.	42
III.9	Diagrama da câmara de focalização hidrodinâmica proposta.	45
III.10	Capilar dentro da peça 2 do corpo do citômetro (A); Detalhe do feixe <i>laser</i> espalhado pelo capilar sem líquido (B).	46
III.11	Diagrama da tampa da câmara de focalização hidrodinâmica.	47
III.12	Detalhe da conexão <i>luer-lok</i> com a agulha de injeção de amostra na tampa da câmara de focalização hidrodinâmica.	48
III.13	Micrografias do homopolímero de PVC NORVIC [®] P72HA peneirado. Partículas maiores (A) e menores (B) que $38\ \mu m$	49
III.14	Fotodiodo para detecção do espalhamento direto.	50
III.15	Tubo fotomultiplicador da Electron-tubes do tipo P25A-09, modelo 9113B	51
III.16	Circuito de condicionamento do sinal do fotodiodo.	52
III.17	Circuito de condicionamento do sinal do PMT.	54
III.18	Desenho do experimento para caracterização dos capacitores utilizados na avaliação do pré-amplificador de carga.	54
III.19	Desenho do experimento para caracterização da sensibilidade do pré-amplificador de carga.	57

III.20	Onda quadrada do gerador de função que simula um degrau de tensão.	58
III.21	Experimento para caracterização da resposta em frequência do filtro e amplificador do sinal do fotodiodo.	59
III.22	Experimento para caracterização da resposta em frequência do condicionador de sinal do tubo fotomultiplicador.	60
IV.1	Micrografias do capilar: (A) preenchido com fluido de revestimento, mas sem amostra; (B) com amostra, mas sem focalização hidrodinâmica; (C) com amostra em focalização hidrodinâmica leve; (D) com amostra em focalização hidrodinâmica intermediária; (E) com amostra em focalização hidrodinâmica precisa. (F) Capilar com bolhas de ar.	64
IV.2	Sinal de saída do pré amplificador (CH2) em função da carga de entrada, representada pelo degrau de tensão (CH1).	65
IV.3	Curva de sensibilidade do pré-amplificador de carga.	67
IV.4	Resposta em frequência segundo estágio do condicionamento do sinal do sinal do fotodiodo. Ganho na banda passante de 5,4, frequência de corte inferior em $380 Hz$ e a frequência de corte superior em $420 kHz$	69
IV.5	Resposta em frequência do amplificador do sinal do tubo fotomultiplicador.	70
IV.6	Sinal obtido utilizando a água destilada e filtrada como amostra. Corrente do <i>laser</i> : $31,3 mA$	72
IV.7	Resultado do experimento com o homopolímero de PVC. Corrente do <i>laser</i> : $31,4 mA$	73
IV.8	Resultado do experimento com o homopolímero de PVC. Corrente do <i>laser</i> : $31,3 mA$	74
IV.9	Resultado do experimento com amostra contendo microesferas de $4\mu m$ e $15\mu m$. Corrente do <i>laser</i> : $34,6 mA$	75

IV.10	Estimativa do resultado de um experimento com amostra contendo microsferas de $4\mu m$ e $15\mu m$ quando extraído o erro normalizado. <i>FWHM</i> (<i>Full-Width at Half Maximum</i>) é a medida da largura a meia altura.	76
A.1	Peça 1 - Sustentação da estrutura de excitação.	89
A.2	Peça 2 - Sustentação das estruturas de detecção do sinal do espalhamento direto e do espalhamento lateral, suporte da câmara de focalização hidrodinâmica, escoamento e furo para observação da amostra.	90
A.3	Peça 3 - Parte externa da estrutura de excitação.	91
A.4	Peça 4 - Estrutura de sustentação da detecção do espalhamento lateral.	92
A.5	Peça 5 - Estrutura de sustentação da detecção do espalhamento direto.	93
A.6	Peça 6 - Apoio do módulo <i>laser</i>	94
A.7	Peça 7 - Apoio do fotodiodo.	95
B.1	Citômetro de fluxo monoparamétrico. (A) Compressor; (B) Vaso de pressão; (C) Vaso de despejo; (D) Osciloscópio; (E) Filtro da ar e controles pneumáticos e hidráulico; (F) Câmera de vídeo; (G) Circuito de proteção e controle do <i>laser</i> ; (H) Vaso da amostra; (I) Vaso do fluido de revestimento; (J) Circuitos de condicionamento de sinais; (L) Fonte de alimentação dos circuitos.	97
B.2	Detalhes: (A) Compressor e vaso de pressão; (B) Filtro de ar e reguladores de pressão.	98
B.3	Detalhes: (A) Válvula de fechamento dos vasos do fluido de revestimento e da amostra; (B) Válvula de despejo.	99
B.4	Vistas laterais do corpo do citômetro de fluxo monoparamétrico ressaltando o tubo fotomultiplicador.	100

B.5 Vistas do citômetro de fluxo monoparamétrico. (A) (Frontal) Detalhe do microscópio adaptado com a câmera de vídeo fixada na ocular; (B) (Superior) Detalhe sensor de espalhamento frontal à direita. 101

Lista de Tabelas

II.1	Transições entre níveis e subníveis energéticos provocadas por radiações de diferentes comprimentos de onda. Adaptada de Ewing (1914, p. 7).	20
III.1	Resposta em frequência do capacitor de teste C_T , onde $ X_{C_T} $ é o módulo da impedância e Φ_{C_T} a fase associada.	55
III.2	Resposta em frequência do capacitor de teste C_1 , onde $ X_{C_1} $ é o módulo da impedância e Φ_{C_1} a fase associada.	55
IV.1	Resposta do pré-amplificador em função da carga de entrada, onde: $V_I (V)$ é a tensão de pico sobre o capacitor C_T ; $Q_I (pC)$ é a carga resultante injetada no pré-amplificador; $V_O (V)$ é a tensão de pico medida na saída do pré-amplificador; $S_{1C} (V/pC)$ é a sensibilidade calculada a partir das tensões de V_I e V_O e do capacitor C_T	66
IV.2	Valores obtidos no levantamento da resposta em frequência do segundo estágio do condicionamento do sinal do fotodiodo.	68
IV.3	Resposta em frequência do condicionador de sinal do tubo fotomultiplicador.	71

Capítulo I

Introdução

Há muito tempo os organismos vivos microscópicos despertam a curiosidade da humanidade, muitas vezes utilizados em benefício próprio para fabricação de bebidas e processamento de alimentos (BARNETT, 2003). Sendo assim, naturalmente surgiu a necessidade de investigá-los, descobrir de que eram compostos, como cresciam e se multiplicavam. Todavia não existiam subsídios suficientes para afirmações precisas. Mesmo assim, muitas inferências sobre a vida foram feitas, mas várias delas eram polêmicas e controversas (SCHUMMER, 2003).

Era preciso descobrir a unidade funcional básica capaz de compor um organismo vivo. A fermentação teve papel importante nesta jornada sendo os químicos os primeiros desbravadores. O químico Antoine Lavoisier, peça chave da química moderna, foi pioneiro em estudos científicos da fermentação alcoólica em 1789 (BARNETT, 2003). Tentativas de observar pequenos objetos já haviam sido feitas desde o século I d.C., com a descoberta dos materiais com capacidade de aumento (FRADA, 2001).

Em meados de 1673 foi creditado a Antony van Leeuwenhoek o mérito da construção do primeiro microscópio ótico, composto por um arranjo de lentes capaz de aumentar 270 vezes a imagem de um objeto, permitindo observar e descrever bactérias e pequenos protozoários, mas sem pretensões de afirmar quais seriam as unidades básicas que constituíam os seres vivos (FRADA, 2001; PORTER, 1976). Com a evolução das lentes de microscópio, outros pesquisadores puderam fazer inferências mais

precisas.

Com isso, a afirmação de três cientistas, Cagniard-atour, Kützing e Schwann, que leveduras eram organismos vivos, provocou grande impacto na sociedade científica da época. Com a evolução do microscópio ótico foi possível descrever a morfologia dos microorganismos e de suas organelas além de poder caracterizá-las qualitativamente de acordo com a sua aparência, forma e cor, possibilitando a Theodor Schwann e Matthias Schleiden em 1839 formularem a Teoria Celular, pois concluíram que os organismos vivos eram formados por unidades básicas, as quais chamou de células, que se multiplicavam e diferenciavam (BARNETT, 2003; GEORGE, 2003).

O estudo da célula teve grande impulso com a utilização de marcadores que melhoravam a sua observação em microscópios ópticos. Até 1850 apenas corantes naturais eram disponíveis, tal como o Açafrão, que Leeuwenhoek usou para marcar células musculares (SHAPIRO, 2003, p. 74). Em 1856, William Henry Perkin, aos 18 anos de idade, criaria o primeiro corante sintético: mauve (anilina roxa). No ano seguinte ele abriu uma empresa com a ajuda do seu pai para industrializar e comercializar a sua descoberta (MURMANN, 2000). O químico Louis Pasteur, no final do século XIX, formulou a teoria microbiana para explicar a causa de enfermidades humanas e animais, o que não apenas revolucionou a medicina e a biologia, mas introduziu aperfeiçoamentos nas técnicas de fermentação tradicionais (BARNETT, 2003). Em 1900, Paul Ehrlich relata o estudo sobre o sangue e ratifica a existência dos leucócitos dos tipos neutrófilos, eosinófilos e basófilos por meio da utilização de misturas de corantes ácidos e básicos. Com o aperfeiçoamento do método, e com a utilização de corantes específicos, tornou-se viável a análise clínica de amostras de células humanas. Sob a influência de Ehrlich, Malachowski e Romanowsky desenvolveram misturas de eosina e azures de metileno que permitiram a identificação da malária em células sanguíneas (SHAPIRO, 2003, p. 74). Depois desse, vieram os corantes fluorescentes (fluorocromos), que emitiam luz visível quando excitados por luz ultra-violeta. Dessa forma, é possível diagnosticar diversos males por meio da observação de uma amostra de células. Em muitos casos também é necessário fazer

a contagem de células contidas em uma amostra para poder estimar a concentração dessas, com o objetivo de avaliar o estado de saúde de um indivíduo.

Com o passar do tempo a biologia foi segmentada em diversas áreas que visavam aprofundamentos em campos concorrentes, onde destacamos a biologia molecular. A partir desta, várias técnicas foram desenvolvidas para a manipulação direta do DNA e dos genes, alcançada no fim do século XX. Estes estudos prepararam o terreno para que florescesse a biotecnologia, que se utiliza de organismos vivos, notadamente os microscópicos, para geração de produtos e insumos (PLAZA *et al.*, 2001). Novos horizontes se abriram para a investigação de enfermidades importantes como AIDS, câncer e tantas outras. A descoberta, industrialização e comercialização dos produtos da biotecnologia representam grande potencial econômico e social, possibilitando a criação de alimentos transgênicos que privilegiam algumas das características ou indicando um caminho para a criação de medicamentos personalizados, a farmacogenética (CANTOR, 2000). É fato que os investimentos necessários para geração de inovações tecnológicas nesse campo são altos. Portanto, para viabilizar uma empreitada por este caminho, é necessário que exista a cooperação de instituições científicas, agências governamentais, empresas privadas, investidores e consumidores. Sendo assim, programas de colaboração entre empresas, universidades e centros de pesquisa têm se firmado para investidas em áreas consideradas promissoras onde os custos de pesquisa são elevados e/ou de alto risco. Um grande exemplo é o Grupo Genoa (www.genoagroup.com.br), empresa privada criada por pesquisadores que desenvolveram uma vacina contra o câncer (BARBUTO *et al.*, 2004; BARBUTO, 2005; NEVES *et al.*, 2005).

Dos benefícios proporcionados pela biotecnologia, a linha voltada para desenvolvimento de reativos para diagnóstico laboratorial de doenças merece redobrada atenção. Estes reagentes são substâncias capazes de, com o auxílio do equipamento adequado, detectar antígenos (substâncias orgânicas nocivas, geralmente de natureza protéica) ou anticorpos (produzidos em reação ao aparecimento dos antígenos) relacionados a diversas doenças.

Estas novas ferramentas representam um grande avanço para a vigilância sanitária e epidemiológica, que são fatores importantes nas decisões governamentais para a gestão da saúde pública. Aids, leishmaniose, doença de Chagas, leptospirose, hepatite, dengue e malária são exemplos de doenças que atingem a população brasileira, pelas quais o governo precisa se responsabilizar.

Nesse contexto, é de fundamental importância para o Brasil o domínio destas tecnologias, tanto dos reagentes como dos equipamentos utilizados nos laboratórios, visando a melhoria dos serviços de Saúde Pública, aumentando a qualidade e reduzindo o tempo e os custos envolvidos nesses processos. Para isso é necessário que o país detenha tanto o conhecimento científico quanto o tecnológico relativo a estes assuntos.

Muito se tem feito nesse sentido, sendo a maior contribuição proveniente da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (GADELHA e AZEVEDO, 2003) que está vinculada ao Ministério da Saúde. Bio-Manguinhos, órgão desta fundação, é responsável pela produção de diversos insumos envolvidos nos programas do Ministério da Saúde para controle de endemias e agravos e doenças sexualmente transmissíveis (CNDST/AIDS), dentre eles estão as vacinas contra doenças como meningite, febre amarela ou poliomielite, assim como os reativos para diagnósticos de dengue, doença de chagas, hanseníase, AIDS, leishmaniose, entre outras. Mesmo assim, apesar da qualidade dos insumos produzidos por Bio-Manguinhos, que tem o domínio tecnológico para a fabricação destes insumos, vários dos equipamentos responsáveis pela manipulação das amostras tratadas com os reativos nacionais são importados, criando a dependência de fornecedores estrangeiros em uma área estratégica e de suma importância no Brasil, que é a saúde pública.

Dentre as técnicas utilizadas nesses exames para a manipulação das amostras tratadas com os reativos, está a Citometria de Fluxo. A citometria consiste na caracterização de células individuais, ou de forma geral, outras partículas biológicas de tamanho semelhante, por meio da medida de suas grandezas físicas e químicas (SHAPIRO, 2003; VAN DILLA *et al.*, 1985). A citometria de fluxo mede estas grandezas

enquanto a célula está em movimento, conduzida por um fluxo. Comumente o fluxo que desloca a célula é um líquido, que é chamado de líquido de revestimento. E, por meio de uma técnica conhecida como Focalização Hidrodinâmica, as células são enfileiradas de forma que possam ser observadas uma a uma.

Uma das técnicas aplicadas na construção de citômetros de fluxo, equipamentos que realizam a citometria de fluxo, consistia na medição das grandezas elétricas da célula para caracterizá-la. Era possível contar as células de uma amostra e estimar o tamanho médio das células com rapidez por meio de sua impedância e resistência elétrica (LOOS *et al.*, 1976; HOFFMAN e BRITT, 1979). Em outra ocasião foram desenvolvidos equipamentos ópticos que ampliavam as possibilidades de análise da célula. O funcionamento dos citômetros de fluxo modernos baseia-se na detecção da luz espalhada e fluorescência emitida pela célula quando esta é marcada por reagentes específicos e iluminada por uma determinada fonte. Os sensores medem a potência radiante espalhada pela célula e também a fluorescência dos marcadores ligados a ela.

A citometria de fluxo se presta para a análise celular, podendo caracterizar partículas biológicas quanto à sua morfologia e seu conteúdo. É possível registrar vários parâmetros simultâneos de cada célula atingida pela fonte luminosa. No âmbito de estudos citológicos e investigações biomédicas, a citometria de fluxo se apresenta como importante ferramenta. Esta técnica possibilita a análise qualitativa, podendo determinar quais são as células em processo de apoptose ou necrose (BERTHO *et al.*, 2000; DIVE *et al.*, 1992), ou ainda identificar em qual fase do ciclo celular a partícula se encontra (POZAROWSKI e DARZYNKIEWICZ, 2004). Possibilita a identificação de cromossomos (LU *et al.*, 2006), ensaios oncológicos (MARTÍNEZ-ARRIBAS *et al.*, 2006), análise de bactérias aquáticas (ANDRADE *et al.*, 2003), estudo do dengue (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005), entre outras aplicações (BERTHO *et al.*, 2000b; BACAL *et al.*, 2002; SARAIVA *et al.*, 2005; RATH *et al.*, 1999). Também é possível quantificar parâmetros importantes, como por exemplo o conteúdo de DNA ou RNA de uma célula (CUI *et al.*, 2003), estimar o tamanho da partícula (CUCCI e

SIERACKI, 2001), ou simplesmente contar as células analisadas, diferenciando as sub-populações de acordo com os parâmetros estabelecidos em um computador para identificá-las.

Em imunologia, a citometria de fluxo auxilia em diversos estudos de doenças auto-imunes e das síndromes de imunodeficiência, em especial a AIDS, facilitando o diagnóstico destas (NEVES *et al.*, 1998). Mudanças nas taxas de linfócitos T, B, CD4+ e CD8+ podem ser facilmente analisadas com a ajuda da citometria de fluxo para o diagnóstico da doença, assim como para o monitoramento de pacientes submetidos a terapias anti-retrovirais.

Atualmente os equipamentos de citometria de fluxo ainda são caros (máquinas que podem custar US\$ 450.000,00) e o Brasil ainda não tem o domínio dessa tecnologia, sendo necessário importar estes equipamentos para o desenvolvimento de pesquisas e para exames clínicos, necessários para a manutenção da saúde pública no país. Sendo assim, fica evidente que o desenvolvimento de citômetros de fluxo trará grandes benefícios para a independência do país no que diz respeito às aplicações mencionadas, uma vez que vacinas e kits diagnósticos já são produzidos no país (GADELHA e AZEVEDO, 2003). O desenvolvimento de citômetros de fluxo poderá resultar em uma redução dos custos para o SUS com diagnóstico de várias doenças, já que essa tecnologia poderá ser repassada para a indústria nacional e tais equipamentos possam vir a ser fabricados no Brasil.

I.1 Objetivos

A proposta deste trabalho consiste no desenvolvimento e validação de um citômetro de fluxo monoparamétrico, sendo guiada pelos objetivos:

Geral:

- Agregar conhecimento científico e tecnológico a respeito dos citômetros de

fluxo para contribuir com a nacionalização desta tecnologia.

Específicos:

- Estudar os princípios de funcionamento dos citômetros de fluxo, com suas várias especificidades hidráulicas, pneumáticas, ópticas, eletrônicas e de condicionamento de sinais.
- Desenvolver uma câmara de focalização hidrodinâmica com tecnologia nacional.
- Construir um citômetro de fluxo, utilizando a câmara de focalização hidrodinâmica proposta, com capacidade para adquirir um parâmetro, o sinal de espalhamento de luz direto (front scatter), para possibilitar a classificação de uma amostra que possui partículas com tamanhos diferentes.
- Realizar experimento com amostra padrão para avaliar a habilidade do equipamento de perceber a diferença de tamanho das partículas da amostra.

Capítulo II

Fundamentos teóricos e estado da arte

O citômetro de fluxo é um equipamento composto por sistemas hidrodinâmicos, ópticos, eletrônicos e computacionais. A partir da iluminação de uma célula (doravante entenda-se célula como qualquer partícula com dimensão semelhante à dimensão da mesma) por uma fonte luminosa com um comprimento de onda específico (que pode ser um *laser*, lâmpada de descarga em gás ou um LED) o espalhamento da luz e a fluorescência de determinadas substâncias ligadas à célula (fluorocromos) são percebidos pelos sensores de luz. Normalmente um tubo fotomultiplicador (PMT - do inglês: *Photomultiplier Tube*) percebe o espalhamento lateral (SSC - do inglês: *side scattering*) da luz e também as fluorescências, enquanto um fotodiodo mede o espalhamento direto da luz (FSC - do inglês: *forward scattering*), sendo que um fotodiodo de avalanche pode ser utilizado para medir o espalhamento lateral no lugar do PMT em circunstâncias específicas.

A construção bem sucedida do primeiro citômetro de fluxo é creditada a Gucker e colaboradores, segundo Shapiro (2003, p. 74). O projeto foi desenvolvido durante a segunda guerra mundial com o financiamento do exército americano. O objetivo era detectar rapidamente bactérias em aerossóis que pudessem ser usadas como armas biológicas. O ar filtrado foi utilizado para conduzir as partículas da amostra até

a região de medição. Na época, a fonte de luz utilizada foi a Ford Headlight. A medição era feita por um PMT, recém desenvolvido, que possibilitava a detecção de partículas de $0,6 \mu m$ de diâmetro.

Os citômetros de fluxo atuais utilizam um fluido líquido para conduzir a célula até a região de medição e baseiam-se no princípio da focalização hidrodinâmica utilizada por Crosland-Taylor em 1953 para contar partículas suspensas em líquido, como consta em vários relatos (HERSHBERGER *et al.*, 1979; ZARRIN e DOVICH, 1985; FU *et al.*, 1999). Ele concebeu este método que possibilita o enfileiramento de células suspensas em uma solução dentro de condutos com diâmetro capaz de alojar até uma dezena dessas células. Elas são levadas por um conduto até a câmara de focalização hidrodinâmica, onde são conduzidas até um capilar por um líquido chamado de líquido de revestimento. A redução do diâmetro do conduto e o fluxo do líquido de revestimento faziam com que cada célula da amostra fosse exposta à região de medição do equipamento individualmente, pois os volumes dos líquidos da amostra e de revestimento são reduzidos com a mesma proporção, mas não se misturam desde que o fluxo laminar seja mantido.

Na época do descobrimento da focalização hidrodinâmica já era possível o enfileiramento de células com a utilização de capilares da ordem de $10 \mu m$ de diâmetro, mas as partículas maiores que isto causavam entupimento, tornando inviável a sua utilização para a citometria de fluxo. A focalização hidrodinâmica permite a movimentação da célula pelo núcleo central de um capilar, com calibre da ordem de $250 \mu m$, que é significativamente maior que o diâmetro das células estudadas. Dessa forma o problema de entupimento não mais ocorre.

As melhorias em citometria de fluxo modificaram pouco os equipamentos convencionais. Foi introduzida a capacidade de classificar sub-populações celulares segundo parâmetros especificados, qualidade esta atribuída aos equipamentos chamados *sorters* apresentado por Kreth e Herzenberg (1974). Além disso, mais parâmetros simultâneos puderam ser medidos com o acréscimo de outros PMTs a um mesmo citômetro de fluxo. As máquinas atuais podem medir simultaneamente até 9 flu-

orescências e dois parâmetros de espalhamento para cada célula (*CyAnTM ADP Flow Cytometry Analyzer*, da *DakoCytomation, Inc*; *BD FACSAriaTM Flow Cytometer*, da *Becton, Dickinson and Company* ou *COULTER[®] EPICS[®] XLTM*, da *Beckman Coulter, Inc.*). A empresa *Compucyte* fabrica um citômetro de fluxo (*iColorTM Fluoro-Chromatic Imaging Cytometer*) capaz de fornecer, além dos parâmetros comuns de espalhamento e fluorescência, imagens, permitindo uma análise detalhada da morfologia das células. Um avanço importante, representando uma tendência, apresenta uma solução de citometria de fluxo totalmente contida em um *chip* (BLANKENSTEIN, 1998; FU *et al.*, 1999).

A citometria de fluxo foi introduzida no Brasil no fim de 1988 com a aquisição de um equipamento da *Coulter Electronics, Inc.*, o *EPICS[®] 751*, ocasião que fazia deste o primeiro citômetro de fluxo da América Latina, e que foi fruto do esforço de Sérgio Gomes Coutinho, pesquisador da Fiocruz. O equipamento foi instalado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC) sob os cuidados do pesquisador Álvaro Luiz Bertho dos Santos que foi devidamente capacitado no exterior para a operar a máquina. Em meados de 1989 o equipamento começou a ser utilizado para pesquisas científicas, não só pelo IOC mas, diante da política de difusão da tecnologia, por diversas instituições de pesquisa no país como UFRJ, INCA, Instituto Butantan, UFRGS, USP, INCOR-SP, UERJ, UFF, entre outras. A demanda crescente pela utilização do equipamento pelo Hospital Evandro Chagas mostrou a importância de uma nova aquisição em 1994 quando foi instalado um outro citômetro de fluxo no Laboratório de AIDS do departamento de Imunologia do IOC. Dois anos depois essa estrutura já não era suficiente para atender às necessidades da comunidade científica nacional e por isso foi adquirido mais um citômetro de fluxo, o *FACScanTM* da *Becton, Dickinson and Company*, que ficou sob a responsabilidade de Tânia de Araújo Jorge. Anos depois de experiência difundida pelo país, várias instituições já possuem um citômetro de fluxo em suas instalações. Desde então, diversos projetos importantes têm sido desenvolvidos, como por exemplo os apresentados em (BERTHO *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1994; DA-CRUZ *et al.*, 1994).

II.1 Visão geral de um citômetro de fluxo

O detalhamento a seguir apresenta o funcionamento de cada sistema que compõe um citômetro de fluxo (Figura II.1).

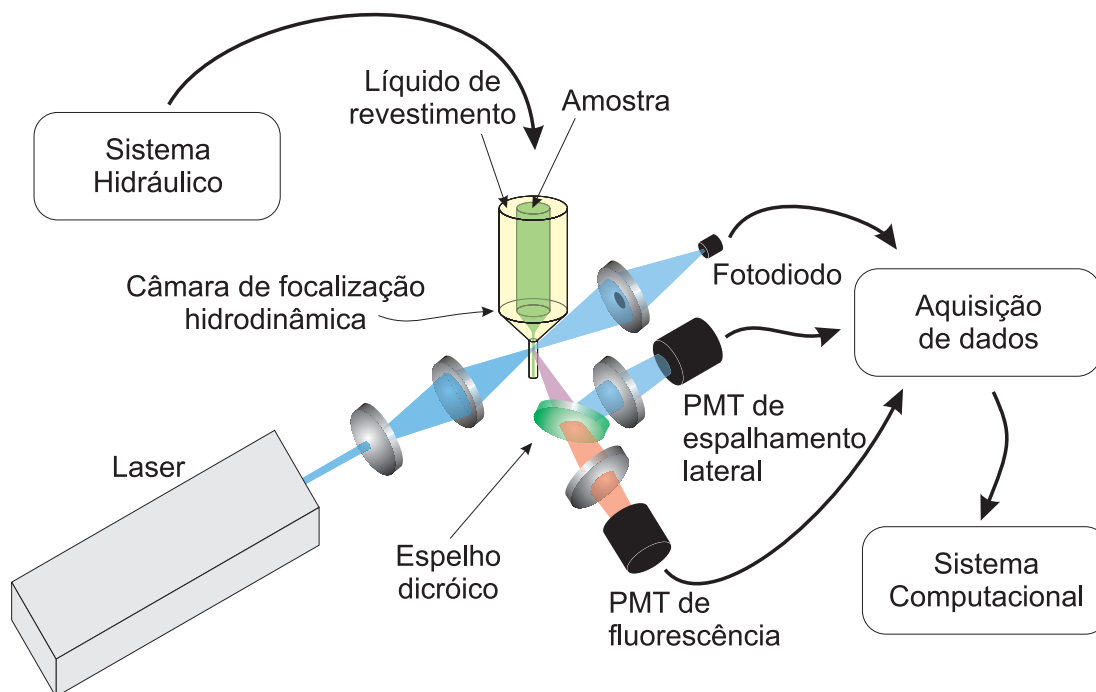


Figura II.1: Diagrama esquemático de um citômetro de fluxo.

II.1.1 Câmara de focalização hidrodinâmica

A câmara de focalização hidrodinâmica desempenha uma função de suma importância no funcionamento dos citômetros de fluxo. Para ter a habilidade de analisar as células da amostra individualmente, cada uma precisa ser caracterizada de forma independente e exclusiva, ou seja, deve ser submetida à excitação em um momento em que nenhuma outra partícula esteja sendo excitada para que os parâmetros gerados sejam relativos somente a ela. E para proceder dessa forma, é preciso enfileirar as partículas suspensas em líquido de alguma maneira. Uma alternativa seria confeccionar um capilar com um diâmetro que só permitisse a passagem de uma célula. Isso de fato impediria que duas partículas atravessassem uma seção transversal simultaneamente, mas o preço dessa conquista era o freqüente entupimento do capilar,

pois nem todo o material tem o mesmo tamanho. Isso inviabilizaria a sua utilização para a análise rápida de uma população grande.

Para evitar o entupimento do capilar e conseguir enfileirar as partículas, o seu diâmetro interno precisa ser bem maior que o tamanho médio das partículas estudadas, mas ainda assim deve ser levado em consideração o fato de que duas partículas não devem atravessar a mesma seção transversal simultaneamente. Para solucionar este problema, uma idéia inovadora foi proposta para enfileirar as partículas em um capilar com o diâmetro interno suficientemente grande para evitar entupimentos. Sabendo que as linhas de fluxo de um fluido dentro de um conduto forçado se mantêm equidistantes quando a seção transversal desse conduto é reduzida, desde que não haja turbulência, Crosland-Taylor desenvolveu o que hoje é conhecido como célula de fluxo ou câmara de focalização hidrodinâmica (CFH). Este aparato é formado por dois condutos concêntricos. O de menor diâmetro é responsável por conduzir a amostra até o interior da câmara. O maior, que conduz o fluido de revestimento, apresenta um redução diametral até atingir um tamanho algumas vezes maior do que o das partículas a serem estudadas. Ao final desta peça encontra-se o capilar que conduzirá as partículas enfileiradas para serem excitadas individualmente pela fonte luminosa. A figura II.2 apresenta a ilustração de uma câmara de focalização hidrodinâmica.

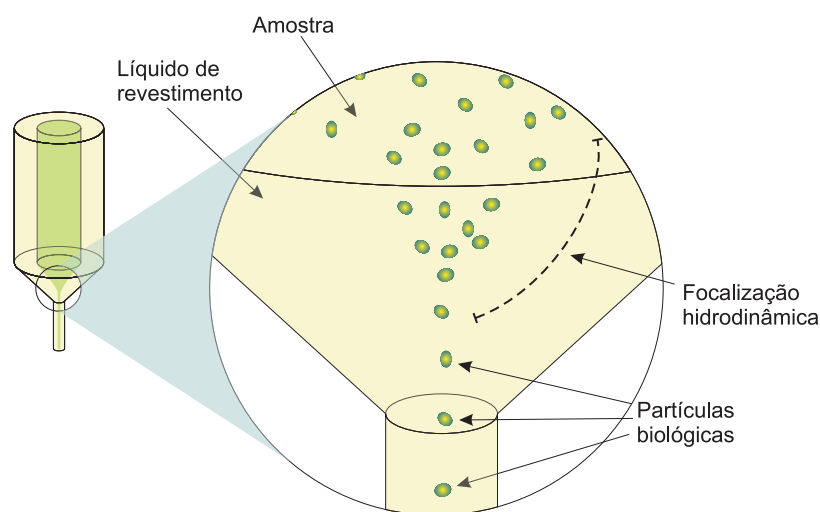


Figura II.2: Câmara de focalização hidrodinâmica, apresentando os condutos que carregam o líquido de revestimento (exterior) e a amostra (interior).

Para a realização da caracterização celular, a amostra preparada é inicialmente colocada em um recipiente apropriado. Um fino tubo introduzido neste recipiente irá conduzir a amostra até a CFH. O fluido de revestimento é armazenado dentro de um outro reservatório maior. A injeção dos líquidos pode ser feita de duas formas. A primeira utiliza a pressurização do vaso para expulsar o líquido e conduzi-lo até o ponto de interesse. Esta técnica normalmente é utilizada para injetar o fluido de revestimento, mas também pode ser empregada para introduzir a amostra, embora exista maior dificuldade na medição do volume injetado dessa forma. A outra maneira de injeção da amostra é por meio de uma seringa com o êmbolo motorizado (VAN DILLA *et al.*, 1985). Assim, a movimentação do motor está diretamente relacionada com o volume injetado.

II.1.2 Sistema ótico

Fonte de iluminação

São comumente utilizados *lasers* ou lâmpadas de descarga em gás para a iluminação da amostra, sendo relatada a aplicações de LEDs em citômetros de fluxo (SHAPIRO, 2003, p. 127). A opção por uma das fontes de radiação luminosa passa por uma decisão que envolve preço, espectro monocromático ou de banda larga e estabilidade.

Os *lasers* no estado sólido ou gasosos apresentam forte radiação monocromática, coerente e colimada, mas são caros, consomem muita energia, tem baixa eficiência e normalmente precisam de alta tensão e refrigeração a ar ou até mesmo a água. Por serem fontes de radiação coerente e apresentarem baixa divergência do feixe, os *lasers* são adequados para a iluminação de regiões da ordem de grandeza das células. O *laser* de íon argônio é o mais utilizado em citometria de fluxo. Além deste, os *lasers* de criptônio e hélio-neônio freqüentemente compõem os citômetros de fluxo.

As lâmpadas de descarga em gás são fontes de radiação incoerentes, abrangendo

uma larga faixa do espectro, sendo para esta aplicação, alimentadas por corrente contínua. Não necessitam de resfriamento forçado e são mais baratas quando comparadas com os *lasers*. As lâmpadas utilizadas em citometria de fluxo são de mercúrio ou xenônio, pois apresentam alta radiação em uma pequena fonte de emissão (VAN DILLA *et al.*, 1985, p. 35).

A fonte de luz deve ser escolhida de forma que haja a liberação de radiação suficiente para que os detectores sejam sensibilizados adequadamente.

Para que seja verificada a fluorescência de um fluorocromo ligado à célula, é necessário excitá-lo no comprimento de onda apropriado. Quando o fluorocromo está excitado, sua energia está aumentada em relação ao seu estado fundamental e deverá ser liberada para que o mesmo retorne ao seu estado energético de repouso. A liberação da energia quase que instantânea pelo fluorocromo se dá através da emissão de fótons com comprimentos de onda maiores do que os que excitaram a substância, fenômeno este conhecido como fluorescência. A detecção dessa fluorescência é feita por um tubo fotomultiplicador (PMT) que capta estes fótons e os converte em corrente elétrica. Como a fluorescência se dá em um determinado comprimento de onda, é necessário que a luz que atinge o PMT seja filtrada, ou seja, que os comprimentos de onda maiores ou menores que o emitido pelo fluorocromo sejam eliminados. Isso garante que a resposta do PMT se deva somente à fluorescência da partícula iluminada, reduzindo a interferência de radiações de comprimentos de onda diferentes.

Filtros ópticos e divisores de feixe e espelhos dicróicos

Os filtros ópticos são componentes que tem a função de atenuar a radiação em determinados comprimentos de onda, enquanto permitem a passagem de outros com mínima alteração. Dois princípios podem ser utilizados em filtros ópticos: interferência ou absorção.

Os filtros ópticos podem ser divididos em cinco classes básicas:

Passa-faixa (*band-pass*): Transmite em uma faixa limitada do espectro de frequên-

cia e tem baixa transmissão fora dessa faixa.

Rejeita-faixa (*block-band*): Ao contrário do passa-faixa, tem baixa transmissão em uma faixa limitada de frequência e transmite fora desta faixa de rejeição.

Short-pass: Permite a passagem de ondas de menor comprimento, ou seja com frequência (e energia) maior, enquanto atenua as de maior comprimento.

Long-pass: Tem função semelhante ao short-pass, mas transmitindo radiações de comprimento maior (frequência e energia menores).

Densidade neutra: Transmite uma parte da radiação e absorve a outra, sendo tal comportamento igualmente realizado para todo o espectro visível.

Outro componente óptico bastante utilizado nos citômetros são os divisores de feixe, que diferente dos filtros de densidade neutra, refletem parte da radiação, ao invés de absorver, e transmitem o restante, independente do comprimento de onda. Existem também divisores de feixe especiais, chamados espelhos dicróicos, que tem a propriedade de refletir a luz em um determinado comprimento de onda e transmitir no resto do espectro. Esses componentes são muito importantes na citometria de fluxo multiparamétrica, pois é necessário que fluorescências diferentes sejam detectadas por PMTs diferentes. Assim, um determinado espelho dicróico possibilita a reflexão de um comprimento de onda e deixa o restante passar para os outros canais de detecção. O próximo espelho reflete outra faixa e transmite o restante e assim por diante. A figura II.1 apresenta um espelho dicróico utilizado para separar os diferentes comprimentos de onda para diferentes sensores, no caso o espalhamento direto e o espalhamento lateral.

Luz e energia

A observação da luz, ou a rigor, energia radiante, pode ser feita de duas maneiras. Primeiramente pode ser entendida como tendo o comportamento de ondas, que possuem velocidade, frequência e comprimento de onda, que se relacionam do modo apresentado pela equação II.1.

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (\text{II.1})$$

onde:

$\lambda \rightarrow$ comprimento de onda (m);

$c \rightarrow$ velocidade de propagação no meio (m/s);

$\nu \rightarrow$ frequência da radiação eletromagnética (Hz).

Entretanto, há uma dualidade na compreensão da luz, que em determinadas circunstâncias fica claro que a radiação consiste em uma série de pacotes de energia discretos, que são denominados fótons. Mesmo assim, as grandezas velocidade de propagação (aproximadamente $2,998 \cdot 10^8 m/s$ no vácuo), frequência e comprimento de onda são mantidas no estudo dos fótons. O cálculo da energia de um fóton é dada pela equação II.2:

$$E = h\nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (\text{II.2})$$

onde:

$E \rightarrow$ Energia (J);

$h \rightarrow$ Constante universal de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34} J \cdot s$);

$\nu \rightarrow$ frequência da radiação eletromagnética (Hz);

$c \rightarrow$ velocidade de propagação no meio (m/s);

$\lambda \rightarrow$ Comprimento de onda em nm ;

A equação II.2 evidencia que um fóton de menor comprimento de onda (maior frequência) possui mais energia que outro de maior comprimento de onda (menor frequência). Vale ressaltar que comumente o termo intensidade é utilizado inadequadamente para indicar a energia liberada por unidade de tempo, quando de fato o termo é potência.

O espectro eletromagnético é dividido em regiões espectrais para conveniência dos estudos de suas aplicações (figura II.3).

A radiação eletromagnética está relacionada com a alteração da velocidade de



Figura II.3: Regiões do espectro eletromagnético.

partículas eletricamente carregadas (EWING, 1914, p. 7). A desaceleração de um elétron, por exemplo, irá reduzir a energia de um átomo. Essa energia não é perdida, ela pode ser liberada na forma de um fóton. O processo inverso ocorre quando um fóton atinge um átomo aumentando sua energia, fazendo o elétron acelerar.

Na figura II.4 as linhas horizontais representam os níveis energéticos possíveis que compõem um átomo, que de acordo com a teoria da mecânica quântica são níveis discretos (SHAPIRO, 2003, p. 109). A linha mais baixa representa o nível energético basal de um átomo. Nem todas as transições energéticas são possíveis, mas apenas as apresentadas pelas linhas verticais. Quanto maior a distância entre os níveis energéticos, maior será a energia necessária para atingir a nova condição, ou seja, menor será o comprimento de onda do fóton envolvido no processo.

Quando o átomo não está excitado, os elétrons ocupam todos níveis necessários para comportá-los, começando pelo mais baixo até o mais alto, sem deixar nenhum deles incompleto.

Quando um átomo é excitado pode ocorrer que o elétron mais afastado do núcleo receba energia suficiente para deixar o seu nível atual e saltar para um nível mais externo. Nessa condição, o átomo apresenta forte tendência de retorno ao nível normal e quando o elétron retorna ao seu nível anterior, liberando a mesma energia que foi utilizada para o salto, ocorre o fenômeno chamado de radiação de ressonância (EWING, 1914, p. 11). Se um elétron das camadas mais internas for arrancado do átomo, outro das camadas mais externas irá tomar o seu lugar. Essa transição libera grande quantidade de energia, resultando na emissão de raios-X. Essa energia, suficiente para desprender elétrons de um átomo, pode ser fornecida

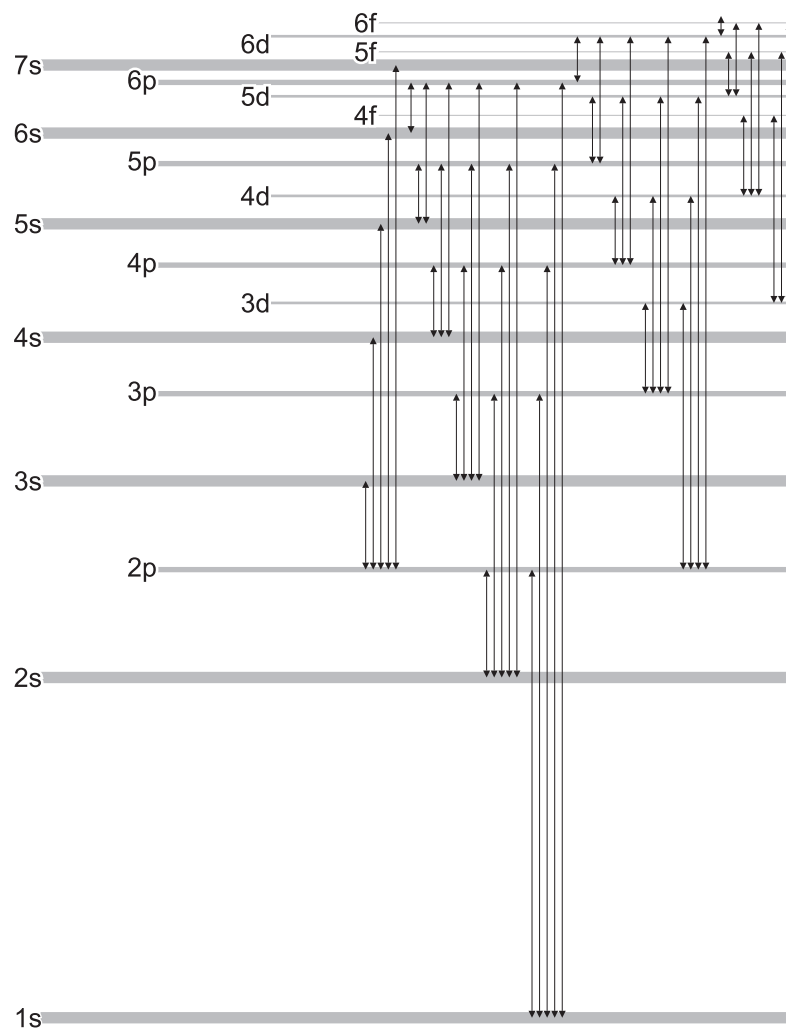


Figura II.4: Esquema dos níveis de energia do átomo. Extraído de Ewing (1914, p. 8).

pelo bombardeamento do átomo por elétrons externos em alta velocidade.

As moléculas podem apresentar duas séries de níveis energéticos, conforma a figura II.5. A série singlete apresenta o estado S_0 , que é o estado não excitado de uma molécula. Podem haver ainda os estados excitados S_1, S_2, \dots, S_n . Além desta, a série triplete, T_1, T_2, \dots, T_n , possui níveis correspondentes à primeira, mas com energia diferente, sendo o spin eletrônico que diferencia uma série da outra.

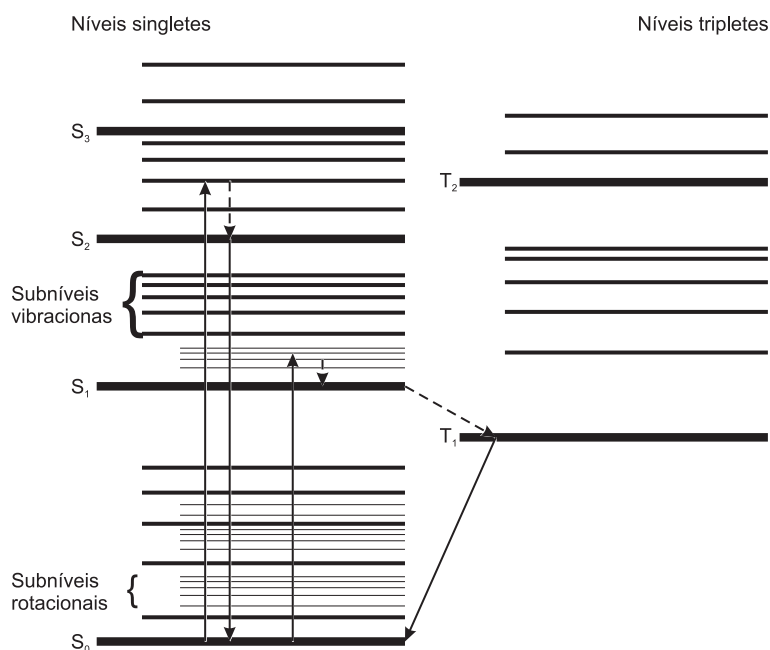


Figura II.5: Esquema dos níveis energéticos moleculares, singlete e triplete. Extraído de Ewing (1914, p. 10).

Quando uma molécula absorve energia radiante, ela passa do estado normal S_0 para um subnível S mais elevado. Como a mudança do spin do elétron é difícil, os estados tripletes só são alcançados indiretamente, ou seja, é preciso que a molécula passa de um estado S excitado para um subnível triplete inferior. O retorno de um estado triplete ao nível normal S_0 também é difícil. Os níveis eletrônicos S e T são divididos em subníveis vibracionais, que por sua vez possuem subníveis rotacionais. A tabela II.1 apresenta a relação para a transição entre níveis e subníveis e o comprimento de onda da radiação necessária para isso.

Tabela II.1: Transições entre níveis e subníveis energéticos provocadas por radiações de diferentes comprimentos de onda. Adaptada de Ewing (1914, p. 7).

Região do espectro	Níveis de transição
Ultravioleta e visível	Eletrônicos
Infravermelho próximo e médio	Vibracionais
Infravermelho afastado e microondas	Rotacionais

O conceito de que a luz é um conjunto de pacotes discretos de energia geralmente é necessário em um tratamento rigoroso da interação da radiação com a matéria. O modelo de onda pode ser usado quando é envolvido um grande número de fótons, resultando em boa aproximação. Shapiro (SHAPIRO, 2003, p. 5) afirma que estudos envolvendo espalhamento da luz por objetos que tem tamanho próximo do comprimento de onda do fóton incidente, necessitam usar a teoria eletrodinâmica quântica, pois a óptica geométrica ou a teoria de ondas não fornecem subsídios suficientes para tal. Os fenômenos de refração ou reflexão podem ser facilmente entendidos quando a energia radiante é estudada como onda. No entanto, em todos os casos pode-se utilizar o conceito de fóton, mesmo quando são numerosos, mas a complexidade dos cálculos podem não compensar o rigor matemático alcançado para situações simples.

Fluorescência

Algumas substâncias podem ser caracterizadas pela absorção seletiva da luz. Pela lei da conservação da energia, se uma molécula excitada voltar ao seu estado energético normal, a mesma quantidade de energia obtida deve ser liberada. Quando um fóton atinge a molécula, que por sua vez eleva o seu nível de energia para um subnível vibracional de um nível eletrônico, essa energia pode ser liberada de uma vez, com a emissão de um outro fóton de mesmo comprimento de onda, que seria a mencionada radiação ressonante ou fluorescência ressonante. Se parte da energia for degradada com o decaimento dos subníveis vibracional e/ou rotacional para o nível eletrônico singlete seguinte e posteriormente o restante da energia for liberada por um fóton, levando a molécula de volta ao estado fundamental, ocorrerá o fenômeno

conhecido como fluorescência, fenômeno passível da caracterização de substâncias. Nesse caso, a radiação emitida tem menos energia e conseqüentemente comprimento de onda maior. Essa diferença entre os comprimentos de onda incidente e emitido é conhecida como desvio de Stokes (SHAPIRO, 2003, p. 112).

Fosforescência

A fosforescência é um outro fenômeno de liberação de energia em excesso em que os estados tripletes estão envolvidos. Algumas moléculas passam de um estado singlete para o estado triplete correspondente por meio de uma transição sem emissão de radiação. Posteriormente, o saldo energético é liberado. Mas como é pequena a probabilidade de uma molécula excitada em um nível triplete retornar ao nível singlete fundamental, a fosforescência pode ser percebida mesmo quando retirada a fonte de excitação após um tempo mensurável, enquanto que a fluorescência ocorre em uma diminuta fração de tempo, não apresentando persistência mensurável.

Fluorocromos

Enquanto o espalhamento da luz revela aspectos físicos da célula, isto é, tamanho ou granularidade ou rugosidade, a fluorescência caracteriza a célula quimicamente. Os marcadores fluorescentes, que são denominados fluorocromos, são substâncias utilizadas na preparação das amostras, emitindo fótons quando excitadas pela energia da fonte luminosa. Algumas moléculas orgânicas podem ser utilizadas como fluorocromos, sendo normalmente aquelas que possuem estruturas grandes, rígidas e multicíclicas (EWING, 1914, p. 89).

Os fluorocromos podem se ligar a estruturas celulares para possibilitar a identificação da presença de um determinado componente celular, ou podem mudar suas características de acordo com o meio onde estão inseridos.

Fotodetectores

A medição da luz é feita normalmente por dispositivos eletrônicos. Sendo assim, o princípio do seu funcionamento está baseado em corrente eletrônica e tensão elétrica. Mas os parâmetros obtidos da caracterização da célula são luminosos, necessitando assim de transdutores para que estes possam ser convertidos em sinais elétricos. Os fotodetectores são os agentes de transdução de grandezas eletromagnéticas em grandezas elétricas utilizados nos citômetros de fluxo. Comumente são utilizados dois tipos: fotodiodo e PMT.

Alguns parâmetros importantes dos fotodetectores podem ser destacados:

Eficiência quântica: É um parâmetro que expressa o relacionamento entre o número de fótons que atingiram o fotocátodo e o número de elétrons liberados pelo mesmo para um dado comprimento de onda (equação II.3).

$$QE(\%) = \frac{n_e}{n_f} \cdot 100\% \quad (\text{II.3})$$

onde:

$QE(\%)$ → Eficiência quântica percentual. Também pode ser expressa por $\eta(\lambda)$;

n_e → Número de elétrons emitidos;

n_f → Número de fótons incidentes.

Sensibilidade radiante do cátodo: É definida com a corrente elétrica gerada por unidade de potência para um determinado comprimento de onda (equação II.4).

$$E(\lambda) = \frac{\lambda \cdot QE(\%)}{124} \quad (\text{II.4})$$

onde:

$E(\lambda)$ → Sensibilidade radiante expressa em $\mu A/W$;

$\lambda \rightarrow$ Comprimento de onda em nm ;

Tubo fotomultiplicador Os PMTs (figura II.6) são dispositivos extremamente sensíveis, utilizados na medição de luz desde infra-vermelho até ultra-violeta, provendo corrente elétrica em função da potência luminosa incidente. Possuem grande área sensível e alto ganho. Seu funcionamento baseia-se no efeito fotoelétrico em que elétrons são desprendidos de seus átomos em função da energia recebida dos fótons provenientes da fonte.

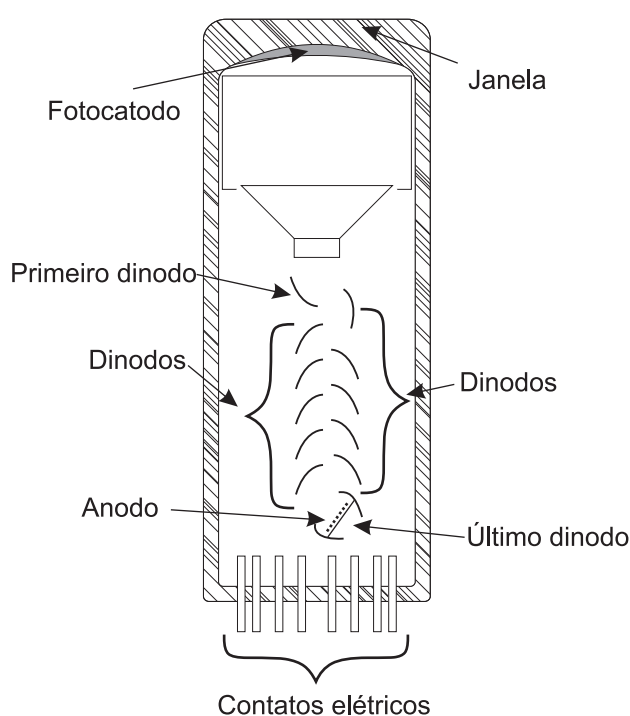


Figura II.6: Ilustração de um tubo fotomultiplicador.

Os fótons atingem a janela do PMT onde fica o fotocatodo que emite os elétrons. Estes são acelerados por um campo eletrostático até o primeiro dinodo, que por sua vez irá liberar outros elétrons em direção ao segundo dinodo e assim por diante, multiplicando o número de elétrons emitidos a cada etapa até atingir o anodo. A cada dinodo o número de elétrons desprendidos aumenta significativamente, fazendo com que o dispositivo tenha ganhos da ordem de 10^6 . Quanto maior o número de dinodos e maior a tensão aplicada, maior o ganho.

O campo eletrostático que acelera os elétrons é gerado por uma fonte de alta

tensão capaz de fornecer valores em torno de 1 a 2,5 kV em corrente contínua. A tensão da fonte também influencia no valor da linearidade e do ganho, por isso é desejável que a fonte tenha boa estabilidade. Além disso, o aumento da tensão da fonte reflete no aumento do ruído, logo deve ser escolhido um ponto onde a razão sinal/ruído seja satisfatória, não excedendo a tensão máxima permitida entre o fotocatodo e o anodo.

A alimentação dos dinodos provem de um divisor de tensão (figura II.7) que provoca campos eletrostáticos sucessivos entre eles. O arranjo mais simples consiste em uma ligação de resistores ôhmicos em série.

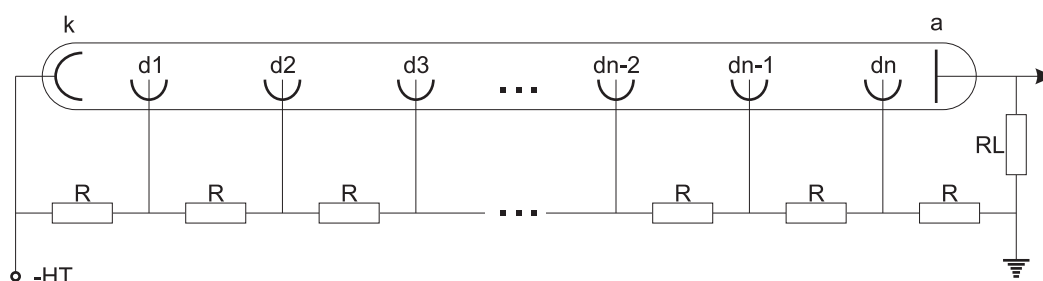


Figura II.7: Divisor de tensão para um tubo fotomultiplicador. Cada R é uma resistência ôhmica, RL é a resistência de carga, $d1$ a dn são os dinodos, a é o anodo, k é o fotocatodo e $-HT$ é a alta tensão negativa em relação à referência.

A escolha da tensão de referência normalmente é feita como apresentado na figura. O fotocatodo tem alta tensão negativa em relação ao terra e o anodo tem baixo potencial. Isso permite que a eletrônica de medição seja diretamente acoplada ao anodo do PMT sem a necessidade de conversão. Outros arranjos com diodos zener no lugar de alguns dos resistores podem ser utilizados para manter a linearidade. E capacitores podem ser ligados em paralelo aos divisores dos últimos dinodos para fornecer carga suficiente para pulsos estreitos.

Fotodiodo É um dispositivo fotossensível no estado sólido. Feito de material semicondutor, o fotodiodo também apresenta o efeito fotoelétrico, liberando elétrons dos átomos em função de radiação incidente. O fotodiodo não necessita de fonte de alimentação para operar, gerando diferença de potencial apenas com a energia

radiante incidente. Todavia, a temperatura exerce muita influência sobre o fotodiodo durante sua operação. Geralmente utilizado em aplicações onde a potência radiante é alta, não necessitando de razão sinal/ruído elevada, comparado com o PMT. Na citometria de fluxo usa-se o fotodiodo para medir o espalhamento direto de luz, mas um fotodiodo especial (de avalanche) já foi utilizado para quantificar o espalhamento lateral (DOORNBOS *et al.*, 1993). Tem a característica de possuir uma pequena área sensível, mas uma larga faixa de resposta espectral. Opera em baixos níveis de tensão, é estável, barato e possui alta eficiência quântica. Apesar disso, apresenta alta corrente no escuro e não possui ganho, necessitando assim de eletrônica para amplificação e processamento dos sinais. Fototransistores e fotodiodos de avalanche também podem ser utilizados, mas devem ter dimensão e resposta em frequência comparadas às do fotodiodo sem comprometer a qualidade do sinal obtido. O fotodiodo pode ser polarizado com a finalidade de reduzir a capacitância da junção, resultando em uma resposta em frequência ampliada no espectro, com a manutenção da linearidade. Essa é a situação onde o dispositivo funciona no modo fotocondutivo. Nesse caso, nem a eficiência quântica nem a sensibilidade radiante são alteradas, apenas o tempo de resposta. Normalmente os fotodiodos são utilizados no modo fotovoltaico, ou seja, sem alimentação. A capacitância de um fotodiodo está relacionada com o seu tamanho. Quanto maior sua área, maior a capacitância e menor o tempo de resposta. Fotodiodos com área com 1 mm^2 ou menores apresentam tempo de resposta satisfatório para aplicações citofluorimétricas (SHAPIRO, 2003, p. 160).

II.1.3 Condicionadores de sinais e sistema de aquisição

Os fotodetectores efetuam a conversão de uma grandeza eletromagnética, a luz, em grandeza elétrica. O sinal observado na saída dos transdutores é a corrente elétrica, uma vez que os PMTs e fotodiodos são fontes de corrente, próximas do ideal, com alta impedância de saída. Este sinal deve ser coletado por um sistema de aquisição que permita a análise posterior dos dados. Isso é feito com auxílio de circuitos

eletrônicos específicos e sistemas computacionais, que permitem o armazenamento e processamento dos dados.

Amplificação

O primeiro tratamento após a saída do transdutor consiste na pré-amplificação do sinal gerado pelos fotodetectores, comumente feito por um amplificador de transimpedância, que é um conversor corrente-tensão. Para possibilitar o acompanhamento adequado dos pulsos luminosos incidentes nos fotodetectores, é razoável a utilização de uma largura de banda de 0,5 MHz ($0,7 \mu s$ de tempo de subida de 10 a 90%) (VAN DILLA *et al.*, 1985, p. 136).

O sinal gerado pelos fotodetectores está imerso em ruído de fundo, ou seja, existem determinados instantes em que a saída do sensor não representa o fenômeno investigado. Para a redução desse ruído, são utilizados filtros passa-faixa, com a finalidade de limitar a banda de frequência analisada pelo equipamento. O controle da linha de base é outro aspecto importante no tratamento do sinal. Uma das maneiras de se manter a linha de base próxima do zero é com controle de malha de realimentação ativa, utilizada em citômetros muito sensíveis a ajuste do *offset* dos amplificadores ou fotocorrentes de iluminação de fundo.

A amplificação do sinal pode ser linear ou logarítmica, de acordo com o parâmetro a ser observado. Dentre os lineares, amplificadores nucleares comerciais, isto é os amplificadores utilizados na área de física nuclear, podem ser utilizados. Apresentam larga faixa de controle de ganho e de constantes de tempo de filtragem, bem como a restauração de linha de base. Porém, estes são equipamentos caros. A alternativa seria a utilização de amplificadores operacionais de alta velocidade. Hoje já é possível encontrar amplificadores operacionais rápidos e de largura de banda da ordem de 100 MHz e tempo de subida em torno de $3,5 ns$. Para aplicações com citômetros de menor velocidade, amplificadores de baixo custo com menor largura de banda podem ser utilizados.

Uma outra forma de controlar o ganho de saída do amplificador é alterando a

tensão de alimentação do tubo fotomultiplicador. Esta alteração pode ser feita tanto pelo operador quanto por um computador.

A amplificação logarítmica é desejável em determinadas ocasiões em que as características que se deseja observar está contida em uma grande faixa de valores. Dessa forma é possível comprimir um conjunto de valores distantes sem a necessidade da utilização de equipamentos de registro de alta resolução. A transformação logarítmica após a digitalização dos dados prejudica a quantidade de valores registrados para as décadas menores. Sendo assim, é preferível a amplificação logarítmica do sinal analógico proveniente do pré-amplificador. No entanto, novas aplicações com conversores AD de alta resolução e velocidade podem compensar a utilização de amplificação linear e transformação logarítmica pelo computador, pois permitem a compensação e tratamento de sinais por *softwares* sofisticados.

É importante destacar que o ruído, de um tubo fotomultiplicador por exemplo, quando amplificado logaritmicamente, aparenta ser maior que na amplificação linear. Se um sinal está contido em uma escala de 0,1 a 100 e o ruído pode atingir valores inferiores a 1, então, numa escala linear, isso representaria 1% do total da escala. No caso de uma representação logarítmica de 3 décadas (0,1-1; 1-10; 10-100), o ruído ocuparia 1 década inteira, ou seja 33% da escala total. Isso provoca a falsa impressão de que o amplificador logarítmico aumentou o ruído. O que acontece é que ele enfatiza os pequenos sinais, o que é desejável em alguns casos, mas também o fará com o ruído.

Pulse Height Analyzer

O sinal elétrico obtido pelos fotodetectores, após a devida amplificação e filtragem, é direcionado para equipamentos chamados *Pulse Height Analyzers* (PHA), ou analisadores de altura de pulso, que também podem ser conhecidos como *Multi Channel Analyzers* (MCA) ou ainda *Multi Channel Buffers* (MCB). Estes equipamentos reúnem detectores de pico, conversores AD, memória digital e o controle associado para possibilitar a medição da altura do pulso.

Cada célula que atravessa o feixe *laser* resulta em um pulso elétrico procedente de cada fotodetector, que revela as características da célula que se deseja medir. Este pulso é estreito, ou seja, tem duração de microssegundos, podendo atingir nanossegundos, dependendo da velocidade de deslocamentos das células e do diâmetro da região focal da iluminação.

A primeira etapa da aquisição consiste em estabelecer a altura do pulso. Isto é feito por circuitos próprios para esta finalidade, onde um capacitor, utilizado como memória analógica, é carregado rapidamente e atinge o valor de tensão correspondente ao valor máximo do pulso. Este valor é mantido até que o processo de digitalização do sinal tenha sido concluído. A figura II.8 mostra um circuito simples para a detecção de pico.

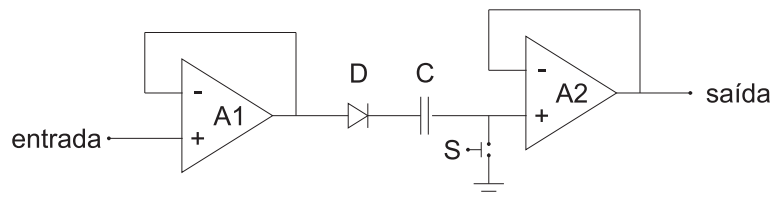


Figura II.8: Diagrama esquemático de um circuito detector de pico.

O primeiro amplificador operacional (AmpOp) funciona como *buffer*. O sinal da entrada não inversora é duplicado na sua saída. Com o capacitor descarregado e com o sinal crescente na entrada do primeiro AmpOp, o diodo irá conduzir, fazendo com que o capacitor comece a se carregar. Quando o pulso atinge o seu valor máximo e começa a decrescer, o diodo deixa de conduzir e o capacitor se mantém carregado, apresentando o valor da tensão máxima atingida pelo pulso e permitindo a conversão AD (analógica-digital) do sinal. Após a conversão, um sinal aplicado a uma chave descarrega o capacitor para possibilitar uma nova operação. Na prática, o capacitor tem valor pequeno e não mantém a carga por muito tempo, somente o suficiente para viabilizar a conversão. Por isso, é importante dimensionar bem a capacitância: não deve ser muito pequena para que a carga se mantenha pelo tempo exigido pelo conversor AD; não deve ser muito grande pois assim o tempo de subida irá aumentar, prejudicando o desempenho do equipamento.

Existem basicamente dois métodos de conversão analógica digital para os sinais dos citômetros de fluxo: Aproximações sucessivas e o método de Wilkinson. Existe um terceiro método, conhecido por *Flash ADC*, que vem sendo utilizado em equipamentos mais recentes (SHAPIRO, 2003, p. 209).

Um conversor AD Wilkinson recebe um sinal que carrega um capacitor que em seguida é descarregado de forma linear. Isso faz com que o tempo de descarga do capacitor seja proporcional à amplitude do sinal de entrada. Sendo assim, este método de conversão conta o tempo de descarga do capacitor para digitalização da informação analógica. A base de tempo é gerada por um oscilador estável e de alta frequência. O número de oscilações que ocorrerem durante a descarga do capacitor serão contadas e essa quantidade representará o nível de tensão na entrada do conversor. O método de aproximações sucessivas faz sistematicamente comparações da tensão de entrada com valores de tensão pré-definidos. As referências correspondem à tensão máxima (V_{max}) capaz de ser convertida que é multiplicada por $2^{-1}, 2^{-2}, 2^{-3}, \dots, 2^{-n}$, onde n é o número de bits utilizados na conversão. Os conversores *flashADC* possuem um divisor de tensão e vários comparadores. Os estados dos comparadores irão definir o valor de tensão digitalizado. Este dispositivo pode fazer a conversão em intervalos tão curtos quanto 10 ns .

A conversão do sinal gera um número que por sua vez corresponde a um canal do PHA. Cada evento incrementará a contagem do canal que corresponde ao determinado nível de tensão. Ao final, a memória digital do PHA contém os dados estatísticos da amostra celular estudada.

II.1.4 Apresentação de dados

Os dados obtidos no estudo de citometria de fluxo podem ser apresentados ao operador de duas formas básicas: gráficos monoparamétricos (figura II.9) ou multiparamétricos (figura II.10). A apresentação dos dados monoparamétricos nada mais é do que a representação da contagem de eventos dos canais, ou seja, um histograma.

A representação multiparamétrica confronta mais de uma característica da célula

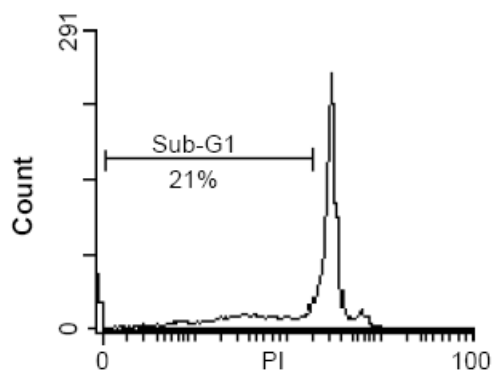


Figura II.9: Representação monoparamétrica dos dados obtidos por um citômetro de fluxo. A abscissa representa os canais do PHA e a ordenada a contagem de eventos. Extraído de Bertho *et al.* (2000b).

em um mesmo gráfico. Em um eixo do gráfico está representada a fluorescência e no outro o espalhamento direto, por exemplo. Cada ponto no gráfico representa uma célula, que possui uma fluorescência associada a seu respectivo espalhamento direto.

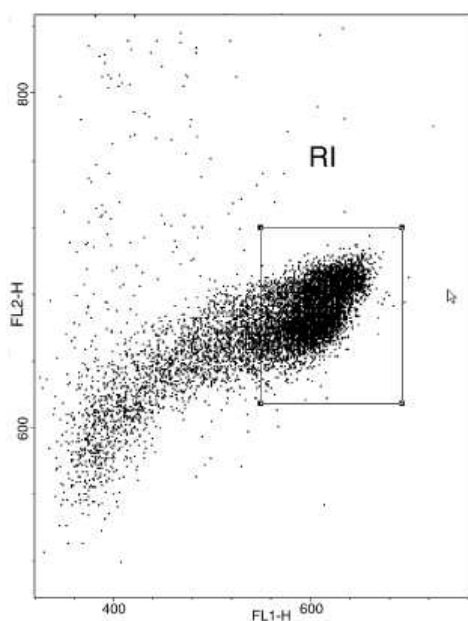


Figura II.10: Representação multiparamétrica dos dados obtidos por um citômetro de fluxo. Os dois eixos representam os canais dos PHAs. Cada ponto representa um evento. Extraído de Lu *et al.* (2006).

Quando uma população é muito concentrada em uma determinada região, fica difícil analisar visualmente os dados. Novos métodos de apresentação estão sendo utilizados para facilitar esta análise. Uma das maneiras é por meio da representação de curvas de níveis (figura II.11), que caracteriza a densidade de pontos no plano

do gráfico, método já utilizado em topografia para delimitar regiões com mesma altitude.

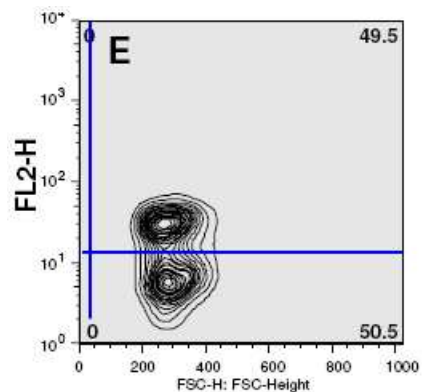


Figura II.11: Representação em curvas de níveis dos dados obtidos por um citômetro de fluxo. Extraído de Neves-Souza *et al.* (2005).

Capítulo III

Materiais e métodos

III.1 Concepção do projeto do citômetro de fluxo monoparamétrico

Um diagrama esquemático do protótipo e as partes principais envolvidas são apresentados na figura III.1. O PHA circundado pela linha pontilhada não foi instalado para este trabalho, apesar do sinal de espalhamento lateral estar disponível. Dessa forma, os experimentos realizados só apresentarão os resultados de um parâmetro: o espalhamento direto. Serão utilizadas amostras de calibração de tamanho, sem fluorescência, dos citômetros comerciais para validar o seu funcionamento.

III.2 Corpo do citômetro de fluxo

A primeira parte a ser construída do citômetro de fluxo proposto foi o seu corpo, parte que serve para a sustentação dos dispositivos ópticos e da câmara de focalização hidrodinâmica. Foram confeccionadas cinco peças em PVC, uma em *nylon* e outra em alumínio.

A parte principal do corpo foi dividida em duas peças, pois não foi viável usar uma peça única com o tamanho desejado. Essas duas peças foram torneadas a partir

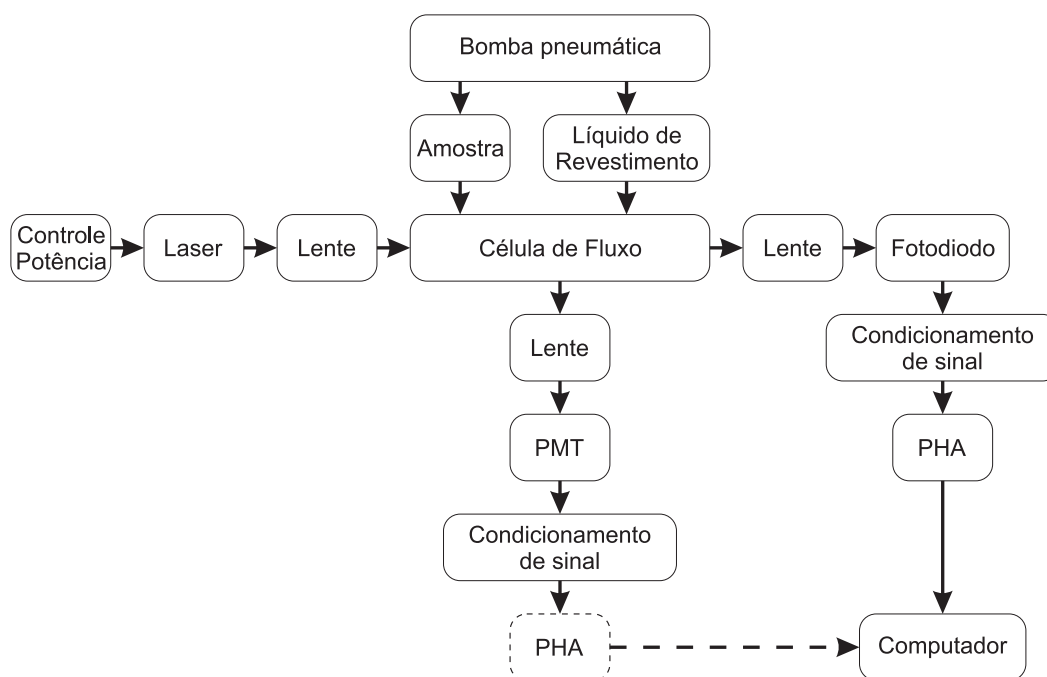


Figura III.1: Diagrama esquemático do citômetro de fluxo proposto.

de um tarugo maciço de PVC com 90 mm de diâmetro.

A primeira delas sustenta a estrutura de excitação *laser* (figura A.1). Observa-se um parafuso na parte inferior, utilizado na fixação do corpo do citômetro, e mais dois na parte superior. O parafuso menor, que está na extremidade da peça, serve para prender a peça 1 à peça 2 por meio de uma haste de alumínio, a fim de impedir que o corpo do citômetro sofra modificações na sua estrutura depois que for montado. O parafuso maior é utilizado para imobilizar a peça 3 e conseqüentemente a estrutura de excitação.

A peça 2 (figura A.2), que se encaixa na peça 1, sustenta as estruturas de detecção do sinal do espalhamento direto e do espalhamento lateral, suporta a câmara de focalização hidrodinâmica, possui um furo lateral utilizado na observação da amostra dentro do capilar com o auxílio de um microscópio e um furo na parte de baixo, ligado a uma mangueira, por onde segue o despejo do material já analisado. A peça possui um parafuso na parte inferior para a fixação do corpo do citômetro. Possui dois

parafusos na parte superior. O menor serve para prender as peças 1 e 2 por meio de uma haste de alumínio. O maior tem a função de imobilizar a peça 4 que é parte da estrutura de detecção do espalhamento direto. Existem ainda dois parafusos na face externa da peça 2. Um deles, que fica na parte superior, prende a câmara de fluxo e o outro, que fica no meio da peça, prende a estrutura de detecção de espalhamento lateral.

A peça 3 (figura A.3), que desliza dentro da peça 1 para focalizar o feixe de excitação no interior do capilar, suporta uma lente objetiva de microscópio e também a peça 6, no qual o *laser* é introduzido. Existe um furo na extremidade interna da peça que tem um parafuso sem cabeça inserido para possibilitar a fixação da lente objetiva, mas sem impedir a movimentação desta peça. Na extremidade externa há um parafuso para imobilizar a peça 6.

A peça 4, apresentada na figura A.4, se encaixa no furo lateral maior da peça 2. Suporta o PMT e uma lente objetiva de microscópio. Possui um furo na parte superior com um parafuso para impedir o deslizamento do PMT. Existe um furo na parte inferior com um parafuso, uma arruela de pressão e uma porca. Esse conjunto possibilita manter o parafuso firme, mesmo que ele não tenha sido introduzido até o final. A sua finalidade é nivelar o apoio da peça 2 com o apoio da peça 4 para impedir que haja deslocamento entre elas provocado por uma força exercida no acoplamento quando for introduzido o PMT. Existe um furo na parte lateral que possui um parafuso sem cabeça inserido nele que prende a lente objetiva, mas não impede a movimentação desta peça. Na face interna existe um furo com um parafuso, uma arruela de pressão e uma porca. Este tem a finalidade de limitar a inserção da peça 4 na peça 2 a fim de que a distância conveniente entre a lente objetiva e o centro do capilar não varie quando a peça for retirada e recolocada.

A peça 5 (figura A.5), utilizada para a sustentação da peça 7 e da lente de convergência do espalhamento, ambas se encaixam firmemente sem a necessidade de parafusos para prendê-las, está inserida na face externa da peça 2.

A peça 6 (figura A.6), confeccionada em *nylon*, é o apoio do módulo *laser*, que

fica encaixado firmemente na peça 3.

A peça 7 (figura A.7) é o apoio do fotodiodo. É confeccionada em alumínio e ligada eletricamente ao terra do circuito para reduzir a interferência eletromagnética à qual o sensor está submetido. O fotodiodo é colocado dentro da peça e fixado com cola de silicone.

III.3 Sistema ótico

Fazem parte do sistema ótico de um citômetro de fluxo as lentes, a fonte luminosa, os fotodetectores e os filtros. Neste projeto não foram utilizados filtros óticos, uma vez que a fluorescência não foi considerada, sendo registrados apenas o espalhamento direto.

III.3.1 Lentes

Para excitar as células é preciso que a luz emitida pela fonte seja direcionada e concentrada em uma pequena região do capilar. São usadas quatro lentes para esta finalidade. A figura III.2 apresenta um diagrama esquemático dos eixos óticos e das posições das lentes.

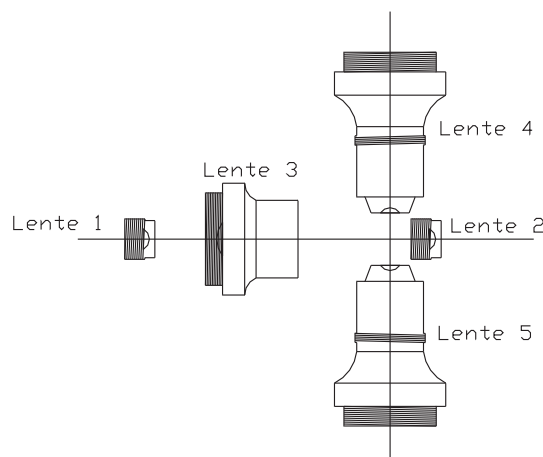


Figura III.2: Diagrama do arranjo das lentes.

As lentes 1 e 2 (figura III.3) são do mesmo tipo de lente usada em leitores de CD. Essas lentes demonstraram sua eficácia em citometria de fluxo no experimento

de Doornbos *et al.* (1993) em que foi possível diferenciar células sanguíneas. A lente 1 está dentro do módulo *laser* e é utilizada para colimar o feixe emitido pelo diodo *laser*. Fica afastada do diodo por uma mola e do outro lado está um apoio rosqueado que pode ser rotacionado para aproximar ou afastar a lente possibilitando o ajuste do foco. A lente 2 é usada para convergir a luz espalhada diretamente pelas partículas. Nela há um anteparo fixado, que é opaco e circular com 2 mm de diâmetro, para impedir que o feixe *laser* atinja diretamente o fotodiodo, o que levaria à saturação do sensor.



Figura III.3: Lente utilizada em leitores de CD.

As lentes 3, 4 e 5 são objetivas (figura III.4) usadas em microscópio binocular (Olympus KHC). Possuem fator de ampliação de imagem/abertura numérica iguais a $4\times/0,10$, $10\times/0,25$ e $40\times/0,65$, respectivamente. A lente 3 é usada para focalizar o feixe *laser* no centro do capilar, por onde passam as partículas. A lente 4 coleta a luz espalhada lateralmente para ser captada pelo PMT. A lente 5 é utilizada, junto com uma adaptação do canhão do microscópio, uma câmera CMOS com saída de vídeo composto, uma placa de captura de vídeo (EZMaker USB 2.0, AVerMedia Inc.) e um microcomputador rodando Windows XP com uma porta USB, para observar o comportamento das partículas dentro do capilar. Esse arranjo foi de suma importância para a comprovação do funcionamento da focalização hidrodinâmica, tratada mais adiante.



Figura III.4: Lentes objetivas utilizadas no sistema ótico.

III.3.2 Excitação

A escolha dos componentes da fonte de excitação luminosa levou em consideração o preço, o tamanho, a facilidade de implementação e controle.

O *laser*

Apesar dos citômetros modernos normalmente utilizarem *lasers* azuis de argônio, com comprimento de onda de 488 nm , e com potência de 15 mW , foi possível substituí-lo por um diodo *laser* vermelho e potência inferior sem prejuízos para o objetivo deste trabalho, como foi feito anteriormente (DOORNBOS *et al.*, 1993). Diante do custo, da praticidade e da facilidade de se contornarem seus problemas, o diodo *laser* Sanyo DL-3148-025 (figura III.5) com $5,6\text{ mm}$ de diâmetro e que fornece 5 mW de potência irradiada no comprimento de onda de 635 nm foi escolhido para ser utilizado neste projeto.

Este dispositivo possui, além do próprio diodo *laser*, um fotodiodo dentro do mesmo encapsulamento capaz de fornecer uma corrente reversa proporcional à potência luminosa emitida. Isso possibilita por um lado o controle da excitação e por outro lado a prevenção contra a queima. O diodo *laser* é um componente extremamente sensível à sobrecorrente e pode danificar-se mesmo quando o excesso se dá por alguns microssegundos e por isso a fonte de alimentação deve ser cuidadosamente projetada para garantir o seu bom funcionamento.

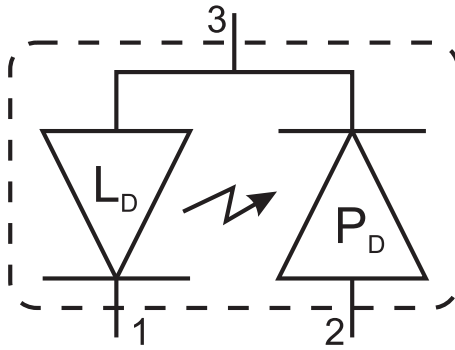


Figura III.5: Diagrama elétrico do *laser* Sanyo DL-3148-025. (D_L) diodo laser; (P_D) fotodiodo.

Circuito de controle e proteção do *laser*

Foi projetado um circuito com diversos meios de proteção para atender às necessidades requeridas pelo diodo *laser*, sendo capaz de manter constante a potência luminosa emitida. O diagrama elétrico é apresentado na figura III.6.

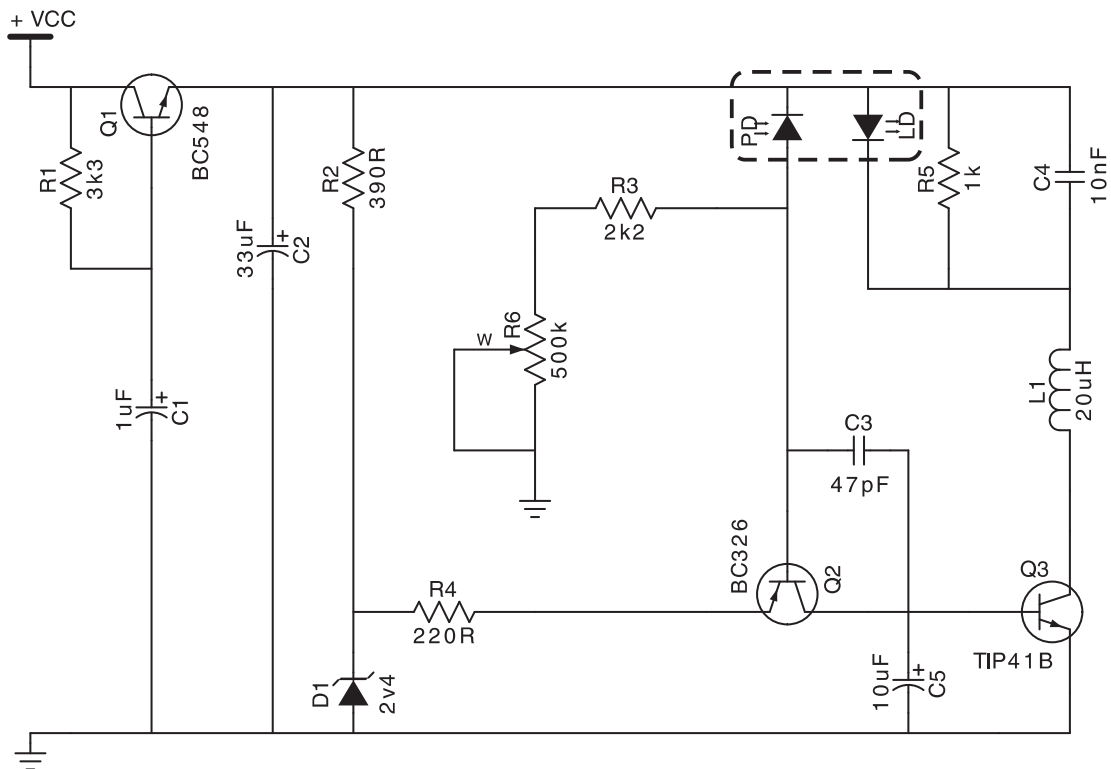


Figura III.6: Diagrama elétrico da fonte de alimentação do diodo *laser*.

O circuito é alimentado por uma fonte de tensão contínua de 5 V. A primeira parte do circuito, composta pelos componentes R_1 , C_1 e Q_1 , é a estrutura de uma chave *soft start*, pois é capaz de aumentar gradativamente a tensão de alimentação

do restante do circuito, evitando surtos de corrente. O capacitor $C2$ tem a função de filtrar qualquer variação rápida de tensão proveniente da fonte depois do acionamento. O capacitor $C4$ evita as variações rápidas de tensão sobre o diodo *laser*, enquanto o indutor $L1$ impede variações rápidas de corrente através dele.

A malha fechada de controle da potência emitida é basicamente formada pelos transistores $Q2$ e $Q3$, pelos resistores $R3$ e $R4$ e pelo potenciômetro $R6$. O diodo *laser* excita o fotodiodo pelo qual irá circular uma corrente em função da potência irradiada pelo dispositivo. Essa corrente atravessa o resistor $R3$ e o potenciômetro $R6$, gerando uma tensão que é aplicada na base do transistor PNP $Q2$. Este fornece corrente para a base do transistor $Q3$, que é responsável pela alimentação da corrente do diodo *laser*. A potência luminosa se mantém constante pois à medida que exista uma variação na emissão, ocorrerá uma compensação com base no sinal percebido pelo fotodiodo, obrigando o circuito a restabelecer o ponto de equilíbrio. Pode-se variar o ponto de equilíbrio da potência emitida por meio do ajuste do potenciômetro $R6$. O ajuste deve ser feito de forma que a corrente não ultrapasse 35 mA para não danificar o componente. Como o valor da corrente aumenta com a temperatura, para uma mesma potência, não é sensato estabelecer o nível de corrente próximo do limite quando o componente está frio.

III.4 Sistema de condução dos fluidos

Para caracterizar uma determinada amostra em um citômetro de fluxo, é preciso que esta seja levada até a região de medição. E não só a amostra, mas também o fluido de revestimento. Estes são injetados na CFH mantendo a relação entre as vazões constante e adequada para o fim que se deseja. Existem dois métodos possíveis para solucionar este problema.

O primeiro método consiste na injeção de fluido por meio de uma seringa com um êmbolo motorizado. Nesse sistema, o volume injetado é proporcional ao deslocamento do êmbolo e conseqüentemente proporcional à movimentação do eixo do motor. Com esse sistema é possível injetar pequenos volumes com grande precisão.

Este só é utilizado para o fluido da amostra.

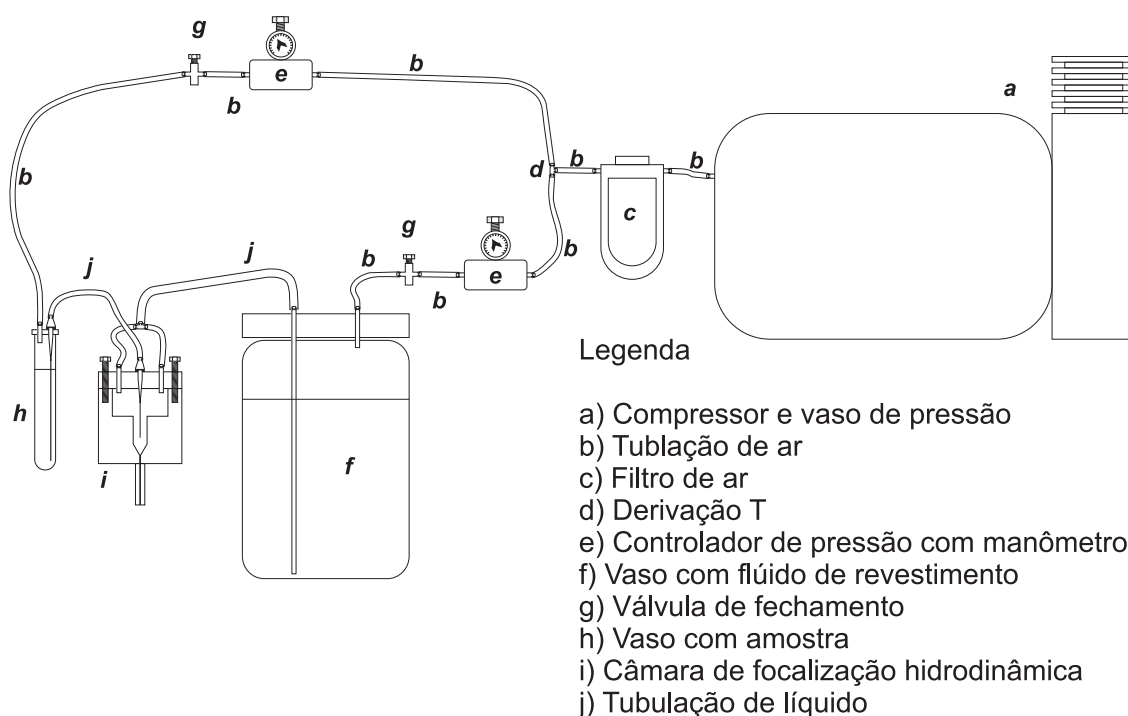


Figura III.7: Diagrama esquemático do sistema de condução de fluidos.

O segundo método, escolhido para ser implementado neste trabalho, movimenta os fluidos por meio de pressurização dos vasos, podendo ser usado tanto para o fluido de revestimento como para o da amostra, como mostra a figura III.7. Injeta-se ar pressurizado dentro do vaso hermeticamente fechado através de um tubo ligado à parte superior deste vaso. Um segundo tubo é colocado dentro do vaso de tal forma que sua extremidade fique imersa no fluido. Quando o vaso é pressurizado, o fluido será expulso através do segundo tubo, que por sua vez o conduzirá até o local desejado.

O compressor utilizado é do aparelho nebulizador *Inala Max Millennium* com potência de 1/40 HP e proteção térmica fabricado pela *NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda.* Ele provoca uma compressão do ar pulsátil, indesejável para a citometria de fluxo. O problema foi resolvido quando foi colocado, na linha da saída do compressor, um vaso de pressão que possui complacência suficiente para reduzir consideravelmente as oscilações a um nível aceitável. Apesar de funcionar adequadamente em regime, o torque do seu motor só é suficiente para acionamento sem carga,

ou seja, o compressor só funciona quando o vaso de pressão não está pressurizado, caso contrário é necessário esvaziar o vaso de pressão para poder ligar o compressor. Mesmo com este inconveniente, e considerando o custo e as opções disponíveis, o compressor mostrou-se suficientemente robusto nos estudos realizados, chegando a ficar ligado por várias horas sem apresentar defeito.

Todos os vasos pressurizados usados neste projeto são feitos de PET (polietileno tereftalato). O vaso de pressão e o vaso do fluido de revestimento foram adaptados de embalagens de refrigerante de 2 litros. Manteve-se a garrafa sem nenhuma alteração. As tampas foram furadas para a introdução da derivação T com uma derivação rosqueável e dois engates rápidos para mangueiras de 6 mm. A peça foi presa na tampa por uma porca que também vedou a região perfurada. O ar entra pela derivação transversal em relação às outras, conduzido por uma mangueira de 6 mm. Um pequeno pedaço de uma mangueira de 6 mm é engatado na última derivação. Por dentro do pequeno pedaço está uma mangueira de 4 mm que atravessa as duas extremidades opostas da peça sem impedir o fluxo proveniente da extremidade transversal. No vaso de pressão esta mangueira se alonga até aproximadamente a metade da garrafa, por onde também sai ar. E no vaso do fluido de revestimento ela tem o comprimento suficiente para atingir o fundo da garrafa e conduz o líquido utilizado como fluido de revestimento. O encaixe das duas mangueiras é de tal modo ajustado que a vedação obtida dispensa aplicação de cola. A figura III.8 ilustra esta montagem.

A tampa do vaso da amostra passa por um processo semelhante, mas a diferença está na mangueira que atravessa a derivação utilizada para conduzir a amostra, que é mais fina que no caso anterior, para que a velocidade do fluido dentro dela seja alta e diminua a quantidade de partículas que eventualmente poderiam aderir à parede interna do tubo.

O ar comprimido do sistema pneumático passa por um filtro de 5 μm (Norgren Mod. F07-100-M1TG). O controle da pressão aplicada aos vasos é feito por duas válvulas reguladoras de pressão mecânicas (Norgren Mod. R07-100-RGEG) que pos-

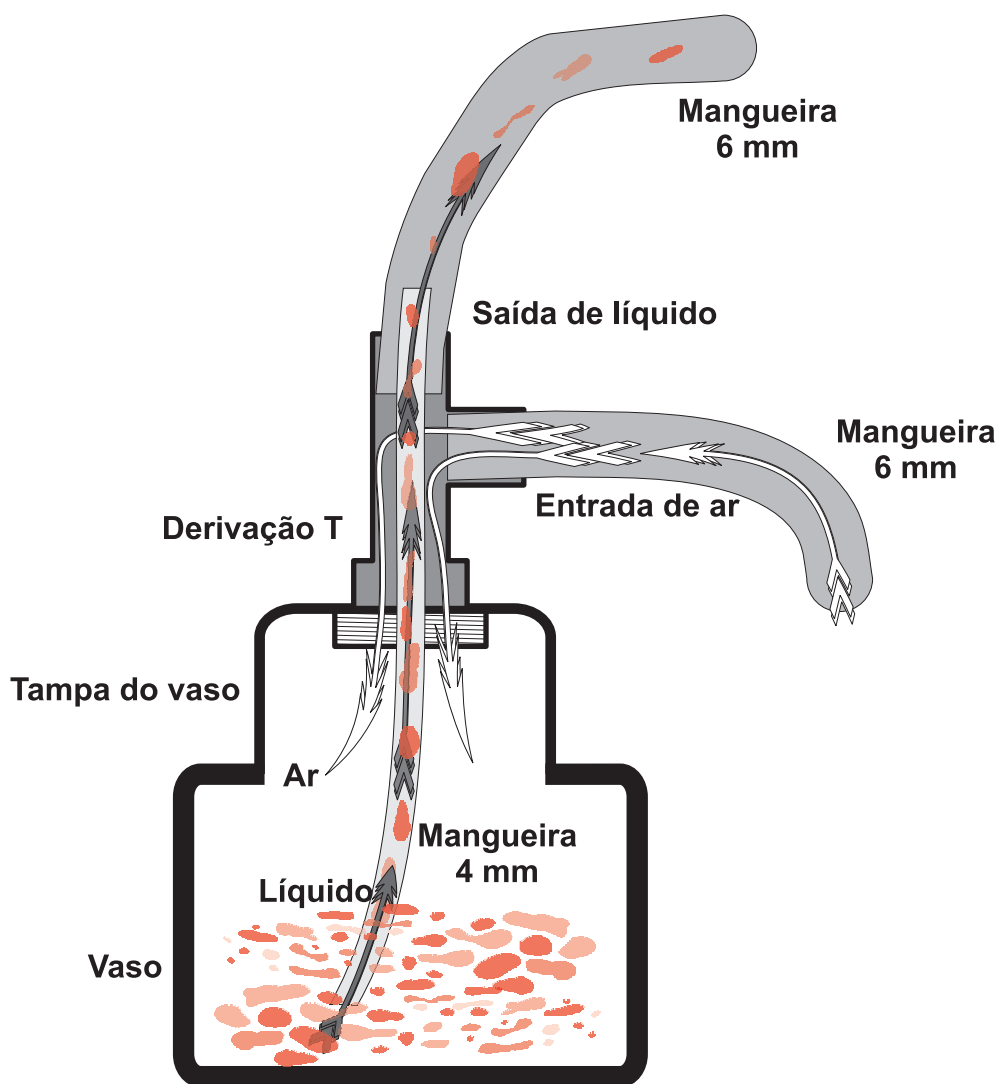


Figura III.8: Montagem da tampa do vaso de pressão e do vaso do fluido de revestimento.

suem manômetros acoplados com fundo de escala em 60 psi . Tanto o vaso do fluido de revestimento como o vaso da amostra são submetidos a uma pressão pouco maior do que 2 psi . Não foi possível precisar mais o valor, pois a resolução do manômetro utilizado não permitiu. O ajuste é feito manualmente com base na informação visual, através do microscópio, do comportamento da focalização hidrodinâmica dentro do capilar.

Quando a pressão aplicada ao vaso da amostra é muito maior do que a aplicada ao vaso do fluido de revestimento, observa-se uma luminosidade em todo o interior do capilar. Quando o inverso acontece, não se vê nenhuma luminosidade dentro do capilar. A partir desta segunda situação, estando as pressões por volta de 2 psi ,

aplica-se um pequeno incremento de pressão ao vaso da amostra e espera-se um tempo de aproximadamente um minuto para que o sistema possa se estabilizar. Quando nenhuma mudança é percebida, aplica-se um novo incremento até que possa ser vista uma pequena mancha luminosa, associada à célula suspensa na amostra, dentro do capilar. Nesse momento assume-se que a focalização hidrodinâmica está devidamente ajustada. Dessa forma as partículas estão passando no centro do capilar e gerando informação óptica adequada para ser analisada.

Em determinados momentos, como por exemplo quando a amostra está acabando, é necessário parar de pressurizar os vasos. Como é difícil encontrar o ponto ideal para conseguir a focalização hidrodinâmica, foram inseridos dois registros de fechamento do tipo de agulha após os reguladores de pressão para permitir que a pressão deixe de ser aplicada sem a necessidade de manipular os reguladores.

III.4.1 Câmara de focalização hidrodinâmica

Pinkel e Stovel qualificam a CFH como elemento crucial em um citômetro de fluxo quando afirmam: "*The heart of a flow system is the flow chamber*" (VAN DILLA *et al.*, 1985, p. 78). E entendendo a importância desta peça para o equipamento, optou-se por não adquirir uma CFH comercial, mas confeccioná-la, com o intuito de dominar esta tecnologia.

A construção da CFH envolve vários aspectos que devem ser levados em consideração. Primeiramente ela deve atender às exigências hidrodinâmicas, ou seja, deve ser cuidadosamente projetada para que seja garantido um fluxo laminar. Deve ainda possuir características ópticas favoráveis, devendo ser feita de um material que apresente alta transparência e, no caso de experimentos com fluorocromos, não emitir fluorescência quando atingida pelo feixe luminoso com o comprimento de onda da fonte de excitação utilizada. Precisa resistir aos níveis de pressão à qual será submetida e ter boa vedação. E também deve possuir características mecânicas compatíveis com as circunstâncias envolvidas na manipulação, no acoplamento dos tubos e em sua fixação no corpo do citômetro.

Escolheu-se trabalhar com acrílico transparente na confecção da CFH já que possibilita uma primeira avaliação visual do fenômeno de focalização hidrodinâmica. O capilar acoplado ao final da CFH, que é responsável por conduzir as células enfileiradas, é onde as partículas são excitadas pelo laser para a análise, é feito de vidro comum. Não há preocupação quanto à fluorescência do material do capilar pois o único parâmetro a ser analisado é o espalhamento direto de luz.

O desenho proposto da CFH deste projeto é apresentado na figura III.9. Para o projeto foi concebida uma peça que possui quatro partes distintas. A primeira delas foi denominada de *Galeria*, que possui a entrada do fluido de revestimento, saída para expulsão do ar contido na CFH e por onde o conduto que carrega o fluido da amostra atravessa. A abertura da galeria é tampada por uma peça apresentada mais adiante. A segunda parte, à qual foi dado o nome de *Região de Confluência*, é o local onde se encontram o fluido de revestimento e a amostra. E a terceira parte é o local onde de fato acontece a focalização hidrodinâmica, que foi chamada de *Região de Convergência*. E por fim, no fundo está a *Região de Condução* que guia as células enfileiradas até o capilar. Para melhorar a qualidade do dispositivo, ao invés de construir as partes separadas e depois uní-las, definiu-se que a peça seria construída inteira a partir de um único elemento, pois o aumento de junções e conexões poderiam provocar mais turbulência e prejudicar as características hidrodinâmicas essenciais para o seu bom funcionamento.

A peça foi confeccionada a partir de um cilindro sólido de acrílico transparente. Este cilindro foi torneado para reduzir o diâmetro até atingir 30 mm e depois polido até que se apresentasse novamente transparente. A galeria também foi moldada no torno com o diâmetro de 20 mm . As regiões de condução e convergência foram perfuradas por uma broca de 5 mm de diâmetro especialmente afiada para que a região de convergência possuísse o ângulo de 45° especificado no projeto. A região de condução foi perfurada por uma broca com $200\ \mu\text{m}$ de diâmetro, uma vez que os citômetros de fluxo convencionais possuem abertura final semelhante a essa.

Ao final da região de condução, foi acoplado o capilar de vidro (figura III.10),

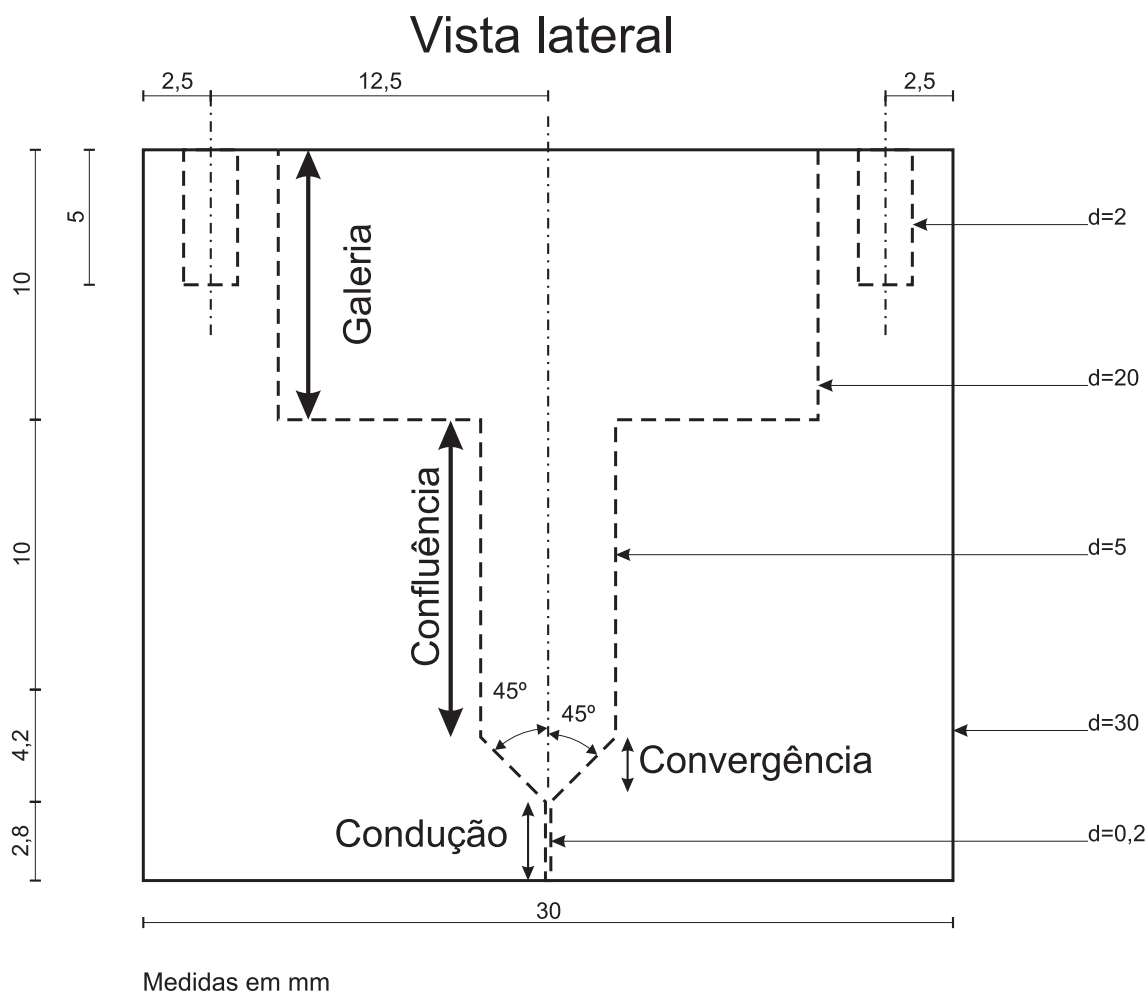


Figura III.9: Diagrama da câmara de focalização hidrodinâmica proposta.

que é peça mais frágil de todo o equipamento. Foram feitos vários capilares até que se conseguisse obter um com o diâmetro interno bem próximo do diâmetro da região de condução, ao ponto de se assumir que são iguais. Para unir o capilar à CFH, foi introduzida a broca de $200\ \mu\text{m}$ na região de condução de forma que parte dela ultrapassasse o furo na parte externa. A CFH foi posicionada sobre uma superfície plana e horizontal com a galeria para baixo e a região de condução para cima. O capilar de vidro foi cuidadosamente colocado por sobre a região de condução ficando os dois alinhados com a ajuda da broca. A fixação do capilar na CFH foi feita com cola de silicone branca. Esse material além de prender as duas peças, veda a junção para impedir possíveis vazamentos hidráulicos. Também possui uma flexibilidade desejável nos momentos de manipulação já que permite um leve desvio no ângulo entre a CFH e o capilar sem provocar o rompimento deste último. Essa característica

foi importante porque evitou que, em alguns momentos de descuido, o trabalho de várias semanas tivesse de ser repetido. Depois que a cola de silicone secou e curou, a broca foi cuidadosamente removida pelo lado da galeria com o auxílio de um alicate fino. À união destas duas peças se deu o nome de Estação de Focalização Hidrodinâmica (EFH).

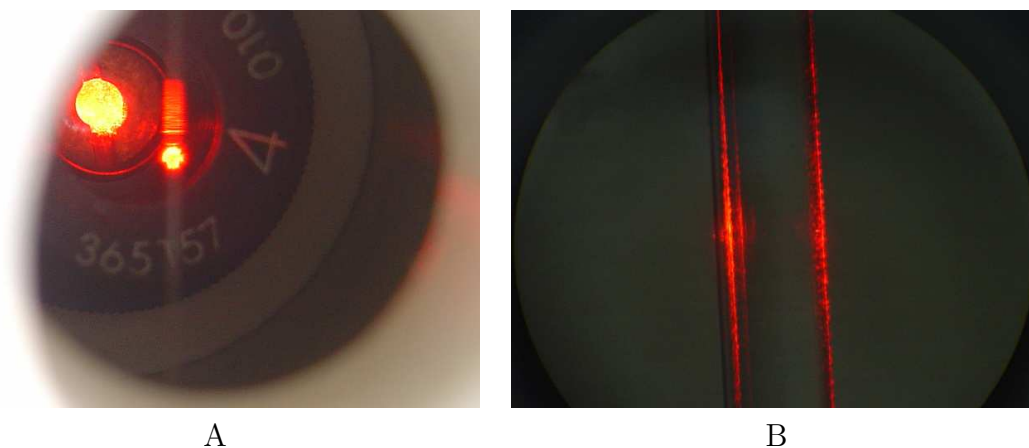


Figura III.10: Capilar dentro da peça 2 do corpo do citômetro (A); Detalhe do feixe *laser* espalhado pelo capilar sem líquido (B).

Depois de pronta, a EFH foi acoplada ao corpo do citômetro. A fixação foi feita com o auxílio de um parafuso que pressionou a CFH contra a peça 2 do corpo do citômetro. O capilar atravessou a peça e terminou no interior do seu furo inferior. Nesse furo há uma mangueira encaixada que leva o despejo das análises para o vaso de despejo. O encontro do capilar com essa mangueira foi preenchido com cola de silicone para impedir que o despejo derramasse dentro do corpo do citômetro.

O fenômeno da focalização hidrodinâmica deve ser avaliado visualmente com o auxílio de uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio. Deverá ser usado como amostra um material que possua alto espalhamento lateral visto que a lente, pela qual se observará o fenômeno, está na direção transversal ao feixe *laser*. É esperado que a região que espalha a luz lateralmente dentro do capilar possa ser controlada com a variação das pressões aplicadas aos vasos.

Condução dos fluidos

A galeria da CFH é fechada com uma tampa também confeccionada em acrílico transparente. Esta tampa (figura III.11) possui três furos. Um dos furos das extremidades é utilizado para o acoplamento do duto de fornecimento do fluido de revestimento, o outro é utilizado para a eventual evacuação de ar presente no seu interior. No furo central é encaixada uma agulha, utilizada em anestesia regional (Becton Dickinson - BD Spinal), com a vedação feita com cola de silicone. A agulha é serrada de modo a possuir o tamanho adequado para que a amostra seja injetada próxima ao final da região de confluência, início da região de convergência.

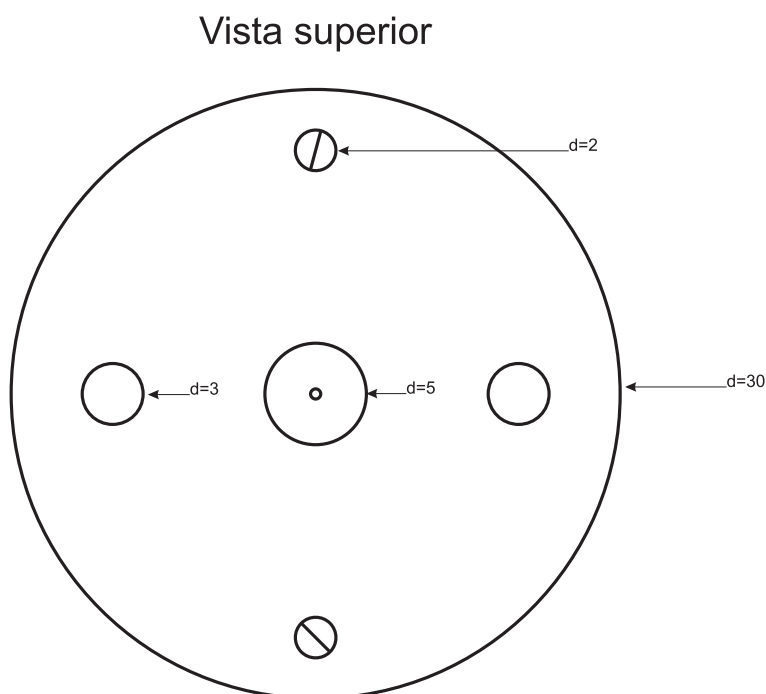


Figura III.11: Diagrama da tampa da câmara de focalização hidrodinâmica.

A agulha é conectada a uma mangueira transparente com conexão *luer-lok* utilizada em um equipo de soro (figura III.12). Uma outra mangueira mais fina (3 mm de diâmetro) é introduzida dentro dessa e a vedação é feita com o auxílio de uma abraçadeira de plástico. A mangueira preta segue até o fundo do vaso da amostra, de onde provem o material da amostra.

Dois pedaços da mangueira preta são encaixados nos furos das extremidades sendo a vedação feita por cola rápida (Adesivo instantâneo Loctite 406). Esses

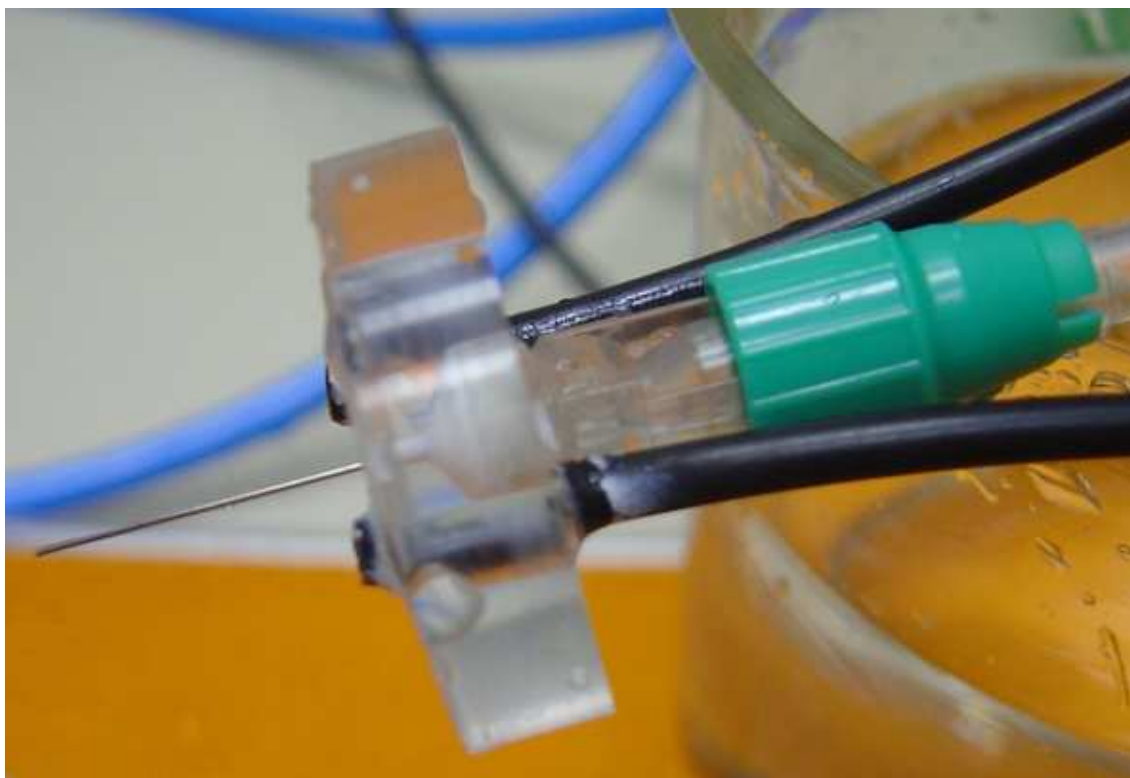


Figura III.12: Detalhe da conexão *luer-lok* com a agulha de injeção de amostra na tampa da câmara de focalização hidrodinâmica.

pedaços são introduzidos em outra mangueira transparente com a vedação feita pela mesma cola. Uma das mangueiras segue até o fundo do vaso do fluido de revestimento e a outra segue para uma válvula que controla a abertura do duto de evacuação, e que por fim é ligada ao vaso de despejo.

III.4.2 Avaliação da focalização hidrodinâmica

A amostra para os experimentos de avaliação foi preparada com 1 g do homopolímero de PVC para pastas NORVIC[®] P72HA, 1 g de detergente líquido e 98 g de água destilada e filtrada. O homopolímero utilizado é um material em pó que possui partículas micrométricas, sendo que apenas 1% dessas tem tamanho maior do que 63 μm . Como pode ser visto na figura III.13, o material possui uma grande variação de tamanho e formato extremamente irregular. Esta característica é interessante para observação através do microscópio, pois apresenta forte espalhamento lateral capaz de sensibilizar a câmera CMOS, utilizada na inspeção visual.

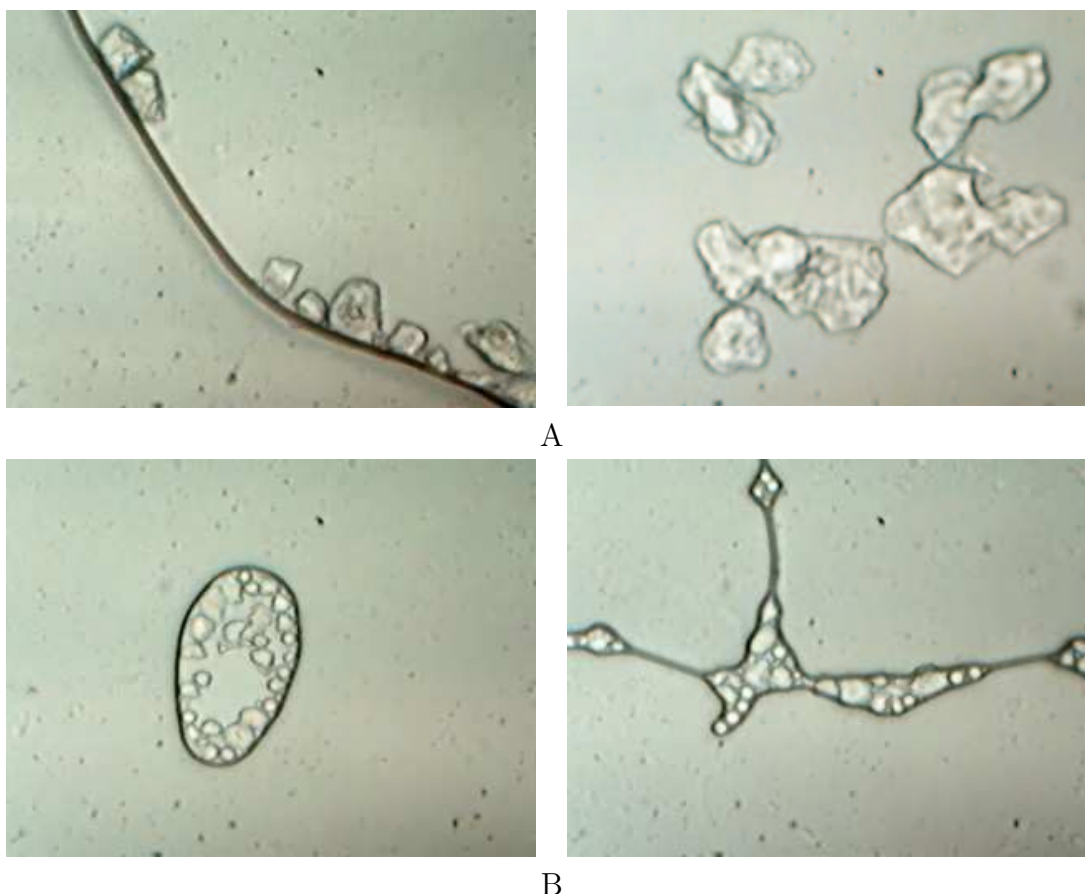


Figura III.13: Micrografias do homopolímero de PVC NORVIC[®] P72HA peneirado. Partículas maiores (A) e menores (B) que $38\ \mu\text{m}$.

III.5 Detecção de sinais

A informação luminosa gerada pelas partículas é quantificada por dois sensores, um para o espalhamento lateral e o outro para o espalhamento direto. O condicionamento do sinal é feito por um pré-amplificador seguido de um filtro passa-baixas e um amplificador. O sinal tratado é então enviado para a placa de aquisição de sinais. É importante ressaltar que, apesar de existirem os dois sensores e suas eletrônicas associadas, só existia uma placa de aquisição disponível durante a execução desse projeto. Por este motivo o trabalho apresenta a construção de um equipamento com a capacidade biparamétrica, mas que se pretende validar como um citômetro de fluxo monoparamétrico, sendo escolhido somente o espalhamento direto para a aquisição.

III.5.1 Espalhamento direto (*forward scatter*)

Para a detecção do espalhamento direto foi utilizado o fotodiodo Infineon SFH213 (figura III.14) com sensibilidade espectral máxima de $0,62 A/W$ em $870 nm$ e de $0,43 A/W$ em $635 nm$. Suas características o fazem capaz de detectar sinais viáveis no comprimento de onda emitido pelo *laser* usado no projeto.



Figura III.14: Fotodiodo para detecção do espalhamento direto.

Os experimentos mostraram que não seria necessário utilizar a polarização reversa do fotodiodo, ou seja no modo fotocondutivo, pois esta só diminui o efeito capacitivo do fotodiodo e não melhora a sua sensibilidade. O modo fotovoltaico, ou sem polarização, foi suficiente e satisfatório.

III.5.2 Espalhamento lateral (*side scatter*)

Como o espalhamento lateral de luz é bem menor que o direto, é preciso utilizar um dispositivo mais sensível. Ainda não se tem notícia de nenhum sensor mais sensível à luz do que o PMT e que apresente uma relação sinal/ruído tão elevada. Sendo assim, foi adquirido o PMT da Electron-tubes do tipo P25A-09, modelo 9113B para detectar esse sinal (figura III.15). Este PMT possui sensibilidade luminosa de $0,11 A/W$ com ganho máximo de $3,1 \cdot 10^6$ resultando em uma sensibilidade máxima do anodo de $341500 A/W$. Possui a máxima eficiência quântica em $350 nm$ de 21%,

reduzida para 6% quando utilizado na faixa do espectro de interesse, em 635 nm . No entanto, a corrente de anodo máxima permitida é de apenas $100\ \mu\text{A}$.

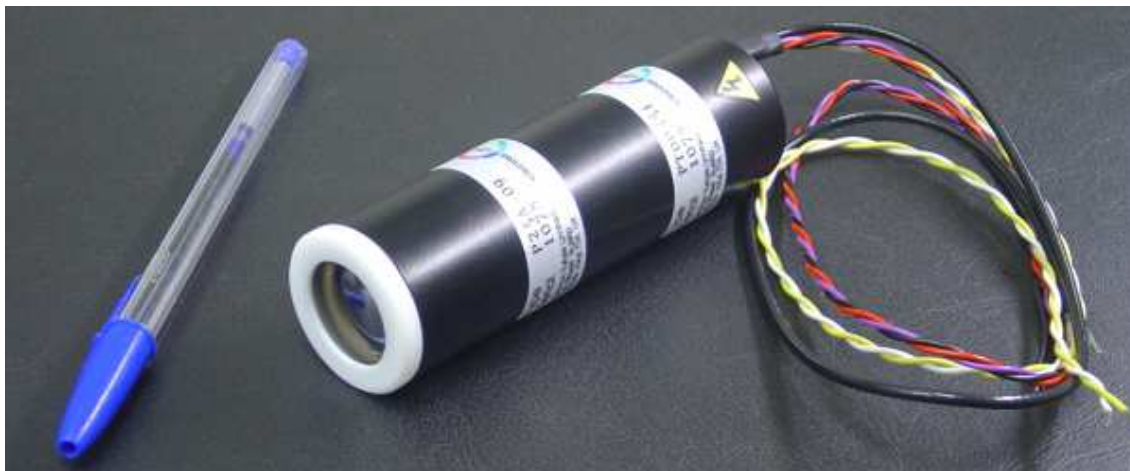


Figura III.15: Tubo fotomultiplicador da Electron-tubes do tipo P25A-09, modelo 9113B .

Um fator importante a ser destacado é quanto à sua funcionalidade. Este tipo de PMT já possui elevador e divisor de tensão embutidos. A alta tensão, e conseqüentemente o ganho do PMT, podem ser controlados por um sinal de baixa tensão ou simplesmente pelo ajuste do potenciômetro interno. Para o seu funcionamento, basta alimentá-lo com tensões de -5V , 0V e $+5\text{V}$ e o conversor DC/DC interno eleva a tensão.

III.5.3 Condicionamento de sinais

O sinal elétrico fornecido pelos sensores carrega a informação para a caracterização da partícula. Os dois sensores também apresentam saída semelhante, possuem alta impedância de saída e podem ser considerados como fontes de corrente próximas do ideal.

Os circuitos apresentados a seguir foram construídos sobre placas de circuito impresso. O condicionador do sinal do fotodiodo foi montado sobre uma placa de fibra de vidro, enquanto que o condicionador do sinal do tubo fotomultiplicador foi montado sobre uma placa de fenolite.

Condicionador do sinal do fotodiodo

O primeiro estágio do condicionamento do sinal do fotodiodo é um pré-amplificador de carga, utilizando o amplificador operacional CA3140 com entrada FET (figura III.16). Dado o valor do capacitor de realimentação utilizado (valor nominal de $2,2\text{ pF}$), a sensibilidade prevista é de $0,45\text{ V/pC}$.

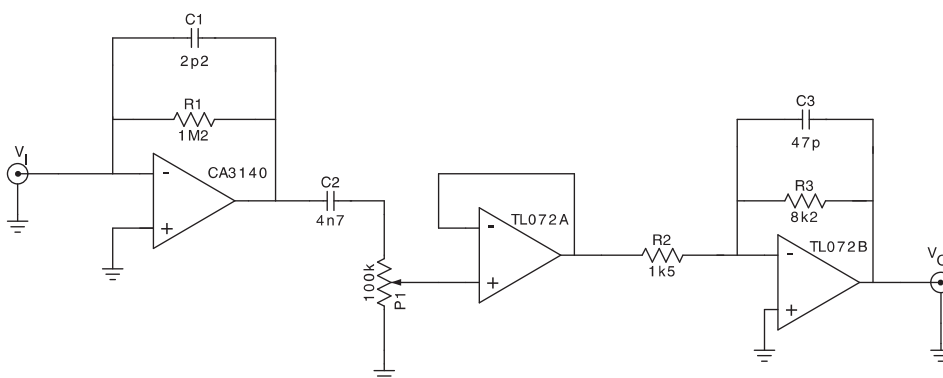


Figura III.16: Circuito de condicionamento do sinal do fotodiodo.

O tensão de saída do pré-amplificador pode não ser suficiente para sensibilizar a placa de aquisição. Além disso, o ruído envolvido e a linha de base não nula são aspectos indesejáveis no momento da aquisição do sinal. Para reduzir o efeito dessas influências, existe um segundo estágio do condicionamento que filtra e amplifica o sinal proveniente do pré-amplificador.

Para levar a linha de base ao nível zero foi utilizado um filtro passa-altas, uma vez que este atenua as componentes de frequência mais baixas, inclusive o nível DC. E para reduzir a influência da interferência eletromagnética de rede elétrica, a frequência de corte foi projetada para ser superior a 60 Hz . Tal frequência de corte é estabelecida pelo capacitor $C2$ e pelo resistor $P1$, sendo fixada em $338,6\text{ Hz}$.

O sinal filtrado alimenta uma carga resistiva, da qual é extraída uma parcela deste sinal (variando de 0 a 1) para o estágio de amplificação linear.

A saída do filtro é ligada a um dos dois amplificadores operacionais do CI TL072CN, identificado por TL072A, funcionando como seguidor de tensão. O seguidor de tensão isola a saída do filtro passa-altas passivo do circuito de amplificação do ponto de vista do carregamento, mas sem alterar o sinal.

A saída do TL072A é ligada a um amplificador linear com ganho estabelecido pela relação $R3/R2$, ou seja, 5,5 na banda passante.

Tal amplificador, que utiliza o CI TL072B, possui uma frequência de corte superior determinada pelo capacitor $C3$ e pelo resistor $R3$, sendo projetada para $412,9 kHz$. Existem ainda capacitores ligando a fonte de alimentação ao terra junto dos CIs, que não estão apresentados na figura III.16.

Os circuitos são alimentados pela fonte de alimentação *Power Supply MPC-3003D* da *Minipa* com tensões de +15 e -15 em relação ao terra.

Uma construção semelhante já foi feita, mas com restauração de linha de base automática (SHAPIRO, 1988, p. 197), o que aproveita uma maior excursão da amplitude do sinal do pré-amplificador.

Condicionador do sinal do tubo fotomultiplicador

O condicionador do sinal de saída do PMT é mostrado na figura III.17. O sinal entra em um amplificador de transresistência, também utilizando o amplificador operacional CA3140, com sensibilidade de $0,1 V/\mu A$ (dada pelo inverso da resistência $R1$).

Segue por um filtro passa-altas passivo com frequência de corte em $16 Hz$, definida pelo resistor $R2$ e pelo capacitor $C1$, para anular o nível DC. Entra em um seguidor de tensão (1/4 do CI TL074CN) que é ligado a um potenciômetro de $10 k\Omega$ linear ligado ao terra. A sua saída é ligada a um amplificador não inversor com ganho 5,5, dado pela relação $1 + R4/R3$, e em seguida um filtro ativo passa-baixas com frequência de corte em $284 kHz$, definida pelo resistor $R6$ e capacitor $C2$, e ganho 10 na banda passante, calculado pela relação $R6/R5$.

III.5.4 Caracterização dos circuitos condicionadores de sinal

De modo a verificar o adequado funcionamento dos circuitos condicionadores de sinais em relação às expectativas de projeto, foram feitos os levantamentos das respostas de frequência dos condicionadores de sinais do fotodiodo e do PMT.

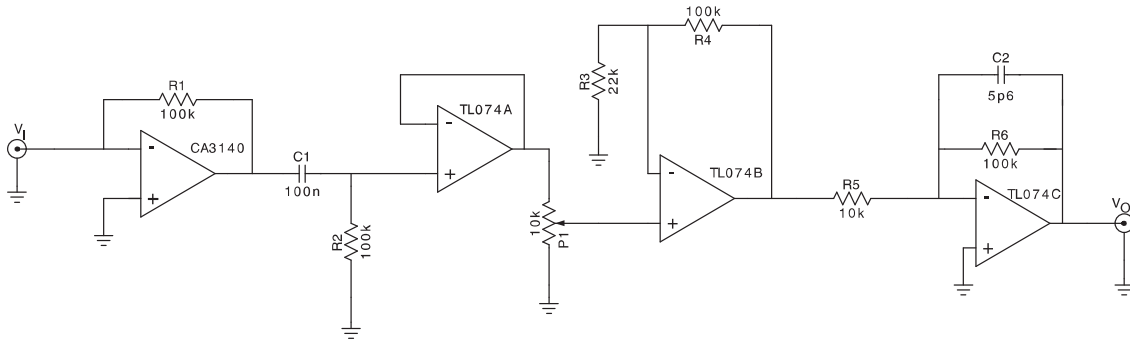


Figura III.17: Circuito de condicionamento do sinal do PMT.

As expectativas teóricas necessitam inicialmente ser corrigidas devido às discrepâncias entre os valores nominais e reais dos principais componentes. Deste modo, faz-se necessário a caracterização dos mesmos. Sendo assim os valores reais do capacitor de realimentação (C_1) do pré-amplificador de carga, assim como o capacitor que foi utilizado para simulação de impulso de carga (C_T), foram medidos. Para isso foi utilizado o arranjo ilustrado na figura III.18, onde se destaca o *4193A Vector impedance meter* da *Hewlett Packard* que possui controle de frequência, podendo variar entre 400 kHz e 110 MHz e mostradores digitais de impedância, fase e frequência.

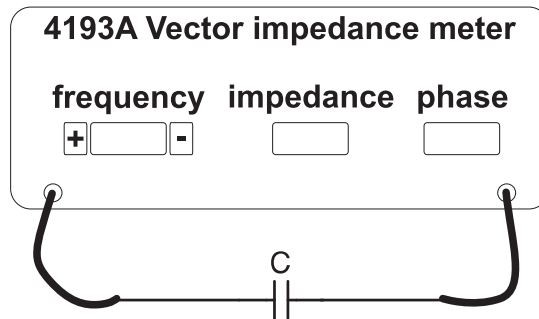


Figura III.18: Desenho do experimento para caracterização dos capacitores utilizados na avaliação do pré-amplificador de carga.

O capacitor de teste C_T (valor nominal de $4,7\text{ pF}$) e o capacitor de realimentação do pré-amplificador C_1 (valor nominal de $2,2\text{ pF}$) foram caracterizados por meio do cálculo de suas impedâncias em diversas frequências, quando submetidos à temperatura ambiente. Os valores referentes às capacitâncias são apresentados respectivamente nas tabelas III.1 e III.2.

O cálculo da capacitância, utilizando a equação III.1, é feito em função do módulo da impedância e da frequência correspondente, mas não leva em consideração a fase,

Tabela III.1: Resposta em frequência do capacitor de teste C_T , onde $|X_{C_T}|$ é o módulo da impedância e Φ_{C_T} a fase associada.

f (kHz)	$ X_{C_T} $ (k Ω)	Φ_{C_T} (graus)	$C_{T_{Calculado}}$ (pF)
400	68,00	-90,0	5,85
700	39,00	-90,0	5,83
1000	27,00	-90,0	5,89
3000	9,10	-91,1	5,83
4000	6,80	-91,0	5,85
7000	3,87	-91,2	5,88
10000	2,70	-91,2	5,89
30000	0,90	-91,5	5,89
40000	0,67	-91,7	5,94
70000	0,36	-92,4	6,32
100000	0,23	-93,2	6,92

Tabela III.2: Resposta em frequência do capacitor de teste C_1 , onde $|X_{C_1}|$ é o módulo da impedância e Φ_{C_1} a fase associada.

f (kHz)	$ X_{C_1} $ (k Ω)	Φ_{C_1} (graus)	$C_{1_{Calculado}}$ (pF)
400	117,00	-91,0	3,40
700	68,00	-90,0	3,34
1000	48,00	-90,0	3,32
3000	15,80	-91,2	3,36
4000	11,80	-91,1	3,37
7000	6,73	-91,1	3,38
10000	4,71	-91,3	3,38
30000	1,57	-91,6	3,38
40000	1,17	-91,8	3,40
70000	0,66	-92,7	3,44
100000	0,45	-93,4	3,54

uma vez que esta permanece coerente com o efeito capacitivo.

As médias(desvios padrão) das capacitâncias avaliadas são $\overline{C}_T = 6,01(0,33) pF$ e $\overline{C}_1 = 3,39(0,06) pF$. Os valores obtidos apresentaram uma variação importante de 54% em relação ao valor nominal. Serão consideradas as médias dos valores reais destas capacitâncias para uma estimativa mais fidedigna da sensibilidade esperada para o pré-amplificador de carga, assim como da carga injetada para avaliá-lo. Dessa forma é esperada uma sensibilidade média ($\overline{S}_1 = 1/\overline{C}_1$) do pré-amplificador de $0,295 V/pC$.

$$C = \frac{1}{2\pi f |X_C|} \quad (\text{III.1})$$

onde:

$C \rightarrow$ capacitância (F);

$f \rightarrow$ frequência (Hz);

$|X_C| \rightarrow$ modulo da impedância (Ω).

Procedimento para avaliação da sensibilidade pré-amplificador de carga

O pré-amplificador de carga gera uma de tensão de saída em função de uma carga de entrada. Sendo assim, o pré-amplificador deverá ser caracterizado diante de um impulso de carga para avaliar a sua eficácia. Então, aplicando-se um impulso de carga na sua entrada, foi observado o pico de tensão na sua saída para avaliar o seu comportamento, teste esse comumente utilizado para este tipo de circuito (BERTUCCIO e PULLIA, 1995; BELTRAN e PERLAS, 2002).

O experimento montado para caracterizar o pré-amplificador de carga para o sinal do fotodiodo é apresentado na figura III.19. Foram utilizados um gerador de funções *8116A Pulse/Function Generator (Hewlett Packard)*, um osciloscópio *TDS2014 Four Channel Digital Storage Oscilloscope (Tektronix)* e uma fonte de alimentação (não apresentada na figura) *Power Supply MPC-3003D (Minipa)*.

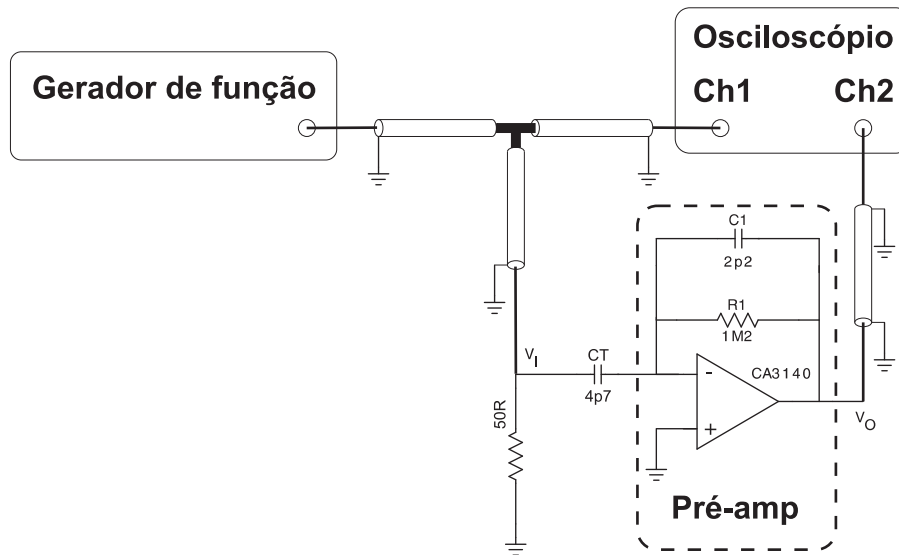


Figura III.19: Desenho do experimento para caracterização da sensibilidade do pré-amplificador de carga.

O gerador de funções fornece uma onda quadrada com uma frequência de 500 Hz , baixa em relação às constantes de tempo associadas ao circuito em questão, sendo possível assumir que a borda de subida da onda simula um degrau de tensão. Dessa forma, a carga fornecida ao pré-amplificador está relacionada com o valor de pico desse sinal que possui tempo de subida de $32,2\text{ ns}$ (figura III.20).

A saída do gerador de função possui impedância de $50\ \Omega$. E para evitar reflexão do sinal, serão utilizados cabos coaxiais e uma resistência de casamento de impedância junto ao pré-amplificador, ambos de $50\ \Omega$.

Será utilizado o capacitor de teste \overline{C}_T de valor nominal $4,7\text{ pF}$, mas cujo valor real apresenta uma média de $6,01\text{ pF}$, de acordo com a aferição anterior. Sendo assim, será fornecido um impulso de carga próximo do ideal na entrada do pré-amplificador devido ao degrau de tensão. Na prática essa estrutura gera um pulso estreito de carga onde a amplitude do degrau de tensão na entrada é proporcional à quantidade de carga na entrada do pré-amplificador (Equação III.2).

$$Q_T = V_{IP} \cdot C_T \quad (\text{III.2})$$

onde:

$Q_T \rightarrow$ carga fornecida ao pré-amplificador (C);

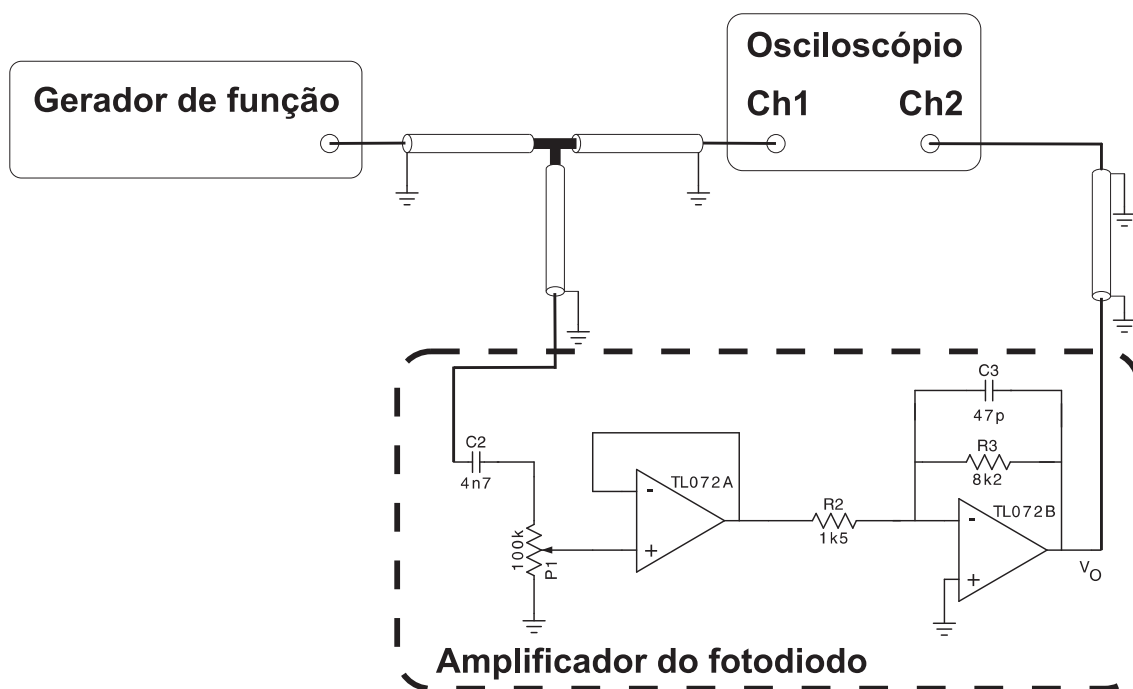


Figura III.21: Experimento para caracterização da resposta em frequência do filtro e amplificador do sinal do fotodiodo.

Avaliação do condicionador do sinal do tubo fotomultiplicador

O circuito completo de condicionamento do sinal do PMT deverá ser caracterizado quanto à sua resposta em frequência diante de um sinal de corrente, visto que o seu estágio de pré-amplificação é um composto por um amplificador de transresistência. Sendo assim, optou-se por levantar a resposta em frequência do circuito de condicionamento de sinal por completo já que a sensibilidade é dada em função da corrente de entrada e não da carga.

O experimento foi montado conforme a figura III.22. O gerador de funções *8116A Pulse/Function Generator (Hewlett Packard)* forneceu sinais senoidais com amplitude constante de 200 mV_{PP} e frequências variadas e um osciloscópio *TDS2014 Four Channel Digital Storage Oscilloscope (Tektronix)* foi utilizado para obter as medições. O atenuador *P1* foi ajustado para o ganho unitário.

Para fornecer uma corrente apropriada ao circuito, colocou-se um resistor em série entre a fonte de tensão e a entrada inversora do pré-amplificador de transresistência. O resistor R_T , indicado na figura III.22, é de filme de carbono, podendo dissipar até $1/2\text{ W}$ e com tolerância de 10%. Este resistor foi aferido com o multi-

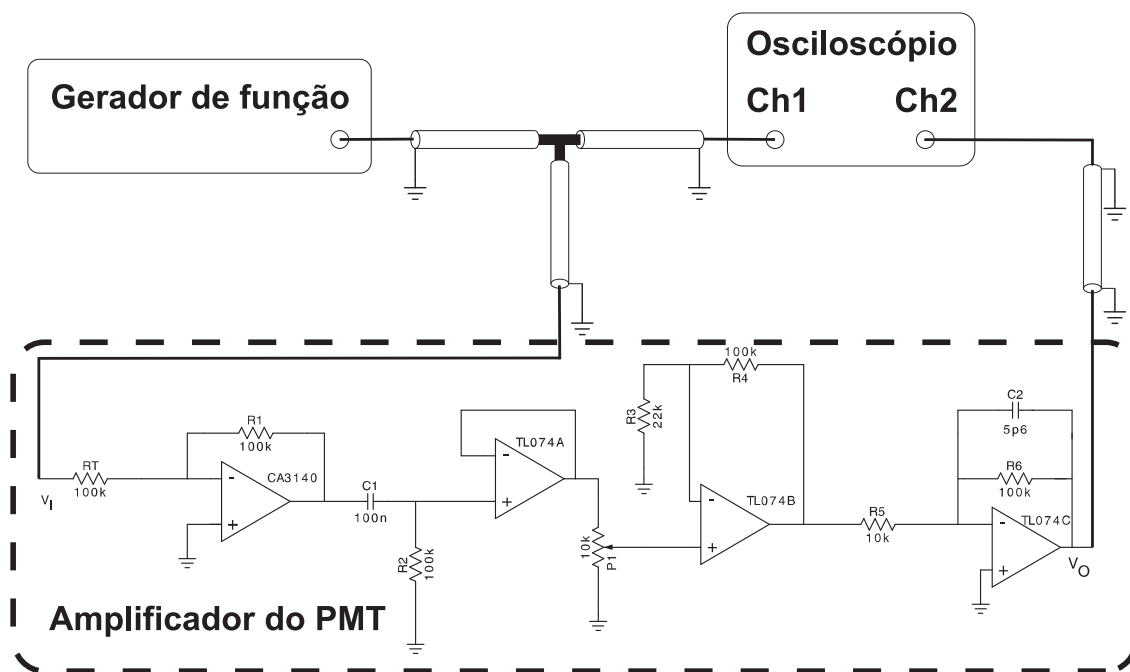


Figura III.22: Experimento para caracterização da resposta em frequência do condicionador de sinal do tubo fotomultiplicador.

metro *Protek 506 Digital Multimeter* e apresentou $105,2\text{ k}\Omega$ de resistência.

III.6 Aquisição

A aquisição dos sinais é feita pela placa de análise de altura de pulso da ORTEC[®] modelo TRUMP[®]-2K *Multichannel Buffer*. A placa é instalada em um PC e se comunica com o computador por meio do barramento ISA. Efetua a conversão AD pelo método de aproximações sucessivas, tem resolução máxima de 2048 canais e tempo de aquisição de $8\ \mu\text{s}$.

Esta placa foi instalada em um PC com placa mãe Soyo K7VTA com *chipset* VIA VT8363, processador AMD Athlon 1 GHz , 256 MB de memória de acesso aleatório (PC133 SDRAM) e disco rígido de 40 GB e rodando o sistema operacional Microsoft Windows 98 SE. Para utilizar a placa foi preciso instalar o *software* MAESTRO for Windows modelo A65-B32 versão 5.10 para controlar e visualizar os dados obtidos. Finalizado o experimento, um arquivo com extensão *Chn* é guardado para posterior análise com a ajuda do *software* WinPlots versão 3.10.

III.7 Validação do citômetro de fluxo monoparamétrico

Foi avaliada a eficácia do citômetro de fluxo monoparamétrico quanto à sua capacidade de medir o espalhamento direto de luz e perceber diferença entre partículas de tamanhos desiguais. Foram utilizados dois tipos de amostra. Um preparo com o homopolímero de PVC e outra amostra preparada com microesferas de tamanhos calibrados. O protocolo que descreve a introdução da amostra dentro CFH consta no apêndice.

A água destilada e filtrada foi utilizada como fluido de revestimento, sendo também utilizada para diluir a amostra a ser analisada pelo citômetro. O filtro utilizado impede a passagem de partículas maiores que $38 \mu m$, cuja finalidade é impedir que partículas grandes possam entupir a CFH ou o capilar.

III.7.1 Avaliação do ruído de fundo

Antes de analisar as microesferas, foi feita uma aquisição de sinal em que a água destilada e filtrada, mesmo material utilizado como fluido de revestimento, serviu de amostra para avaliar o ruído de fundo adquirido pelo PHA quando não existem partículas propositalmente colocadas no vaso da amostra.

III.7.2 Experimento com homopolímero de PVC

Foi feita a avaliação da amostra com homopolímero de PVC no citômetro de fluxo monoparamétrico com a finalidade de se tentar diferenciar o tamanho das partículas desse material. Para isso foi analisada uma amostra de $3 ml$ do mesmo material utilizado para avaliar a focalização hidrodinâmica.

III.7.3 Experimento com microesferas de poliestireno

Um outro experimento foi feito para avaliação da capacidade de diferenciação de tamanhos de partículas do citômetro de fluxo monoparamétrico. Foi utilizado o *Flow*

*Cytometry Size Calibration Kit *nonfluorescent microspheres** (No. Cat. F-13838), fornecido pela *Invitrogen*. Este *kit* possui seis frascos com 1 ml. Cada um possui um tamanho de microesfera com dispersão mínima, sendo tais tamanhos garantidos pelo fabricante. Fazem parte do estojo as microesferas com diâmetros de 1 μm , 2 μm , 4 μm , 6 μm , 10 μm e 15 μm .

Foi feito um experimento utilizando as microesferas com uma amostra preparada com partículas de dois tamanhos diferentes suspensas em 3 ml de água filtrada e destilada dentro de um tubo de ensaio. Os frascos das microesferas foram submetidos a uma estimulação ultra-sônica por 30 minutos e agitados por 5 minutos. Adicionou-se uma gota (com volume estimado em 50 μl) do material de 4 μm e outra gota do material de 15 μm . O objetivo de tal amostra é verificar se o equipamento é capaz de diferenciar as duas partículas presentes.

Capítulo IV

Resultados

IV.1 Focalização hidrodinâmica

A figura IV.1 apresenta micrografias do capilar em situações diversas no funcionamento do citômetro de fluxo. No caso A o capilar está completamente preenchido com o fluido de revestimento, que tem índice de refração próximo do índice do vidro e evita o espalhamento intenso de luz, que é o caso apresentado na situação F, mas não possui amostra no seu interior porque a pressão no vaso da amostra não é suficiente para expulsar o material diante da pressão no vaso do fluido de revestimento. Quando o capilar está preenchido com líquido e há espalhamento lateral de luz em todo o interior significa que a pressão aplicada no vaso da amostra é excessivamente maior que a do outro vaso, como no caso B. Mas quando a diferença de pressão atinge um nível adequado, ocorre a focalização hidrodinâmica. Essa comprovação se dá pelas imagens dos casos C, D e E. Apenas a região central do capilar apresenta espalhamento de luz.

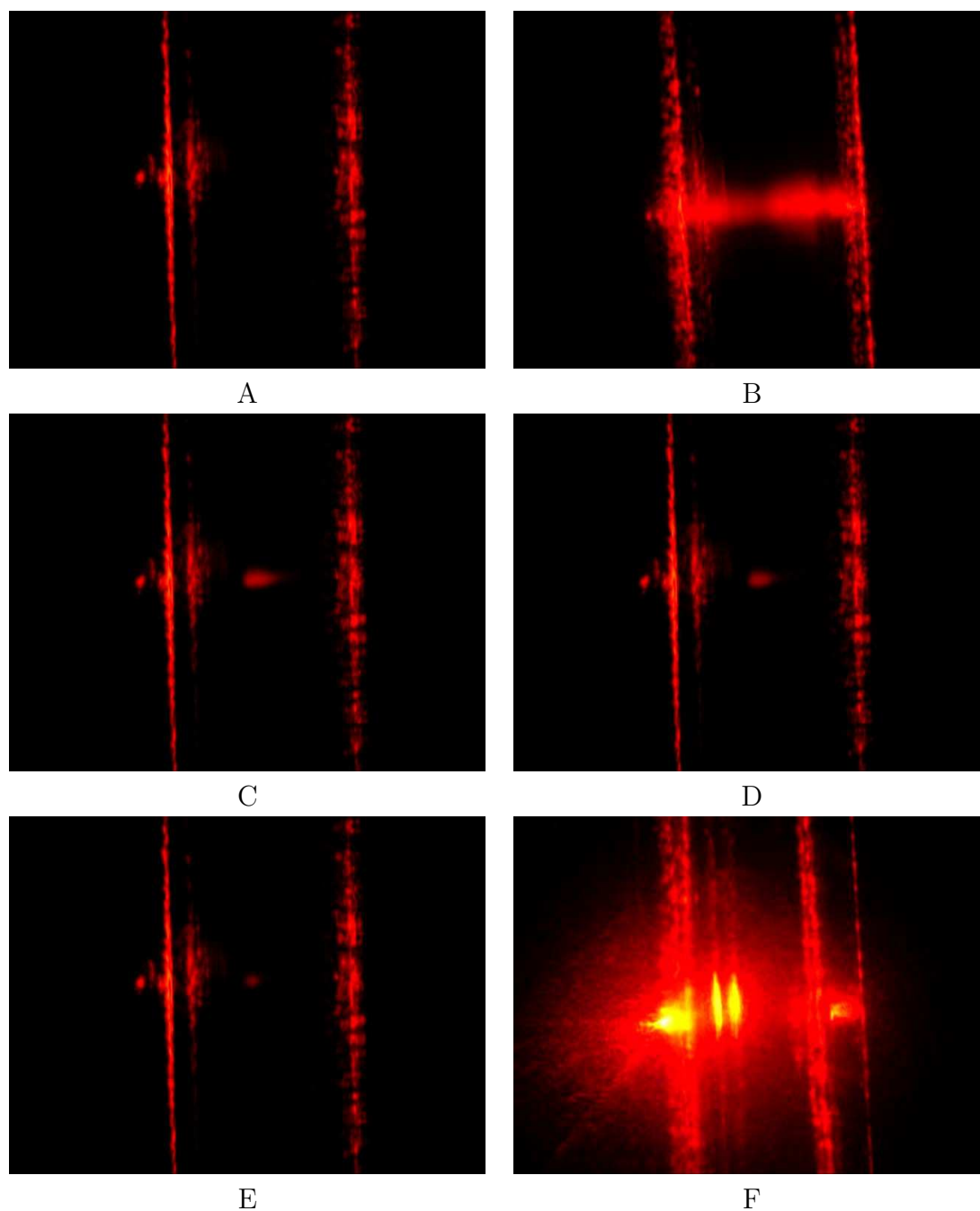


Figura IV.1: Micrografias do capilar: (A) preenchido com fluido de revestimento, mas sem amostra; (B) com amostra, mas sem focalização hidrodinâmica; (C) com amostra em focalização hidrodinâmica leve; (D) com amostra em focalização hidrodinâmica intermediária; (E) com amostra em focalização hidrodinâmica precisa. (F) Capilar com bolhas de ar.

IV.2 Pré-amplificador de carga do sinal do fotodiodo

O sinal de saída do pré-amplificador tem o formato apresentado na figura IV.2, sendo este o formato esperado.

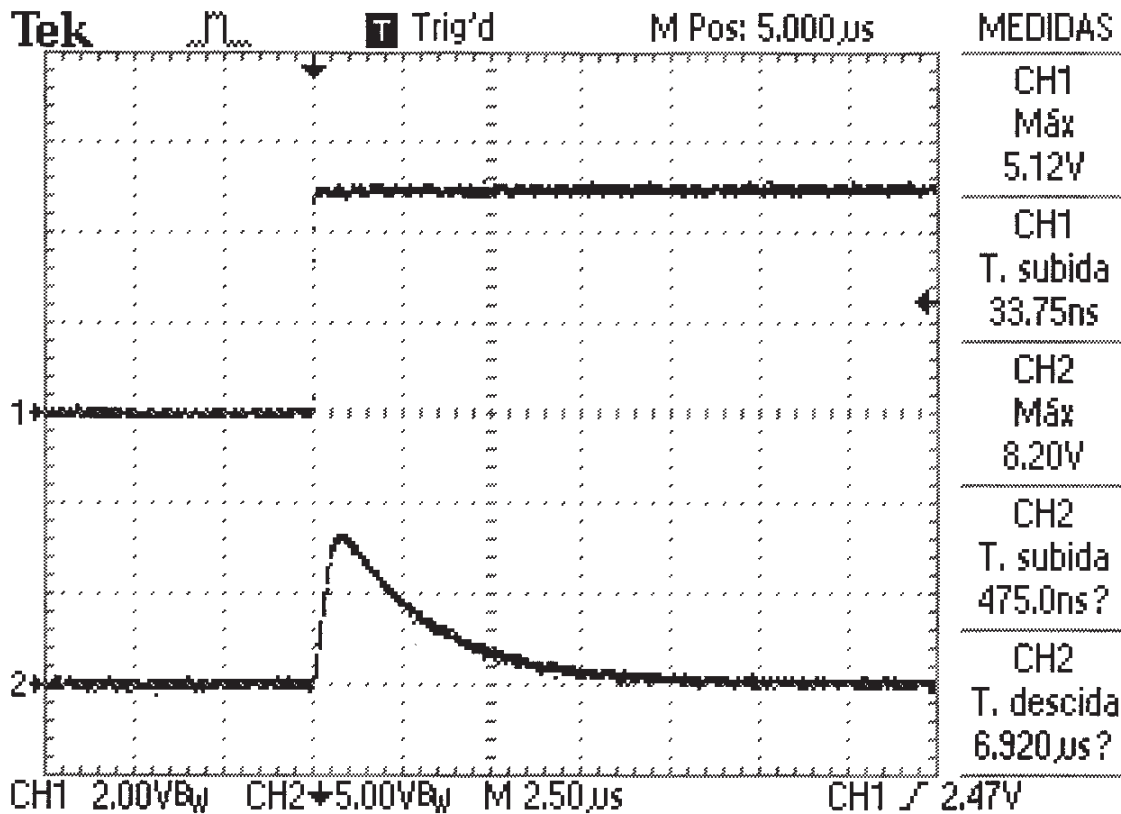


Figura IV.2: Sinal de saída do pré amplificador (CH2) em função da carga de entrada, representada pelo degrau de tensão (CH1).

As medidas da tensão de saída em função da tensão de entrada são apresentadas na tabela IV.1.

A média(desvio padrão) da sensibilidade S_{1C} é $\bar{S}_{1C} = 0,288(0,004) V/pC$.

Os resultados apresentam uma relação linear entre a carga de entrada e a tensão de saída do pré-amplificador. A figura IV.3 apresenta o resultado da curva de calibração que foi modelada (por mínimos quadrados) por uma reta como sendo $V_O = 2,86 \cdot 10^{11} \cdot Q_T$. A partir desta reta foi obtido o erro máximo de linearidade, sendo o mesmo de 1,53% para uma saída máxima de 8,48 V. Neste levantamento, a máxima carga de entrada foi de 30,03 pC, mas a máxima carga de entrada possível

Tabela IV.1: Resposta do pré-amplificador em função da carga de entrada, onde: V_I (V) é a tensão de pico sobre o capacitor C_T ; Q_I (pC) é a carga resultante injetada no pré-amplificador; V_O (V) é a tensão de pico medida na saída do pré-amplificador; S_{1c} (V/pC) é a sensibilidade calculada a partir das tensões de V_I e V_O e do capacitor C_T .

V_I	Q_I	V_O	S_{1c}	V_I	Q_I	V_O	S_{1c}
0,10	0,60	0,18	0,299	2,58	15,49	4,48	0,289
0,20	1,18	0,34	0,289	2,68	16,09	4,68	0,291
0,29	1,75	0,51	0,292	2,78	16,69	4,84	0,290
0,40	2,38	0,66	0,279	2,88	17,29	5,04	0,291
0,50	2,98	0,85	0,285	2,96	17,78	5,20	0,293
0,59	3,56	1,01	0,284	3,06	18,38	5,36	0,292
0,70	4,23	1,18	0,279	3,16	18,98	5,52	0,291
0,80	4,80	1,35	0,281	3,24	19,46	5,68	0,292
0,90	5,43	1,60	0,295	3,34	20,06	5,84	0,291
1,01	6,07	1,76	0,290	3,44	20,66	6,04	0,292
1,10	6,61	1,92	0,291	3,64	21,86	6,16	0,282
1,19	7,15	2,10	0,294	3,68	22,10	6,32	0,286
1,29	7,75	2,26	0,292	3,80	22,82	6,44	0,282
1,40	8,41	2,44	0,290	3,88	23,30	6,64	0,285
1,50	9,01	2,62	0,291	4,00	24,02	6,76	0,281
1,62	9,73	2,78	0,286	4,12	24,74	7,04	0,285
1,70	10,21	2,96	0,290	4,20	25,22	7,20	0,285
1,80	10,81	3,12	0,289	4,32	25,94	7,36	0,284
1,90	11,41	3,28	0,287	4,40	26,42	7,52	0,285
1,98	11,89	3,44	0,289	4,48	26,90	7,68	0,285
2,08	12,49	3,64	0,291	4,60	27,62	7,84	0,284
2,18	13,09	3,80	0,290	4,68	28,10	8,00	0,285
2,28	13,69	4,00	0,292	4,80	28,82	8,16	0,283
2,38	14,29	4,16	0,291	4,88	29,30	8,32	0,284
2,48	14,89	4,32	0,290	5,00	30,03	8,48	0,282

é de 84,14 pC.

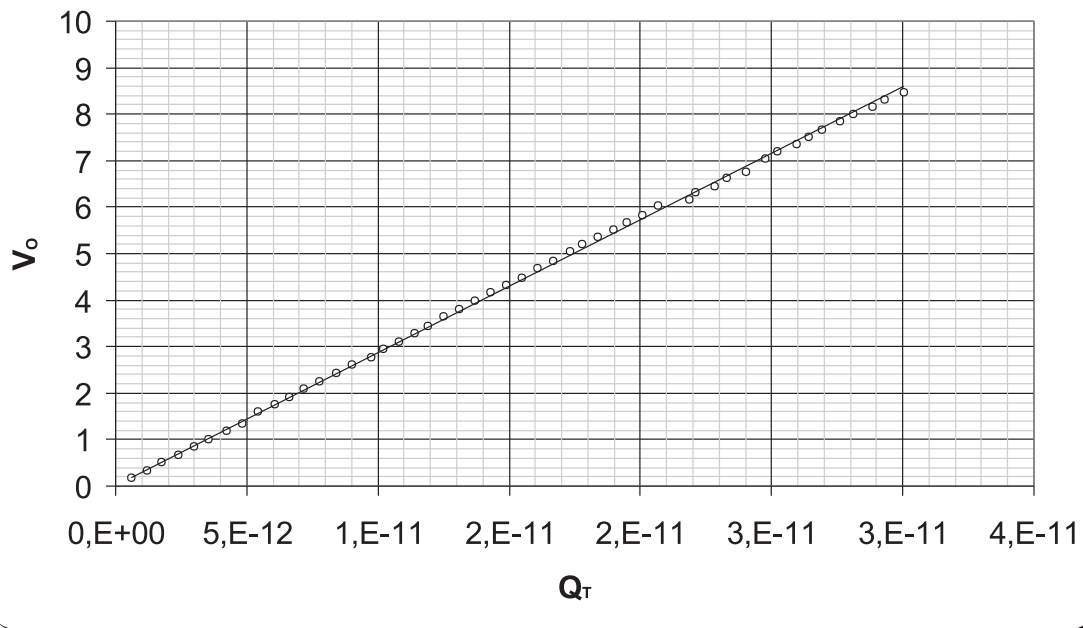


Figura IV.3: Curva de sensibilidade do pré-amplificador de carga.

IV.2.1 Resposta em frequência do filtro e amplificador linear do sinal do fotodiodo

Os valores obtidos no levantamento da resposta em frequência do segundo estágio do condicionamento do sinal do fotodiodo são apresentados na tabela IV.2 e o no gráfico da figura IV.4, onde observa-se um ganho na banda passante em torno de 5,4. Baseado neste valor, pode-se verificar uma frequência de corte inferior no entorno de 380 Hz e a frequência de corte superior de aproximadamente 420 kHz. Em função destes valores, o tempo de subida do sinal é estimado pela equação IV.1 em 834 ns.

$$t_s = \frac{0,35}{BW} \quad (\text{IV.1})$$

onde:

t_s → tempo de subida (s);

BW → largura de banda (Hz).

Tabela IV.2: Valores obtidos no levantamento da resposta em frequência do segundo estágio do condicionamento do sinal do fotodiodo.

f (Hz)	V_I (V_{PP})	V_O (V_{PP})	Ganho
5,04	2,00	0,17	0,09
7,02	2,00	0,22	0,11
9,94	2,04	0,31	0,15
19,97	2,00	0,62	0,31
49,50	2,00	1,46	0,73
71,23	2,00	2,06	1,03
100,40	2,04	2,82	1,38
200,20	2,04	5,04	2,47
498,00	2,00	8,56	4,28
708,20	2,04	9,44	4,63
1008,00	2,04	10,10	4,95
2012,00	1,96	10,60	5,41
5102,00	2,04	10,70	5,25
7138,00	2,00	11,00	5,50
10140,00	1,96	11,00	5,61
20040,00	1,96	11,00	5,61
50400,00	2,04	10,80	5,29
70620,00	1,96	10,60	5,41
100400,00	1,96	10,20	5,20
198800,00	2,00	8,40	4,20
502500,00	1,96	4,72	2,41
699600,00	1,92	3,60	1,88
994000,00	1,96	2,72	1,39
2020000,00	1,84	1,36	0,74

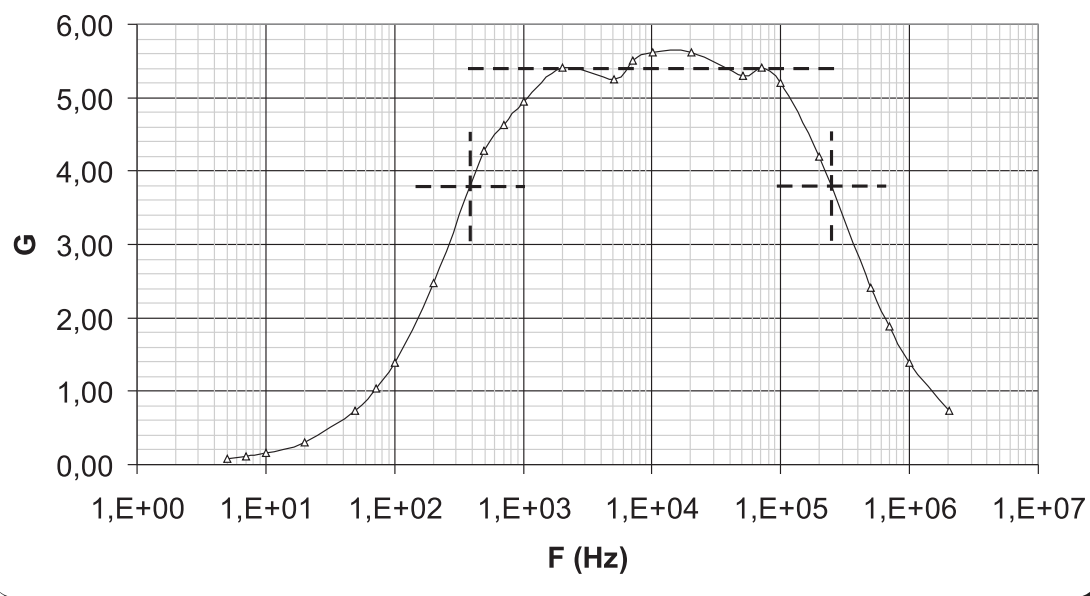


Figura IV.4: Resposta em frequência segundo estágio do condicionamento do sinal do sinal do fotodiodo. Ganho na banda passante de 5,4, frequência de corte inferior em 380 Hz e a frequência de corte superior em 420 kHz.

IV.2.2 Condicionador do sinal do tubo fotomultiplicador

A tabela IV.3 apresenta os valores da resposta em frequência do condicionador de sinal do tubo fotomultiplicador. A figura IV.5 mostra o gráfico desta resposta.

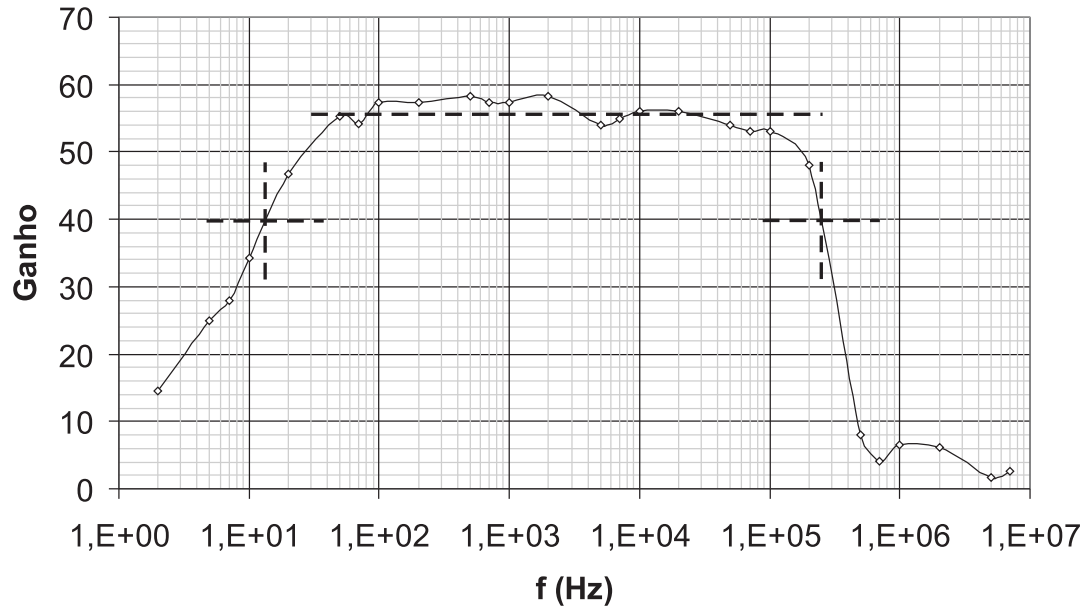


Figura IV.5: Resposta em frequência do amplificador do sinal do tubo fotomultiplicador.

Pelo gráfico, é possível observar que o ganho na banda passante está em torno de 55,8. As frequências de corte inferior e superior obtidas são próximas de 13 Hz e 230 kHz , respectivamente. O tempo de subida, calculado de acordo com a equação IV.1, é $1,52\ \mu\text{s}$.

Tabela IV.3: Resposta em frequência do condicionador de sinal do tubo fotomultiplicador.

f (Hz)	V_I (V_{PP})	V_O (V_{PP})	Ganho
2	192,00	2,80	14,58
5	192,00	4,80	25,00
7	192,00	5,36	27,92
10	192,00	6,56	34,17
20	192,00	8,96	46,67
50	192,00	10,60	55,21
70	192,00	10,40	54,17
100	192,00	11,00	57,29
200	192,00	11,00	57,29
500	192,00	11,20	58,33
700	192,00	11,00	57,29
1k	192,00	11,00	57,29
2k	192,00	11,20	58,33
5k	204,00	11,00	53,92
7k	200,00	11,00	55,00
10k	196,00	11,00	56,12
20k	196,00	11,00	56,12
50k	196,00	10,60	54,08
70k	196,00	10,40	53,06
100k	196,00	10,40	53,06
200k	196,00	9,40	47,96
500k	200,00	1,60	8,00
700k	196,00	0,82	4,18
1M	196,00	1,26	6,43
2M	196,00	1,22	6,22
5M	184,00	0,32	1,74
7M	184,00	0,48	2,61

IV.3 Validação do citômetro de fluxo monoparamétrico

IV.3.1 Avaliação do ruído de fundo

No teste do ruído de fundo, utilizou-se, como anteriormente mencionado, a amostra de 3 ml de água destilada e filtrada, sendo o diodo *laser* alimentando por uma corrente de $31,3\text{ mA}$. O volume da amostra foi consumido em aproximadamente 30 minutos, resultando em uma vazão de $\sim 100\ \mu\text{l}/\text{min}$. O resultado deste experimento, mostrado na figura IV.6, apresenta uma distribuição tal que o pico das contagens coincide com o limite inferior de aquisição do PHA.

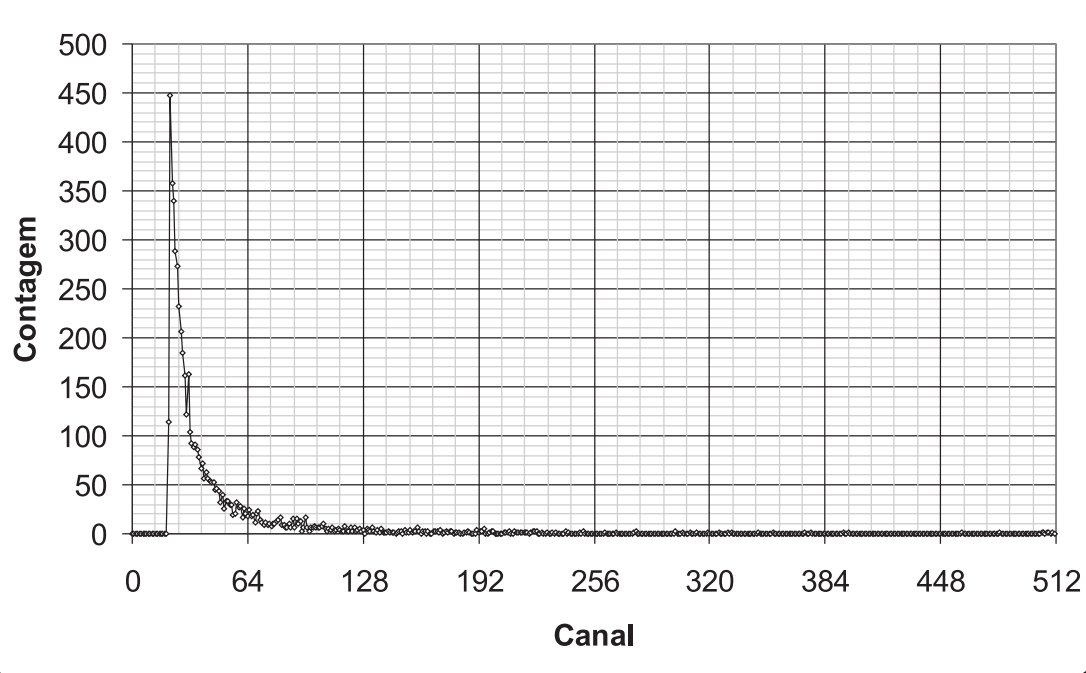


Figura IV.6: Sinal obtido utilizando a água destilada e filtrada como amostra. Corrente do *laser*: $31,3\text{ mA}$.

IV.3.2 Experimento usando homopolímero de PVC

O experimento realizado utilizou a amostra de 3 ml preparada com o homopolímero de PVC, de acordo com o método descrito na página 48. O *laser* permaneceu alimentado por uma corrente de $31,4\text{ mA}$ durante este experimento. O resultado (figura IV.7) apresenta uma distribuição semelhante à do ruído de fundo.

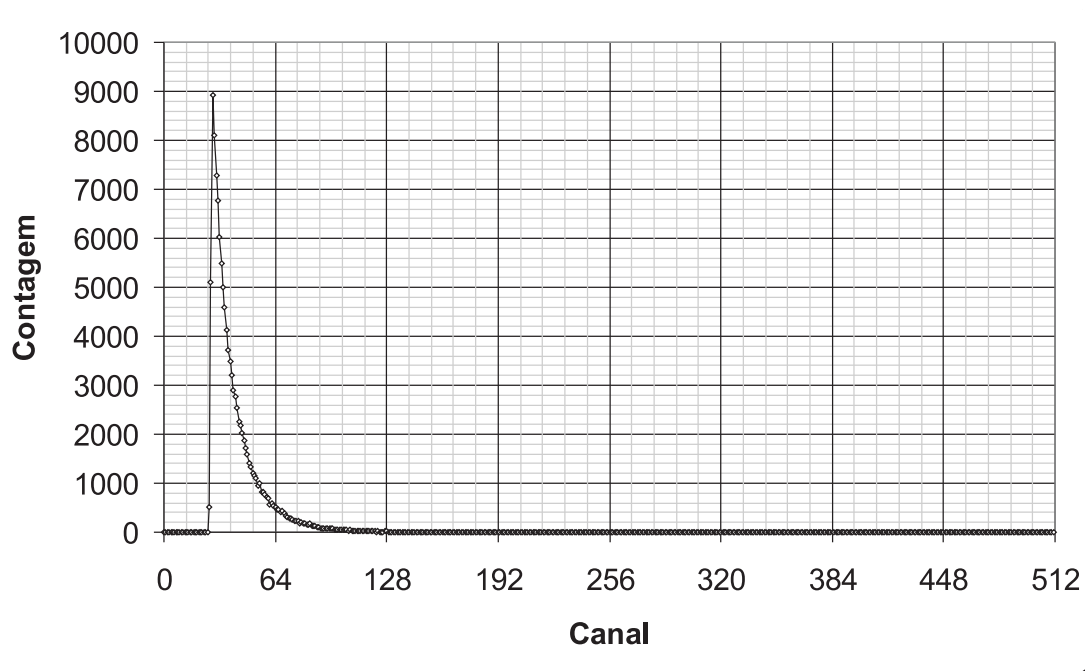


Figura IV.7: Resultado do experimento com o homopolímero de PVC. Corrente do laser: $31,4\text{ mA}$.

IV.3.3 Experimento com microesferas de poliestireno

O primeiro ensaio utilizou microesferas de poliestireno de $4\ \mu\text{m}$ e $15\ \mu\text{m}$ misturadas em um tubo de ensaio com 3 ml de água destilada e filtrada. O resultado deste experimento (figura IV.8) mostra que ainda existe forte presença do ruído de fundo, mas já é possível observar um segundo pico na distribuição das contagens nos canais do PHA. Neste experimento, o *laser* permaneceu alimentado por uma corrente de $31,3\text{ mA}$.

Um outro experimento foi feito utilizando o mesmo preparo de amostra com microesferas de $4\ \mu\text{m}$ e $15\ \mu\text{m}$, mas desta vez elevou-se a corrente do *laser* para

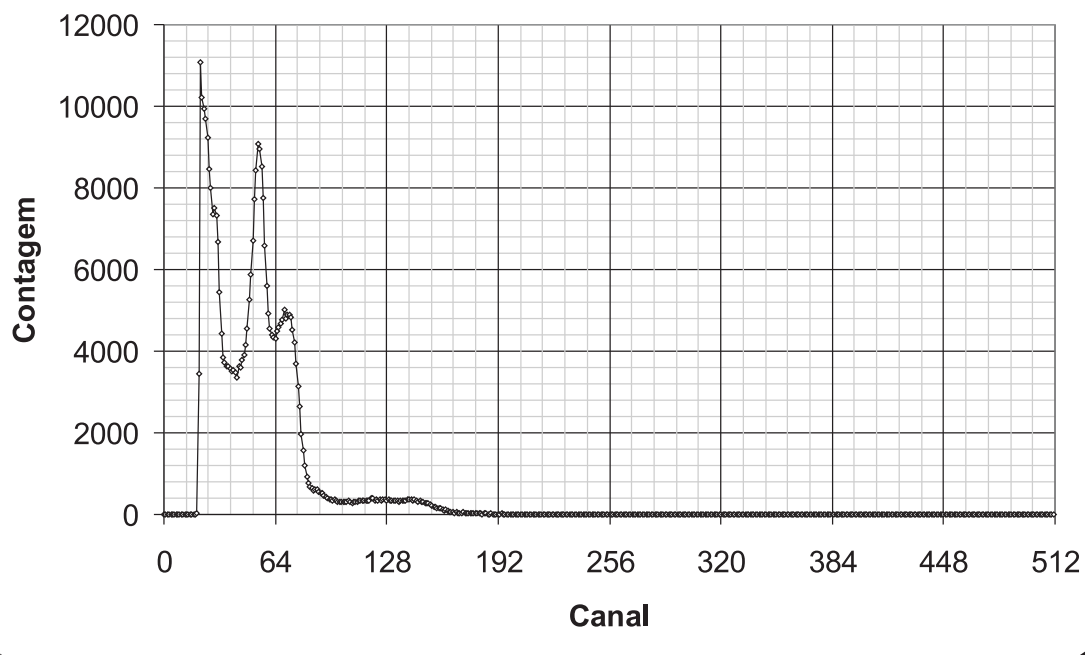


Figura IV.8: Resultado do experimento com o homopolímero de PVC. Corrente do laser: 31,3 mA.

34,6 mA. A figura IV.9 apresenta o resultado deste último experimento. É claramente perceptível o deslocamento das distribuições das contagens para a direita.

Foi feita uma avaliação deste último resultado subtraindo-se a contagem normalizada do PHA do ruído de fundo $\alpha(c)$, onde α é a contagem para cada canal c . O valor de $\alpha(c_{max})$ corresponde a contagem máxima de eventos apresentada na figura IV.6. O pico de contagem do PHA da figura IV.9 é representado por $\beta(c_{max})$. O ruído normalizado é dado por $\alpha_n(c) = \alpha(c) \cdot \beta(c_{max}) / \alpha(c_{max})$. A contagem final $\delta(c)$, apresentada na figura IV.10, é obtida subtraindo-se $\beta(c)$ de $\alpha_n(c)$. Observa-se neste último resultado uma largura a meia altura de 48 canais para a amostra associada ao material de $4 \mu m$ e de 57 canais para a amostra associada ao material de $15 \mu m$. As resoluções, calculadas pela equação IV.2, são $r|_4 = 40,7\%$ e $r|_{15} = 49,8\%$.

$$r|_t = \frac{FWHM}{\Delta\#} \quad (IV.2)$$

Onde:

$FWHM \rightarrow$ largura a meia altura (*nmerodecanais*);

$\Delta\# \rightarrow$ distância entre os picos (*nmerodecanais*);

$t \rightarrow$ tamanho da partícula associada (μm).

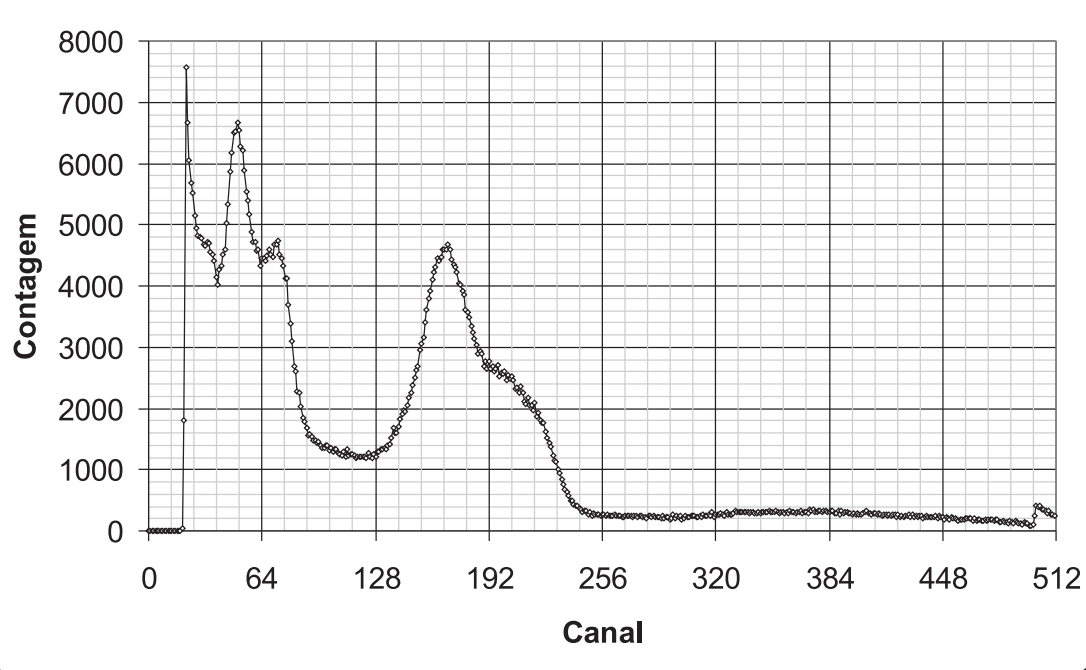


Figura IV.9: Resultado do experimento com amostra contendo microesferas de 4 μm e 15 μm . Corrente do *laser*: 34,6 mA.

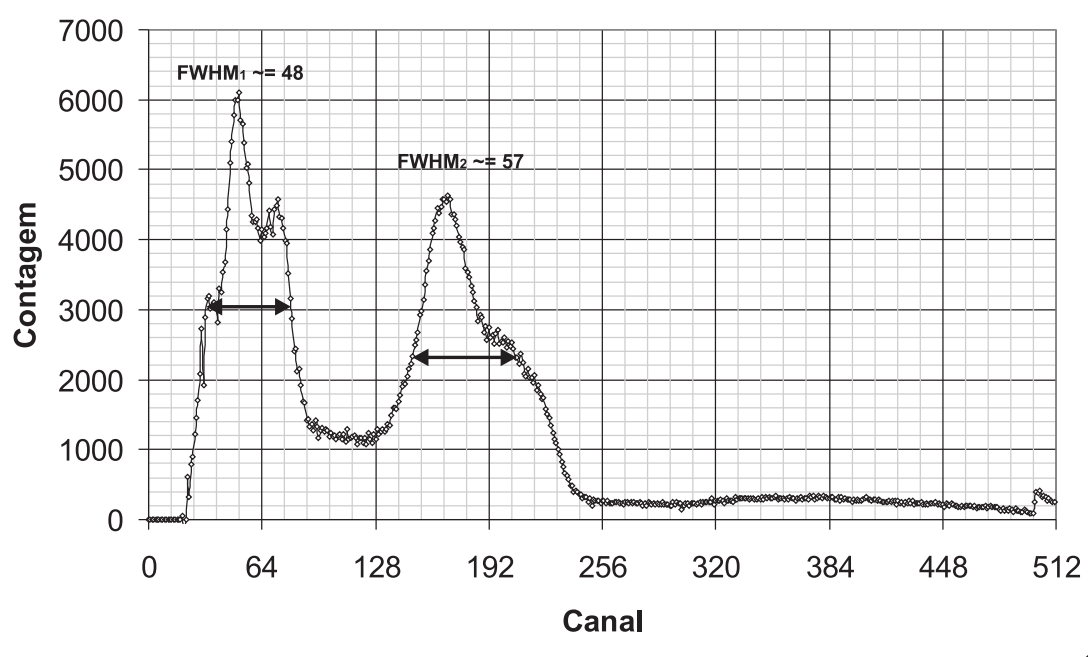


Figura IV.10: Estimativa do resultado de um experimento com amostra contendo microesferas de $4\mu\text{m}$ e $15\mu\text{m}$ quando extraído o erro normalizado. *FWHM* (*Full-Width at Half Maximum*) é a medida da largura a meia altura.

Capítulo V

Discussões

O homopolímero de PVC utilizado nos experimentos foi importante para a avaliação visual do fenômeno da focalização hidrodinâmica por conta do seu intenso espalhamento lateral, justificado pelo formato irregular das partículas. Mas, como esse homopolímero não tem o formato esférico, não pode ser feita nenhuma inferência sobre os tamanhos dessas partículas. A razão para não se poder analisar o tamanho desse material é que a análise de Mie (SHAPIRO, 2003, p. 106) que relaciona o volume das partículas, de tamanho próximo ao comprimento de onda da fonte utilizada, com o espalhamento de luz em ângulos de abertura pequena, é formulada apenas para partículas com formato esférico, ou próximo disso.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que a diferença de pressão entre o vaso do fluido de revestimento e o vaso da amostra pode ser tal que a focalização hidrodinâmica possibilite a passagem de apenas uma célula por vez na seção transversal do capilar que é iluminada. A obtenção de uma boa focalização está relacionada com o correto ajuste das pressões envolvidas, sendo que neste trabalho tal tarefa foi dificultada devido ao uso de reguladores mecânicos industriais de pressão.

O capacitor de realimentação do pré-amplificador de carga, estimado a partir da sua caracterização prévia, apresentou um valor 54% maior do que o nominal e, conseqüentemente, o valor da sensibilidade estimada apresentou-se menor do que a previsão teórica.

A análise da água destilada e filtrada pelo citômetro de fluxo monoparamétrico

apresentou contagem elevada. A hipótese para este resultado é de que o sinal detectado pelo fotodiodo seja gerado por partículas presentes na água destilada e filtrada, uma vez que a filtragem permite a passagem de materiais que tem tamanho com mesma ordem de grandeza do material utilizado nos outros experimentos. Esse fato está relacionado com a baixa qualidade do filtro utilizado.

O aparecimento de 3 picos de contagem na figura IV.9, devido ao deslocamento das distribuições de contagem para a direita do gráfico, o que não ocorreu no resultado da figura IV.8, deve estar relacionado ao fato de que uma partícula de mesmo tamanho irá espalhar maior potência luminosa se forem mantidas as condições de pressão e focalização hidrodinâmica, mas se a potência luminosa for aumentada por causa do aumento da corrente fornecida ao diodo *laser*. A resposta a essa mudança é coerente com o deslocamento dos picos para a direita já que nessa situação o fotodiodo será mais sensibilizado pela passagem de uma partícula na circunstância em que a fonte luminosa fornece mais potência. Com base nessa discussão e no resultado apresentado na figura IV.10, sustenta-se a hipótese de que o pico da esquerda é relativo ao ruído, o pico central é atribuído à presença das partículas de $4\ \mu m$ e o pico da direita é devido à presença das partículas de $15\ \mu m$.

Capítulo VI

Conclusões

O objetivo de se desenvolver um citômetro de fluxo monoparamétrico capaz de diferenciar partículas com tamanhos micrométricos (que são próximos aos de células sangüíneas) foi atingido.

Em tal desenvolvimento foi investigado o processo de focalização hidrodinâmica, tendo sido concebida uma CFH com tecnologia totalmente nacional. Apesar dos resultados mostrarem a necessidade do uso de válvulas eletrônicas para o controle das pressões envolvidas no processo de focalização, foi possível enfileirar as partículas para serem iluminadas individualmente.

A tecnologia de vários dispositivos optoeletrônicos, assim como de seus condicionadores de sinais associados, também foi investigada e dominada, sendo mostrada a viabilidade de sua construção no país. Foi possível desenvolver-se um circuito de controle e proteção para diodos *laser* que, apesar de ter sido projetado para um *laser* de 635 nm, poderá ser utilizado para dispositivos de outros comprimentos de onda e potências, sem modificações expressivas. Os resultados apontam para o funcionamento adequado do pré-amplificador de carga projetado, sendo este comparável a outros apresentados na literatura. Foi também verificado que, com componentes encontrados no mercado nacional, é possível desenvolver amplificadores com ganhos e bandas passantes capazes de condicionar adequadamente os sinais dos detectores de luz de modo a adequá-los à faixa dinâmica das placas PHA disponíveis no mercado. Observou-se também que os ruídos associados intrinsecamente aos circuitos

eletrônicos situam-se em níveis adequados para boas medições, sendo o ruído total fortemente influenciado pelas condições ópticas experimentais.

A medição de espalhamento lateral não foi realizada, apesar de toda a sua estrutura ter sido construída, devido à inexistência de um segundo PHA.

A partir do resultado apresentado na figura IV.10 observa-se que a largura a meia altura das distribuições para as partículas de $4\mu m$ e $15\mu m$ apontam para uma resolução ainda não comparável à de citômetros modernos. Possivelmente, tal resultado é influenciado por aspectos construtivos ligados à CFH e ao ruído de fundo associado ao aparato óptico.

Apesar do objetivo geral do trabalho ter sido alcançado, melhorias devem ser feitas na direção de se desenvolver um citômetro de fluxo análogo aos comerciais disponíveis atualmente. A utilização de *lasers* mais potentes e com comprimentos de onda menores possibilitará o estudo de partículas menores e da fluorescência, já que a distribuição das contagens se desloca para a direita com o aumento da potência do *laser*. A corrente fornecida ao diodo *laser* neste trabalho chegou ao limite recomendado pelo fabricante. Podem ser feitos ainda estudos comparativos entre fontes monocromáticas e lâmpadas de descarga em gas para excitação do sistema. Estas modificações sugerem a utilização de uma instrumentação fotônica mais ampla, visto que poucos instrumentos dessa área estiveram disponíveis durante a execução dos trabalhos. Apesar do bom funcionamento dos circuitos condicionadores de sinais, estes podem ainda ser melhorados para redução do seu ruído intrínseco. No tocante ao pré-amplificador de carga, um novo projeto deve envolver uma malha de realimentação para restaurar a linha de base, com a finalidade de aumentar a faixa de aproveitamento de sinal neste primeiro estágio do condicionamento. Quanto à focalização hidrodinâmica, a utilização de transdutores de pressão no sistema pneumático permitiria quantificar a vazão dos fluidos para avaliação mais precisa do poder de focalização, pois segundo Van Dilla *et al.* (1985, p.87), tal característica está relacionada às pressões envolvidas no equipamento. A montagem do corpo do citômetro dificultou o posicionamento do sistema óptico. Um futuro equipamento deve con-

templar a utilização de uma mesa óptica com microposicionadores para facilitar a movimentação e o ajuste fino dos filtros ópticos, *lasers* e lentes.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, L., GONZALEZ, A. M., ARAUJO, F. V. *et al.*, 2003, "Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments", *J Microbiol Methods*, v. 55, n. 3 (Dec), pp. 841–850.
- BACAL, N. S., GUERRA, J. C., FERREIRA, E. *et al.*, 2002, "A importância da citometria de fluxo no diagnóstico raro de mieloma mielomonocítico", *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 38, n. 1 (Jan), pp. 25–31.
- BARBUTO, J. A., 2005 (Jul), *Vacina terapêutica contra o Câncer*. http://www2.uol.com.br/sciam/conteudo/materia/materia_73.html. Internet.
- BARBUTO, J. A. ENSINA, L. F., NEVES, A. R. *et al.*, 2004, "Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer", *Cancer Immunol Immunother*, v. 53, n. 12 (Dec), pp. 1111–1118.
- BARNETT, J. A., 2003, "Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research", *Microbiology*, v. 149, n. Pt 3 (Mar), pp. 557–567.
- BELTRAN, D. and PERLAS, J. A., 2002, "A fast low noise charge preamplifier for position sensitive detectors", *Review of Scientific Instruments*, v. 73, n. 8 (Aug), pp. 3075–3079.
- BERTHO, A. L., CYSNE L. and COUTINHO S. G., 1992, "Flow cytometry in the study of the interaction between murine macrophages and the pro-

tozoan parasite *Leishmania amazonensis*", *J. Parasitol.*, v.78, n.4 (Aug), pp.666–671.

BERTHO, A. L., SANTIAGO, M. A., DA-CRUZ, A. M. *et al.*, 2000, "Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis", *Braz J Med Biol Res*, v.33, n.3 (Mar), pp.317–325.

BERTHO, A. L., SANTIAGO, M. A. and COUTINHO, S. G., 2000b, "Flow cytometry in the study of cell death", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95, n.3 (May/Jun), pp.429–433.

BERTUCCIO, G. and PULLIA, A., 1995, "An hemt input charge preamplifier for nanoseconds signal processing time", *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, v. 42, n. 2 (Apr), pp. 66–72.

BLANKENSTEIN, G. A., 1998, "Modular concept of a laboratory on a chip for chemical and biochemical analysis", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 13, n. 3-4 (Mar), pp. 427–438.

CANTOR, C. R., 2000, "Biotechnology in the 21st century", *Trends in Biotechnology*, v. 18, n. 1 (Jan), pp. 6–7.

CUCCI, T. L. and SIERACKI, M. E., 2001, "Effects of mismatched refractive indices in aquatic flow cytometry", *Cytometry*, v. 44, n. 3 (Jul), pp. 173–178.

CUI, H. H., VALDEZ, J. G., STEINKAMP, J. A. *et al.*, 2003, "Fluorescence lifetime-based discrimination and quantification of cellular dna and rna with phase-sensitive flow cytometry", *Cytometry*, v. 52A, n. 1 (Mar), pp. 46–55.

DA-CRUZ A. M., CONCEIÇÃO-SILVA F., BERTHO A. L., *et al.*, 1994, "Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of

- human cutaneous leishmaniasis”, *Infect. Immun.*, v. 62, n. 6 (Jun), pp. 2614–2618.
- DIVE, C., GREGORY, C. D., PHIPPS, D. J. *et al.*, 1992, ”Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry”, *Biochim Biophys Acta*, v. 1133, n. 3 (Feb), pp. 275–285.
- DOORNBOS, R. M., HENNINK, E. J., PUTMAN, C. A. *et al.*, 1993, ”White blood cell differentiation using a solid state flow cytometer”, *Cytometry*, v. 14, n. 6 (Mar), pp. 589–594.
- EWING, G. W., 1914, *Métodos instrumentais de análise química*. São Paulo, Edgard Blucher.
- FRADA, J., 2001, ”Evolução do microscópio: das origens ao início do século xx”, *RFML*, v. 6, n. 5 (Out), pp. 285–287.
- FU, A. Y., SPENCE, C., SCHERER, A. *et al.*, 1999, ”A microfabricated fluorescence-activated cell sorter”, *Nat Biotechnol*, v. 17, n. 11 (Nov), pp. 1109–1111.
- GADELHA, C. e AZEVEDO, N., 2003, ”Inovação em vacinas no brasil: experiência recente e constrangimentos estruturais”, *Hist. cienc. saude-Manguinhos*, v. 10, n. 2 (Jul), pp. 697–724.
- GEORGE, C. R., 2003, ”The cellular history of the glomerulus”, *J Nephrol*, v. 16, n. 6 (Dec), pp. 949–957.
- HERSHBERGER, L. W., CALLIS, J. B. and CHRISTIAN, G. D., 1979, ”Sub-microliter flow-through cuvette for fluorescence monitoring of high performance liquid chromatographic effluents”, *Anal. Chem.*, v. 51, n. 9 (Aug), pp. 1444–1446.

- HOFFMAN, R. A. and BRITT, W. B., 1979, "Flow-system measurement of cell impedance properties", *J Histochem Cytochem*, v. 27, n. 1 (Jan), pp. 234–240.
- KRETH, W. H. and HERZENBERG, L. A., 1974, "Fluorescence-activated cell sorting of human t and b lymphocytes : I. direct evidence that lymphocytes with a high density of membrane-bound immunoglobulin are precursors of plasmacytes", *Cellular Immunology*, v. 12, n. 3 (Jun), pp. 396–406.
- LOOS, H., BLOK-SCHUT, B., KIPP, B. *et al.*, 1976, "Size distribution, electronic recognition, and counting of human blood monocytes", *Blood*, v. 48, n. 5 (Nov), pp. 743–753.
- LU, Y. Q. Q., ZHANG, M., MENG, B. *et al.*, 2006, Identification of x- and y-chromosome bearing buffalo (*bubalus bubalis*) sperm. *Anim Reprod Sci*, (Article in press) January .
- MARTÍNEZ-ARRIBAS, F., MARTÍN-GARABATO, E., LAFUENTE, P. *et al.*, 2006, "Proliferation measurement in breast cancer by two different methods", *Anticancer Res*, v. 26, n. 1A (Feb), pp. 199–202.
- MURMANN, J. P., 2000, "Knowledge and competitive advantage in the synthetic dye industry, 1850-1914: the coevolution of firms, technology, and national institutions in great britain, germany, and the united states", *Enterprise Soc*, v. 1, n. 4 (Dec), pp. 699–704.
- NEVES, A. R., ENSINA, L. F., ANSELMO, L. B. *et al.*, 2005, "Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more cd86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions", *Cancer Immunol Immunother*, v. 54, n. 1 (Jan), pp. 61–66.
- NEVES, I., BERTHO, A. L., VELOSO, V. G. *et al.*, 1998, "Improvement of the lymphoproliferative immune response and apoptosis inhibition upon

- in vitro treatment with zinc of peripheral blood mononuclear cells (pbmc) from hiv+ individuals”, *Clinical and Experimental Immunology*, v. 111, n. 2 (Feb), pp. 264–268.
- NEVES-SOUZA, P. C., AZEREDO, E. L., ZAGNE, S. M. *et al.*, 2005, ”Inducible nitric oxide synthase (inos) expression in monocytes during acute dengue fever in patients and during in vitro infection”, *BMC Infect Dis*, v. 5, n. 64 (Aug).
- PLAZA, G., ULFIG, K., HAZEN, T. C. *et al.*, 2001, ”Use of molecular techniques in bioremediation”, *Acta Microbiol Pol*, v. 50, n. 3-4 (Oct), pp. 205–218.
- PORTER, J. R., 1976, ”Antony van leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria”, *Bacteriol Rev*, v. 40, n. 2 (Jun), pp. 260–269.
- POZAROWSKI, P. and DARZYNKIEWICZ, Z., 2004, ”Analysis of cell cycle by flow cytometry”, *Methods Mol Biol*, v. 281 (Jun), pp. 301–311.
- RATH, D., LONG, C. R., DOBRINSKY, J. R. *et al.*, 1999, ”In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of x-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer” *J Anim Sci*, v. 77, n. 12 (Dec), pp. 3346–3352.
- SARAIVA, E. M., PINTO-DA-SILVA, L. H., WANDERLEY, J. L. *et al.*, 2005, ”Flow cytometric assessment of leishmania spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers”, *Exp Parasitol*, v. 110, n. 1 (May), pp. 39–47.
- SCHUMMER, J., 2003, ”Chemical versus biological explanations. interdisciplinarity and reductionism in the 19th century life sciences”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 988, n. 1 (May), pp. 269–281.
- SHAPIRO, H. M., *Practical flow cytometry*, 1988, 2. ed., New York, A.R. Liss.

SHAPIRO, H. M., *Practical flow cytometry*, 2003, 4. ed., Hoboken, Wiley-Liss.

SILVA E. M., BERTHO A. L. and MENDONÇA S. C, 1994, "Effect of in vivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*", *Acta Trop.*, v.56, n.1 (Feb), pp.111–120.

VAN DILLA, M. A., DEAN, P. N., LAERUM, O. D. *et al.* (Ed.), 1985, *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis*, Orlando, Academic Press.

ZARRIN, F. and DOVICHİ, N. J., 1985, "Particle counting by laser light scatter for capillary hydrodynamic chromatography", *Anal. Chem.*, v. 57, n. 9 (Aug), pp. 1826–1829.

Apêndice A

Desenhos das peças do corpo do citômetro

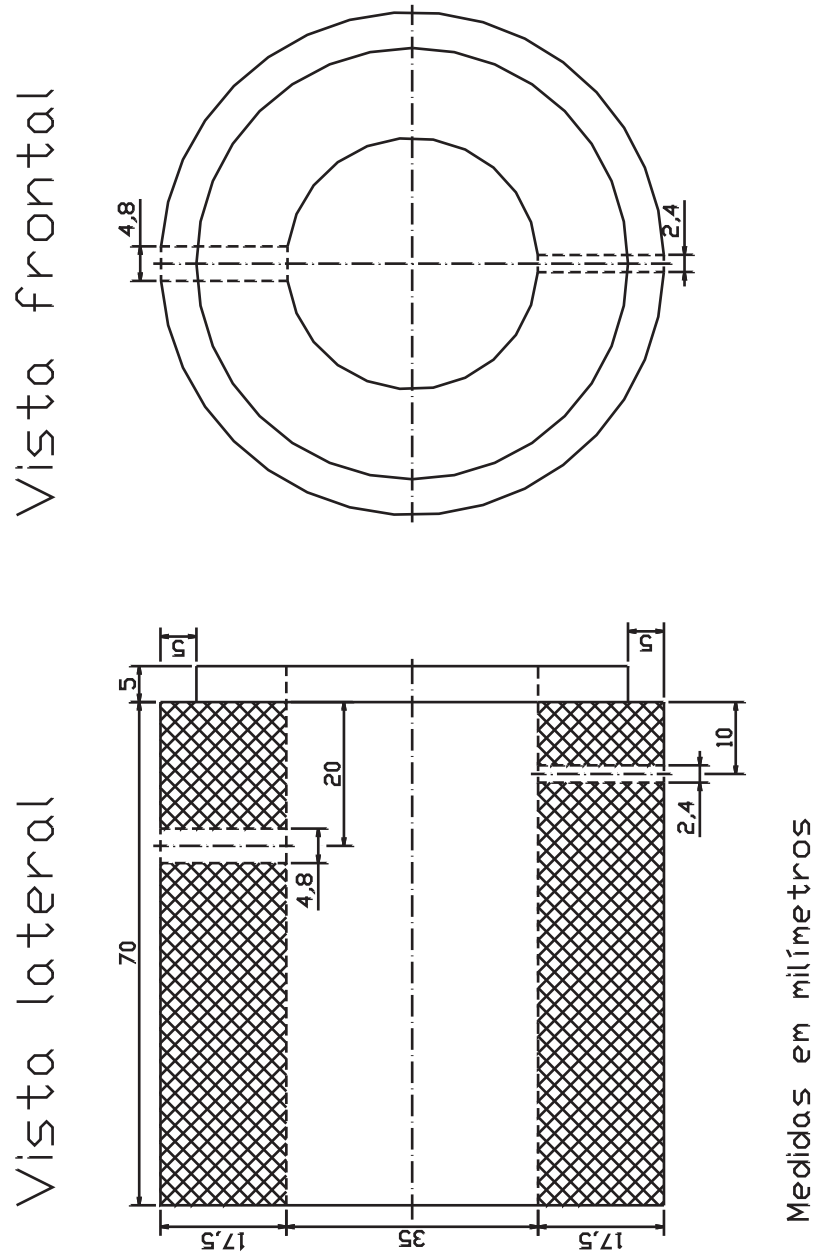


Figura A.1: Peça 1 - Sustentação da estrutura de excitação.

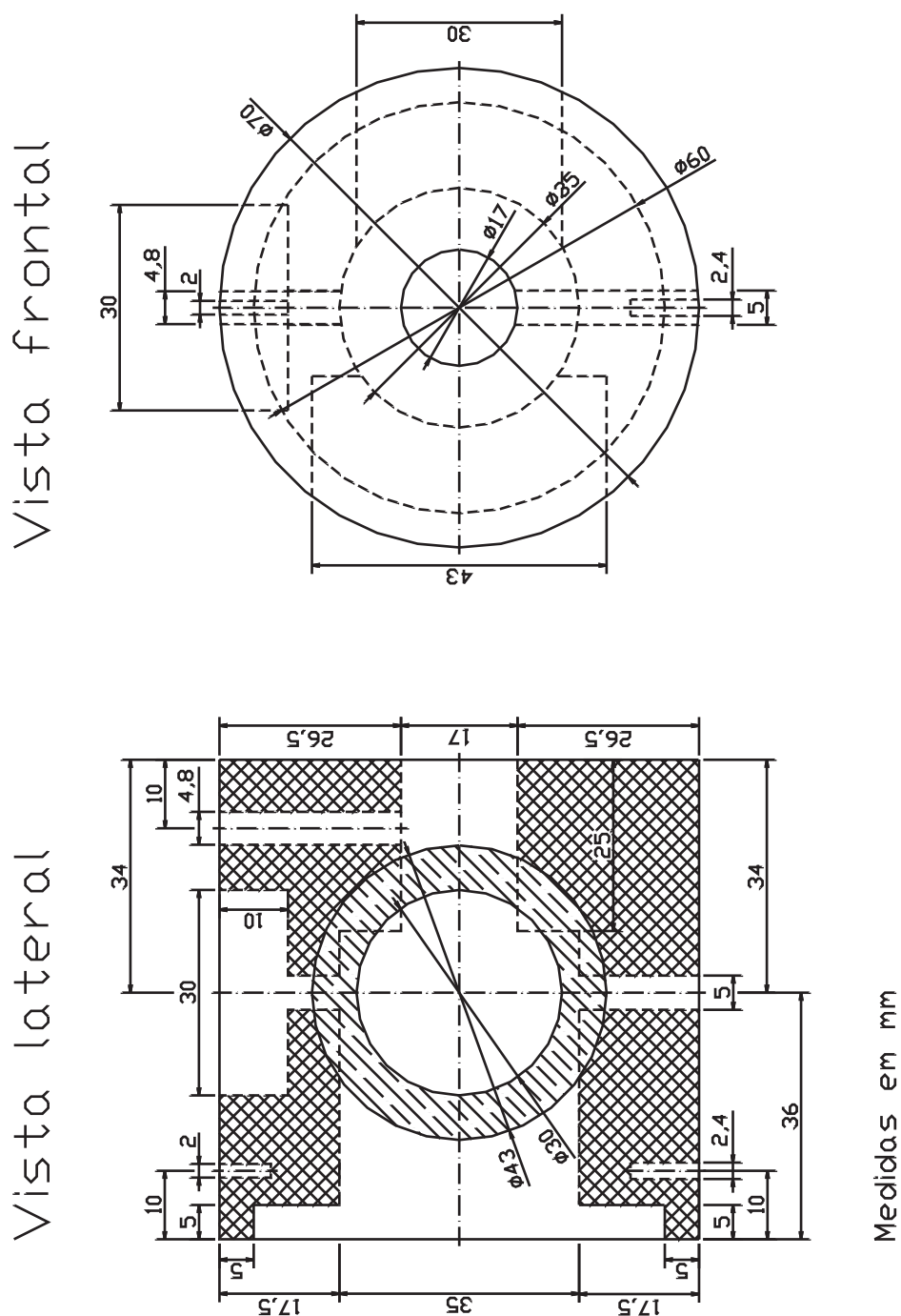


Figura A.2: Peça 2 - Sustentação das estruturas de detecção do sinal do espalhamento direto e do espalhamento lateral, suporte da câmara de focalização hidrodinâmica, escoamento e furo para observação da amostra.

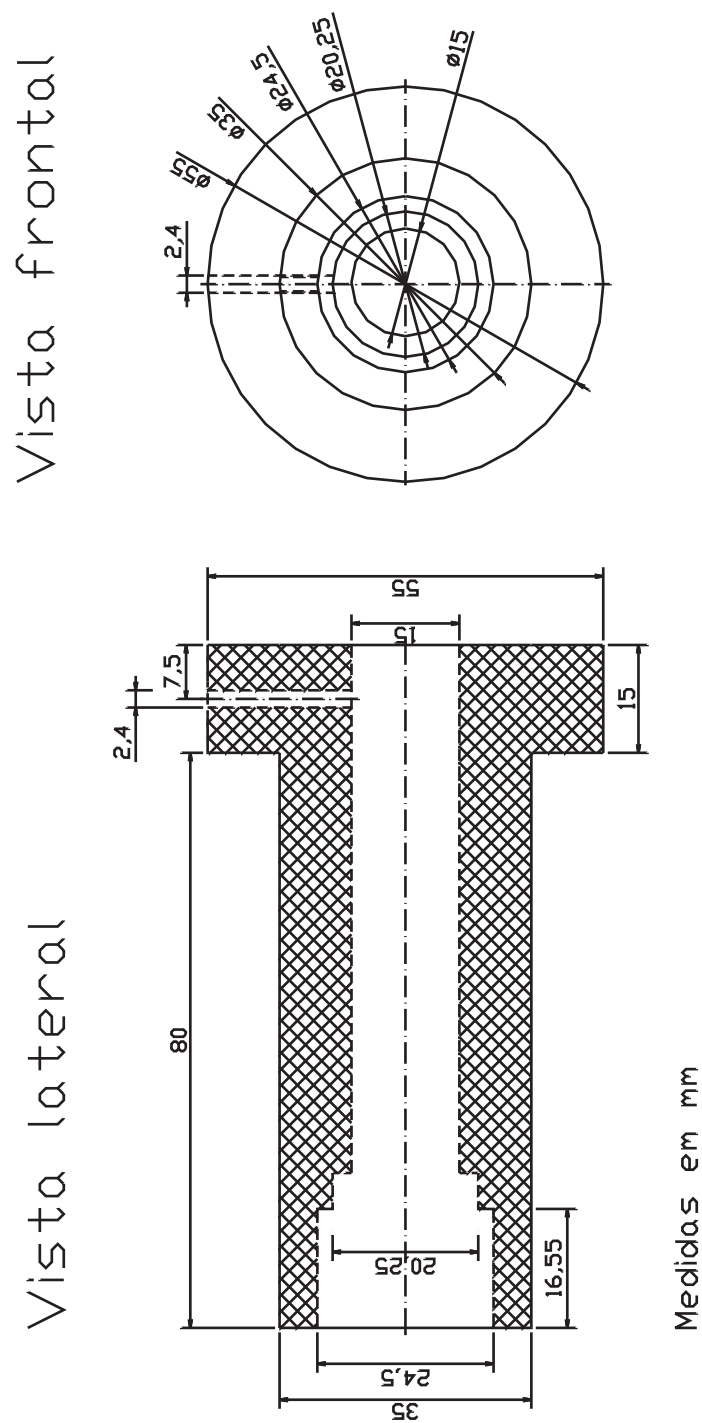
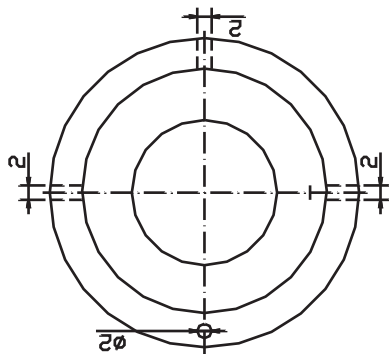
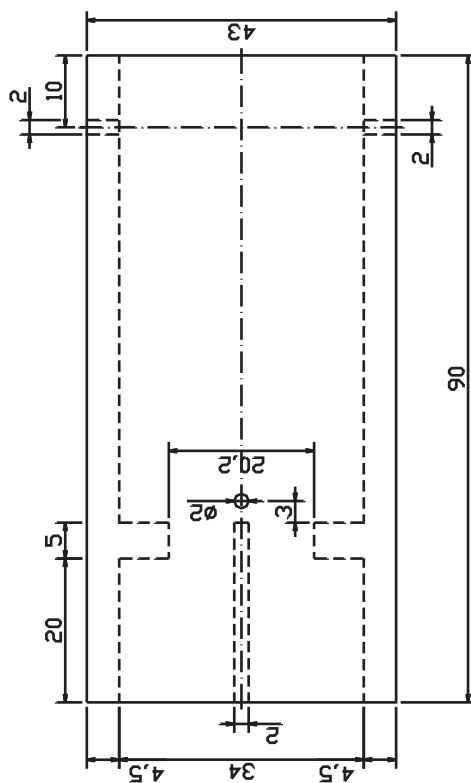


Figura A.3: Peça 3 - Parte externa da estrutura de excitação.

Vista frontal



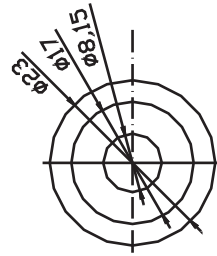
Vista lateral



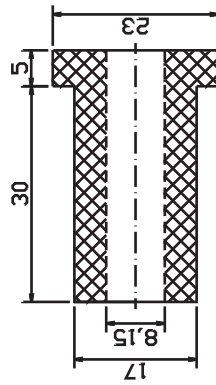
Medidas em mm

Figura A.4: Peça 4 - Estrutura de sustentação da detecção do espalhamento lateral.

Vista frontal



Vista lateral



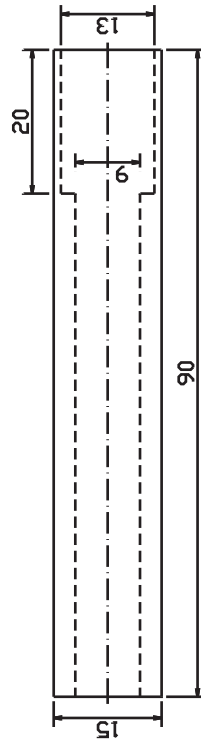
Medidas em mm

Figura A.5: Peça 5 - Estrutura de sustentação da detecção do espalhamento direto.

Vista frontal



Vista lateral



Medidas em mm

Figura A.6: Peça 6 - Apoio do módulo *laser*.

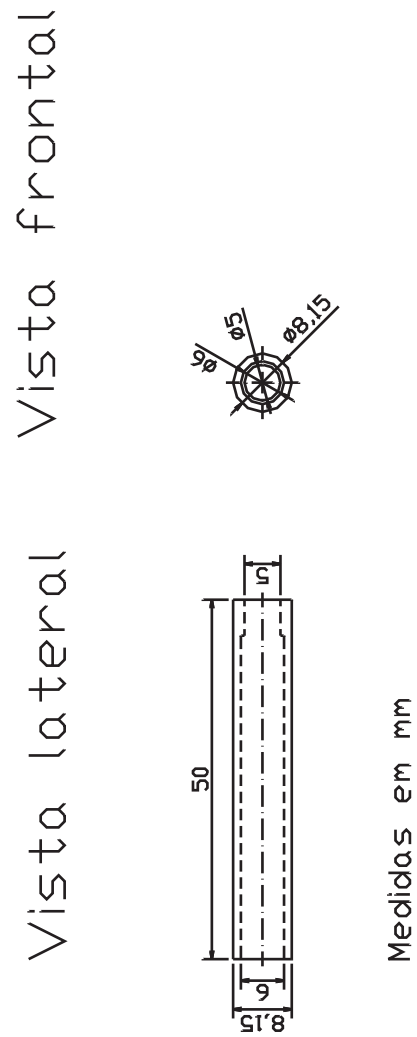


Figura A.7: Peça 7 - Apoio do fotodiodo.

Apêndice B

Ilustrações complementares

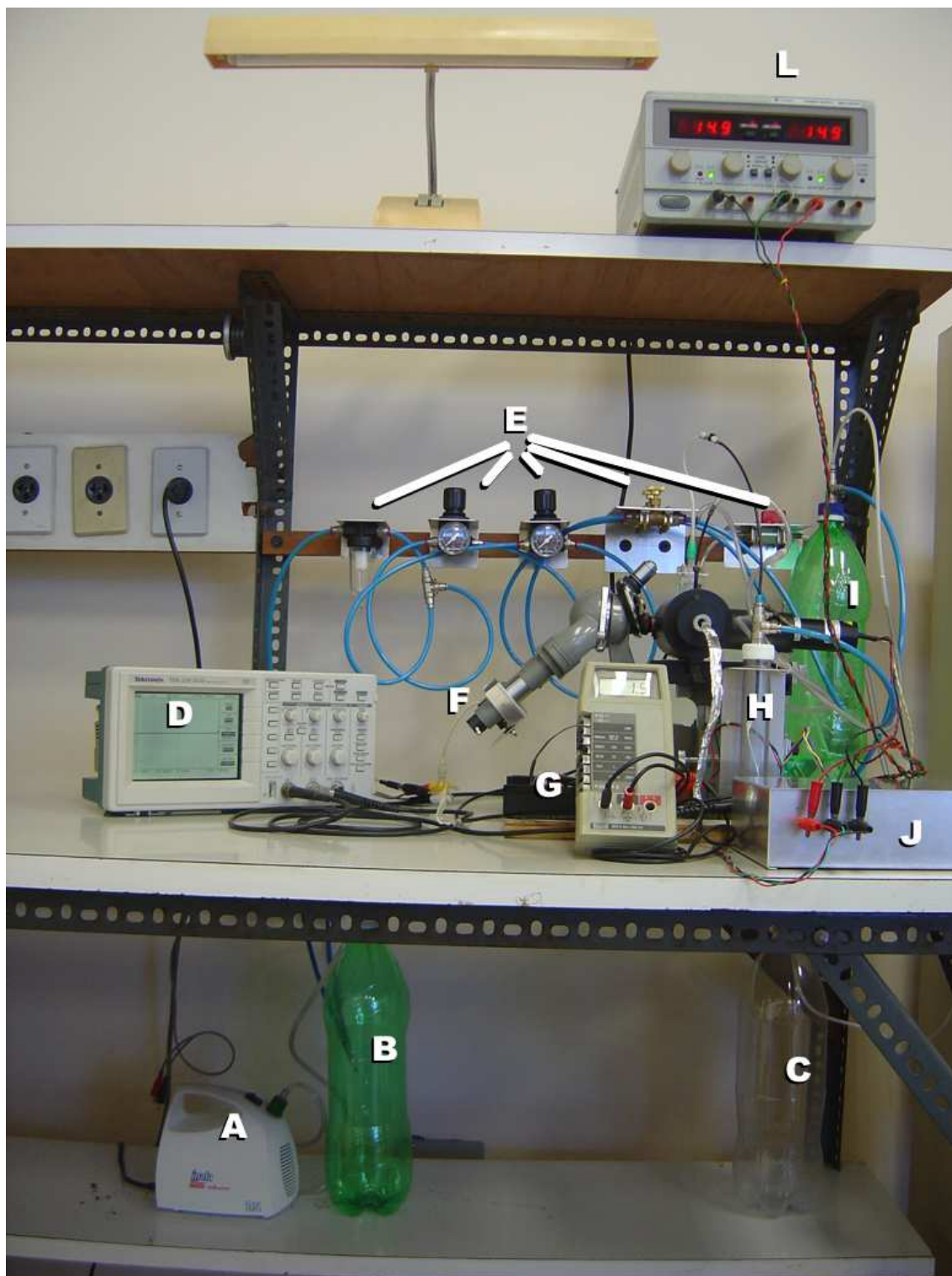
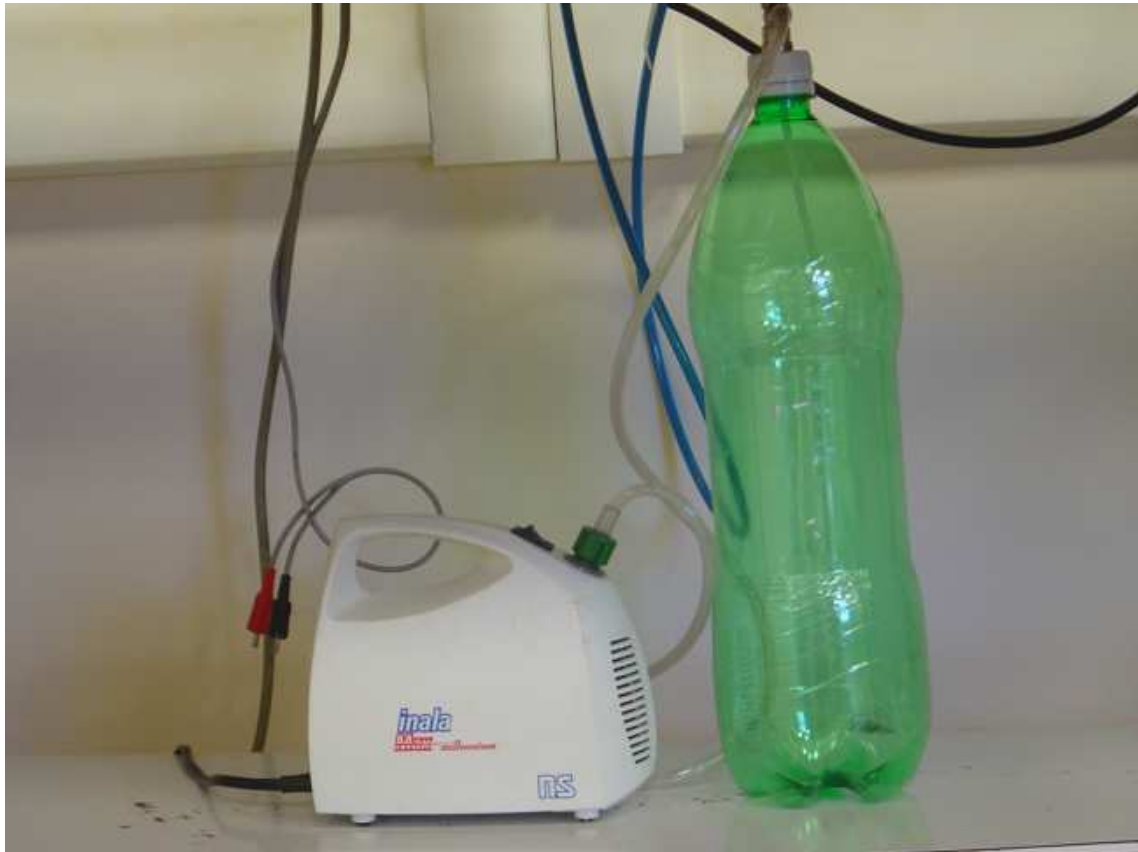


Figura B.1: Citômetro de fluxo monoparamétrico. (A) Compressor; (B) Vaso de pressão; (C) Vaso de despejo; (D) Osciloscópio; (E) Filtro da ar e controles pneumáticos e hidráulico; (F) Câmera de vídeo; (G) Circuito de proteção e controle do *laser*; (H) Vaso da amostra; (I) Vaso do fluido de revestimento; (J) Circuitos de condicionamento de sinais; (L) Fonte de alimentação dos circuitos.



A

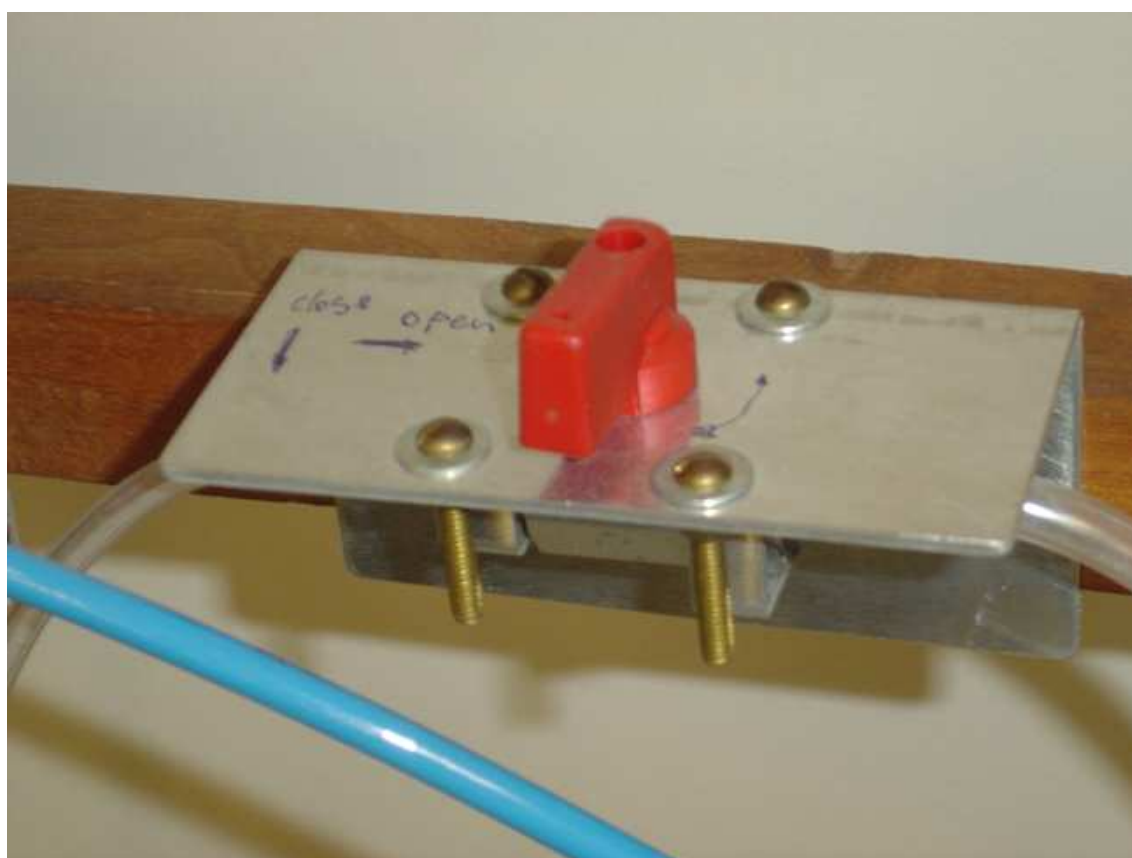


B

Figura B.2: Detalhes: (A) Compressor e vaso de pressão; (B) Filtro de ar e reguladores de pressão.



A



B

Figura B.3: Detalhes: (A) Válvula de fechamento dos vasos do fluido de revestimento e da amostra; (B) Válvula de despejo.

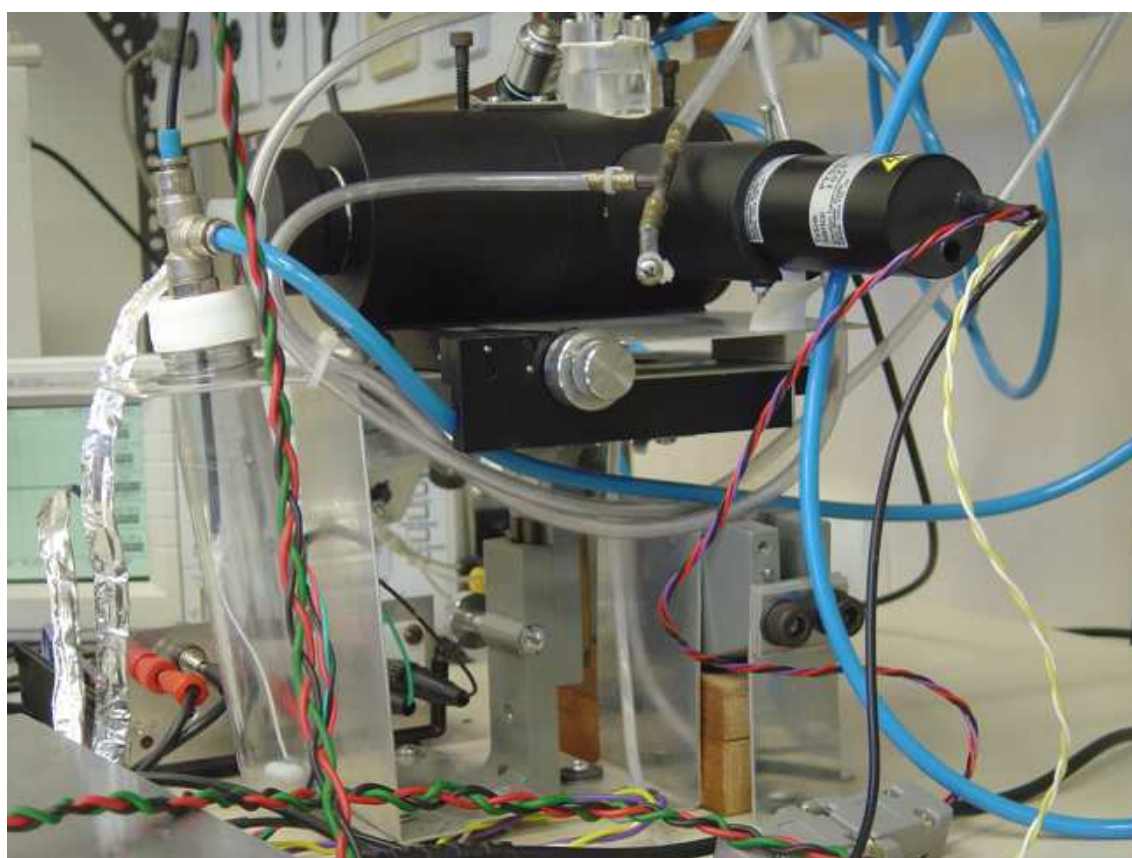
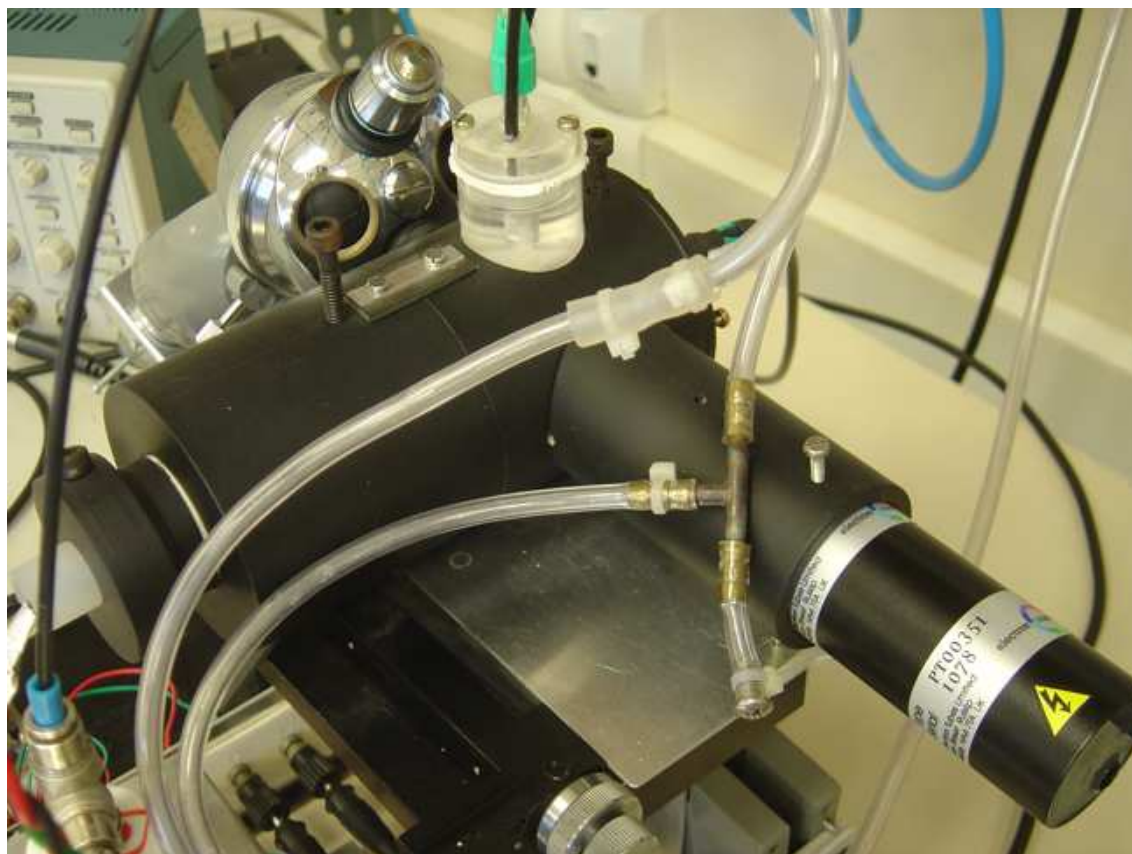
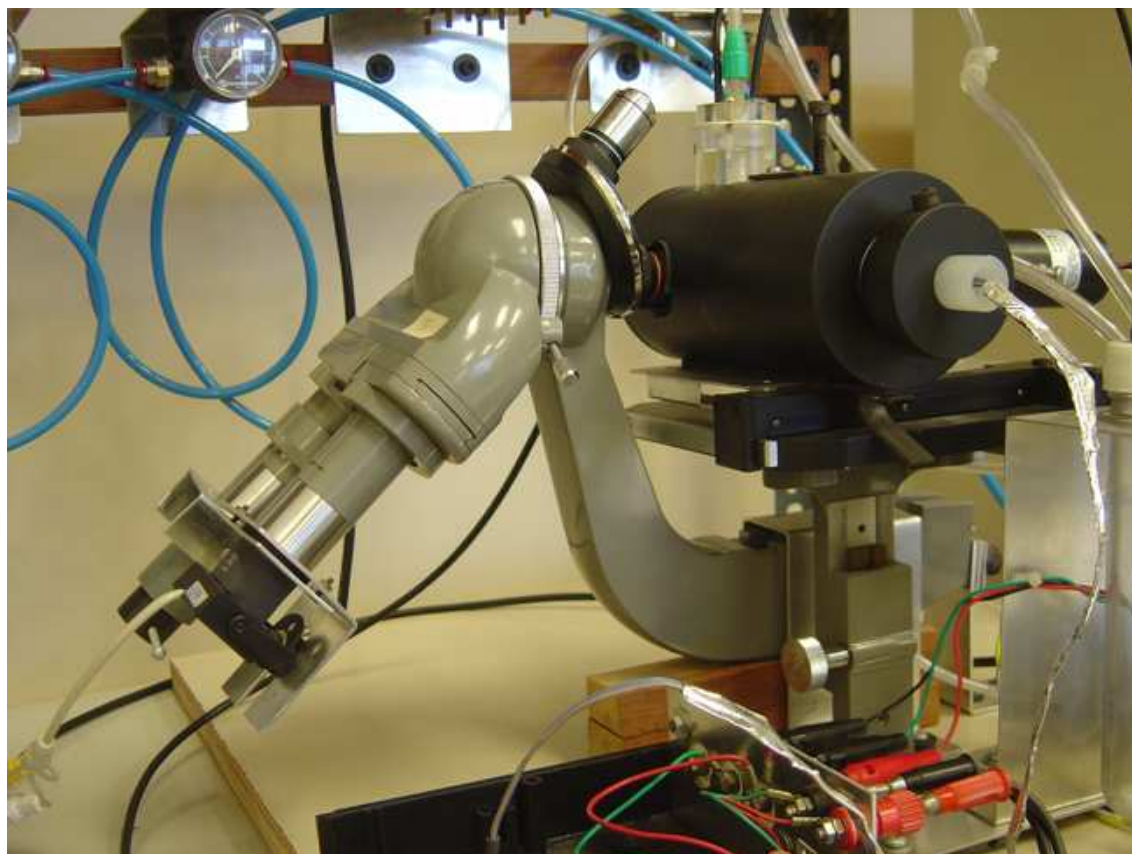
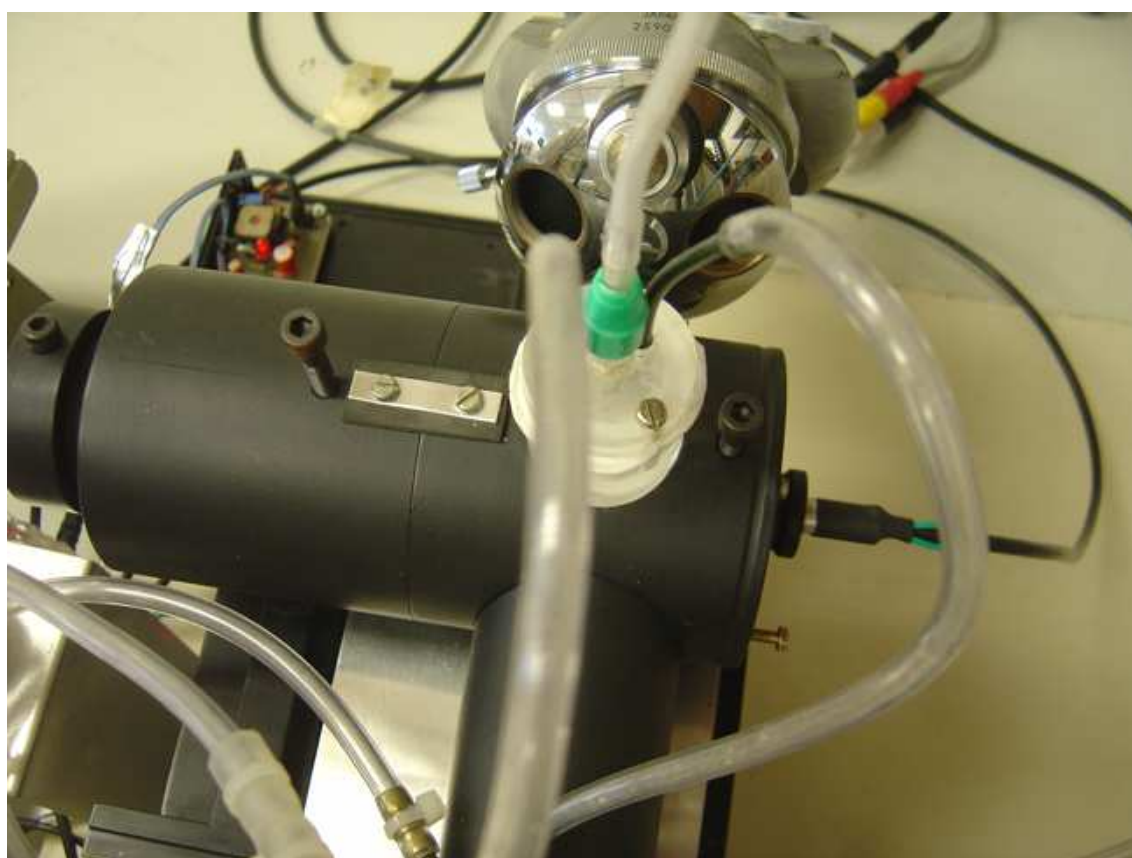


Figura B.4: Vistas laterais do corpo do citômetro de fluxo monoparamétrico ressaltando o tubo fotomultiplicador.



A



B

Figura B.5: Vistas do citômetro de fluxo monoparamétrico. (A) (Frontal) Detalhe do microscópio adaptado com a câmera de vídeo fixada na ocular; (B) (Superior) Detalhe sensor de espalhamento frontal à direita.

Apêndice C

Protocolo para injeção de amostra

O processo de inicialização do sistema é complicado e exige certos cuidados por parte do operador para que a CFH não seja tomada por completo pela amostra, para que a focalização hidrodinâmica funcione adequadamente e para que os componentes eletrônicos não sejam danificados. Para isso é preciso seguir uma ordem definida no acionamento dos sistemas pneumático e hidráulico e eletrônico. O roteiro descrito a seguir lista as etapas necessárias para o bom funcionamento do citômetro de fluxo monoparamétrico.

1.Estado Inicial:

O sistema pneumático e hidráulico deve estar com pressão interna igual à pressão atmosférica. Os reguladores de pressão devem estar ajustados para o nível de pressão nulo ou o mais baixo possível. Os vasos da amostra e do fluido de revestimento precisam estar hermeticamente fechados e devem conter os seus respectivos fluidos. As válvulas pneumáticas e hidráulicas devem estar fechadas. A fonte de alimentação dos circuitos deve estar desligada. e a câmera de vídeo e o computador com a placa de aquisição já devem estar ligados.

2.Pressurização do sistema:

O compressor é acionado e todas as válvulas permanecem fechadas por, pelo menos, 5 minutos. Em seguida os dois reguladores de pressão são ajustados para um valor próximo de 2psi . A válvula de escape é aberta e em seguida

a válvula de fechamento do vaso do fluido de revestimento é aberta. Isso fará com que a CFH seja preenchida com o fluido de revestimento, expulsando possíveis bolhas de ar. Depois de alguns segundos (3 ou 4), a válvula de escape é fechada novamente. Nesse instante o fluido de revestimento irá penetrar no capilar e no vaso da amostra. O conduto da amostra pode estar cheio de ar e por isso é necessário que o seu interior seja preenchido com líquido. Como o líquido utilizado para diluir a amostra é o mesmo do fluido de revestimento, não há problema nessa mistura. Para ter certeza de que todo conduto está preenchido, deve-se permitir que 0,5 ml fluam da CFH até o vaso da amostra. E para não modificar a diluição planejada para o estudo, o tubo de ensaio deve conter 0,5 ml a menos no momento do preparo da amostra. Quando o volume atingir o nível recomendado, a válvula de fechamento do vaso da amostra é aberta e o fluxo de fluido de revestimento é interrompido uma vez que os dois reguladores estão ajustados para a mesma pressão. A partir de agora, todo o líquido que entra na CFH sairá pelo linha de condução para o capilar.

3. Ajuste da focalização hidrodinâmica:

Depois que os dois vasos estão pressurizados e o capilar está cheio de líquido, a fonte de alimentação dos circuitos deve ser ligada, acionando o *laser* e os amplificadores. Com a iluminação do *laser* é possível observar pelo monitor da câmera o capilar na região onde as partículas serão iluminadas. E é por meio dessa informação visual que a focalização hidrodinâmica será ajustada. Nesse momento, duas situações são possíveis: nenhum espalhamento de luz é observado no interior do capilar, assim como nenhum sinal visto no osciloscópio; ou há espalhamento excessivo no interior do capilar. Na primeira situação, a pressão do vaso da amostra deve ser aumentado por pequenos incrementos com intervalos de aproximadamente 30 segundos entre eles, pois o sistema se estabiliza lentamente. Na segunda situação, a pressão do vaso do fluido de revestimento deve ser incrementado, com os mesmos cuidados, para diminuir a quantidade de amostra injetada na CFH. Não se deve tentar decrementar

a pressão dos vasos, pois os reguladores possuem uma histerese que exige de um movimento considerável do manipulador para iniciar o decréscimo de pressão. Caso o incremento seja excessivo, deve-se compensar com o acréscimo da pressão do outro vaso. Quando for observado um espalhamento de luz concentrado no centro do capilar, entende-se que a focalização hidrodinâmica está satisfatória.

4. Aquisição:

No momento em que a focalização hidrodinâmica está ajustada, dá-se início à aquisição de dados. Quando o conteúdo da amostra está próximo de acabar, a aquisição é interrompida e os dados obtidos são gravados no computador.

5. Finalização:

Depois de interrompida a aquisição, fecha-se a válvula do vaso da amostra e depois a válvula do vaso do fluido de revestimento para suspender a pressurização destes recipientes. O fluido de revestimento irá novamente preencher o vaso da amostra. Quando retornarem aproximadamente 2 ml de líquido para o vaso da amostra, abre-se a válvula de escape, e com isso o vaso da amostra pode ser aberto para um novo ensaio.