

DESENVOLVIMENTO DE UM CITÔMETRO DE FLUXO BIPARAMÉTRICO

Henrique Thadeu Baltar de Medeiros Cabral Moraes

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. Alexandre Visintainer Pino, D.Sc

Prof. Frederico Caetano Jandre de Assis Tavares, D.Sc

Dr. Luiz Carlos Guedes Valente, D.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

SETEMBRO DE 2008

MORAES, HENRIQUE THADEU BALTAR DE
MEDEIROS CABRAL

Desenvolvimento de um Citômetro de
Fluxo Biparamétrico [Rio de Janeiro] 2008

XIX, 113 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc.,
Engenharia Biomédica, 2008)

Dissertação - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, COPPE

1. Citometria de Fluxo

2. Citômetro de Fluxo

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

À minha avó Maria Thereza, *in memoriam*,
e aos meus pais, sem os quais não
realizaria este mestrado.

Agradeço...

... à minha avó Maria Thereza, *in memoriam*, a qual deu grandes contribuições em me tornar o que sou; às fontes “paitrocinadoras”, Manoel e Carolina, pelo suporte à realização do meu mestrado e sem os quais esta dissertação não existiria; à minha irmã Heloisa pela paciência em ler e revisar a dissertação, mesmo “sem entender metade”; à família luso-brasileira, Deolinda e Cabral, que me apoiou como se eu fosse um filho; aos orientadores pelas inúmeras horas despendidas – e não desperdiçadas – orientando, ensinando e ajudando no trabalho; aos amigos e colegas-amigos de laboratório pelo apoio moral, social e até mesmo técnico; aos professores que me fizeram enxergar o universo com outros olhos; ao prof. Marcão do Laboratório de Ultra-Som pelos conselhos nas preparações das amostras; ao Luciano do Laboratório de Engenharia Pulmonar pelas contribuições na parte hidráulica; ao Diniz do almoxarifado; aos funcionários da secretaria do PEB por cuidarem da burocracia inerente ao mestrado; ao Jocimar da Silva Tinoco e aos outros integrantes da Oficina de Hialotecnica do Instituto de Química da UFRJ pela fabricação dos tubos capilares; ao prof. Cláudio Lenz Cesar pela ajuda nos experimentos de calibração do *laser* no Instituto de Física da UFRJ; à Alessandra de Paiva Granato pela realização de experimentos com o FACScan na Unidade Multiusuário de Citometria de Fluxo da UFRJ; ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro pessoal e de novo ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

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

DESENVOLVIMENTO DE UM CITÔMETRO DE FLUXO BIPARAMÉTRICO

Henrique Thadeu Baltar de Medeiros Cabral Moraes

Setembro/2008

Orientadores: Márcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Programa de Engenharia Biomédica

A citometria de fluxo é uma técnica automatizada para medição de propriedades físico-químicas de partículas e células individualmente, que possui diversas aplicações desde análises clínicas até o desenvolvimento de novas drogas e vacinas. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um citômetro de fluxo biparamétrico excitado por um *laser* de 635 nm e 5 mW de potência nominal, o qual mede as intensidades dos espalhamentos frontal e lateral do *laser* devido à passagem de partículas pelo sítio de observação. Especificamente, foram desenvolvidos ou melhorados os sistemas eletrônicos relacionados ao controle do *laser* e à captação da intensidade luminosa dos espalhamentos frontal e lateral, assim como foi desenvolvido um programa para aquisição dos histogramas de alturas de pulsos associados a estes dados. Resultados obtidos com amostras contendo microesferas de 6 e 10 μm de diâmetro indicam que o protótipo é capaz de medir adequadamente o espalhamento frontal, fornecendo resultados comparáveis aos de um citômetro de fluxo comercial. Entretanto, o sistema de medição do espalhamento lateral apresentou baixa relação sinal-ruído, necessitando aperfeiçoamentos adicionais.

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

DEVELOPMENT OF A BIPARAMETRIC FLOW CYTOMETER

Henrique Thadeu Baltar de Medeiros Cabral Moraes

September/2008

Advisors: Márcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Biomedical Engineering Program

The flow cytometry is an automated technique to assess physical and chemical properties of particles and cells one by one, which has plenty of applications from clinical diagnosis to development of new drugs and vaccines. This study aimed at the development of a biparametric flow cytometer excited by a 635 nm laser with 5 mW of nominal power, which measures intensities of forward and side laser scatterings due to the passage of particles through an observation site. Specifically, the work concerns developing and improving electronic circuits related to the laser control and to the acquisition of the light intensity of the forward and side scatterings, as well as on the development of a software for acquiring pulse heights associated with these data. Achieved results for samples with microspheres of 6 and 10 μm of diameter show that the prototype can properly measure the forward scattering, providing comparable results to the ones obtained using a commercial flow cytometer. However, the side scattering measurement system showed a low signal-to-noise ratio, needing further improvements.

Sumário

Sumário	vii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xviii
Lista de Abreviaturas	xix
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 Objetivo	4
1.1.1 Geral	4
1.1.2 Específicos	4
Capítulo 2	6
Fundamentos de Citometria de Fluxo	6
2.1 Histórico	6
2.1.1 No Brasil	13
2.2 Conceitos Gerais de Citometria de Fluxo	15
2.2.1 Célula de Fluxo	17
2.2.2 Sistema de Injeção dos Fluidos	21
2.2.3 Óptica	21

2.2.3.1	Fontes de Excitação.....	21
2.2.3.2	Fluorocromos.....	23
2.2.3.3	Filtros Ópticos.....	24
2.2.3.4	Divisores de Feixe e Espelhos Dicroicos.....	24
2.2.3.5	Fotodetectores.....	25
2.2.4	Aquisição de Dados.....	27
2.2.4.1	Condicionadores de Sinais.....	27
2.2.4.2	Analizador de Altura de Pulso.....	29
2.2.5	Exibição de Dados.....	31
Capítulo 3.....		33
Materiais e Métodos.....		33
3.1	O Citômetro de Fluxo Biparamétrico.....	33
3.1.1	Sistema de Condução dos Fluidos.....	34
3.1.1.1	Eletroválvula Pneumática VSO-EP.....	36
3.1.2	Célula de Fluxo.....	38
3.1.3	Montagem Óptica.....	40
3.1.4	Sistema de Excitação.....	42
3.1.4.1	Circuito de Alimentação e Controle do <i>Laser</i>	42
3.1.5	Espalhamento Frontal.....	44
3.1.5.1	Pré-Amplificador de Carga.....	44
3.1.5.2	Amplificador Conformador.....	46
3.1.6	Espalhamento Lateral.....	47
3.1.6.1	Tubo Fotomultiplicador 9113B em montagem P25A.....	48
3.1.6.2	Amplificador Conformador.....	49
3.1.7	Alimentação dos Circuitos do <i>Laser</i> e de Condicionamento de Sinais..	51
3.1.8	Sistema de Aquisição.....	53

3.1.8.1	Placa <i>PHA</i>	53
3.1.8.2	<i>Software</i> de Aquisição e Apresentação de Dados.....	53
3.2	Critérios de Avaliação	54
3.2.1	Avaliação da Eletrônica	55
3.2.1.1	Eletroválvula Pneumática.....	55
3.2.1.2	<i>Laser</i>	55
3.2.1.3	Espalhamento Frontal: Pré-Amplificador de Carga.....	56
3.2.1.4	Espalhamento Frontal: Amplificador Conformador	58
3.2.1.5	Espalhamento Lateral: Amplificador Conformador	58
3.2.2	Avaliação do Citômetro de Fluxo Biparamétrico	59
3.2.2.1	Focalização Hidrodinâmica	59
3.2.2.2	Espalhamento Frontal	59
3.2.2.3	Espalhamento Lateral	60
Capítulo 4	62
Resultados	62
4.1	Avaliação da Eletrônica.....	62
4.1.1	Eletroválvula Pneumática	62
4.1.2	<i>Laser</i>	63
4.1.3	Espalhamento Frontal: Pré-Amplificador de Carga.....	67
4.1.3.1	Caracterização de Componentes Discretos	67
4.1.3.2	Sensibilidade.....	69
4.1.4	Espalhamento Frontal: Amplificador Conformador	71
4.1.5	Espalhamento Lateral: Amplificador Conformador.....	73
4.2	Avaliação do Citômetro de Fluxo Biparamétrico	75
4.2.1	Focalização Hidrodinâmica	75

4.2.2	Espalhamento Frontal	76
4.2.2.1	Distância entre capilar e lente do fotodiodo: 0,5 cm	77
4.2.2.2	Distância entre capilar e lente do fotodiodo: 2 cm	79
4.2.2.3	Experimentos com o FACScan	81
4.2.3	Espalhamento Lateral.....	82
4.2.3.1	Experimentos com o FACScan	84
Capítulo 5	86
Discussão	86
Capítulo 6	91
Conclusão	91
Referências Bibliográficas	94
Circuito de Controle do <i>Laser</i>: Potência e Realimentação	101
Suporte do <i>Laser</i> e da Lente de Focalização	105
Pré-Amplificador com Malhas de Capacitores e Resistores em T	106
Análise do Amplificador do Espalhamento Lateral	109
Estrutura Interna do <i>Software</i> de Aquisição e Apresentação de Dados	111

Índice de Figuras

Figura 2.1: Montagem do microscópio utilizado por Antoni van Leeuwenhoek (extraída de VISION).....	7
Figura 2.2: Pesquisador trabalhando em câmara aerobiológica com aerossóis microbiais e propagação de doenças em <i>Camp Detrick</i> . (extraída de COVERT, 2000).....	9
Figura 2.3: Visualização por um microscópio de um hemocitômetro com células de <i>Candida glabrata</i> (adaptada de FIDEL JR. <i>et al.</i> , 1999).	11
Figura 2.4: Diagrama do FACS apresentando o sistema de condução dos fluidos, o laser de excitação, o detetor de espalhamento frontal, o do espalhamento lateral e as placas de deflexão, responsáveis pela separação eletrostática (adaptada de HERZENBERG <i>et al.</i> , 1976 <i>apud</i> HERZENBERG <i>et al.</i> , 2002).....	13
Figura 2.5: Primeiro citômetro de fluxo no Brasil: o <i>cell sorter</i> EPICS 751 (Beckman Coulter, EUA) (extraída do sítio do PFCF-Fiocruz, <i>vide</i> BERTHO nas referências). 14	
Figura 2.6: Diagrama de blocos simplificado de um citômetro de fluxo, apresentando o sistema hidráulico que impele a amostra e o líquido de revestimento, a fonte luminosa de excitação e os detectores de espalhamentos e/ou luminescências com seus respectivos condicionadores de sinais. Em seguida, a placa de aquisição e o sistema digital para exibição e análise de dados.....	15
Figura 2.7: Exemplo de citômetro de fluxo. Neste aparelho se verifica um fotodiodo para detecção do espalhamento frontal, um <i>PMT</i> para o espalhamento lateral e outro para uma cor de fluorescência (adaptada de WANDERLEY, 2006, p. 11). ...	17
Figura 2.8: Câmara de focalização hidrodinâmica terminada em capilar. A região por onde passam a amostra e o fluido de revestimento é afilada até a entrada no capilar. Com as vazões adequadas para cada um dos líquidos, ocorre a focalização	

hidrodinâmica, ou seja, o enfileiramento das partículas dentro do capilar (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 12).....	18
Figura 2.9: Célula de fluxo mostrando a aceleração do fluido. A_1 e A_2 são as áreas das secções transversais, v_1 e v_2 são as velocidades médias nestas secções.	20
Figura 2.10: Gráfico da pressão dentro da câmara de focalização hidrodinâmica <i>versus</i> a velocidade média numa secção transversal do fluido no capilar ou na saída do bico injetor. O círculo indica a velocidade de 10 m/s e pressão de 50 kPa, ou 7,3 psi.	20
Figura 2.11: Comprimentos de onda de diversos tipos de <i>lasers</i> (extraída de WIKIPEDIA).	23
Figura 2.12: Estrutura interna de um fotomultiplicador. Um fóton entra pela janela no lado esquerdo e atinge o fotocatodo, de onde arranca um elétron. Este elétron é acelerado por uma tensão até um dinodo, de onde arranca outros elétrons, os quais são acelerados até o próximo dinodo e assim sucessivamente até o anodo (extraída de LIP).	26
Figura 2.13: Circuito básico de um pré-amplificador.	27
Figura 2.14: Circuito básico de um detector de pico, apresentando o capacitor onde a altura do pulso de entrada é armazenada.	30
Figura 2.15: Exemplo de representações de dados adquiridos por um citômetro de fluxo: fluorescência a propídio iodado e espalhamento frontal de uma mistura de esporos bacteriais de <i>Bacillus globigii</i> e células do fungo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Em A, tem-se um histograma monoparamétrico; em B, um diagrama de espalhamento, <i>scatter plot</i> ; em C, curvas de níveis; e em D, um histograma biparamétrico (extraída de DAVEY e KELL, 1996).	32
Figura 3.1: Diagrama de blocos do citômetro de fluxo biparamétrico. Abreviaturas: <i>DL</i> , <i>laser</i> de diodo; <i>PD</i> , fotodiodo; <i>PMT</i> , tubo fotomultiplicador; <i>PHA</i> , analisador de altura de pulso.....	33

Figura 3.2: Diagrama do sistema de condução dos fluidos. Legenda: A, compressor; B, derivação T; C, filtro pneumático; D, filtro de ar; E, válvula manual de pressão; F, válvula eletrônica de pressão; G, vaso da amostra; H, vaso do fluido de revestimento; I, câmara de focalização hidrodinâmica; J, válvula de fechamento; L, vaso de rejeito.....	34
Figura 3.3: Alguns dispositivos utilizados para pressurização do sistema. Legenda: A, compressor para pressurizar os vasos da amostra e do fluido de revestimento; B, derivação T; C, garrafa para amortecer flutuações de pressão.	35
Figura 3.4: Alguns dispositivos hidráulicos e para pressurização do sistema. Legenda: D, filtro de ar; E, válvula manual de pressão; F, válvula eletrônica de pressão; J, válvula de fechamento.	35
Figura 3.5: Unidade de controle eletrônico de pressão modelo VSO-EP (Parker, EUA).	37
Figura 3.6: Conector RJ-45 das eletroválvulas e sua fiação.....	37
Figura 3.7: Circuito de alimentação das válvulas pneumáticas.	38
Figura 3.8: Circuito de controle de pressão das eletroválvulas.	38
Figura 3.9: Vista ortogonal lateral da câmara de focalização hidrodinâmica sem capilar nem tampa. As medidas são fornecidas em milímetros (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 45).	39
Figura 3.10: Tampa da câmara de focalização hidrodinâmica e a conexão luer-lok da mangueira com a agulha que conduz a amostra para dentro da câmara (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 48).....	40
Figura 3.11: Montagem óptica do citômetro de fluxo biparamétrico, apresentando o <i>laser</i> de excitação, o sistema de detecção do espalhamento frontal, o de detecção do espalhamento lateral e a <i>webcam</i> acoplada ao microscópio. Abreviaturas: <i>DL</i> , <i>laser</i> de diodo; <i>PD</i> , fotodiodo, <i>PMT</i> , tubo fotomultiplicador.	41
Figura 3.12: Circuito elétrico de alimentação e controle do <i>laser</i> de diodo.....	43

Figura 3.13: Circuito do pré-amplificador de carga utilizado na detecção do espalhamento frontal.....	45
Figura 3.14: Pré-amplificador de carga utilizado na detecção do espalhamento frontal.	46
Figura 3.15: Circuito do amplificador conformador utilizado na detecção do espalhamento frontal.....	47
Figura 3.16: Tubo fotomultiplicador 9113B (Electron Tubes, Inglaterra) utilizado na detecção do espalhamento lateral (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 51).....	48
Figura 3.17: Circuito do amplificador conformador do espalhamento lateral.	50
Figura 3.18: Carregador das baterias de 12 V.	52
Figura 3.19: Alimentação e proteção dos circuitos de sinais e do <i>laser</i>	52
Figura 3.20: Conversor DC-DC de ± 12 V para ± 5 V.....	53
Figura 3.21: Painel frontal do <i>software</i> para controle da placa <i>PHA</i> , captura das alturas dos pulsos relativos às partículas da amostra e apresentação do histograma monoparamétrico.	54
Figura 3.22: Fonte de pulsos de carga para avaliação da sensibilidade do pré-amplificador de carga.	57
Figura 3.23: Configuração do pré-amplificador de carga utilizada para medição da sensibilidade.	57
Figura 4.1: Calibração da válvula 1. Os pontos e a reta de regressão superiores representam a tensão de controle, V_c . Os pontos e a reta de regressão inferiores representam a tensão de monitorização, V_m	62
Figura 4.2: Calibração da válvula 2. Os pontos e a reta de regressão superiores representam a tensão de controle, V_c . Os pontos e a reta de regressão inferiores representam a tensão de monitorização, V_m	63
Figura 4.3: Comprimento de onda emitido pelo <i>laser</i> versus a potência detectada pelo sensor à frente do <i>laser</i>	65

Figura 4.4: Dados do fabricante para o comprimento de onda emitido pelo <i>laser</i> versus a potência.	65
Figura 4.5: Potência detectada pelo sensor à frente do <i>laser</i> versus a corrente no fotodiodo acoplado ao <i>laser</i>	66
Figura 4.6: Corrente no <i>laser</i> versus potência detectada pelo sensor à sua frente.	66
Figura 4.7: Medição de C_1 do pré-amplificador de carga do espalhamento frontal.	67
Figura 4.8: Medição de C_2 do pré-amplificador de carga do espalhamento frontal.	68
Figura 4.9: Medição de C_3 do pré-amplificador de carga do espalhamento frontal.	68
Figura 4.10: Medição do capacitor de teste, C_t , da fonte de pulsos de corrente utilizada na medição da sensibilidade do pré-amplificador de carga projetado no presente trabalho.	69
Figura 4.11: Medição do capacitor de teste, C_t , da fonte de pulsos de corrente utilizada na medição da sensibilidade do pré-amplificador de carga projetado no trabalho anterior (WANDERLEY, 2006).	69
Figura 4.12: Exemplo de tensões no capacitor de teste, canal 1, e na saída do pré-amplificador de carga atual, canal 2. Escala de tempo: 25 μ s; escala de tensão do canal 1: 200 mV; escala de tensão do canal 2: 5 V.	70
Figura 4.13: Exemplo de tensões no capacitor de teste, canal 1, e na saída do pré-amplificador de carga prévio, canal 2. Escala de tempo: 10 μ s; escala de tensão: 500 mV.	71
Figura 4.14: Sensibilidade dos pré-amplificadores de carga atual, curva inferior, e prévio, curva superior.	71
Figura 4.15: Exemplo de pulsos do espalhamento frontal resultantes da passagem de microesferas de 15 μ m de diâmetro nominal pelo citômetro de fluxo. No canal 2, observam-se pulsos na saída do pré-amplificador de carga. No canal 1, observam-se pulsos na saída do amplificador conformador.	72

Figura 4.16: Ganho do amplificador conformador do espalhamento frontal em função da frequência. As retas verticais indicam a frequência de corte, e a horizontal, o ganho acima do qual se tem a banda do amplificador.....	73
Figura 4.17: Exemplo de pulso do espalhamento lateral resultante da passagem de microesfera de 10 µm de diâmetro nominal pelo citômetro de fluxo. No canal 2, observa-se o sinal na saída do pré-amplificador de corrente interno ao <i>PMT</i> . No canal 1, observa-se o sinal na saída do amplificador conformador.....	74
Figura 4.18: Ganho do amplificador conformador do espalhamento lateral em função da frequência. As retas verticais indicam a frequência de corte, e a horizontal, o ganho acima do qual se tem a banda do amplificador.....	75
Figura 4.19: Micrografias do capilar: Em A se verifica o capilar com bolhas de ar e iluminação externa; em B há fluido de revestimento passando; em C ocorre focalização hidrodinâmica; em D ocorre focalização hidrodinâmica de qualidade inferior.....	76
Figura 4.20: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de água destilada por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 10.637.....	77
Figura 4.21: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 6 µm de diâmetro nominal por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 254.034.	78
Figura 4.22: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 10 µm de diâmetro nominal por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 153.226.	79
Figura 4.23: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 6 e de 10 µm de diâmetro nominal por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 308.699.....	79

Figura 4.24: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de água destilada por 5 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 2 cm. Contagem total: 3.054.	80
Figura 4.25: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 6 μm de diâmetro nominal por 5 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 2 cm. Contagem total: 37.095.	80
Figura 4.26: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 10 μm de diâmetro nominal por 5 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 2 cm. Contagem total: 74.851.	81
Figura 4.27: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas pelo citômetro de fluxo FACScan (BD, EUA). À esquerda, observa-se a análise de partículas de 6 μm de diâmetro nominal; e, à direita, a análise de partículas de 10 μm de diâmetro nominal.	82
Figura 4.28: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de água destilada por 5 minutos. Contagem total: 3.143.	83
Figura 4.29: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de microesferas de 6 μm de diâmetro nominal por 5 minutos. Contagem total: 1.333.	83
Figura 4.30: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de microesferas de 10 μm de diâmetro nominal por 5 minutos. Contagem total: 36.214.	84
Figura 4.31: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de microesferas pelo citômetro de fluxo FACScan (BD, EUA). À esquerda, observa-se a análise de partículas de 6 μm de diâmetro nominal; e, à direita, a análise de partículas de 10 μm de diâmetro nominal.	85

Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Funções dos pinos do conector da eletroválvula. 37

Tabela 3.2: Fios do PMT e suas funções..... 48

Tabela 4.1: Valores de calibração do laser: potência detectada, corrente no laser, corrente no fotodiodo acoplado ao laser, e comprimento de onda emitido..... 62

Lista de Abreviaturas

ADC: analog-digital converter, conversor analógico-digital.

COPPE: Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia.

DL: diode laser, laser de diodo.

FACS: fluorescence-activated cell sorter.

Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz.

LED: light-emitting diode, diodo emissor de luz.

Laser: light amplification by stimulated emission of radiation, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação.

LIB: Laboratório de Instrumentação Biomédica.

PD: photodiode, fotodiodo.

PEB: Programa de Engenharia Biomédica.

PHA: pulse height analyser, analisador de altura de pulso.

PMT: photomultiplier tube, tubo fotomultiplicador.

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Capítulo 1

Introdução

O início da microbiologia pode ser atribuído a Louis Pasteur (1822-1895), quem – no final do século XIX – revolucionou a vida moderna com seus estudos sobre fermentação alcoólica, concluindo que era um processo microbiológico (BARNETT, 2003; PASTEUR). Participou também de estudos importantes desde a fabricação de cerveja até a de antibióticos. Mais adiante, criou a teoria dos germes para as doenças (BARNETT, 2003; MILLER *et al.*, 2005; PASTEUR), o que conduziu à criação dos métodos de esterilização e assepsia (PASTEUR). A partir daí e com o surgimento de outras tecnologias – como microscopia, corantes e fluorocromos¹ –, algumas doenças passaram a ter diagnóstico e prevenção relacionados à observação de células e verificação de organismos parasitas no sangue.

Atualmente vários diagnósticos dependem de técnicas de investigação celular, como é o caso do exame de Papanicolaou², o qual é usado na prevenção e detecção de câncer de colo uterino e no diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis, DSTs (ANDRADE e PARADA, 1987; GARCÍA, 2005). Outro exemplo de exame citológico é a estimativa de concentrações de células específicas nos exames de sangue para avaliação do estado geral da saúde (SHAPIRO, 2003, p. 77-78). Ademais, para se reduzir a possibilidade de doador e receptor desfavoráveis nos transplantes, procuram-se anticorpos específicos nos linfócitos por intermédio de

¹ Fluorocromo: marcador fluorescente, detalhado no Capítulo 2.

² Exame de Papanicolaou: também conhecido como colpocitologia oncótica (GREENWOOD, 2006). O nome Papanicolaou deriva de seu inventor, o grego Georgios Nicholas Papanicolaou (1883-1962).

marcadores fluorescentes (BENINI, 1997). Até mesmo o conteúdo celular de ácidos nucleicos passou a ser estimado, com a finalidade de se determinar o estado funcional de células (CUI *et al.*, 2003) e diagnosticar tumores e cânceres (BARLOGIE *et al.*, 1983; CUI *et al.*, 2003).

Todas essas possibilidades clínicas são de suma importância para a saúde pública, fazendo com que se torne importante para qualquer país dominar os vários aspectos da chamada engenharia biológica ou biotecnologia.

Apesar de muito se ter feito no país em relação à imunização em massa com os programas de erradicação de doenças e programas regulares de vacinação (GADELHA e AZEVEDO, 2003), é importante almejar-se o domínio de toda a tecnologia envolvida desde o diagnóstico das doenças até a produção dos medicamentos e vacinas. No Instituto Butantan e em Bio-Manguinhos, unidade da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz –, produzem-se vacinas, soros, reagentes e insumos para diagnóstico laboratorial e biofármacos³ (BIO-MANGUINHOS; INSTITUTO BUTANTAN).

Como pode ser visto, vários avanços estão sendo realizados na Fiocruz e no Instituto Butantan, porém os processos ainda são dependentes de tecnologia importada no que concerne à maioria dos equipamentos envolvidos.

Duas das técnicas de observação celular, detecção de parasitas e estimativa de concentrações celulares, são a visualização e a espectrofotometria por meio de um microscópio óptico. Porém a contagem visual de células é um processo impreciso, lento e bastante laborioso (SHAPIRO, 2003, p. 77-78), e a microespectrofotometria por citometria de escaneamento⁴ também é vagaroso (SHAPIRO, 2003, p. 9). Em

³ Biofármaco: proteína ou outra substância química com função medicamentosa advinda de plantas geneticamente modificadas (SPENDELER, 2005).

⁴ Citometria de escaneamento: técnica a qual consiste na análise de células em lâmina microscópica por um fotodetector. A montagem da lâmina tem liberdade de movimento num plano e isto permite que seja escaneada.

contrapartida, existe outro método automatizado, preciso e bastante rápido chamado citometria de fluxo.

Citometria – do gr., métron, instrumento de medição, e kitos, espaço oco, cavidade, célula (FERREIRA, 1999) – é a medição de propriedades físico-químicas de partículas, especialmente células. Entre as propriedades possíveis de serem medidas por um citômetro estão as elétricas, acústicas, ópticas e a emissão de radiação nuclear (SHAPIRO, 2003, p. 1).

A citometria de fluxo é a modalidade de citometria na qual as partículas a terem suas propriedades medidas passam através do sítio de medição impulsionadas pela vazão de um fluido no qual estão imersas. Dependendo do que se deseja medir, é necessário o uso de substâncias específicas – como corantes e luminescentes – com alguma característica mensurável que seja função da propriedade a ser determinada.

A citometria de fluxo possui uma grande quantidade de funções imprescindíveis à biotecnologia, o que a torna bastante importante para a saúde pública, e para o desenvolvimento tecnológico e econômico, tanto que em alguns países é tema ligado à segurança nacional.

Outro fator que torna importante o estudo dos citômetros de fluxo são seus preços, os quais podem variar de US\$ 15.000, para um contador de linfócitos com função de detectar infecção e monitorar seu estado, a mais de US\$ 400.000, no caso dos mais completos *cell sorters* – um tipo de citômetro de fluxo capaz de realizar separação de populações. Isto torna inviável a existência de citômetros em muitos hospitais e clínicas. Além do mais, por não existir no mercado um determinado modelo de equipamento, às vezes faz-se necessário comprar um citômetro de fluxo complexo e caro, mesmo que seja usado para apenas uma aplicação específica.

Torna-se então evidente a necessidade de se investir no desenvolvimento de citômetros de fluxo mais específicos e baratos, almejando-se a possibilidade de haver ao menos um em cada hospital público.

1.1 Objetivo

O Laboratório de Instrumentação Biomédica – LIB – do PEB/COPPE/UFRJ iniciou em 2004 uma linha de investigação no desenvolvimento de citometria de fluxo. Primeiramente projetou-se um citômetro de fluxo monoparamétrico cuja variável medida era a intensidade luminosa frontal e cuja excitação era produzida por um feixe de *laser* semiconductor (WANDERLEY, 2006). Neste trabalho, algumas considerações foram feitas no que concerne à expansão e melhoria do equipamento, sendo apontada claramente a importância da medição do espalhamento lateral com a finalidade de aumentar a funcionalidade do aparelho.

1.1.1 Geral

Diante do acima exposto, o objetivo geral do presente trabalho é desenvolver um sistema biparamétrico de citometria de fluxo, acrescentando ao protótipo do sistema monoparamétrico desenvolvido por WANDERLEY (2006) um sistema de medição de intensidade luminosa ortogonal ao feixe de excitação, assim como realizar melhorias relacionadas às partes hidráulica, eletrônica e fotônica.

1.1.2 Específicos

- 1º: Melhorar o controle de pressão dos fluidos envolvidos na focalização hidrodinâmica por meio da utilização de duas eletroválvulas modelo VSO-EP (Parker, EUA) e de sua eletrônica associada;
- 2º: Realizar melhorias no que concerne à relação sinal-ruído e sensibilidade do pré-amplificador utilizado nas medições do espalhamento frontal;
- 3º: Criar o segundo canal do citômetro de fluxo pela adição do sistema de leitura do espalhamento lateral, utilizando para tal um sistema óptico adequado, o tubo fotomultiplicador 9113B (Electron Tubes, Inglaterra), a eletrônica associada e uma placa analisadora de pulsos;

- 4º: Implementar programa para aquisição e apresentação de dados do citômetro de fluxo;
- 5º: Estabelecer e executar procedimento para validar a focalização hidrodinâmica;
- 6º: Estabelecer e executar experimentos de validação do citômetro de fluxo biparamétrico.

Capítulo 2

Fundamentos de Citometria de Fluxo

Este capítulo tem por objetivo realizar uma breve revisão sobre como surgiu a citometria de fluxo, sua definição e princípios de funcionamento.

2.1 Histórico

Há muito tempo a curiosidade humana sonha em conhecer tanto o macro quanto o microcosmo. Diversas teorias foram criadas na tentativa de predizer o que havia de tão pequeno ou de tão distante que não se podia enxergar, porém muitas eram apenas extrapolações.

Apesar de há pelo menos 4.000 anos se saber que os vidros curvos possuíam algumas propriedades ópticas como a ampliação de imagens e de haver algumas tentativas de observar pequenos objetos por materiais com capacidade de aumento desde o século I (FRADA, 2001 *apud* WANDERLEY, 2006), as lentes só passaram a ser realmente usadas no século XIII, com o uso das “pedras de leitura” e com a invenção de lentes de grau unidas por aros de ferro e rebites (ROCHA). Em seguida, começou-se a estudar a combinação de lentes, o que resultou na invenção do microscópio composto ao final do século XVI e do telescópio na mesma época ou início do próximo século. Não se sabe bem ao certo quando e por quem foram inventados (HOGG, 1871, p. 1).

Em 1673, o holandês Antoni van Leeuwenhoek já havia construído um microscópio simples⁵ com magnificação de até cerca de 270 vezes, com o qual pôde observar pequenas estruturas micrométricas, inclusive diversos tipos de células – foi a própria descoberta das células (PORTER, 1976). Uma ilustração do microscópio utilizado por Leeuwenhoek é mostrada na Figura 2.1.



Figura 2.1: Montagem do microscópio utilizado por Antoni van Leeuwenhoek (extraída de VISION).

Além do desenvolvimento de novas montagens de microscópios, métodos de fixação⁶, corantes ou marcadores, corantes fluorescentes e micrótomos⁷ ajudaram na descrição da morfologia das células e de suas organelas, ou seja, da arquitetura celular. Aí entram diversos nomes como os dos alemães Matthias Jakob Schleiden e Theodor Schwann com a Teoria Celular de 1839 afirmando que a célula é a unidade básica da vida (GEORGE, 2003); o do britânico William Henry Perkin em 1856 que ao acaso descobriu o primeiro corante sintético, a anilina roxa (MURMANN, 2000); o do francês Louis Pasteur que, dentre outras coisas, criou a teoria microbiana das enfermidades infecciosas afirmando que sua origem seria em micróbios, estabeleceu métodos de esterilização e assepsia, aperfeiçoou as técnicas de fermentação (BARNETT, 2003; MILLER *et al.*, 2005; PASTEUR) amplamente utilizadas na produção de álcool, de algumas bebidas alcoólicas, de vinagre e até de antibióticos; o

⁵ Microscópio simples: possui apenas uma lente, ao contrário do microscópio composto.

⁶ Fixação: método de tornar permanente uma imagem fotográfica (DICMAXI, 1998).

⁷ Micrótomo: instrumento para cortar seções de tecido orgânico para exame microscópico (DICMAXI, 1998).

do alemão co-prêmio Nobel de medicina em 1908, Paul Ehrlich (NOBELPRIZE.ORG; SHAPIRO, 2003, p. 74), que estudou o sangue e confirmou a existência de leucócitos acidofílicos ou eosinofílicos, neutrofílicos e basofílicos pelo uso de corantes ácidos e básicos; o do escocês prêmio Nobel de medicina de 1945, Sir Alexander Fleming, descobridor da proteína bacteriolítica à qual deu o nome lisozima e do antibiótico penicilina (NOBELPRIZE.ORG); etc.

A partir do desenvolvimento dos corantes, começou-se a análise clínica das células com a detecção de doenças pelo estudo das células sanguíneas – realizada por Malachowski e Romanowsky em 1891 na identificação da malária (LILLIE, 1978). Apareceram os fluorocromos e passou-se a contar células para estimar as concentrações e avaliar a saúde dos pacientes. Surgiu, destarte, a medição das células, a citometria. As células passaram a ser observadas pelas lentes do microscópio e, mais tarde, surgiu um método automatizado chamado citometria de fluxo.

A citometria de fluxo foi primeiramente descrita por Andrew Moldavan em seu artigo *Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells* publicado no volume 80 da revista *Science* em agosto de 1934 (ADS; BERTHO, [entre 2001 e 2004]; RHODIUS e THIJS, 2003). Ele estabeleceu a idéia de um sensor fotoelétrico contando células coradas, as quais passariam por um capilar. Segundo SHAPIRO (2003, p. 73), o artigo sugere que o autor – até o momento da publicação – não havia obtido êxito com este aparelho. “E em 1941, Kielland patenteou um modelo semelhante ao de Moldavan” (BERTHO, [entre 2001 e 2004]).

Durante a 2ª Guerra Mundial, máscaras de filtro de gás foram aperfeiçoadas para defesa contra armas biológicas. Na mesma época, fotômetros eletrônicos denominados *smoke penetrometers* foram desenvolvidos para medições de concentrações de aerossóis bastante diluídos. No ano de 1944, em *Fort Detrick* – outrora *Camp Detrick*, Figura 2.2 – e na *Harvard Medical School*, GUCKER JR. *et al.* (1947) começaram – com patrocínio do exército dos Estados Unidos – o projeto de um

aparelho que pudesse contar partículas individuais com o intuito de testar filtros de ar e rapidamente identificar bactérias ou esporos usados em armas biológicas. No ano seguinte, estava pronto um dispositivo fotoeletrônico contador de partículas de DOP – dioctil-ftalato, um tipo de polímero – com 0,6 μm de diâmetro mínimo, o qual poderia ser adaptado para diversas outras substâncias ou até mesmo bactérias. O trabalho só foi publicado após a guerra, em 1947, quando deixou de ser considerado confidencial (SHAPIRO, 9, p. 74).



Figura 2.2: Pesquisador trabalhando em câmara aerobiológica com aerossóis microbiais e propagação de doenças em *Camp Detrick*. (extraída de COVERT, 2000).

Em 1948, GUCKER JR. e O'KONSKI (1949) detalharam o método. Consistia na detecção por uma célula fotossensitiva do espalhamento de luz provocado pela passagem de partículas suspensas em ar dentro de um capilar. Além deste método, apresentaram outro, “desenvolvido por Guyton⁸, baseado na colisão de partículas do aerosol eletricamente carregadas com um coletor metálico. Os pulsos elétricos gerados por partículas com pelo menos 2,5 μm eram amplificados para incrementar um contador mecânico. Guyton verificou empiricamente que a amplitude do pulso era proporcional ao quadrado do diâmetro das partículas. Nos dois métodos, contadores poderiam ser aplicados para determinar o tamanho das partículas do aerosol com o

⁸ Arthur C. Guyton, o autor do livro *Tratado de Fisiologia Médica*.

uso de discriminadores elétricos adequados, porém o primeiro aparelho apresentado pode ser usado com partículas ainda menores” (GUCKER JR. e O’KONSKI, 1949).

Na mesma publicação, havia outro artigo relacionado à produção de suspensão de bactérias em aerossóis e também à medida fotoeletrônica de sua concentração, escrito por FERRY *et al.* (1949).

Até a década de 1950, a contagem das células sanguíneas era realizada por observação visual (SHAPIRO, 2003, p. 77): leucócitos – glóbulos brancos, defensores do organismo contra infecções por meio da fagocitose –, eritrócitos – hemácias ou glóbulos vermelhos, responsáveis por trocas gasosas – e trombócitos – ou plaquetas, fragmentos nucleares de megacariócitos responsáveis pela coagulação sanguínea para manter a hemostasia (BERNE e LEVY, 2000, p. 303-304). “Leucócitos eram contados em soluções diluídas em 1:10 com substância para corar seus núcleos e outra a qual provocava lise dos eritrócitos; estes eram contados em diluição de 1:200 em solução salina; e plaquetas eram contadas em diluições de 1:100 num fluido que causava sua turgência⁹ e deixava os eritrócitos translúcidos num microscópio de contraste de fase¹⁰” (SHAPIRO, 2003, p. 77). Essas soluções com células eram postas numa lâmina para microscópio chamada hemocitômetro – criado por Cramer em 1855 (CROSLAND-TAYLOR *et al.*, 1958; VERSO, 1964). O hemocitômetro possui uma matriz de linhas formando retângulos de áreas conhecidas num espaço de altura também conhecida, como mostra a Figura 2.3. Sabendo-se a quantidade de células neste volume e a razão de diluição, pode-se estimar a concentração das células no sangue.

Além deste método ser bastante laborioso, estava sujeito a erros de pipetagem, de volumes descalibrados das câmaras das lâminas e estatísticos de amostragem (SHAPIRO, 2003, p. 77).

⁹ Turgência: estado dilatado da célula ao ser posta em meio hipotônico.

¹⁰ Microscopia de contraste de fase: técnica baseada em difração da luz e retardo de fase descrita em 1934 a qual deu ao físico holandês Frits Zernike o prêmio Nobel de física em 1953 (NOBELPRIZE.ORG; NIKON).

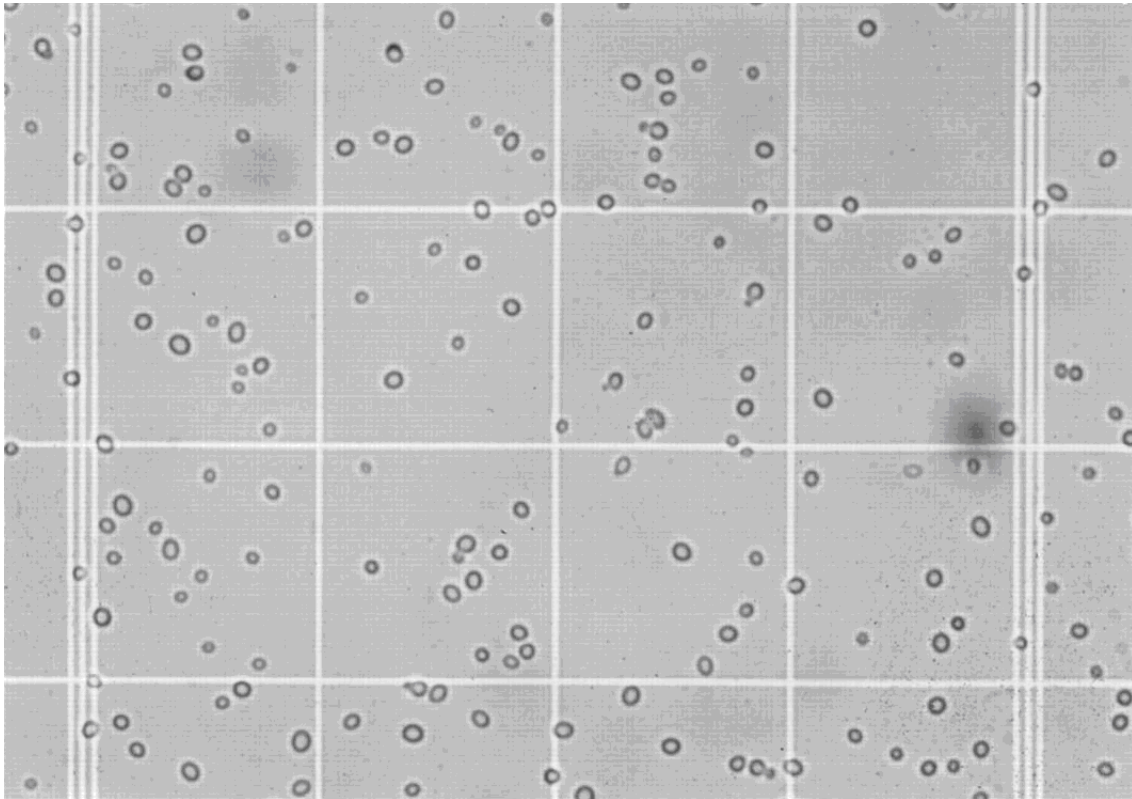


Figura 2.3: Visualização por um microscópio de um hemocitômetro com células de *Candida glabrata* (adaptada de FIDEL JR. *et al.*, 1999).

Em 1949, Wallace H. Coulter patenteou um acurado contador e estimador de tamanhos de células sangüíneas, o *Coulter counter*, baseado na diferença das impedâncias elétricas das células e da solução salina (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; CARTER *et al*, 1968; COULTER, 1953; SHAPIRO, 2003, p. 78).

Em 1953, CROSLAND-TAYLOR publicou um trabalho no qual apresentava um contador de células sangüíneas baseado no mesmo princípio do contador de partículas de GUCKER JR. *et al.* (1947).

“No mesmo ano, Parker e Horst descreveram o primeiro contador diferencial hematológico usando células coradas em vermelho – hemácias – e azul – leucócitos –, luz visível, e detectores para luz vermelha e azul” (BERTHO, [entre 2001 e 2004]).

Em 1965, Kamensky construiu o RCS – *Rapid Cell Spectrophotometer* –, um citômetro de fluxo em que a suspensão com células passava por um canal em lâmina microscópica, e não pela célula de fluxo – a qual será estudada mais adiante. Com este instrumento, mediam-se tamanhos celulares e quantificava-se DNA com o uso de

espectrofotometria. Ainda com o RCS, Kamentsky introduziu a medição multiparamétrica da luz dispersada, sendo o primeiro a usar histogramas biparamétricos em citometria de fluxo (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; SHAPIRO, 2003, p. 84).

Logo após este trabalho ser publicado, ainda em 1965, Fulwyler apresentou o *sorter* eletrostático, o qual separava células por tamanho. Este *sorter* foi baseado na então recente tecnologia das impressoras à jato de tinta, que usava deflexão eletrostática para depositar gotículas de tinta em posições controladas (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; FULWYLER, 1965; SHAPIRO, 2003, p. 85).

Em 1967, Kamentsky e Melamed descreveram um *sorter* pneumático de seringa injetora com o qual puderam remover células selecionadas para exame e verificar o desempenho do RCS (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; SHAPIRO, 2003, p. 84).

Em 1972, foi publicado um trabalho no qual BONNER *et al.* apresentaram o *FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorter* –, um tipo de *sorter* em que as células eram marcadas com fluorocromos, iluminadas por um feixe de *laser* e eram medidos o espalhamento frontal e a fluorescência (HERZENBERG *et al.*, 2002). No *FACS*, as células eram separadas eletrostaticamente por funções específicas e sua vantagem era uma melhor relação sinal-ruído que a dos citômetros baseados em corantes e absorção. O diagrama do *FACS* é apresentado na Figura 2.4.

Até então existiam poucas aplicações biológicas para a citometria, porém a partir da década de 1970 houve importantes avanços (BERTHO, [entre 2001 e 2004]), tais como: identificação de subpopulações celulares em função dos antígenos de superfície (Reinherz, 1975), estudo do cariótipo¹¹ (Gray, 1975), medição de pH intracelular (VISSER *et al.*, 1979), início da classificação de leucemias (Andreff, 1980), medição da concentração intracelular de íons Ca^{++} (Grynkiewicz, 1985), entre outros.

¹¹ Cariótipo: conjunto de cromossomos de cada espécie.

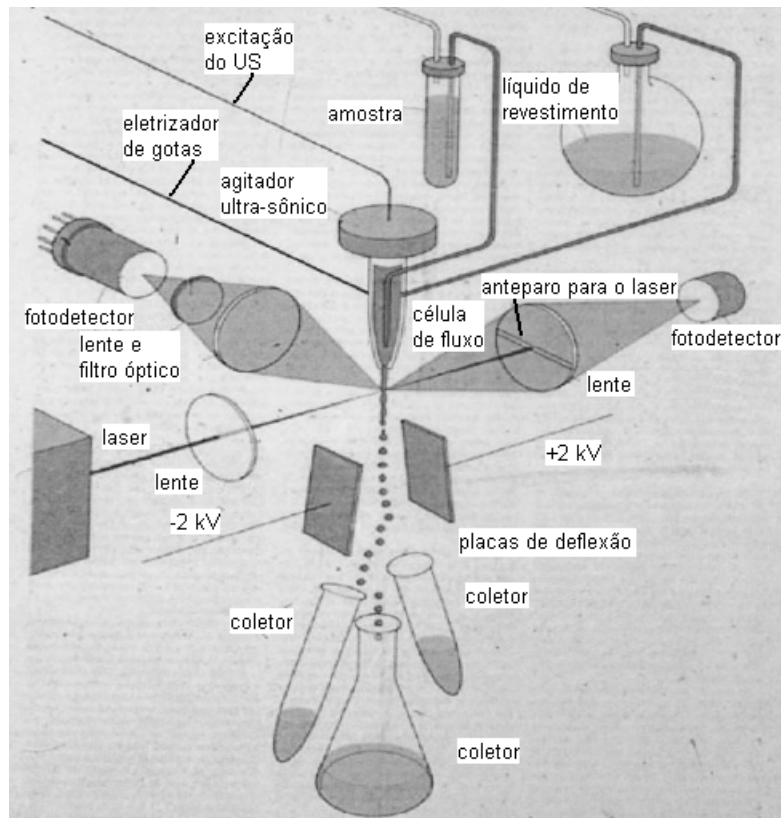


Figura 2.4: Diagrama do FACS apresentando o sistema de condução dos fluidos, o laser de excitação, o detector de espalhamento frontal, o do espalhamento lateral e as placas de deflexão, responsáveis pela separação eletrostática (adaptada de HERZENBERG *et al.*, 1976 *apud* HERZENBERG *et al.*, 2002).

2.1.1 No Brasil

O primeiro trabalho em periódicos da América do Sul no qual havia o uso da análise citofluorimétrica de populações celulares foi realizado no *WHO Immunology Research and Training Centre*, Lausanne, Suíça (COUTINHO, 2000). Este trabalho foi publicado em 1983 na revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* com o título *Functional analysis of the murine T lymphocyte immune response to a protozoan parasite, Leishmania tropica* e escrito por Engers, H.D., Coutinho, S.G., Araújo Lima, G.M. e Louis, J.A.

Alguns anos mais tarde, a Fiocruz conseguiu o recurso financeiro necessário para a aquisição de um citômetro de fluxo de ponta – o *cell sorter* EPICS 751 (Beckman Coulter, EUA) apresentado na Figura 2.5 –, que foi instalado ao final de 1988 na própria fundação, tornando-se o primeiro citômetro de fluxo da América

Latina. Coube ao biólogo Álvaro Luiz Bertho a coordenação da utilização e o aprendizado da operação do instrumento. Após sua instalação e Bertho ter terminado o treinamento necessário para manipulá-lo, este aparelho entrou em operação em março do ano seguinte (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; COUTINHO, 2000).



Figura 2.5: Primeiro citômetro de fluxo no Brasil: o *cell sorter* EPICS 751 (Beckman Coulter, EUA) (extraída do sítio do PÍCF-Fiocruz, *vide* BERTHO nas referências).

Este *cell sorter* passou a ser usado tanto em pesquisa científica como em prestação de serviços para outras instituições, como universidades, o INCA – Instituto Nacional do Câncer –, o Instituto Butantan e o InCor – Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; COUTINHO, 2000).

Devido à importância do equipamento, institutos de pesquisa e a iniciativa privada providenciaram os seus próprios citômetros de fluxo para diagnosticar doenças que acometem o sistema imunológico e as de caráter neoplásico¹², assim como para acompanhar o tratamento dos pacientes (COUTINHO, 2000).

O citômetro de fluxo pioneiro da Fiocruz foi utilizado até o início de 2000. Atualmente, o PÍCF-Fiocruz – Programa Integrado em Citometria de Fluxo da

¹² Neoplasia: do gr., neos, novo, e plásis, ação de dar forma (FERREIRA, 1999). São alterações celulares causadas por mudanças em genes que regulam crescimento e diferenciação celular acarretando proliferação e diferenciação anormais.

Fundação Oswaldo Cruz – disponibiliza 4 no Rio de Janeiro, 2 em Salvador e 1 em Belo Horizonte (PICF).

2.2 Conceitos Gerais de Citometria de Fluxo

Um citômetro de fluxo é basicamente um aparelho que analisa partículas ou células individualmente. Embora propriedades acústicas, elétricas e a emissão de radiação nuclear possam ser utilizadas na citometria de fluxo, as propriedades ópticas são – sem dúvida – as mais utilizadas pela simplicidade de implementação e diversidade de informações (SHAPIRO, 2003, p. 1; VAN DILLA *et al.*, 1985, p. 1). Em vista disso, apenas as propriedades ópticas serão tratadas neste trabalho.

Um citômetro de fluxo é constituído por tecnologias diversas: sistemas hidrodinâmico, óptico, eletrônico e computacional. Seu diagrama de blocos simplificado é apresentado na Figura 2.6 e explicado a seguir.

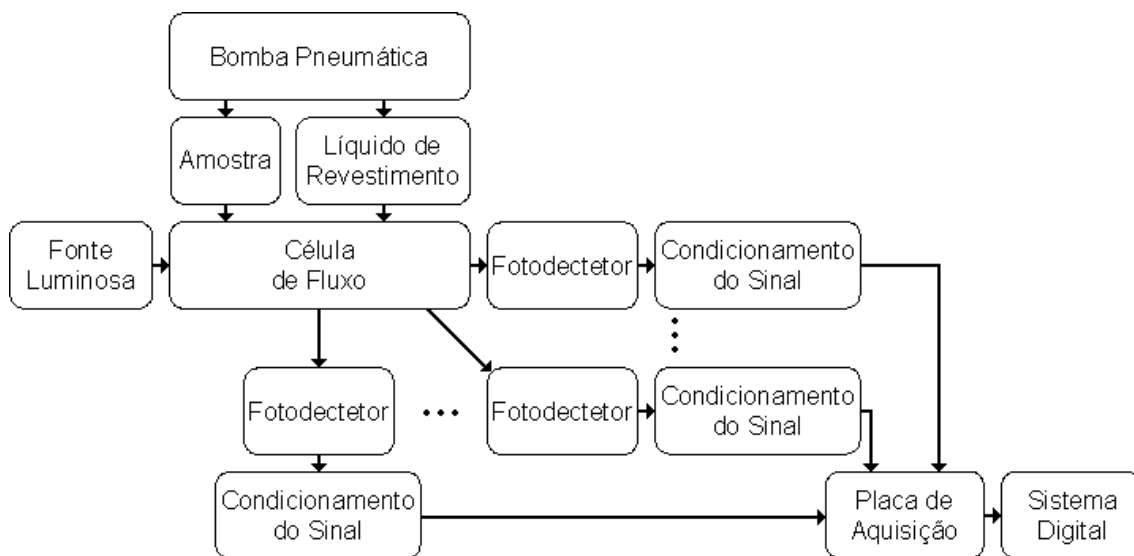


Figura 2.6: Diagrama de blocos simplificado de um citômetro de fluxo, apresentando o sistema hidráulico que impele a amostra e o líquido de revestimento, a fonte luminosa de excitação e os detectores de espalhamentos e/ou luminescências com seus respectivos condicionadores de sinais. Em seguida, a placa de aquisição e o sistema digital para exibição e análise de dados.

A bomba pneumática impele a amostra de partículas em suspensão e o líquido de revestimento a passarem pela célula de fluxo, também conhecida como câmara de focalização hidrodinâmica. A célula de fluxo termina em um tubo capilar ou numa peça

denominada *nozzle* ou bico injetor, a qual produz um delgado esguicho de fluido. Pelo efeito da focalização hidrodinâmica, as partículas chegam enfileiradas ao capilar ou ao bico injetor, possibilitando a análise individual.

A seguir, uma fonte luminosa excita a partícula que espalha a luz em todas as direções. Transdutores fotoelétricos convertem os sinais luminosos espalhados, que carregam informações da partícula, em sinais elétricos. Em seguida, estes sinais passam por circuitos condicionadores para conformação, amplificação e casamento de impedância. Após condicionamento, os sinais são enviados à placa digitalizadora. Em citometria de fluxo é comum se utilizar placa analisadora de altura de pulso – *PHA*, *pulse height analyzer* –, a qual gera um número binário proporcional à altura do pulso emitido pelo fotodetector. Deste modo um sistema digital pode então registrar a altura do pulso para exibição e análise dos dados da amostra.

De acordo com a solução de Mie para as equações de Maxwell relativas ao espalhamento de luz por partículas dielétricas e esféricas maiores que o comprimento de onda da luz, o espalhamento frontal é função principalmente do tamanho da partícula. Porém há outros fatores envolvidos como o índice de refração e o coeficiente de absorção. O espalhamento lateral ou ortogonal, por sua vez, varia com a granulosidade citoplasmática (BERTHO, [entre 2001 e 2004]; SHAPIRO, 2003, p. 275-276). Há diversas outras características possíveis de se mensurar num citômetro de fluxo: a absorção em determinadas faixas do espectro que permite avaliar atividade enzimática e concentração de pigmentos fotossintéticos como a hemoglobina; a luminescência advinda de fluorocromos que possibilita determinar propriedades diversas como pH intracelular, atividade enzimática, concentração citoplasmática de íons Ca^{++} , permeabilidade da membrana, metabolismo oxidativo, conteúdo de ácidos nucléicos, receptores e antígenos intracelulares e de superfície; e muitas outras características (SHAPIRO, 2003, p. 3).

Além da possibilidade de se medirem tantas propriedades com um citômetro de fluxo, existe um tipo especial de equipamento o qual, além de medi-las, separa

populações de células consoante alguma característica desejada. A este equipamento dá-se o nome de *cell sorter*, ou simplesmente *sorter*.

A Figura 2.7 apresenta um exemplo de citômetro de fluxo. No caso, o aparelho mede a intensidade do espalhamento frontal, a do espalhamento lateral e a de um comprimento de onda de fluorescência.

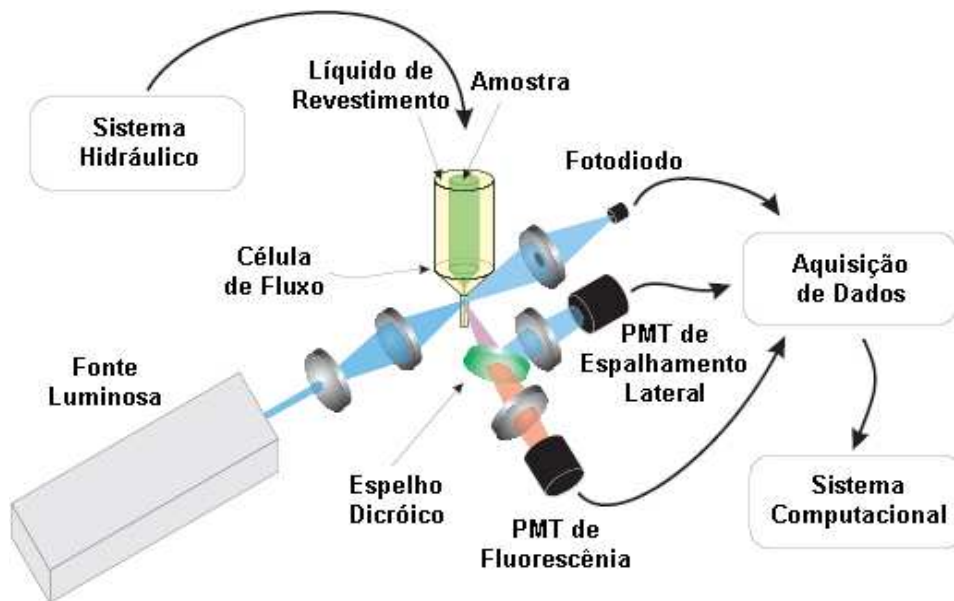


Figura 2.7: Exemplo de citômetro de fluxo. Neste aparelho se verifica um fotodiodo para detecção do espalhamento frontal, um *PMT* para o espalhamento lateral e outro para uma cor de fluorescência (adaptada de WANDERLEY, 2006, p. 11).

2.2.1 Célula de Fluxo

Num citômetro de fluxo, deseja-se analisar cada partícula ou célula individualmente. As partículas devem ser excitadas e as respostas de cada uma delas devem ser lidas separadamente de forma que a resposta de uma não se sobreponha à da outra. Uma solução simples seria enfileirar as células, deixando-as passar por um finíssimo capilar no qual apenas uma célula por vez caberia em sua seção transversal. Os primeiros citômetros de fluxo funcionavam deste modo, porém o capilar constantemente ficava entupido por alguma partícula maior que seu diâmetro interno. Outra desvantagem de um tubo muito fino é a dificuldade de observações microscópicas devido às diferenças do índice de refração do tubo e da suspensão (CROSLAND-TAYLOR, 1953).

Aumentando-se a secção do capilar, cessam o entupimento e a dificuldade de observação, porém pode acontecer de duas partículas passarem ao mesmo tempo no ponto de excitação luminosa. Resolvendo este problema, CROSLAND-TAYLOR (1953) desenvolveu um método chamado de focalização hidrodinâmica, sendo o aparato que a realiza chamado de câmara de focalização hidrodinâmica ou célula de fluxo. Na Figura 2.8 é apresentada uma célula de fluxo terminada em um capilar. Ao invés do capilar, é possível também utilizar um bico injetor.

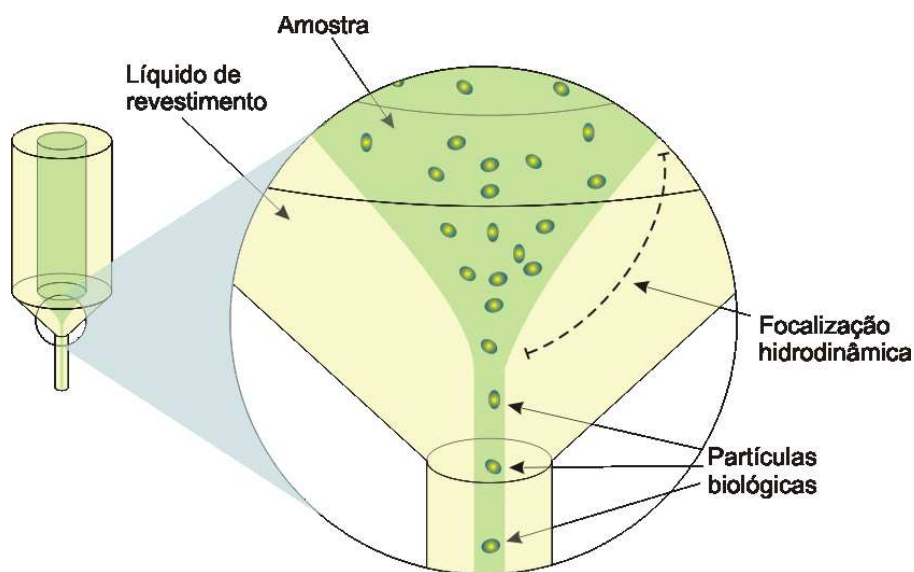


Figura 2.8: Câmara de focalização hidrodinâmica terminada em capilar. A região por onde passam a amostra e o fluido de revestimento é afinada até a entrada no capilar. Com as vazões adequadas para cada um dos líquidos, ocorre a focalização hidrodinâmica, ou seja, o enfileiramento das partículas dentro do capilar (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 12).

Ao se injetar uma suspensão envolta por uma rápida corrente de fluido, no mesmo sentido, em uma câmara onde o diâmetro se reduz longitudinalmente, as partículas são aceleradas e enfileiram-se num tênue filete, permitindo que apenas uma partícula por vez seja observada. Com o objetivo de se manter a vazão laminar e também a focalização hidrodinâmica, não deve haver muita turbulência na célula de fluxo. Para isto, reduções bruscas de diâmetro devem ser evitadas. Ademais, a célula de fluxo precisa resistir às pressões às quais será submetida, assim como precisa ter boa vedação e garantir uma vazão com perfil laminar. Para a última característica, o contorno interno deve ser suave, sem alterações acentuadas de diâmetro. Além do

fator hidrodinâmico, nos citômetros de fluxo com tubo capilar, a célula de fluxo deve ser feita de material transparente na faixa do espectro de interesse e não deve emitir luminescência ao ser excitado com o comprimento de onda da fonte luminosa.

A câmara é constituída por dois tubos concêntricos: o interno conduz a amostra em suspensão e o externo, o líquido de revestimento. No trecho onde ocorre a focalização hidrodinâmica, o tubo interno acaba e o tubo externo tem seu diâmetro suavemente reduzido até atingir um diâmetro algumas vezes maior que o das partículas em estudo, garantindo o não entupimento. O bico injetor ou o capilar, em continuidade com a célula de fluxo, conduz os fluidos e as partículas enfileiradas até o sítio de observação. Os valores típicos do diâmetro do capilar são de 70 μm , para os *cell sorters*, a 250 μm , para os outros tipos de citômetros (SHAPIRO, 2003, p. 168); e a velocidade do fluido em seu interior tem um valor típico de 10 m/s (PINKEL e STOVEL, 1985, p. 78; SHAPIRO, 2003, p. 168), mas pode variar de um aparelho para o outro.

Pelo princípio da continuidade, a vazão dentro da câmara de focalização é constante ao longo do eixo, equação (2.1), onde v_1 e v_2 são as velocidades médias na secção transversal, A_1 e A_2 são as áreas, conforme apresentado na Figura 2.9. A razão de velocidades, equação (2.2), possui valor típico de 150 para citômetros de fluxo e de 1500 para *cell sorters* (PINKEL e STOVEL, 1985, p. 81).

$$\text{vazão} = v_1 A_1 = v_2 A_2 \quad (2.1)$$

$$\frac{v_2}{v_1} = \frac{A_1}{A_2} \quad (2.2)$$

Desprezando as perdas por resistência hidráulica e variações da energia potencial, devido ao pequeno tamanho da célula de fluxo – poucos centímetros –, a equação de Bernoulli para o sistema se reduz a:

$$\Delta p = \frac{\rho}{2} (v_2^2 - v_1^2), \quad (2.3)$$

onde ρ é a densidade do fluido, aproximadamente a da água, e Δp é a variação de pressão.

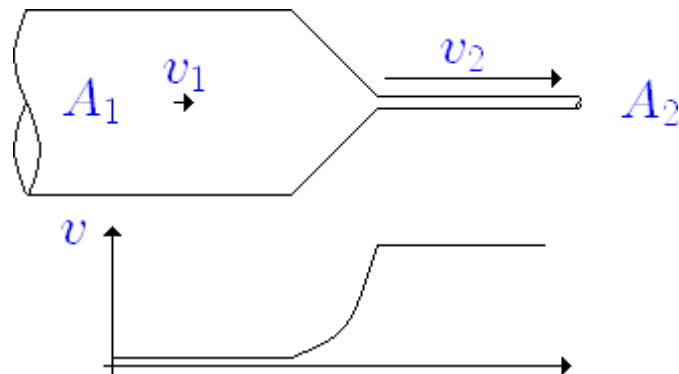


Figura 2.9: Célula de fluxo mostrando a aceleração do fluido. A_1 e A_2 são as áreas das secções transversais, v_1 e v_2 são as velocidades médias nestas secções.

Como a área da seção transversal interna do capilar ou do esguicho na saída do bico injetor é muito menor que a área da célula de fluxo, a equação (2.4) torna-se válida. E daí conclui-se que a velocidade do fluido não depende das dimensões da câmara, apenas da pressão dentro da mesma. O gráfico da pressão *versus* a velocidade do fluido no capilar é apresentado na Figura 2.10.

$$v_2 \gg v_1 \Rightarrow v_2 \approx \sqrt{\frac{2}{\rho} \Delta p} \quad (2.4)$$

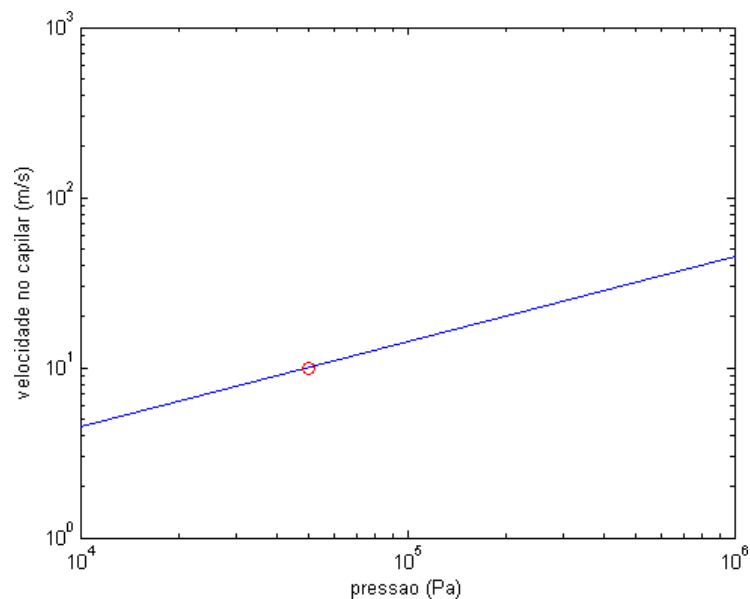


Figura 2.10: Gráfico da pressão dentro da câmara de focalização hidrodinâmica *versus* a velocidade média numa secção transversal do fluido no capilar ou na saída do bico injetor. O círculo indica a velocidade de 10 m/s e pressão de 50 kPa, ou 7,3 psi.

2.2.2 Sistema de Injeção dos Fluidos

Para uma boa focalização hidrodinâmica, os fluidos devem ser impelidos a passar pela célula de fluxo a uma taxa constante e pré-estabelecida.

Uma forma de se fazer isto é pressurizando os vasos que contêm a amostra e o fluido de revestimento. Com as pressões adequadas em cada vaso, é possível obter as vazões certas de cada um dos fluidos para uma boa focalização hidrodinâmica.

Outro método factível é o uso de vasos com êmbolos controlados por motor. À medida que o motor empurra o êmbolo, o fluido é expelido à célula de fluxo. A vantagem deste método é a possibilidade de se avaliar precisamente a vazão dos fluidos, entretanto é um sistema mais caro e volumoso que o anterior. Para compelir o êmbolo da seringa, pode ser usado motor contínuo ou motor de passo, porém em baixas velocidades este não é adequado devido ao movimento pulsátil (PINKEL e STOVEL, 1985, p. 122).

2.2.3 Óptica

2.2.3.1 Fontes de Excitação

Para se caracterizarem as partículas, é necessário excitá-las com uma fonte luminosa: lâmpada de arco, diodo emissor de luz ou *laser*. Cada uma delas tem vantagens e desvantagens, sua escolha depende do que se deseja medir, da radiância, do espectro, da estabilidade e do preço.

As lâmpadas incandescentes não são utilizadas, em contrapartida às lâmpadas de arco, por causa da baixa radiância e largo espectro de emissão. Com a aplicação de uma tensão acima do limiar num tubo de gás de uma lâmpada de arco, este se ioniza e passa a ser um condutor elétrico, ocorrendo descarga entre catodo e anodo. A geração da luz ocorre quando os elétrons, ao passarem pelo gás, ficam indo e voltando pelas camadas energéticas. A corrente necessária para esta operação é relativamente alta, o que impede uma vida útil elevada para as lâmpadas – há

algumas que chegam a pouco mais de 1.000 h. Devido ao aquecimento, apenas as de mais baixas potências são utilizadas em citometria de fluxo. Devem ser sempre operadas em corrente contínua, pois a alternada impõe oscilação à radiação (WHEELESS JR. e KAY, 1985, p. 35).

Outra fonte luminosa utilizada é o diodo emissor de luz, *LED*, um diodo com semicondutores de *gap* direto, o qual emite fótons por emissão espontânea. Esta emissão é provocada, nos sistemas quânticos, por transições eletrônicas aleatórias para níveis de menor energia. Os *LEDs* têm a vantagem de serem extremamente baratos em relação aos outros tipos de fontes luminosas – custam alguns centavos de real – e consomem muito pouca energia, porém a sua emissão não é monocromática como a dos *lasers*, o que torna sua relação sinal-ruído baixa.

Uma das vantagens do *laser* é o fato de ser coerente e colimado; isto permite que sua radiação seja concentrada num pequeno espaço e que o feixe possa ser focalizado em áreas do tamanho de uma célula. Além disso, é uma fonte de luz de alta pureza espectral, por ser monocromática, e bastante estável. Porém os *lasers*, geralmente, são mais caros que as lâmpadas de arco, possuem baixa eficiência e requerem um sistema de resfriamento para manter a estabilidade.

A geração do *laser* ocorre por uma propriedade quântica chamada emissão estimulada, ao invés da emissão espontânea. Um meio numa cavidade ressonante é excitado a ponto de ocorrer uma inversão de população em seus elétrons, passando a existir mais em estado excitado de condução do que no estado de baixa energia, de valência. Este processo pode ser causado por bombeamento óptico – nos *lasers* de sólidos com impurezas –, excitação eletrônica – nos *lasers* a gás –, colisão inelástica de átomos – nos *lasers* com mistura de gases – ou injeção de portadores – nos *lasers* de semicondutores (REZENDE, 1996, p. 338-342). Quando a inversão de população ocorre, um fóton liberado por um elétron, o qual voltou a um estado de menor energia, pode encontrar outro átomo com o mesmo estado excitado que o gerou e induzir a emissão de mais um fóton em mesma fase, frequência e sentido. Num dos lados, a

cavidade ressonante é espelhada de forma a refletir de volta os fótons para estimularem a emissão de mais fótons. No outro lado, a cavidade ressonante é semi-espelhada para refletir parte dos fótons de volta e emitir o restante.

Na Figura 2.11 estão indicados diversos tipos de *lasers* e os seus comprimentos de onda emitidos. O mais comum em citometria de fluxo é o de Ar de 488 nm, azul, bastante utilizado para excitação de substâncias fluorescentes (SHAPIRO, 2003, p. 138). Outros *lasers* comuns nos citômetros de fluxo são os de He-Ne de 632,8 nm, vermelho, e o de Kr. Os de He-Ne são relativamente econômicos e usados principalmente em medidas de espalhamento de luz (WHEELLESS JR. e KAY, 1985, p. 40-41). Os *lasers* de semicondutores estão sendo cada vez mais utilizados, devido aos comprimentos de onda conseguidos com novas tecnologias e pelo baixo consumo energético.

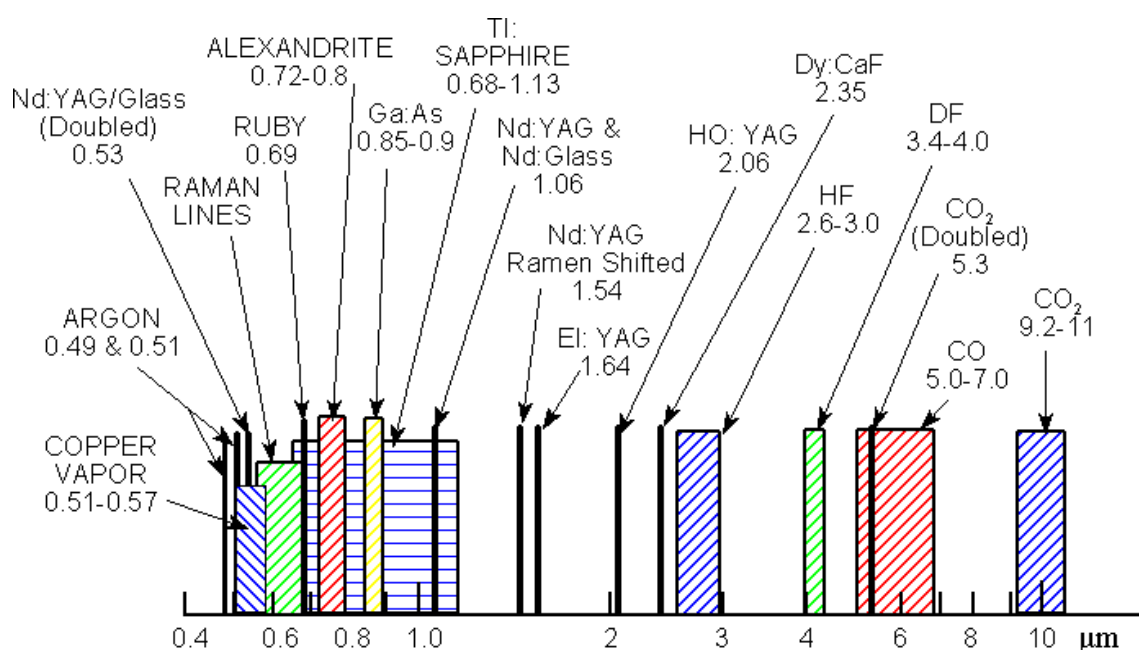


Figura 2.11: Comprimentos de onda de diversos tipos de *lasers* (extraída de WIKIPEDIA).

2.2.3.2 Fluorocromos

É comum se prepararem as amostras a serem caracterizadas com marcadores fluorescentes, os chamados fluorocromos. O espalhamento da luz permite o estudo de

aspectos físicos das partículas como tamanho e granulosidade, enquanto com a fluorescência se estudam aspectos químicos, como os citados na seção 2.2.

Existem fluorocromos seletivos que se ligam a determinadas moléculas de alguns componentes celulares específicos. Dentre estes, há os marcadores de proteínas, de lipídios, de DNA, de RNA etc. Há também fluorocromos os quais variam suas características de excitação e emissão em função do ambiente em que se encontram imersos (BERTHO, [entre 2001 e 2004]).

2.2.3.3 Filtros Ópticos

Filtro óptico, como o próprio nome sugere, é um dispositivo que atenua determinadas faixas de radiação eletromagnética, por interferência ou absorção, e deixa passar outras faixas. Alguns de seus tipos mais comuns são: passa-banda, rejeita-banda, *short-wavelength pass*, *long-wavelength pass* e densidade neutra (WHEELESS JR. e KAY, 1985, p. 42-43).

O filtro monocromático é um tipo de passa-banda em que a faixa de frequência passante é bastante estreita. Já o filtro de densidade neutra possui atenuação constante dentro de uma faixa de frequência, por absorção ou reflexão, e é utilizado para reduzir a intensidade luminosa.

2.2.3.4 Divisores de Feixe e Espelhos Dicroicos

Bastante conhecido pelo nome em inglês, o *beam splitter* ou divisor de feixe é um componente óptico que transmite parte da radiação incidente e reflete outra, ao invés de absorver como o filtro de densidade neutra. Um dos tipos de divisores de feixe possui a finalidade de dividir o feixe em dois, cada um com metade da potência original, num comprimento de onda específico. Um outro tipo, comumente usado em citometria de fluxo, é o espelho dicroico, o qual reflete numa faixa do espectro e transmite fora dela.

2.2.3.5 Fotodetectores

Os transdutores de detecção óptica geralmente utilizados são o fotodiodo e o tubo fotomultiplicador, abreviado em inglês por *PMT*. Ambos funcionam como fontes de corrente proporcionais à potência luminosa recebida. Para o espalhamento frontal se costuma utilizar o fotodiodo. Entretanto o espalhamento lateral e a intensidade de fluorescência possuem menor potência, utilizando-se, para estes, o *PMT*, o qual possui um alto ganho com melhor relação sinal-ruído.

É desejável que apenas a luz espalhada pela partícula atinja o fotodetector e não a luz direta da fonte emissora. Por este motivo o fotodetector é protegido por uma peça opaca chamada *beam stop* ou barra de obscuração. Apesar de a luz direta da fonte não atingir o detector no espalhamento lateral, há espalhamento causado pelo capilar ou pelo jato da amostra, portanto também há necessidade do fotodetector do espalhamento lateral ser protegido por uma barra de obscuração.

O fotodiodo é um diodo especial em que a luz excita um elétron ao atingir a região de depleção da junção, levando-o à banda de condução – efeito fotoelétrico. Destarte, é criado um elétron livre e um buraco, os quais produzem a fotocorrente. O fotodiodo pode ser operado sem polarização, no modo fotovoltaico, ou com polarização reversa, no modo fotocondutivo. Em ambos, as cargas móveis criadas pela luz produzem uma tensão e uma corrente no sentido reverso. Não há diferença entre as eficiências quânticas¹³ dos dois modos. O modo fotocondutivo apresenta melhores linearidade à fotocorrente e resposta em frequência com a diminuição da capacitância da junção (HIEBERT e SWEET, 1985, p. 135), porém possui maior ruído devido à corrente de escuro. Os fotodiodos de silício possuem ruído mais baixo que os de germânio devido ao alto *gap* entre as bandas de condução e de valência.

O *PMT* é considerado o sensor mais sensível à luz e possui alta relação sinal-ruído. Seu funcionamento também se baseia no efeito fotoelétrico: um fóton, ao incidir

¹³ Quociente entre o número de fotoelétrons emitidos e o número de fótons incidentes ao fotocátodo (NICHOLSON, 1974, p.31).

num material, pode arrancar um elétron se sua energia for maior que um determinado valor chamado função trabalho. A Figura 2.12 ilustra o funcionamento do tubo fotomultiplicador. Um fóton incide numa placa metálica chamada de fotocatodo e arranca um elétron. Este é acelerado por um potencial elétrico de centenas de volts até o primeiro dinodo, de onde irá arrancar mais elétrons que, por sua vez, serão acelerados até o segundo dinodo, onde acontecerá o mesmo processo, e assim sucessivamente até o anodo. O fator de multiplicação deste processo pode estar entre 10^5 e 10^7 (NICHOLSON, 1974, p. 31) e é isto que o torna tão sensível à luz. Uma forma de controlar o ganho do dispositivo é controlando a tensão responsável pela aceleração dos elétrons. Há várias geometrias possíveis, a da Figura 2.12 é apenas uma delas. A principal fonte de ruído deste transdutor é a corrente de escuro provocada pela emissão termiônica do fotocatodo, porém pode ser reduzida pelo seu resfriamento ou uso de material bialcalino, como o de K-Cs-Sb (NICHOLSON, 1974, p. 33). Na citometria de fluxo, porém, o principal gerador de ruído é a própria luz utilizada como excitação da amostra (SHAPIRO, 2003, p. 161).

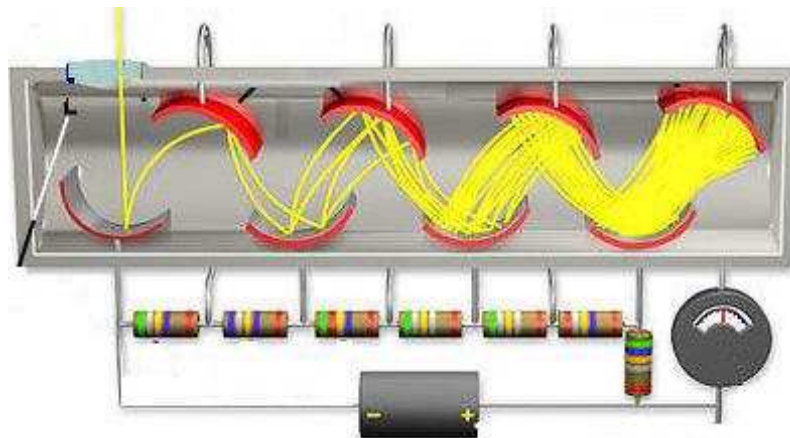


Figura 2.12: Estrutura interna de um fotomultiplicador. Um fóton entra pela janela no lado esquerdo e atinge o fotocatodo, de onde arranca um elétron. Este elétron é acelerado por uma tensão até um dinodo, de onde arranca outros elétrons, os quais são acelerados até o próximo dinodo e assim sucessivamente até o anodo (extraída de LIP).

2.2.4 Aquisição de Dados

2.2.4.1 Condicionadores de Sinais

Os fotodetectores estudados convertem a potência luminosa em sinal elétrico e podem ser modelados como fontes de corrente próximas do ideal, com alta impedância de saída. Geralmente as placas digitalizadoras de sinal trabalham com potenciais elétricos ao invés de corrente, e nestes casos o sinal deve passar por um circuito que converta a corrente do fotodetector em tensão. Além disso, nesse tipo de medição é comum o sinal ter baixa amplitude, advindo a necessidade de haver um pré-amplificador de transimpedância ou transresistência com baixo ruído de entrada. O problema do ruído pode ser reduzido com a utilização da tecnologia do transistor de efeito de campo, *FET* (NICHOLSON, 1974, p. 166).

O pré-amplificador pode ser sensível à corrente ou sensível à carga. A Figura 2.13 apresenta o circuito básico de um pré-amplificador. Se, nas frequências de interesse, a resistência é muito menor que a impedância capacitiva, o pré-amplificador é sensível à corrente: a amplificação é dada pelo resistor e o capacitor serve para filtrar as altas frequências. Por outro lado, se, nas frequências de interesse, a impedância capacitiva é muito menor que a resistência, o pré-amplificador é sensível à carga.

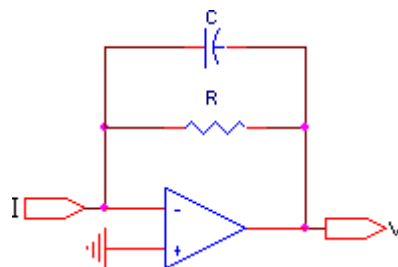


Figura 2.13: Circuito básico de um pré-amplificador.

A função de transferência do pré-amplificador é dada pela equação (2.5).

$$\frac{V}{I} = -\frac{1}{C} \frac{1}{s + \frac{1}{RC}} \quad (2.5)$$

Quando o *laser* incide sobre uma partícula no capilar, a luz é espalhada e o fotodiodo detecta um pulso de luz. Já que os fotodetectores atuam como fonte de corrente, o pré-amplificador recebe como entrada um pulso de corrente. No caso do pré-amplificador de carga, a impedância capacitiva é bem menor que a resistiva e a constante de tempo, RC , é projetada para ser muito maior que a largura do pulso de corrente. Portanto este pulso pode ser modelado pela função delta de Dirac, equação (2.6), onde Q é a carga do pulso e é proporcional à energia luminosa detectada.

$$i(t) = Q\delta(t) \xrightarrow{L} I(s) = Q \quad (2.6)$$

Nesta condição, a transformada de Laplace da tensão de saída do circuito é dada por:

$$V(s) = -\frac{Q}{C} \frac{1}{s + \frac{1}{RC}} \quad (2.7)$$

Calculando a transformada inversa, obtém-se a resposta temporal do circuito à excitação de um impulso luminoso:

$$v(t) = -\frac{Q}{C} e^{-\frac{t}{RC}} \quad (2.8)$$

A equação (2.8) mostra que a saída de um pré-amplificador de carga a um impulso de corrente é uma exponencial decrescente cuja amplitude é proporcional à carga de entrada. Pode-se, então, definir a sensibilidade do pré-amplificador de carga como o inverso da capacitância de realimentação:

$$\text{sensibilidade} = \frac{1}{C} \quad (2.9)$$

Como anteriormente mencionado, os pré-amplificadores convertem o sinal do fotodetector em tensão. Em seguida, tal sinal deve passar por amplificadores para fornecer ganho e conformar os pulsos por meio de filtros com o intuito de se melhorar a relação sinal-ruído (HIEBERT e SWEET, 1985, p. 137). Ademais, quando o pré-amplificador é sensível à carga, o amplificador tem que filtrar a baixa frequência

responsável pelo longo tempo de descida do pulso, reduzindo a probabilidade de haver sobreposição de pulsos (NICHOLSON, 1974, p. 150).

Os amplificadores podem ser lineares ou logarítmicos. Os logarítmicos amplificam com maior ganho sinais de pequena magnitude e amplificam com menor ganho sinais de maior magnitude; são comumente utilizados quando os valores da característica observada variam numa faixa com mais de uma ordem de grandeza. Com a mesma faixa dinâmica de um amplificador linear, a amplificação logarítmica permite obter melhor resolução para os sinais de baixa amplitude. Caso um amplificador linear seja utilizado em substituição a um amplificador logarítmico, a digitalização subsequente do sinal deve ser realizada com maior resolução na conversão A/D para que seja possível manter a resolução dos sinais de baixa amplitude equivalente à obtida com o amplificador logarítmico (HIEBERT e SWEET, 1985, p. 137-139). Em citometria de fluxo, os amplificadores logarítmicos são muito utilizados em análises com fluorocromos.

2.2.4.2 Analisador de Altura de Pulso

Após o pulso ser convertido em tensão, amplificado e filtrado, é necessária sua aquisição, a qual é realizada por um analisador de altura de pulso – em inglês, *pulse height analyser*, ou simplesmente *PHA* – também conhecido como *pulse amplitude analyser*.

O *multi-channel analyzer*, *MCA*, ou *multi-channel buffer*, *MCB*, é um *PHA* que armazena o número de pulsos recebidos para cada altura medida, chamada de canal; são compostos por detector de pico, conversor A/D, memória digital e controle para a medição da altura do pulso.

Referindo-se a palavra canal às entradas do dispositivo, o analisador de altura de pulso pode ser monocanal ou multicanal. O primeiro é utilizado na detecção de um espalhamento ou fluorescência por vez, o segundo, na aquisição simultânea de dois

ou mais canais de espalhamento e/ou fluorescência. Na grande maioria das aplicações de citometria de fluxo, se utilizada um *PHA* multicanal.

O funcionamento básico de um *PHA* pode ser resumidamente explicado como se segue. O pulso de tensão recebido pelo analisador de altura de pulso passa internamente por um circuito detector de pico, semelhante ao apresentado na Figura 2.14. Neste circuito, o pulso é aplicado ao seguidor de tensão e então carrega o capacitor. Quando o pulso atinge o pico e começa a decrescer, o diodo pára de conduzir e a altura do pulso é mantida no capacitor, ou seja, este circuito age como uma memória analógica do valor máximo do pulso. Em seguida, a conversão A/D desta tensão é realizada e o conteúdo de uma posição da memória digital relativa à altura do pulso é incrementada, de forma a se salvar os dados da amostra em estudo e se permitir a exibição e análise dos dados por um computador.

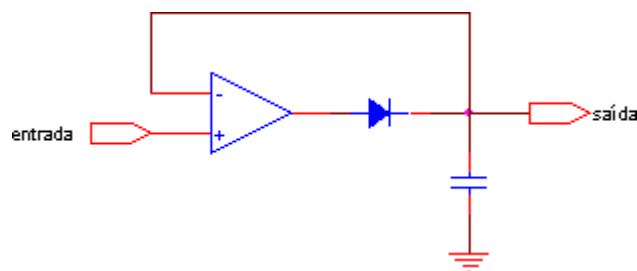


Figura 2.14: Circuito básico de um detector de pico, apresentando o capacitor onde a altura do pulso de entrada é armazenada.

A conversão A/D pode ser realizada pelo conversor de Wilkinson, pelo método das aproximações sucessivas ou pelo *flash ADC*. (SHAPIRO, 2003, p. 208).

No primeiro tipo, o capacitor, ao atingir o pico, é descarregado linearmente enquanto um contador conta os pulsos de um oscilador de alta frequência, o que torna este conversor lento em relação aos outros. A altura do pulso é proporcional ao tempo que o capacitor levou para ser descarregado.

No método de aproximações sucessivas, a altura do pulso, tensão V , é comparada primeiramente com uma tensão de referência E . Se o pico for maior, sua saída adquire o valor lógico 1 e a tensão $E - V$ é mandada ao segundo estágio para

ser comparada com $\frac{E}{2}$ e assim sucessivamente. Caso a tensão de entrada em um estágio seja menor que o valor de comparação, a saída do estágio adquire o valor lógico 0 e a mesma tensão de entrada é mandada para o próximo estágio. Estes sinais lógicos de cada estágio formam um código binário da tensão de pico do sinal (SHAPIRO, 2003, p. 208).

Os conversores mais modernos e rápidos são chamados *flash ADC*, também conhecidos como conversores A/D paralelo. A tensão do pico do pulso passa por vários comparadores, cada qual com uma diferente tensão de referência advinda de um divisor de tensão.

2.2.5 Exibição de Dados

No caso de uma análise monoparamétrica da amostra, os dados podem ser apresentados na forma de um histograma, como exemplificado na Figura 2.15-A. Dados multiparamétricos não podem ser representados num gráfico bidimensional de características versus contagem. Para dados biparamétricos, é comum a representação por diagramas de espalhamento ou *scatter plots*, como na Figura 2.15-B, mas também podem ser apresentados em histograma tridimensional, como na Figura 2.15-D. Uma outra forma para se apresentarem os dados biparamétricos é como na Figura 2.15-C, na qual se utilizam curvas de níveis para dividir o espaço em regiões com determinadas densidades de pontos.

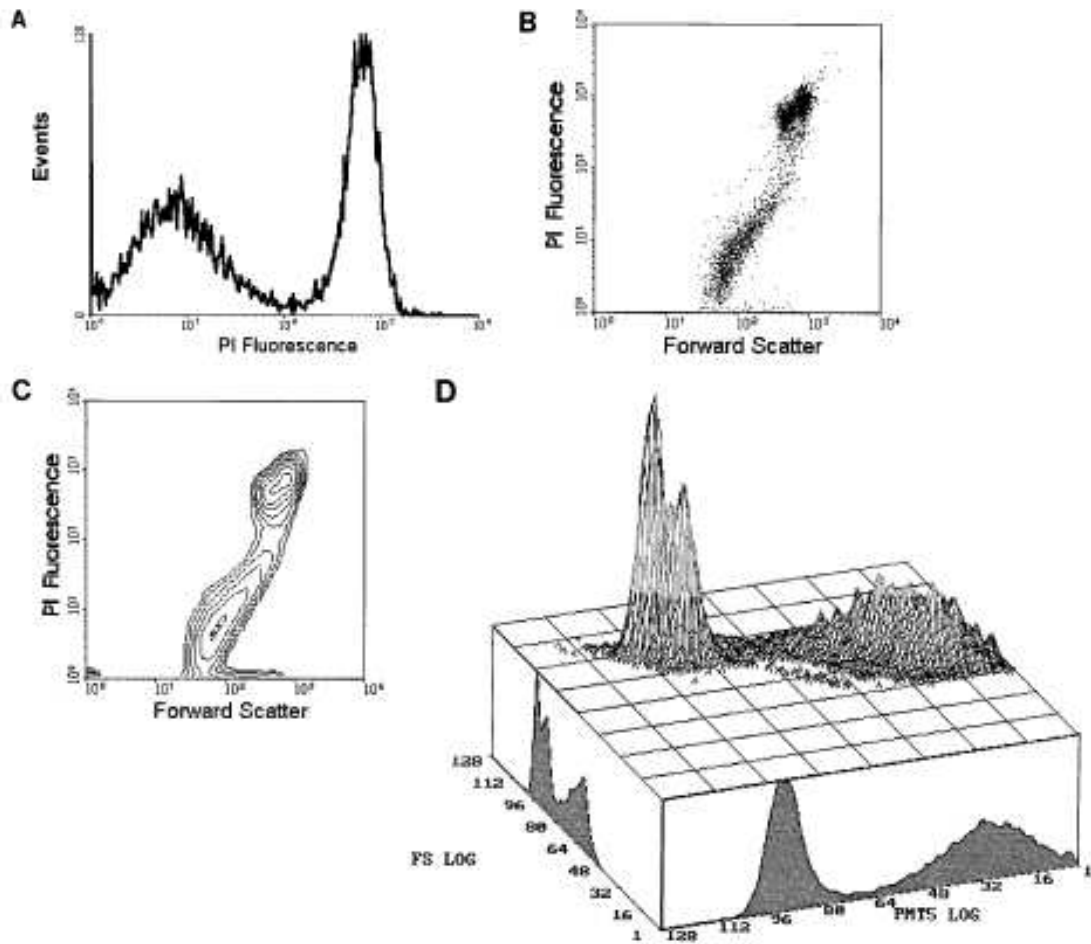


Figura 2.15: Exemplo de representações de dados adquiridos por um citômetro de fluxo: fluorescência a propídio iodado e espalhamento frontal de uma mistura de esporos bacteriais de *Bacillus globigii* e células do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Em A, tem-se um histograma monoparamétrico; em B, um diagrama de espalhamento, *scatter plot*; em C, curvas de níveis; e em D, um histograma biparamétrico (extraída de DAVEY e KELL, 1996).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Este capítulo expõe o que foi realizado no projeto do citômetro de fluxo biparamétrico: as ferramentas utilizadas, o funcionamento do sistema idealizado, e os métodos empregados para validação de cada parte e do sistema como um todo.

3.1 O Citômetro de Fluxo Biparamétrico

O citômetro de fluxo biparamétrico foi implementado conforme o diagrama de blocos exibido na Figura 3.1. A construção é detalhada nas subseções a seguir.

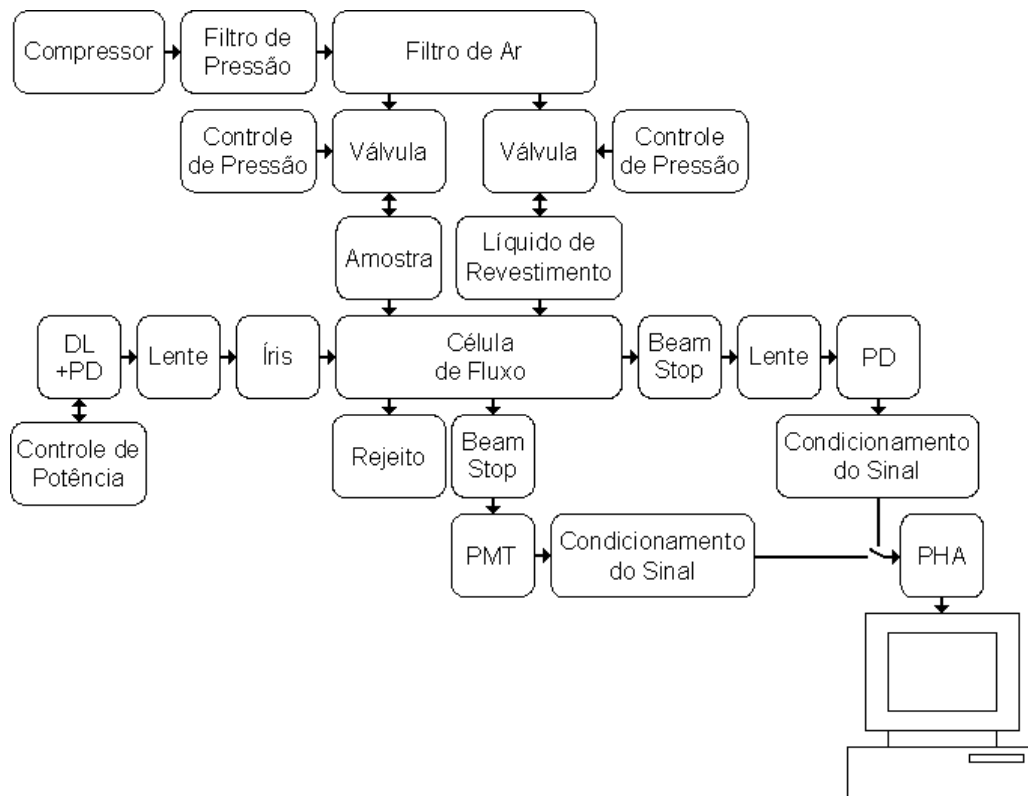


Figura 3.1: Diagrama de blocos do citômetro de fluxo biparamétrico. Abreviaturas: *DL*, laser de diodo; *PD*, fotodiodo; *PMT*, tubo fotomultiplicador; *PHA*, analisador de altura de pulso.

3.1.1 Sistema de Condução dos Fluidos

Para se caracterizarem as partículas de uma amostra utilizando um citômetro de fluxo, é necessário que a amostra e o fluido de revestimento sejam impelidos com vazão constante à câmara de focalização hidrodinâmica. O método utilizado neste trabalho é o da pressurização dos vasos que contêm os fluidos, como mostra a Figura 3.2.

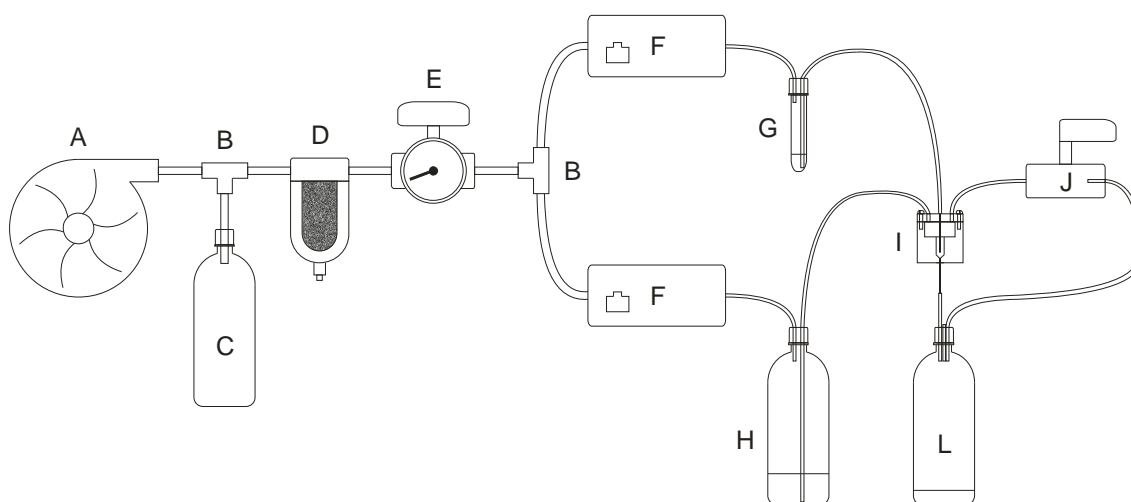


Figura 3.2: Diagrama do sistema de condução dos fluidos. Legenda: A, compressor; B, derivação T; C, filtro pneumático; D, filtro de ar; E, válvula manual de pressão; F, válvula eletrônica de pressão; G, vaso da amostra; H, vaso do fluido de revestimento; I, câmara de focalização hidrodinâmica; J, válvula de fechamento; L, vaso de rejeito.

Foi utilizado como compressor o nebulizador InalaMax Millennium (NS, Brasil) com potência de 1/40 HP – Figuras 3.2 e 3.3, itens A. Como sua pressão de saída é pulsátil, fez-se necessário o uso de um filtro pneumático passa-baixa, para tornar a pressão de ar resultante quase constante.

Como filtro pneumático foi utilizada uma garrafa PET¹⁴ de refrigerante com 2 L – Figuras 3.2 e 3.3, itens C. A tampa da garrafa foi furada e nela presa, e vedada por porca, uma derivação T rosqueável – Figuras 3.2 e 3.3, itens B – e dois engates rápidos para mangueiras de 6 mm.

¹⁴ PET: polietileno tereftalato.

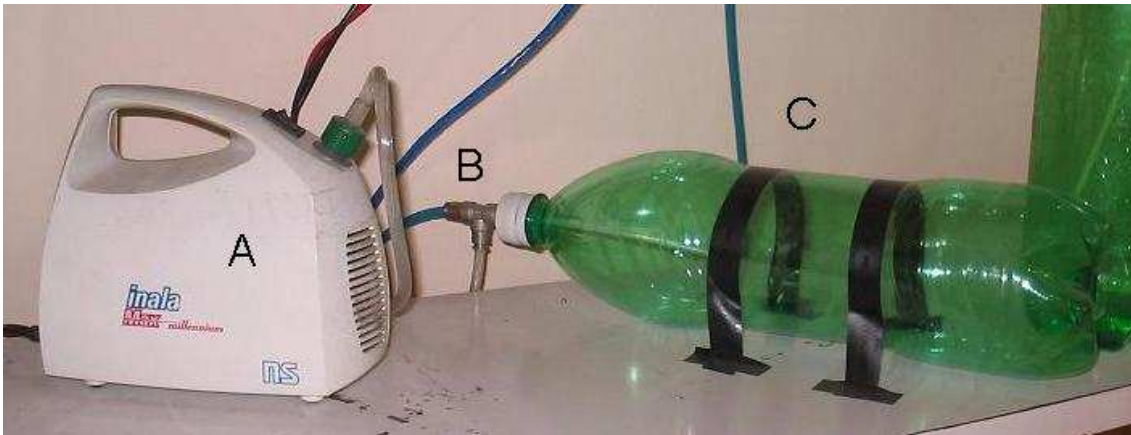


Figura 3.3: Alguns dispositivos utilizados para pressurização do sistema. Legenda: A, compressor para pressurizar os vasos da amostra e do fluido de revestimento; B, derivação T; C, garrafa para amortecer flutuações de pressão.

O ar comprimido passa por um filtro de ar de 5 μm , modelo F07-100-M1TG (Norgren, Brasil), para até 150 psi¹⁵ – Figuras 3.2 e 3.4, itens D.

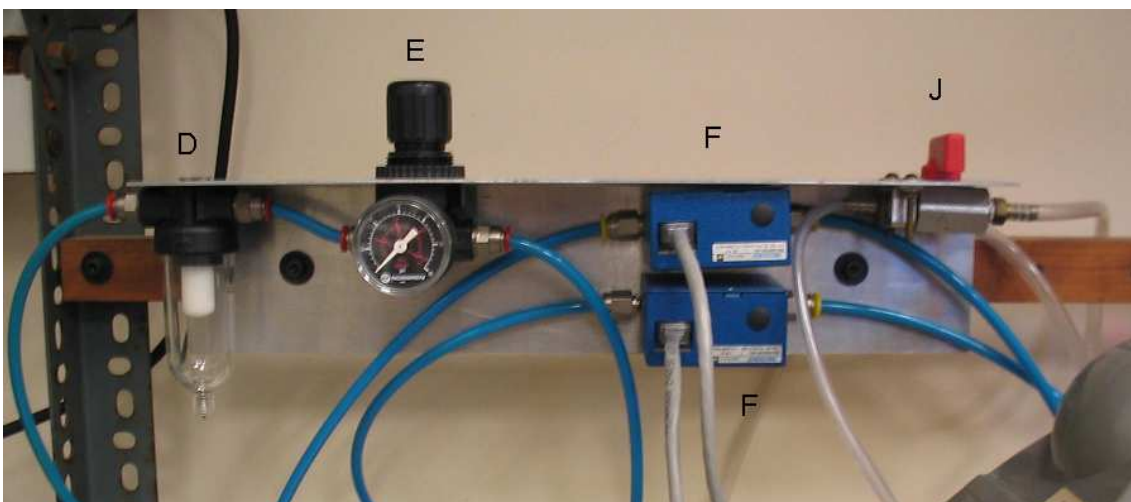


Figura 3.4: Alguns dispositivos hidráulicos e para pressurização do sistema. Legenda: D, filtro de ar; E, válvula manual de pressão; F, válvula eletrônica de pressão; J, válvula de fechamento.

O controle de pressão do protótipo do citômetro de fluxo monoparamétrico era realizado por válvulas mecânicas R07-100-RGEG (Norgren, Brasil) com 60 psi de fundo de escala, uma para o vaso da amostra e outra para o vaso do fluido de revestimento. As experiências realizadas por WANDERLEY (2006) mostraram que a resolução das válvulas mecânicas e suas histereses impediam a regulação das

¹⁵ 1 atm \approx 14,7 psi \approx 101,3 kPa

pressões com a precisão adequada. Além do mais, o controle era totalmente manual, indesejável para um citômetro de fluxo automatizado. Em vista disso, estas válvulas mecânicas foram substituídas pelas válvulas eletrônicas VSO-EP (Parker, EUA), Figuras 3.2 e 3.4, itens F. Foi mantida, no entanto, uma válvula mecânica – Figuras 3.2 e 3.4, itens E – para limitar a pressão nas entradas das válvulas eletrônicas.

Estas válvulas eletrônicas controlam as pressões no vaso da amostra – Figura 3.2, itens G – e no vaso do fluido de revestimento – Figura 3.2, itens H. Pressurizados, os líquidos são impelidos à câmara de focalização hidrodinâmica – Figura 3.2, item I – e saem para o vaso de rejeito – Figura 3.2, item L.

Na parte superior da câmara de focalização hidrodinâmica, há outra saída, para o vaso de rejeito, utilizada para evacuação do ar interno à câmara e de partículas da amostra que acidentalmente possam se espalhar pela câmara durante o ajuste das pressões nos vasos da amostra e do fluido de revestimento. Esta saída é controlada por uma válvula manual de fechamento, Figuras 3.2 e 3.4, itens J.

3.1.1.1 Eletroválvula Pneumática VSO-EP

As válvulas eletrônicas VSO-EP (Parker, EUA) para controle de pressão – Figuras 3.2 e 3.4, itens F, e Figura 3.5 – possuem fundo de escala de 15 psi e suportam uma vez e meia esta pressão na entrada. São alimentadas por 24 V_{DC}, possuem controle proporcional de pressão por tensão de 0 a 5 V e indicador de pressão também proporcional de 0 a 5 V. Os conectores das válvulas estão simbolizados na Figura 3.6 e as funções de seus pinos estão indicadas na Tabela 3.1.

A fonte de 24 V_{DC} da Figura 3.7 foi implementada para alimentar as duas eletroválvulas. Nela há uma chave de 3 entradas e 3 estados para cada, sendo um dos estados com todas as saídas desconectadas da entrada. Esta mesma chave foi utilizada para o circuito carregador das baterias, descrito na seção 0.

Para as tensões de controle das pressões, foi implementado um circuito da Figura 3.8 para o vaso do fluido de revestimento e outro para o vaso da amostra. Para

tal, foi usado um amplificador operacional duplo, o LF353. O circuito é composto basicamente por um amplificador inversor de ganho unitário e entrada controlada por resistores e *trimpot*¹⁶. A tensão na saída do amplificador é limitada pela tensão no *trimpot*. Mesmo assim – por medida de segurança das válvulas de pressão – acrescentou-se um resistor com um diodo zener para limitar a tensão na saída do amplificador. Os dois diodos em série servem para reduzir a tensão da saída de forma a possibilitar o trabalho com tensão próxima à da referência, 0 V. A chave de dois estados serve para acionar ou desacionar a válvula. E o resistor, paralelo à entrada de controle da válvula, conserva uma certa corrente nos diodos para manter a tensão constante na entrada da válvula.



Figura 3.5: Unidade de controle eletrônico de pressão modelo VSO-EP (Parker, EUA).

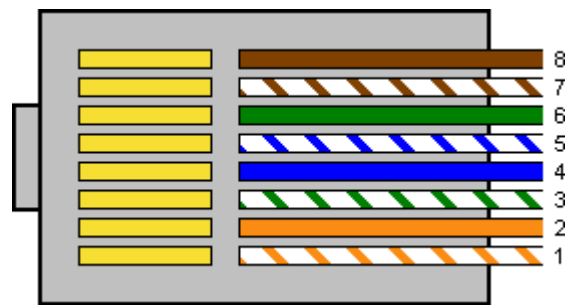


Figura 3.6: Conector RJ-45 das eletroválvulas e sua fiação.

Tabela 3.1: Funções dos pinos do conector da eletroválvula.

Pino	Função
1	alimentação: 24 V _{DC}
2	controle de pressão: 0 a 5 V
3	indicador de pressão: 0 a 5 V
4	referência
5 a 8	–

Teoricamente, a tensão de controle é proporcional à pressão de saída e igual à tensão de monitorização no pino indicador, conforme equação (3.1). Mas, na prática, a

¹⁶ Abreviatura em inglês de *trimmer potentiometer*.

válvula funciona como uma fonte de pressão em série a uma resistência de saída. Portanto a tensão de controle tem que estar acima da teórica calculada para a pressão ser a desejada.

$$\text{tensão} = \frac{\text{pressão}}{3 \frac{\text{psi}}{\text{V}}} \quad (3.1)$$

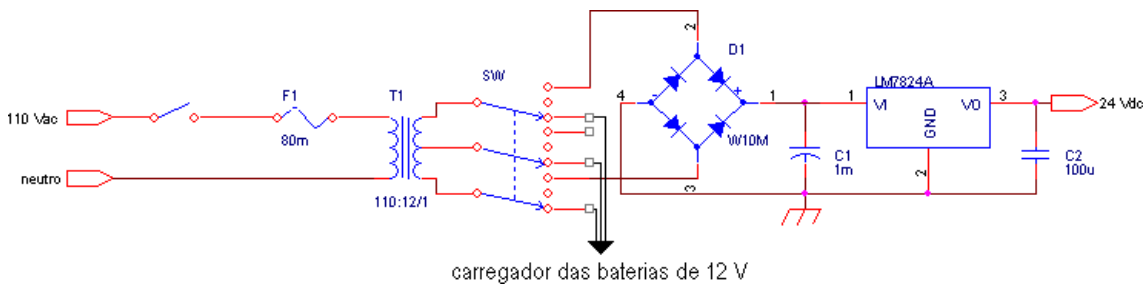


Figura 3.7: Circuito de alimentação das válvulas pneumáticas.

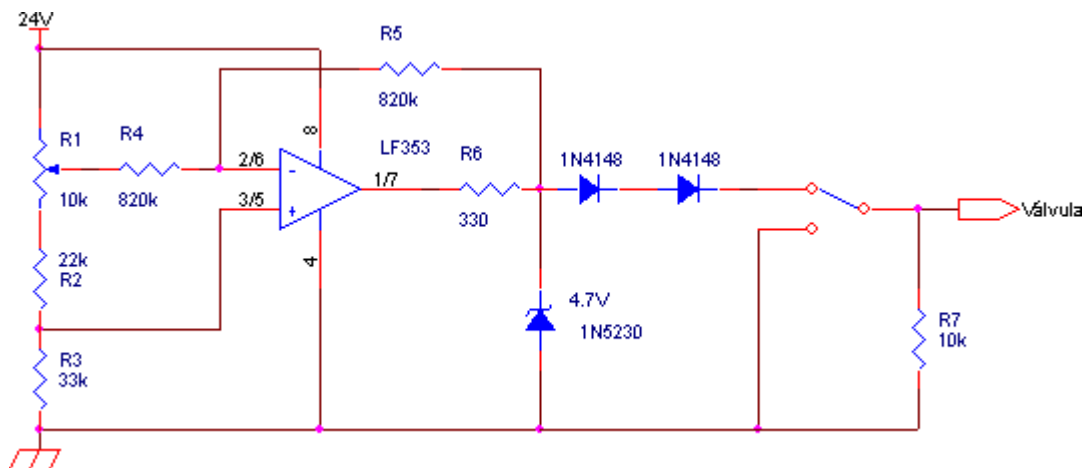


Figura 3.8: Circuito de controle de pressão das eletroválvulas.

3.1.2 Célula de Fluxo

A câmara de focalização hidrodinâmica, desenvolvida no trabalho anterior (WANDERLEY, 2006; WANDERLEY e SOUZA, 2006), foi feita de acrílico transparente com capilar de vidro comum com 200 µm de diâmetro. Suas dimensões, sem capilar nem tampa, estão mostradas na Figura 3.9.

Nas extremidades diametralmente opostas da célula de fluxo, há furos para passagem dos parafusos que a fixam à célula. Há mais dois furos intermediários: um para a entrada do fluido de revestimento e outro que conduz ao vaso de rejeito

intermediado pela válvula de fechamento. Há também um furo central onde é encaixada uma agulha de anestesia local BD Spinal (Becton Dickinson, EUA), a qual leva a amostra até perto do término da região de confluência. Esta agulha é conectada à mangueira que conduz a amostra por uma conexão luer-lok – Figura 3.10.

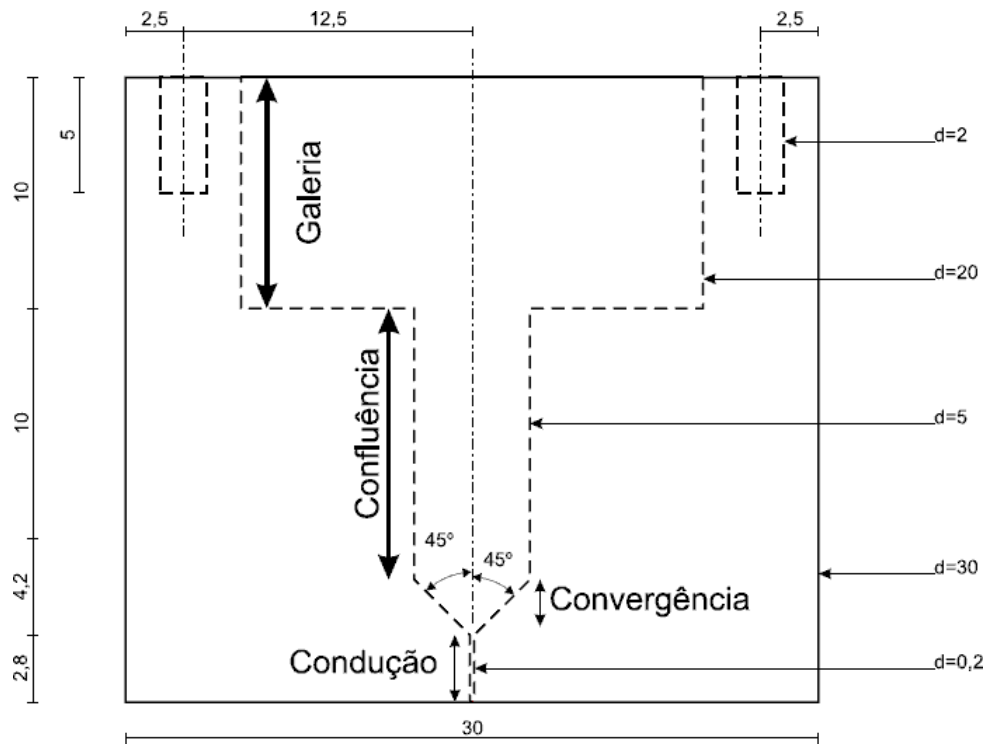


Figura 3.9: Vista ortogonal lateral da câmara de focalização hidrodinâmica sem capilar nem tampa. As medidas são fornecidas em milímetros (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 45).



Figura 3.10: Tampa da câmara de focalização hidrodinâmica e a conexão luer-lok da mangueira com a agulha que conduz a amostra para dentro da câmara (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 48).

3.1.3 Montagem Óptica

A montagem óptica do citômetro de fluxo biparamétrico é apresentada na Figura 3.11. Ela é composta basicamente pelos sistemas de excitação e de detecção dos espalhamentos frontal e do lateral. Estes sistemas serão descritos nas seções seguintes.

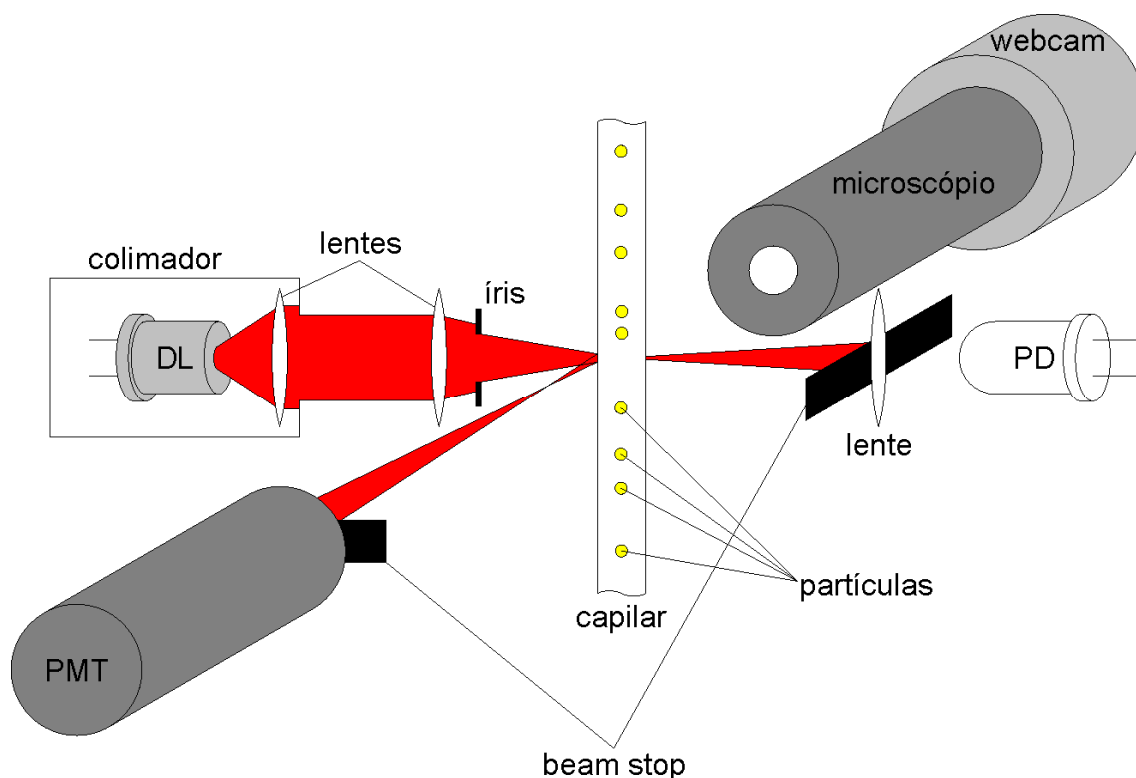


Figura 3.11: Montagem óptica do citômetro de fluxo biparamétrico, apresentando o *laser* de excitação, o sistema de detecção do espalhamento frontal, o de detecção do espalhamento lateral e a *webcam* acoplada ao microscópio. Abreviaturas: *DL*, *laser* de diodo; *PD*, fotodiodo, *PMT*, tubo fotomultiplicador.

Ao sistema, acoplou-se um microscópio cuja lente ocular foi substituída por uma *webcam*. Este microscópio foi instalado, ainda no trabalho anterior (WANDERLEY, 2006), perpendicularmente ao feixe de excitação óptica e ao capilar de tal forma que fosse possível visualizar as partículas iluminadas pelo *laser* passando pelo sítio de observação, com o propósito de se averiguar a focalização hidrodinâmica. O microscópio é o binocular KHC (Olympus, EUA). A lente objetiva utilizada possui fator de ampliação de 40x e abertura numérica¹⁷ 0,65. A *webcam* é uma câmera CMOS colorida com resolução de 1,3 megapixels (Clone, Taiwan) conectada a um computador pela porta USB.

¹⁷ A abertura numérica, NA, para uma lente é definida por: $NA = n \cdot \sin(\theta)$, onde n é o índice de refração do meio externo à lente e θ é o meio ângulo do cone de revolução de luz mais divergente que pode atravessar a lente.

3.1.4 Sistema de Excitação

Neste trabalho, continuou-se utilizando o *laser* de estado sólido DL-3148-025 (Sanyo, Japão) com comprimento de onda de 635 nm, vermelho, 5 mW de potência, 5,6 mm de diâmetro, corrente máxima de 45 mA e eficiência diferencial de 0,5 W/A. A equação correspondente à eficiência diferencial é definida em (A.8) no Apêndice A.

O citado diodo *laser* é equipado com um fotodiodo, o qual permite a medição da intensidade luminosa emitida e torna viável o seu controle de potência e prevenção contra dano, já que *lasers* de estado sólido são facilmente danificados por sobrecorrente.

O feixe do *laser* é colimado por uma lente usada em leitores de CD. Esta lente é mecanicamente fixa ao *laser* por uma peça chamada colimador. Uma lente de microscópio com fator de ampliação de 4x e abertura numérica 0,10 focaliza o *laser* no sítio de observação do capilar. Logo após esta lente, foi acrescentada uma íris com 1 mm de diâmetro para tornar mais fino o feixe de *laser*, com a finalidade de reduzir o sítio de observação.

Um novo suporte para o *laser* e para a lente que o focaliza no capilar foi construído em alumínio e pintado de preto fosco. A íris foi fixada na própria montagem da lente. A função deste novo suporte é permitir um melhor controle direcional do feixe do *laser*. Suas vistas ortogonais estão apresentadas no Apêndice B.

3.1.4.1 Circuito de Alimentação e Controle do *Laser*

O circuito de alimentação e controle do *laser* foi reprojetoado com uma nova malha de realimentação com maior ganho de malha aberta – Figura 3.12. Tal circuito consiste basicamente de uma fonte de corrente controlada pela corrente do fotodiodo encapsulado junto ao próprio *laser* de diodo, ou seja, controlada pela potência emitida.

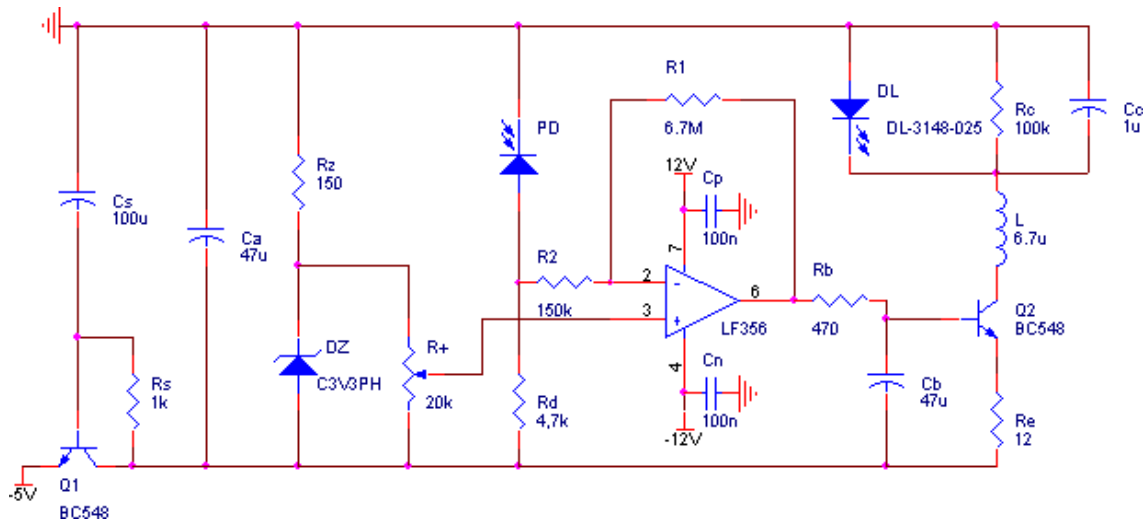


Figura 3.12: Circuito elétrico de alimentação e controle do *laser* de diodo.

O circuito possui vários componentes que impedem variações abruptas da corrente no *laser*, reduzindo a possibilidade de danos no mesmo: os componentes R_s , C_s e Q_1 formam a chamada chave *soft start*, a qual impede eventuais surtos de corrente quando o aparelho é ligado, aumentando gradativamente a tensão de alimentação, no coletor de Q_1 ; o capacitor C_a funciona como um filtro passa-baixa, reduzindo variações da mesma tensão; os dispositivos C_c , R_c e L impedem variações rápidas de tensão e corrente sobre o *laser*. DZ e R_z funcionam como um regulador de tensão e o *trimpot* R_+ controla o potencial na entrada não-inversora do amplificador operacional, fixando a potência do *laser*. R_b e R_e são resistores limitadores de corrente para o transistor Q_2 em emissor degenerado. O capacitor C_b realiza um filtro passa-baixa para a tensão de controle do mesmo transistor. C_p e C_n filtram oscilações da tensão de alimentação.

Neste circuito, o fotodiodo atua como uma fonte de corrente proporcional à potência emitida pelo *laser*, fazendo com que a tensão sobre R_d seja aproximadamente proporcional a esta potência. Se a potência aumenta, a tensão sobre R_d aumenta e, conseqüentemente, a tensão na saída do amplificador operacional diminui, forçando o diodo *laser* a diminuir sua potência para o valor previamente ajustado. Efeito análogo de compensação ocorre quando a potência do

laser é reduzida. Para detalhes sobre o cálculo da potência e realimentação deste circuito, *vide* Apêndice A.

3.1.5 Espalhamento Frontal

Para medir a potência luminosa do espalhamento frontal, foi utilizado o mesmo fotodiodo utilizado no trabalho anterior (WANDERLEY, 2006), o SFH213 (Infineon, Alemanha), operando no modo fotocondutivo. Este dispositivo possui sensibilidade espectral máxima de 0,62 A/W em 870 nm e de aproximadamente 0,42 A/W no comprimento de onda do *laser* utilizado, 635 nm.

A luz do *laser*, após passar pelo capilar e sofrer espalhamento, incide sobre uma lente que o focaliza no fotodiodo. Esta lente é do que se usa em leitores de CD. Além disso, foi posto na frente da lente uma barra de obscuração retangular feita de papel cartão preto com aproximadamente 1 mm de largura, para impedir a passagem do *laser* direto.

Todo o sistema de condicionamento de sinal para detecção do espalhamento frontal foi reprojeto de forma a se obter melhor sensibilidade e maior relação sinal-ruído. Tal sistema, composto por um pré-amplificador de carga e um amplificador conformador, é detalhado a seguir.

3.1.5.1 Pré-Amplificador de Carga

O novo projeto do pré-amplificador de carga para detecção do sinal proveniente do fotodiodo é ilustrado na Figura 3.13. As modificações em relação ao pré-amplificador de carga anterior concernem à sensibilidade, ao uso de um amplificador operacional com menor ruído e maior taxa de comutação, à polarização do fotodiodo, e ao uso de duas malhas de realimentação em T: uma de capacitores e outra de resistores.

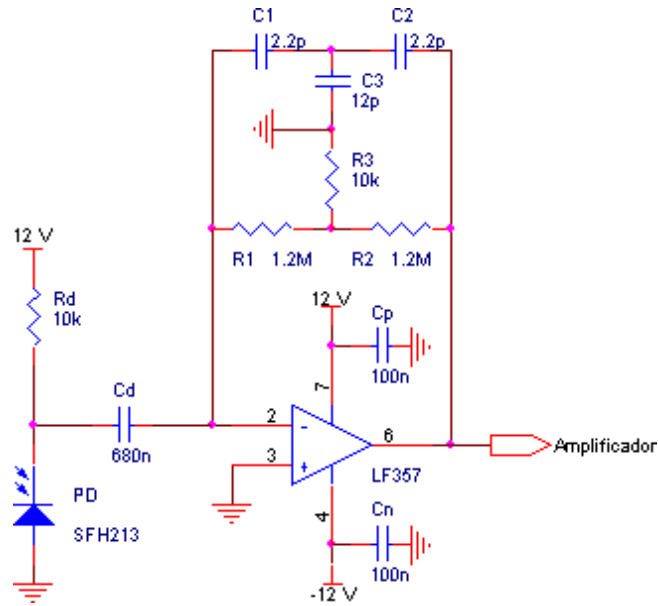


Figura 3.13: Circuito do pré-amplificador de carga utilizado na detecção do espalhamento frontal.

O fato de o fotodiodo ser polarizado, ou seja, operar em modo fotocondutivo, não implica em mudança no funcionamento do circuito. Apesar disto, o resistor de polarização, R_d , e o capacitor de acoplamento, C_d , impõem uma filtragem passa-alta aos pulsos de corrente oriundos do fotodetector.

Quanto às malhas em T, pode ser demonstrado – *vide* Apêndice C – que os valores teóricos para capacitância e resistência equivalentes são dados pelas equações (3.2) e (3.3), considerando C_1 igual a C_2 e R_1 igual a R_2 . Para os valores dos componentes indicados na Figura 3.13, as expectativas teóricas da capacitância e resistência equivalentes são 0,295 pF e 144 M Ω , porém na prática há limitações na obtenção de tais valores, principalmente pelo fato do amplificador operacional não ser ideal e pela existência de capacitâncias parasitas. Em relação a estas, procurou-se minimizá-las utilizando-se placa de fibra de vidro, e trilhas de cobre finas e espaçadas no *layout* do circuito.

$$C = \frac{C_1}{2 + \frac{C_3}{C_1}} \quad (3.2)$$

$$R = R_1 \left(2 + \frac{R_1}{R_3} \right) \quad (3.3)$$

A intenção de se ter uma capacitância tão baixa é obter-se uma alta sensibilidade, prevista pela equação (2.9). Quanto à resistência, é desejável que seja alta para o descarregamento da capacitância ser desprezível enquanto houver pulso de corrente proveniente da amostra. Para reduzir o ruído térmico intrínseco desta resistência de realimentação, utilizou-se a malha em T, proporcionando uma resistência efetiva para a malha de realimentação bem maior que a dos resistores utilizados.

O pré-amplificador de carga foi acondicionado numa caixa metálica independente, Figura 3.14, com o intuito de se reduzirem interferências eletromagnéticas indesejáveis. Cuidados especiais também foram tomados em relação ao uso de cabos coaxiais de menor capacitância e mais imunes à interferência para as conexões de alimentação, de entrada e saída de sinal. Ademais a conexão ao fotodiodo foi realizada por um cabo curto para se reduzir ainda mais a interferência.

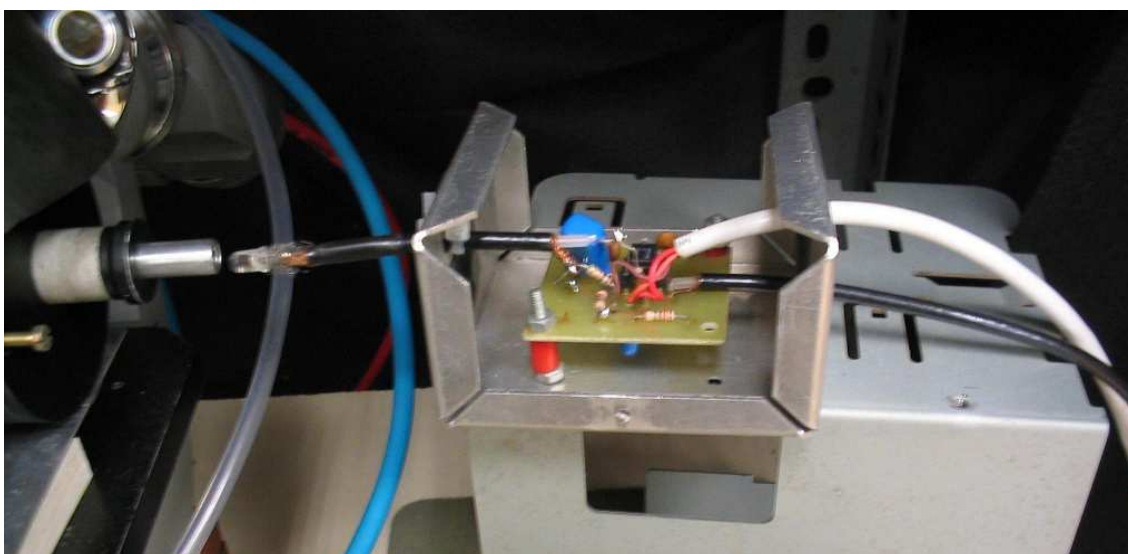


Figura 3.14: Pré-amplificador de carga utilizado na detecção do espalhamento frontal.

3.1.5.2 Amplificador Conformador

A saída do pré-amplificador de carga é conectada ao amplificador apresentado na Figura 3.15. A topologia final deste amplificador foi estabelecida de forma maximizar a relação sinal-ruído e propiciar a maior taxa de contagem possível. Os valores dos componentes foram calculados e/ou escolhidos de forma heurística

durante experimentos com o citômetro de fluxo utilizando microesferas não fluorescentes de poliestireno F-13838 (Invitrogen, EUA) com 15 μm de diâmetro nominal.

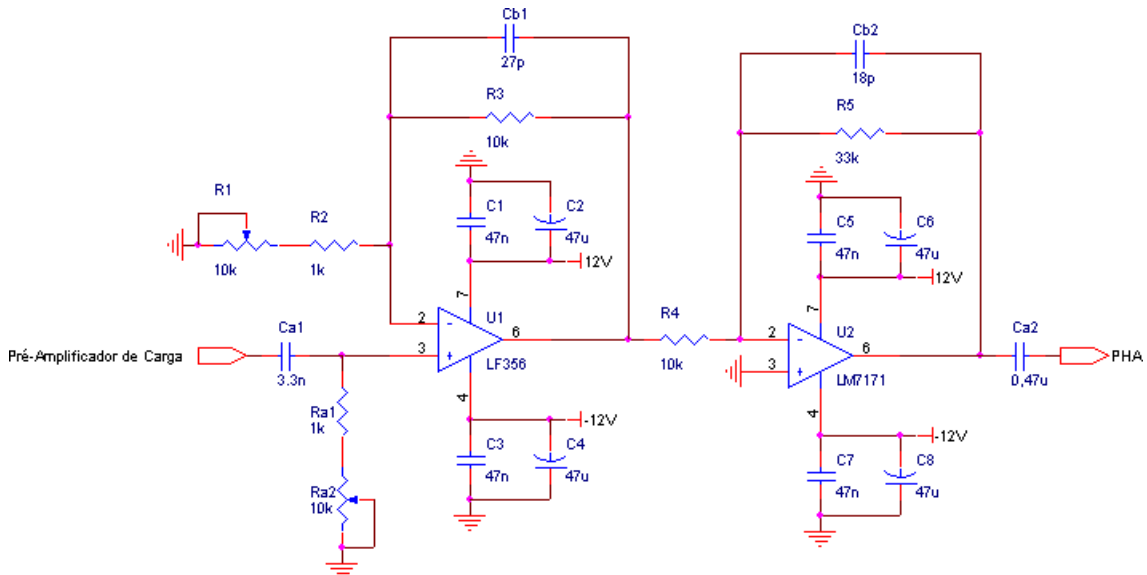


Figura 3.15: Circuito do amplificador conformador utilizado na detecção do espalhamento frontal.

O amplificador possui frequência de corte inferior teórica variável de 4,38 kHz a 48,2 kHz, controlada pelo potenciômetro R_{a2} . Dispõe de 2 estágios de ganho, variável de 3 a 33 vezes e controlado pelo potenciômetro R_1 . A frequência de corte superior teórica é de 268 kHz. Em cada entrada de alimentação, há capacitores para filtrar possíveis flutuações. Ademais, este amplificador, durante experimentos com espalhamento frontal, é conectado à placa *PHA* – detalhada na seção 3.1.8 – por um acoplamento AC com frequência de corte inferior de 338,6 Hz, considerando que a placa possui impedância de entrada aproximada de 1 k Ω .

3.1.6 Espalhamento Lateral

Para medição da intensidade luminosa do espalhamento lateral, foi utilizado o *PMT 9113B* em montagem P25A (Electron Tubes, Inglaterra), Figura 3.16, o qual possui 10 dinodos de SbCs e fotocatodo S20. A sensibilidade luminosa típica do

fotocatodo é de $160 \mu\text{A}/\text{lm}$; o ganho¹⁸ máximo nos dinodos, de $3,1 \cdot 10^6$; a eficiência quântica máxima é de 21% em 350 nm e de aproximadamente 6% no comprimento de onda do *laser* utilizado; e o diâmetro ativo é de 2,2 cm. Este *PMT* dispõe internamente de um pré-amplificador de corrente com ganho de $4 \text{ V}/100 \mu\text{A}$ e largura de banda 6 dB de 100 MHz.



Figura 3.16: Tubo fotomultiplicador 9113B (Electron Tubes, Inglaterra) utilizado na detecção do espalhamento lateral (extraída de WANDERLEY, 2006, p. 51).

Para proteção do *PMT* e redução do ruído óptico, é necessário impedir a chegada ao dispositivo do reflexo do *laser* no capilar e em outras partes do sistema. Para isto, uma barra de obscuração foi implementada por um retângulo de papel cartão preto com 1 cm de largura e comprimento superior ao da janela do *PMT*.

Como este *PMT* já dispunha de um pré-amplificador de corrente, construiu-se somente um amplificador conformador.

3.1.6.1 Tubo Fotomultiplicador 9113B em montagem P25A

Apesar do elevado ganho do tubo fotomultiplicador ser obtido pela aplicação de alta tensão entre dinodos e fotocatodo, a alimentação deste dispositivo é realizada por três fios aos quais devem ser aplicadas tensões de $+5 \text{ V}_{\text{DC}}$, -5 V_{DC} e a referência, 0 V.

¹⁸ Número de elétrons que chegam ao coletor para cada fotoelétron emitido pelo catodo (NICHOLSON, 1974, p.31).

A alta tensão é obtida internamente a partir da alimentação positiva por meio de um conversor DC-DC.

Este *PMT* possui dois fios para controle e monitoração da tensão de ganho, e um cabo coaxial RG174 para saída de sinal, com impedância característica de 50 Ω . Os fios e suas funções estão apresentados na Tabela 3.2. O dispositivo possui ainda um *trimpot* na parte interna traseira, o qual pode ser utilizado para controlar a tensão de ganho.

Tabela 3.2: Fios do *PMT* e suas funções.

Fio	Função
vermelho	alimentação: +5 V
preto	referência: 0 V
violeta	alimentação; -5 V
amarelo	indicador da tensão de ganho/1.000
branco	controle da tensão de ganho: de 0,3 a 1,8 V

A tensão total de ganho pode ser controlada de 2 modos diferentes. Num deles, pode-se aplicar uma tensão externa de 0,3 a 1,8 V ao fio branco. No outro modo – o escolhido para o citômetro de fluxo biparamétrico –, os fios branco e amarelo devem ser curto-circuitados e a tensão deve ser controlada pelo *trimpot*. Em ambos os modos, a tensão pode ser monitorada pelo fio amarelo, o qual indica a mesma dividida por 1.000.

De acordo com os resultados dos testes de fábrica, fornecidos com o dispositivo, a tensão máxima permitida aplicada entre o fotocatodo e o último anodo é de 978 V. Acima deste valor, o *PMT* pode sofrer perda da performance ou dano permanente.

3.1.6.2 Amplificador Conformador

A saída do pré-amplificador de corrente do *PMT* é conectada ao amplificador apresentado na Figura 3.17. Da mesma forma que o amplificador do espalhamento frontal, a topologia final do amplificador do espalhamento lateral foi estabelecida de

forma a maximizar a relação sinal-ruído e a taxa de contagem, sendo os valores dos componentes ajustados de forma heurística durante experimentos com microesferas não fluorescentes de poliestireno F-13838 (Invitrogen, EUA) com 10 μm de diâmetro nominal.

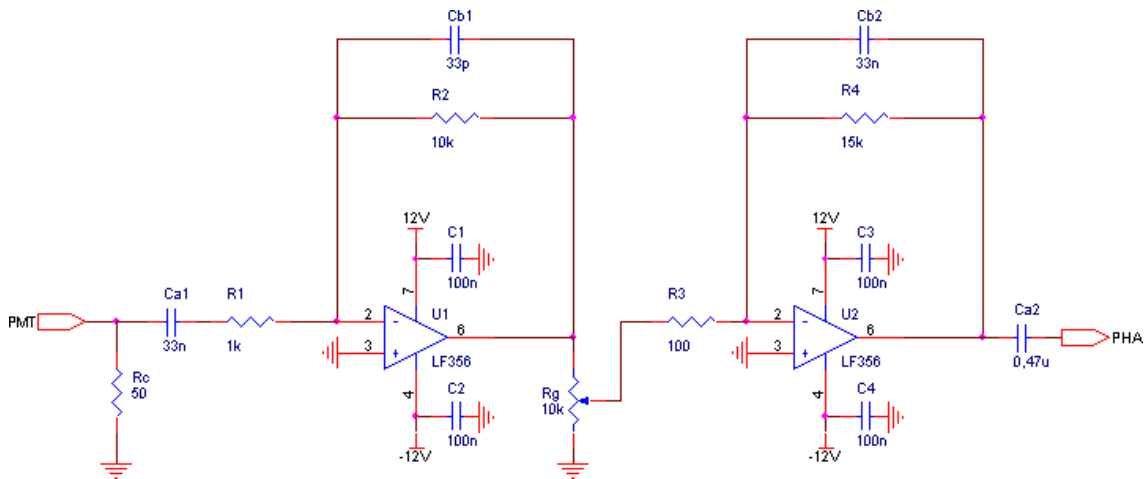


Figura 3.17: Circuito do amplificador conformador do espalhamento lateral.

Na entrada do amplificador há um resistor de 50 Ω para casamento da impedância do cabo coaxial do *PMT*. Logo após, há um estágio com amplificador operacional funcionando como um filtro ativo passa-banda de ganho 10 e banda de 4,82 kHz a 482 kHz. Na saída deste estágio, há um potenciômetro para controle de ganho e, em seguida, outro estágio com amplificador operacional atuando como um passa-baixa ativo de ganho 150 e frequência de corte superior de 321,5 Hz. O amplificador, durante o uso, é conectado à placa *PHA* por um acoplamento AC com frequência de corte de 338,6 Hz, considerando que a placa possui impedância de entrada aproximada de 1 k Ω . Em cada entrada de alimentação dos amplificadores operacionais, há capacitores para filtrar possíveis flutuações.

Este amplificador possui uma frequência de corte superior no segundo estágio abaixo da frequência de corte inferior do primeiro estágio, o que implica numa banda estreita em termos da melhor relação sinal-ruído. No Apêndice D, este circuito foi analisado e seu valor teórico de ganho foi estimado. Este é variável de 0 a 100 vezes e sua banda de frequência se situa entre 338,6 Hz e 4,82 kHz.

3.1.7 Alimentação dos Circuitos do Laser e de Condicionamento de Sinais

Visando reduzir ruído e interferência nos circuitos condicionadores de sinais, já que os sinais de entrada são tipicamente pequenos na eletrônica de *front-end*¹⁹ relativa à detecção fotônica, os condicionadores foram alimentados por duas baterias recarregáveis de 12 V e 2,2 Ah (Sunnyway, China).

Para se carregarem as baterias pela rede elétrica, foi projetado o circuito da Figura 3.18. Como é desaconselhável realizar medições com o citômetro de fluxo durante o carregamento das baterias, utilizou-se a chave SW. Esta ainda possibilita que o mesmo transformador seja utilizado tanto para carregar as baterias como para alimentar as válvulas eletrônicas de pressão, nunca os dois simultaneamente.

O transformador interferia na captação dos sinais dos fotodetectores. Por esta razão, os circuitos que o utilizam – o carregador das baterias e o circuito de alimentação das eletroválvulas – foram montados em um gabinete à parte. Desta forma, para o carregamento das baterias é necessária a interligação dos dois gabinetes por um cabo de força específico.

Para proteção das baterias e dos circuitos alimentados por elas, foram utilizados fusíveis, porém a queima de apenas um deles pode danificar amplificadores operacionais. Contornando este problema, relés garantem que as duas baterias sejam desconectadas do circuito em caso de falha. Este sistema de proteção está desenhado na Figura 3.19.

¹⁹ *Front-end*: termo utilizado em eletrônica para representar a parte do sistema responsável pela coleta do sinal de entrada, o qual, em seguida, é enviado ao *back-end* para amplificação, filtragem e edição para apresentação ao usuário.

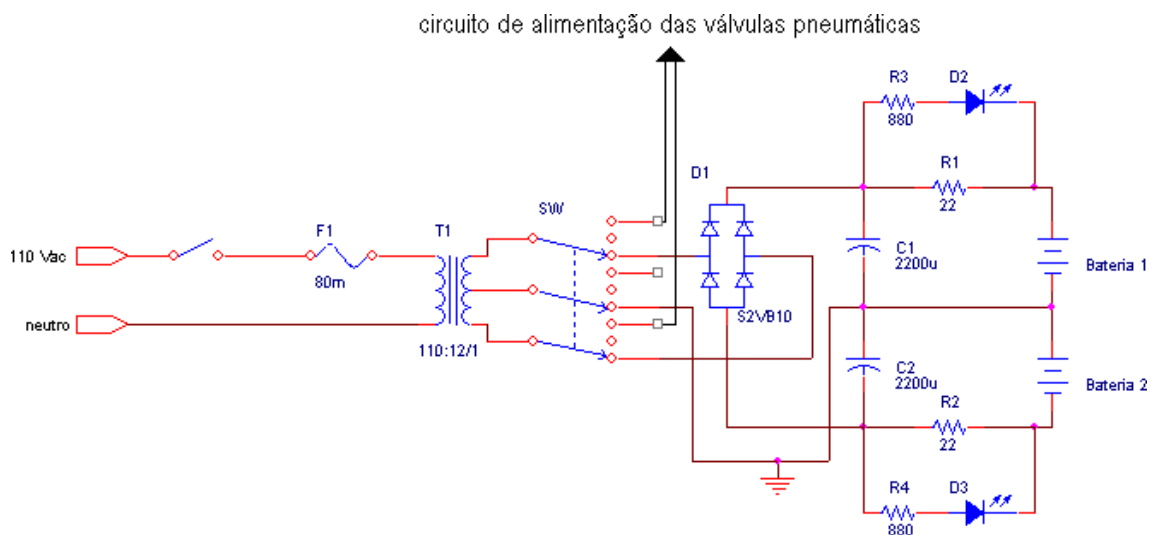


Figura 3.18: Carregador das baterias de 12 V.

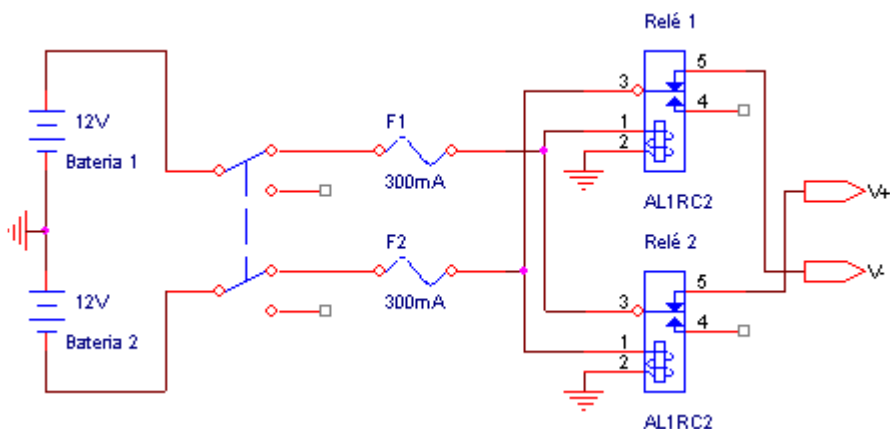


Figura 3.19: Alimentação e proteção dos circuitos de sinais e do *laser*.

Nem todo o sistema pode ser alimentado com ± 12 V, como é o caso do *PMT*, o qual requer tensões de alimentação de ± 5 V, e do circuito de controle do *laser*, o qual requer -5 V. Em virtude destes requisitos, foi desenvolvido o conversor DC-DC da Figura 3.20. A saída da tensão de +5 V dispõe de maior filtragem com o uso de um indutor e um capacitor adicionais. O *PMT* internamente utiliza a tensão de +5 V_{DC} para alimentar um conversor DC-DC chaveado e gerar a alta tensão necessária ao seu funcionamento. Para evitar interferência na alimentação positiva, utilizou-se uma filtragem adicional na saída da fonte de tensão. Além disso, um diodo foi adicionado à referência do regulador para compensar queda de tensão causada pela resistência do fio do indutor.

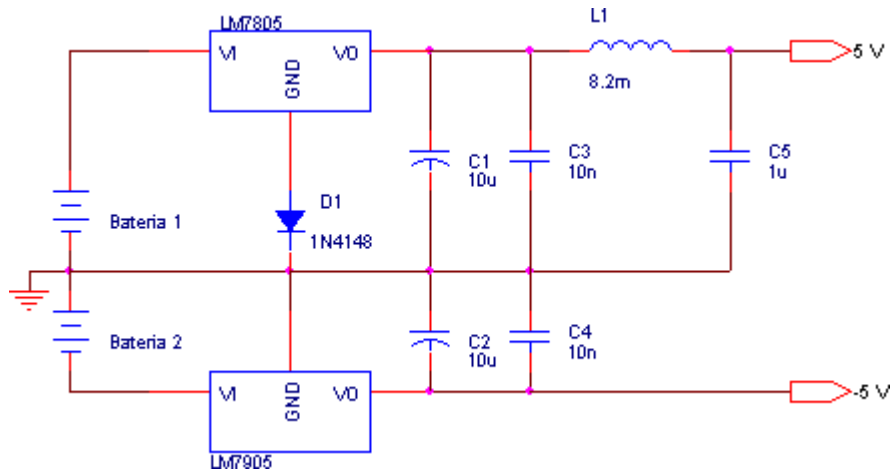


Figura 3.20: Conversor DC-DC de ± 12 V para ± 5 V.

3.1.8 Sistema de Aquisição

3.1.8.1 Placa PHA

O sistema de citometria de fluxo dispõe de uma placa *PHA* modelo TRUMP-PCI-2k (Ortec, EUA). Este dispositivo é monocanal, o que impossibilita a aquisição simultânea dos espalhamentos frontal e lateral. Possui tempo morto por evento de $8 \mu\text{s}$, resolução máxima de 2.048 alturas de pulso e impedância de entrada de aproximadamente $1 \text{ k}\Omega$. Na parte traseira da placa, há um *trimpot* para ajuste de zero e outro para ajuste do nível de discriminação, a menor altura de pulso que pode ser contada. A comunicação da placa com o computador é realizada pelo barramento ISA. Foi implementado um *software*, descrito a seguir, para controle da placa *PHA*, aquisição das alturas de pulsos e apresentação dos histogramas monoparamétricos.

3.1.8.2 Software de Aquisição e Apresentação de Dados

O programa apresentado na Figura 3.21 foi implementado em LabVIEW (National Instruments, EUA) com o fito de controlar a placa *PHA*, adquirir os dados relativos ao espalhamento e apresentar os dados num histograma monoparamétrico. Este programa de instrumentação virtual possui uma chave liga-desliga, um botão para iniciar ou finalizar a aquisição, outro para salvá-la e mais um para abrir uma aquisição previamente realizada. Além disso, durante a aquisição, o tempo decorrido é

apresentado num indicador. O *software* disponibiliza um espaço a ser preenchido pelo usuário com informações relativas à aquisição. Estas informações juntamente às contagens para cada altura de pulso, data e horário do início da aquisição são armazenados num arquivo com formato txt. Para análise dos dados, há um gráfico para apresentação do histograma em função das alturas dos pulsos, um indicador da contagem total e uma chave seletora, caso se deseje visualizar o eixo das contagens em escala logarítmica. A estrutura interna do programa é apresentada no Apêndice E.

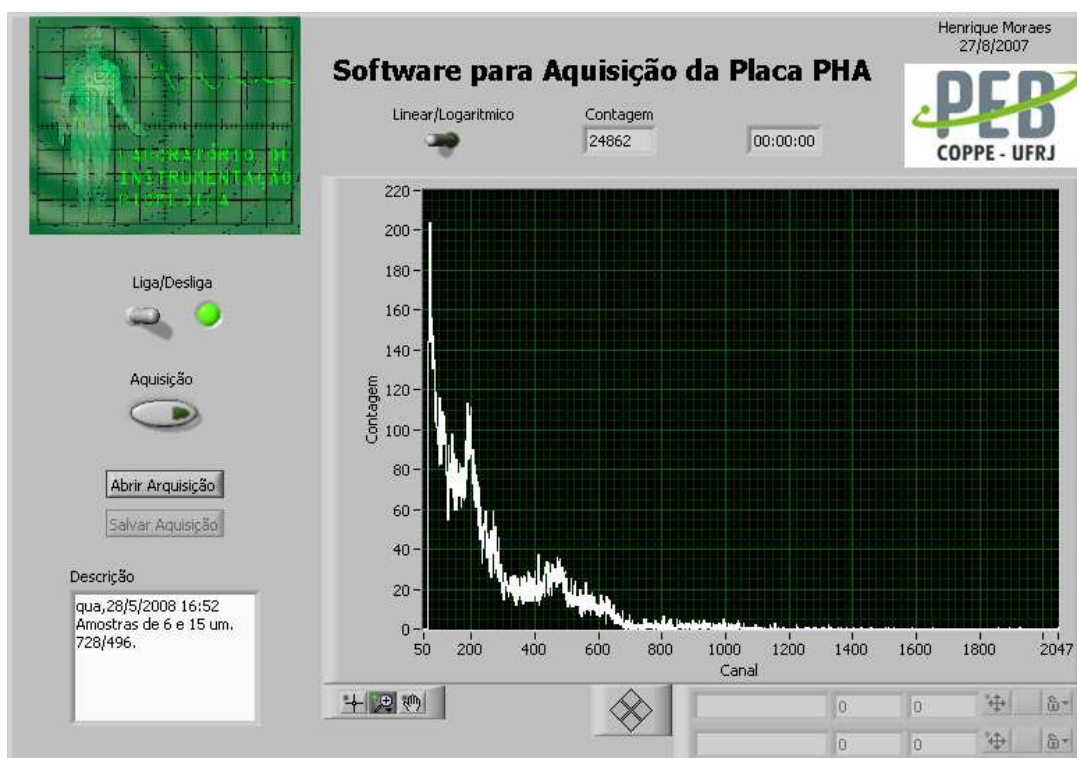


Figura 3.21: Painel frontal do *software* para controle da placa *PHA*, captura das alturas dos pulsos relativos às partículas da amostra e apresentação do histograma monoparamétrico.

3.2 Critérios de Avaliação

A avaliação do trabalho desenvolvido foi dividida em avaliação da eletrônica e avaliação do citômetro de fluxo biparamétrico. Na primeira, foram avaliados isoladamente o circuito de controle das eletroválvulas de pressão, o circuito de alimentação e controle do *laser*, e os circuitos de sinais – pré-amplificador de carga e amplificadores conformadores dos espalhamentos lateral e frontal. Na avaliação do

citômetro de fluxo biparamétrico, foram avaliadas sua focalização hidrodinâmica e sua capacidade de discriminar partículas diferentes tanto com o espalhamento frontal quanto com o lateral.

Os espalhamentos foram avaliados por meio de experimentos só com água destilada, para verificar ruído de fundo, e outros com suspensão de partículas. Tendo em vista que a placa *PHA* utilizada é monocanal, os espalhamentos não puderam ser avaliados simultaneamente. Ademais os espalhamentos no citômetro de fluxo desenvolvido no presente trabalho foram comparados com os espalhamentos análogos, obtidos de amostras semelhantes, num citômetro de fluxo comercial, o FACScan (BD, EUA).

3.2.1 Avaliação da Eletrônica

3.2.1.1 Eletroválvula Pneumática

Para se avaliar a linearidade de cada uma das válvulas, realizou-se um experimento em que uma mangueira conectava cada válvula, uma por vez, a um manômetro de classe B com 15 psi de fundo de escala (IMB, Brasil). A mangueira foi furada por uma broca com o mesmo diâmetro do diâmetro interno do capilar, 0,2 mm, para simular a carga hidráulica. Foram então aplicados valores de tensão na entrada de controle de cada eletroválvula – crescentes até 5 V e depois decrescentes –, e medidas as pressões e as tensões de monitorização.

3.2.1.2 Laser

Para averiguar o funcionamento do *laser* com o novo circuito de alimentação e controle, realizou-se um experimento em que a tensão de controle – dada pelo *trimpot* R+ da Figura 3.12 – era alterada, enquanto eram monitoradas as correntes no *laser* e no fotodiodo acoplado, além da potência e do comprimento de onda emitidos. A corrente no *laser* foi medida pelo osciloscópio digital/multímetro HDS1022M (Meastech, China); a corrente no fotodiodo acoplado, pelo multímetro digital 506

(Protek, EUA); a potência emitida, pelo LaserMate-Q (Coherent, EUA); e o comprimento de onda, pelo WaveMaster Laser Wavelength Meter (Coherent, EUA). Durante este experimento, o *laser* ficou dentro de seu colimador, sem a utilização da íris, e os instrumentos de medição de potência e comprimento de onda eram postos frente ao mesmo de forma a capturar seu feixe de luz.

3.2.1.3 Espalhamento Frontal: Pré-Amplificador de Carga

Os componentes de realimentação do pré-amplificador de carga são críticos para o funcionamento conforme previsão teórica. Em vista disso, estes componentes foram caracterizados antes de serem soldados à placa de circuito impresso. As resistências foram medidas pelo osciloscópio digital/multímetro HDS1022M (Meastech, China) e as capacitâncias, pelo medidor de impedância vetorial 4193A (Hewlett-Packard, EUA) do Laboratório de Ultra-Som do PEB/UFRJ. O módulo e a fase das impedâncias capacitivas foram adquiridos em função de alguns valores de frequências. Para avaliar a capacitância, realizou-se uma regressão com os módulos e as frequências, utilizando o *software* Matlab 6.5 (The MathWorks, EUA).

Para se avaliar a sensibilidade do pré-amplificador de carga, deve-se injetar pulso de corrente com carga conhecida na entrada e verificar o pico de tensão na saída (BELTRAN e PERLAS, 2002, *apud* WANDERLEY, 2006, p. 56; BERTUCCIO e PULLIA, 1995, *apud* WANDERLEY, 2006, p. 56). O levantamento da curva de calibração foi realizado para um conjunto de valores de carga injetada, utilizando-se como fonte de pulsos de carga o circuito ilustrado na Figura 3.22. A curva de calibração do pré-amplificador de carga desenvolvido no trabalho anterior (WANDERLEY, 2006) também foi levantada, com a finalidade de se compararem os dois pré-amplificadores.

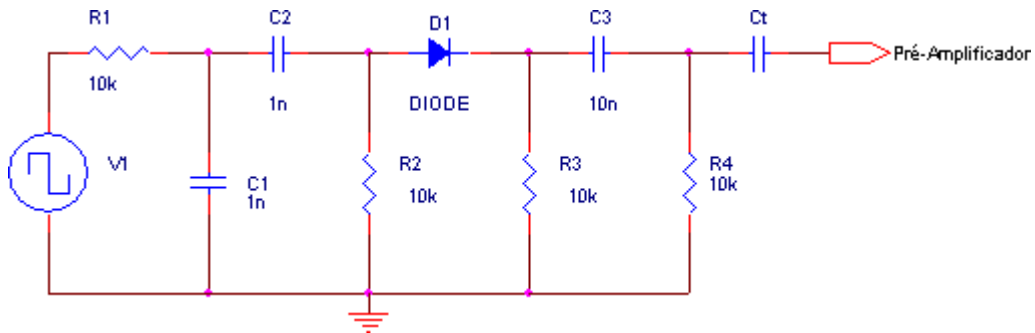


Figura 3.22: Fonte de pulsos de carga para avaliação da sensibilidade do pré-amplificador de carga.

A saída da fonte de pulsos de carga foi aplicada ao pré-amplificador de carga do presente trabalho na configuração apresentada na Figura 3.23.

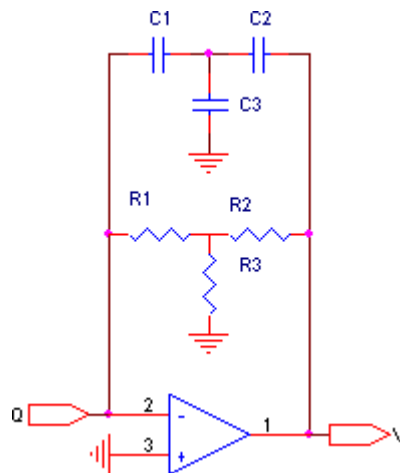


Figura 3.23: Configuração do pré-amplificador de carga utilizada para medição da sensibilidade.

A fonte de pulsos de carga compõe-se inicialmente de um filtro RC-CR, responsável por conformar a onda de tensão quadrada da entrada em pulsos de tensão. Em seguida, os pulsos positivos seguem a um filtro passa-alta. E, por fim, tem-se o capacitor de teste, C_t , com o qual se permite determinar a carga do pulso, de acordo com a equação (3.4), onde V é o valor máximo da tensão aplicada em C_t . Como C_t é um componente crítico para a medição da sensibilidade, este componente também foi caracterizado.

$$Q = C_t V \quad (3.4)$$

A frequência da onda quadrada foi fixada em 500 Hz, o suficiente para a capacitância da realimentação do pré-amplificador de carga ser descarregada durante

o intervalo entre os pulsos. A amplitude da onda quadrada era variada, controlando-se, destarte, a amplitude do pulso. Com o osciloscópio digital/multímetro HDS1022M (Meastech, China), mediu-se a tensão aplicada no capacitor de teste, C_t , e a tensão na saída do pré-amplificador. Com os vários pares – carga de entrada, pico da tensão de saída – obtidos, procedeu-se a caracterização do pré-amplificador de carga. Sua sensibilidade pôde ser obtida por meio de regressão linear daqueles pares.

3.2.1.4 Espalhamento Frontal: Amplificador Conformador

Tendo em vista que o amplificador conformador foi ajustado heurísticamente de forma a se obter a melhor relação sinal-ruído possível e baixa taxa de sobreposição de pulsos, a avaliação de seu funcionamento ocorreu durante os experimentos, quando os pulsos de tensão na saída e na entrada eram capturados pelo osciloscópio digital TDS 1001B (Tektronix, EUA).

A *posteriori*, foi caracterizada a resposta em frequência do amplificador, aplicando-se o sinal senoidal do gerador de função CFG250 (Tektronix, EUA). Esta resposta foi adquirida com um resistor de 1 k Ω na saída, simulando a placa *PHA*, e com os potenciômetros ajustados para valores máximos de ganho e de frequência de corte inferior. A frequência e os picos das tensões de entrada e de saída do amplificador foram medidas por intermédio do osciloscópio digital/multímetro HDS1022M (Meastech, China). Com os dados obtidos, pôde-se determinar o ganho e as frequências de corte inferior e superior do amplificador.

3.2.1.5 Espalhamento Lateral: Amplificador Conformador

Assim como o amplificador conformador do espalhamento frontal, o do espalhamento lateral também foi ajustado heurísticamente. Conseqüentemente suas avaliações se deram de maneiras similares.

Posteriormente, este amplificador também teve sua resposta em frequência levantada com o objetivo de se determinar ganho e frequências de corte – da mesma

forma e com os mesmos equipamentos utilizados para o amplificador do espalhamento frontal.

3.2.2 Avaliação do Citômetro de Fluxo Biparamétrico

3.2.2.1 Focalização Hidrodinâmica

Para avaliação da focalização hidrodinâmica, foi realizado um experimento com uma amostra de partículas no qual se variavam as pressões tanto do vaso do fluido de revestimento quanto do vaso da amostra e se observava a imagem do sítio de observação pela *webcam*, assim como o sinal na saída do sistema de medição do espalhamento frontal pelo osciloscópio digital TDS 1001B (Tektronix, EUA). Neste mesmo experimento foram estabelecidas as pressões nas quais o sistema operou durante a avaliação dos sistemas de medição dos espalhamentos frontal e lateral.

Como fluido de revestimento, utilizou-se água destilada. Como amostra, utilizou-se uma suspensão em água destilada de homopolímero²⁰ de PVC²¹ NORVIC@ P72HA (Braskem, Brasil) filtrada em 38 μm e agitada por 198 s pelo agitador ultra-sônico TS-255 (Toyo, Brasil) em 60 W. Pelo fato do PVC ser apolar, a suspensão foi misturada com detergente para tornar o PVC mais miscível com água e evitar agregação. As quantidades utilizadas na fabricação da amostra foram: 100 mL de água, 1 g de pó de PVC e 1 g de detergente.

3.2.2.2 Espalhamento Frontal

Primeiramente, foi avaliado o ruído de fundo do sistema. Para tal, utilizou-se água destilada tanto como fluido de revestimento quanto como amostra. Posteriormente, foi avaliada a capacidade do citômetro de fluxo de identificar partículas de diferentes tamanhos. Foram preparadas 2 soluções de partículas: uma com microesferas de diâmetro nominal de 6 μm e outra com microesferas de 10 μm .

²⁰ Homopolímero: polímero com apenas uma espécie de monômero.

²¹ PVC: policloreto de vinila.

Estas partículas fazem parte do *kit* de calibração de tamanho para citometria de fluxo com microesferas não fluorescentes, F-13838 (Invitrogen, EUA), com índice de refração de 1,591 a 590 nm.

Para a preparação da amostra, o respectivo frasco de microesferas era posto em banho por 99 s dentro do agitador ultra-sônico TS-255 (Toyo, Brasil), funcionando com potência de 60 W. A seguir, uma gota do conteúdo do frasco era adicionada a um béquer contendo aproximadamente 3 mL de água destilada. Por fim, o béquer era posto em banho com agitação ultra-sônica também por 60 W durante 99 s.

Os experimentos foram realizados com duas diferentes distâncias entre o tubo capilar e a lente que converge o sinal luminoso ao fotodiodo: 0,5 cm e 2 cm. Na configuração da menor distância, também foi realizado um experimento com as duas populações de partículas simultaneamente, com o fito de se comparar o histograma resultante com os histogramas das duas partículas em separado. Neste caso, a amostra foi preparada de maneira análoga, com uma gota de cada população de microesferas: de 6 e de 10 μm .

A análise do espalhamento frontal do citômetro de fluxo proposto, para as microesferas de 6 e de 10 μm em separado, foi comparada com a análise realizada por um citômetro de fluxo comercial, o FACScan (BD, EUA).

3.2.2.3 Espalhamento Lateral

Experimentos similares foram realizados para o espalhamento lateral. Primeiramente, foi avaliado o ruído de fundo num experimento em que água destilada foi usada como amostra e como líquido de revestimento. Em seguida, foram realizados experimentos com amostras das mesmas microesferas de 6 e de 10 μm de diâmetro nominal. Estas amostras de partículas foram preparadas da mesma forma que as amostras utilizadas para a avaliação do espalhamento frontal. Por fim, foram realizados experimentos com as mesmas microesferas utilizando o citômetro de fluxo

comercial, FACScan (BD, EUA), para comparação com a análise realizada pelo protótipo do citômetro de fluxo.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Avaliação da Eletrônica

4.1.1 Eletroválvula Pneumática

As curvas de calibração obtidas para as duas eletroválvulas estão ilustradas nas Figuras 4.1 e 4.2. Observa-se que as retas de regressão para os pontos adquiridos se aproximam da condição ideal, indicada pela equação (3.1).

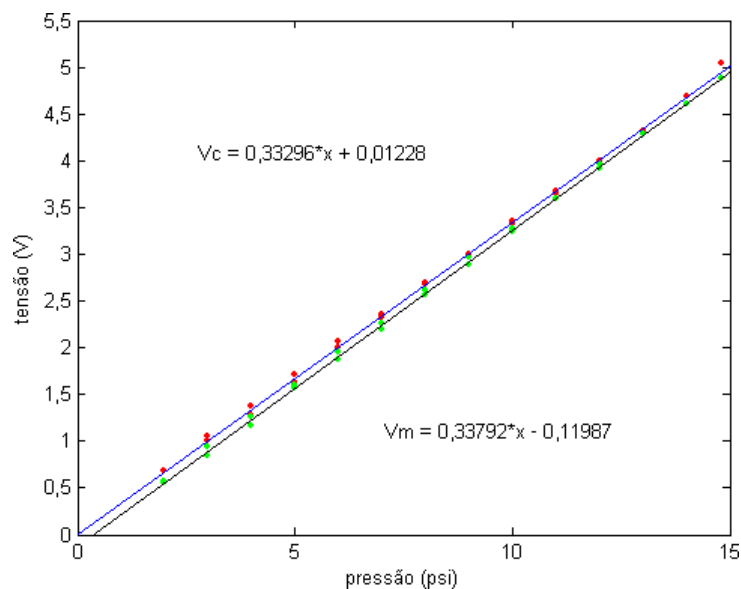


Figura 4.1: Calibração da válvula 1. Os pontos e a reta de regressão superiores representam a tensão de controle, V_c . Os pontos e a reta de regressão inferiores representam a tensão de monitorização, V_m .

Durante experimentos com o citômetro de fluxo, notou-se que o sistema pneumático nem sempre indicava as pressões previamente fixadas ao ser religado.

Isto implicava em uma necessidade de se reajustar levemente as tensões de controle nas eletroválvulas.

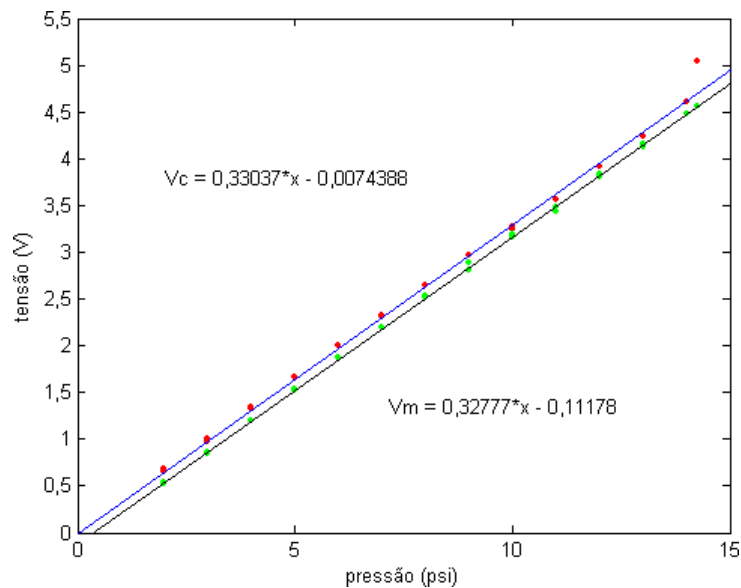


Figura 4.2: Calibração da válvula 2. Os pontos e a reta de regressão superiores representam a tensão de controle, V_c . Os pontos e a reta de regressão inferiores representam a tensão de monitorização, V_m .

4.1.2 Laser

Os resultados dos experimentos de calibração do *laser* estão apresentados na Tabela 4.. Na coluna do comprimento de onda emitido pelo *laser*, em vários pontos de medição, houve como resposta a expressão *multi-line*. Isto significa que o *laser* não estava emitindo um comprimento de onda fixo, e sim, estava mudando de modo. Os pontos em que o *laser* ficou estável estão apresentados na Figura 4.3, enquanto o dado do fabricante é apresentado na Figura 4.4. É esperado o *laser* mudar o comprimento de onda com a potência emitida. A temperatura também influencia neste resultado, assim como na corrente de monitorização gerada pelo fotodiodo (REZENDE, 1996, p. 322) e na corrente liminar em que o *laser* deixa de se comportar como *LED* – com emissão espontânea – e se torna efetivamente *laser* – com emissão estimulada (REZENDE, 1996, p. 339-349).

Tabela 4.1: Valores de calibração do *laser*: potência detectada, corrente no *laser*, corrente no fotodiodo acoplado ao *laser*, e comprimento de onda emitido.

Potência detectada (mW)	Corrente no <i>laser</i> (mA)	Corrente no fotodiodo (μ A)	Comprimento de onda (nm)
0,05	32,02	11,5	Multi-Line
0,10	32,65	19,1	Multi-Line
0,15	33,03	26,6	Multi-Line
0,20	33,35	33,8	Multi-Line
0,25	33,67	41,2	Multi-Line
0,30	33,99	49,1	Multi-Line
0,35	34,33	56,7	Multi-Line
0,40	34,70	64,3	Multi-Line
0,45	35,18	73,8	Multi-Line
0,50	35,55	81,2	636,630
0,55	35,93	88,0	Multi-Line
0,60	36,39	97,6	Multi-Line
0,65	36,67	102,3	636,649
0,70	36,89	107,8	639,648
0,75	37,35	115,9	Multi-Line
0,80	37,74	123,4	Multi-Line
0,85	38,19	131,3	Multi-Line
0,90	38,60	138,2	636,673
0,95	39,13	147,2	636,681
1,00	39,59	154,7	636,694
1,05	40,0	162,4	636,699
1,10	40,4	170,4	636,706
1,15	41,0	178,3	636,714
1,20	41,5	186,3	626,723
1,25	41,9	192,0	636,730
1,30	42,5	201,3	636,740
1,35	43,0	208,1	636,746
1,40	43,7	216,2	Multi-Line
1,45	44,4	225,1	Multi-Line

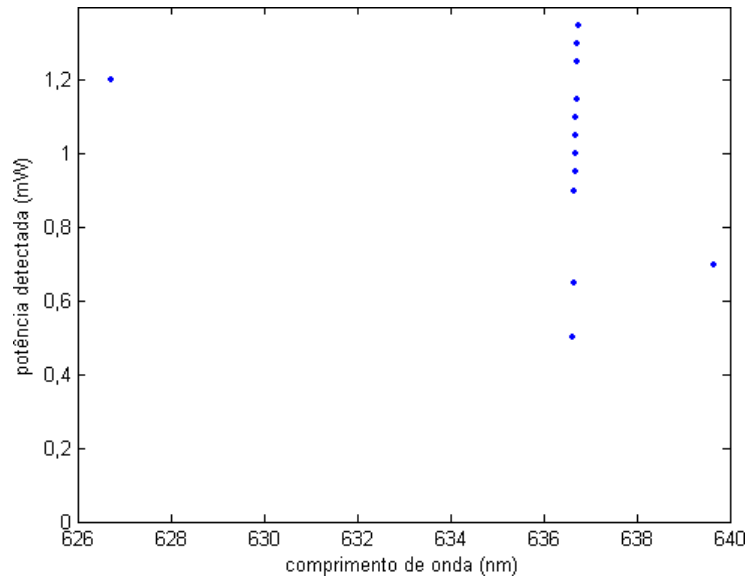


Figura 4.3: Comprimento de onda emitido pelo *laser* versus a potência detectada pelo sensor à frente do *laser*.

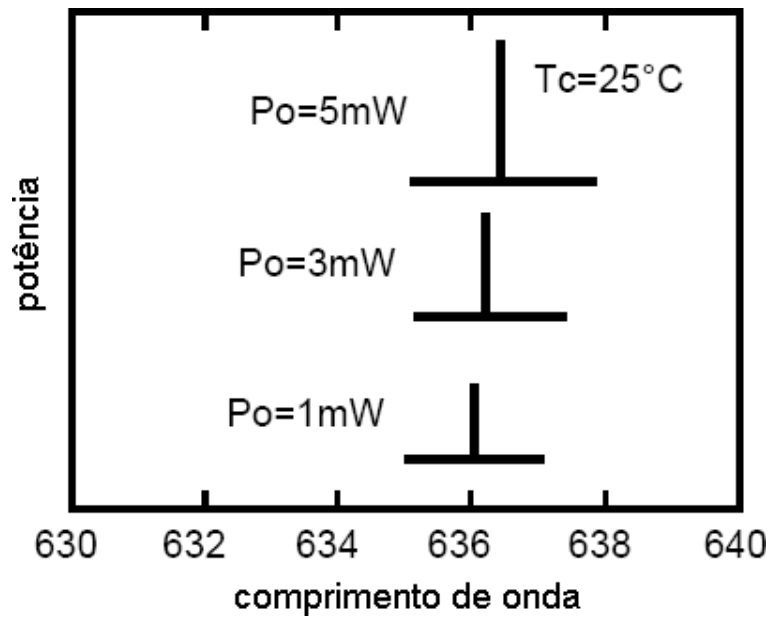


Figura 4.4: Dados do fabricante para o comprimento de onda emitido pelo *laser* versus a potência.

Na Figura 4.5, observa-se a curva da corrente de monitorização do *laser*, gerada pelo fotodiodo acoplado, em função da potência emitida. A corrente comporta-se linearmente com a potência, conforme descrito pela literatura (REZENDE, 1996, p. 323; SEDRA e SMITH, 2000, p. 191).

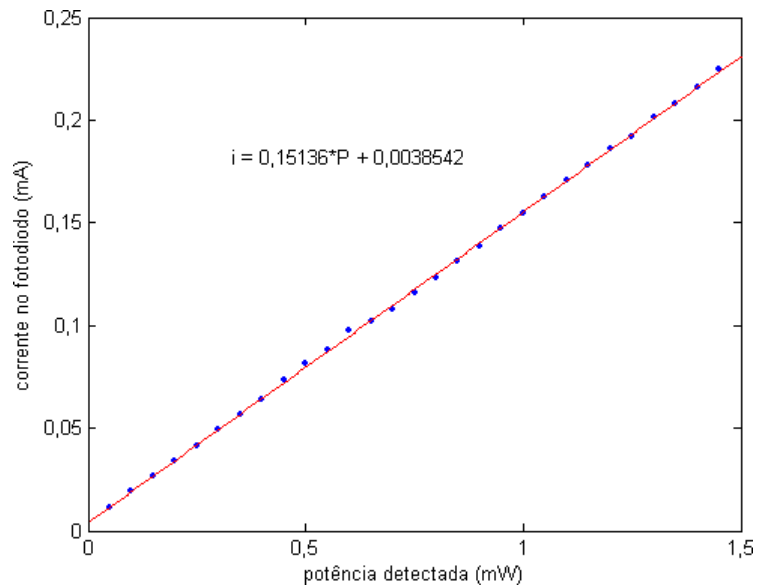


Figura 4.5: Potência detectada pelo sensor à frente do *laser* versus a corrente no fotodiodo acoplado ao *laser*.

Na Figura 4.6, vê-se a curva da potência detectada pelo sensor à frente do *laser* em função da corrente. Pela regressão dos pontos experimentais, verifica-se que a eficiência diferencial – equação (A.8) – é de aproximadamente 0,12 W/A, enquanto o valor especificado no *datasheet* do dispositivo é de 0,5 W/A. Em virtude desta baixa eficiência diferencial, a potência máxima atingida ficou em 1,45 mW, com a corrente próxima do valor limite estabelecido no *datasheet*.

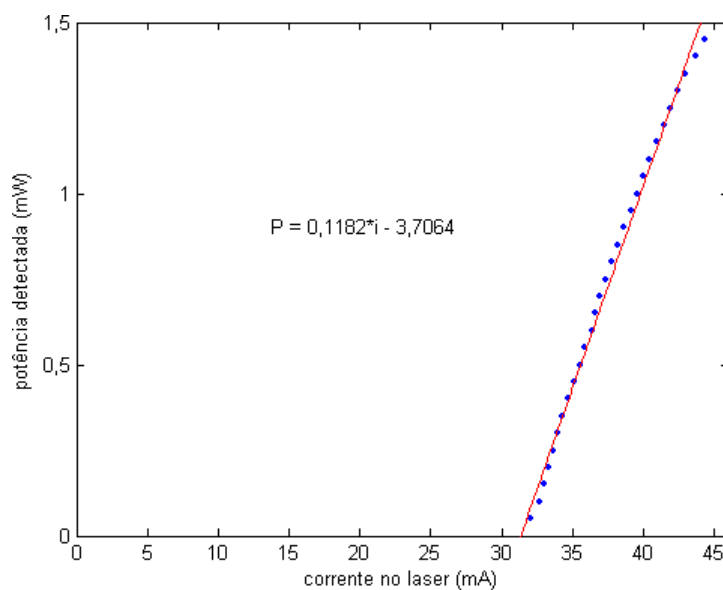


Figura 4.6: Corrente no *laser* versus potência detectada pelo sensor à sua frente.

4.1.3 Espalhamento Frontal: Pré-Amplificador de Carga

4.1.3.1 Caracterização de Componentes Discretos

Os valores dos resistores de realimentação utilizados na montagem do pré-

amplificador foram medidos, obtendo-se $\begin{cases} R_1 = 1,205 \text{ M}\Omega \\ R_2 = 1,200 \text{ M}\Omega \\ R_3 = 10,64 \text{ k}\Omega \end{cases}$. Com estes valores, a

resistência teórica obtida pela equação (C.11) foi de 138,3 M Ω .

Foram medidos também módulos, $|X|$, e fases das impedâncias capacitivas em função da frequência, f . As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 mostram os gráficos da frequência *versus* módulo da reatância dos capacitores C_1 , C_2 e C_3 do pré-amplificador de carga, apresentando também a equação de regressão obtida para cada capacitor. Os gráficos da frequência *versus* módulo da reatância dos capacitores de teste, C_t , estão apresentados nas Figuras 4.10 e 4.11. Nas Figuras 4.9 a 4.11, as abcissas vão até 40 MHz porque, acima deste valor, as medições diferiram significativamente das medições em frequências mais baixas, indicando efeitos deletérios nas altas frequências, que foram desconsideradas nos cálculos dessas capacitâncias.

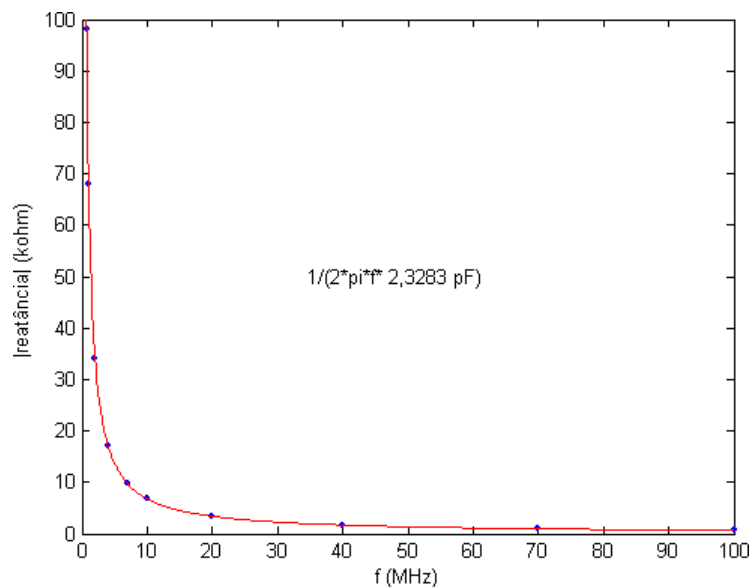


Figura 4.7: Medição de C_1 do pré-amplificador de carga do espalhamento frontal.

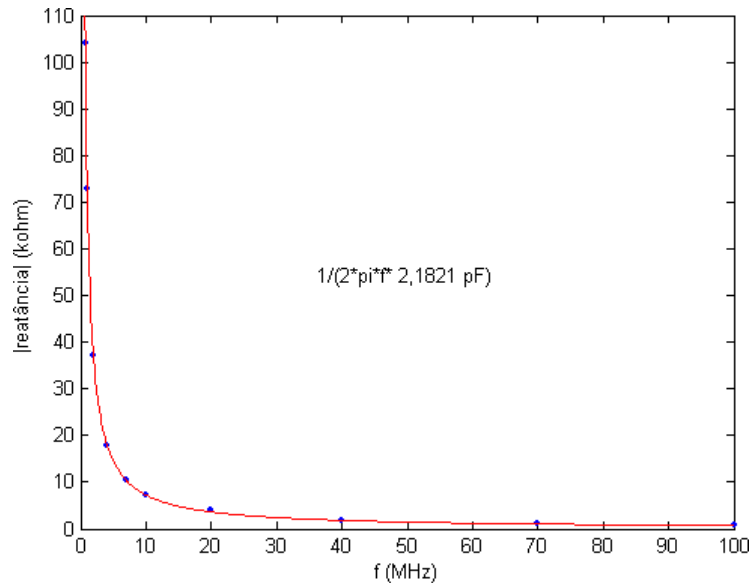


Figura 4.8: Medição de C_2 do pré-amplificador de carga do espalhamento frontal.

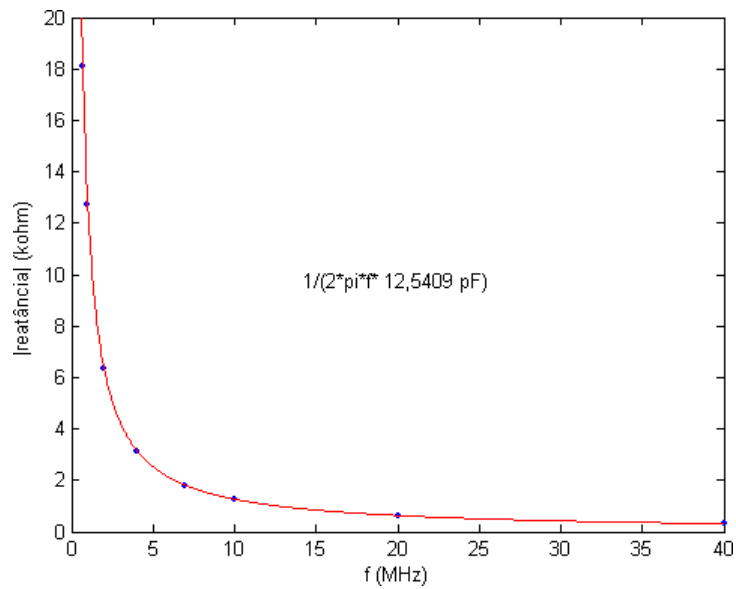


Figura 4.9: Medição de C_3 do pré-amplificador de carga do espalhamento frontal.

Como resultados para as capacitâncias do pré-amplificador de carga,

obtiveram-se $\begin{cases} C_1 = 2,33 \text{ pF} \\ C_2 = 2,18 \text{ pF} \\ C_3 = 12,54 \text{ pF} \end{cases}$. Com estes valores estimados e utilizando-se a equação

(C.12), obtém-se 0,30 pF para a capacitância equivalente de realimentação do pré-amplificador de carga.

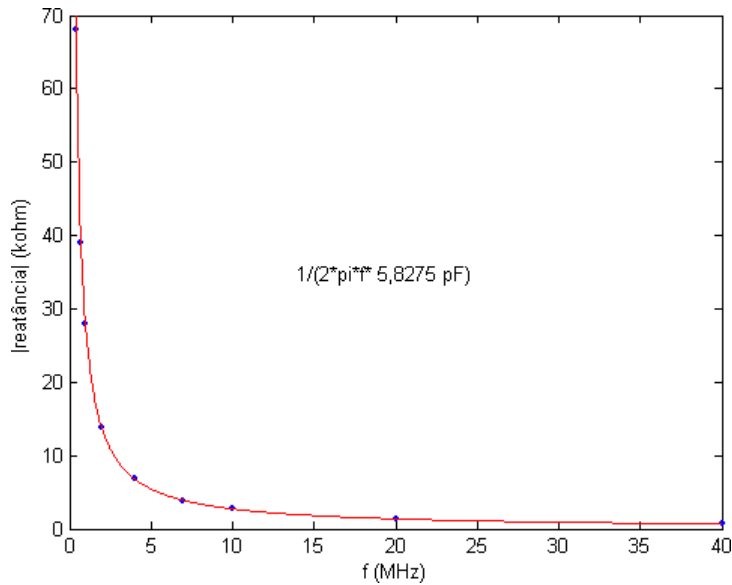


Figura 4.10: Medição do capacitor de teste, C_t , da fonte de pulsos de corrente utilizada na medição da sensibilidade do pré-amplificador de carga projetado no presente trabalho.

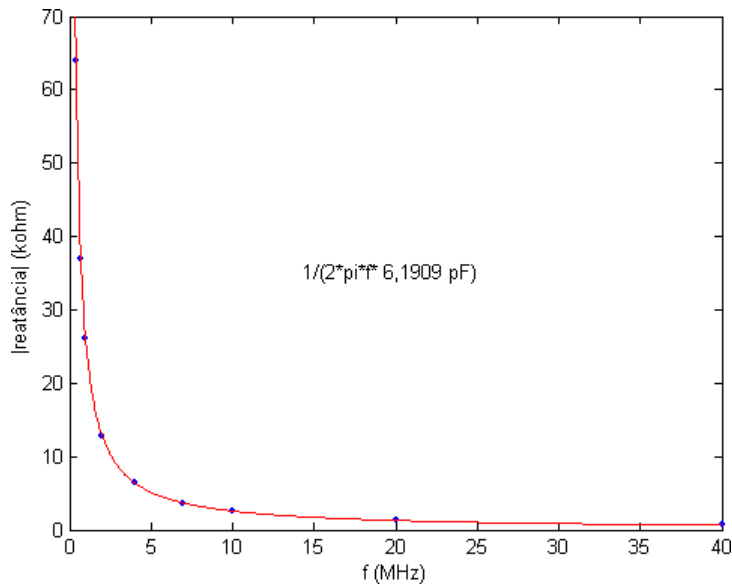


Figura 4.11: Medição do capacitor de teste, C_t , da fonte de pulsos de corrente utilizada na medição da sensibilidade do pré-amplificador de carga projetado no trabalho anterior (WANDERLEY, 2006).

Como resultado para o capacitor de teste utilizado na medição da sensibilidade do pré-amplificador deste trabalho, obteve-se 5,83 pF, enquanto que, para o capacitor de teste utilizado na medição do pré-amplificador anterior, o valor obtido foi 6,19 pF.

4.1.3.2 Sensibilidade

As Figuras 4.12 e 4.13 mostram exemplos das tensões de entrada e saída adquiridas com o osciloscópio digital para os dois pré-amplificadores de carga. Nota-

se o aumento da sensibilidade do pré-amplificador de carga atual em relação ao anterior.

As curvas de avaliação da sensibilidade estão apresentadas na Figura 4.14. Estão desenhadas também as retas de regressão e suas equações. Os resultados indicam que o pré-amplificador do trabalho anterior (WANDERLEY, 2006) possui sensibilidade de $-0,198 \text{ V/pC}$, enquanto no novo este parâmetro é de $-2,438 \text{ V/pC}$, representando um aumento de 12,3 vezes. A capacitância equivalente de realimentação é o inverso da sensibilidade, o que resulta em $0,41 \text{ pF}$ para o novo pré-amplificador de carga, enquanto o valor estimado pela medição das capacitâncias foi de $0,30 \text{ pF}$.

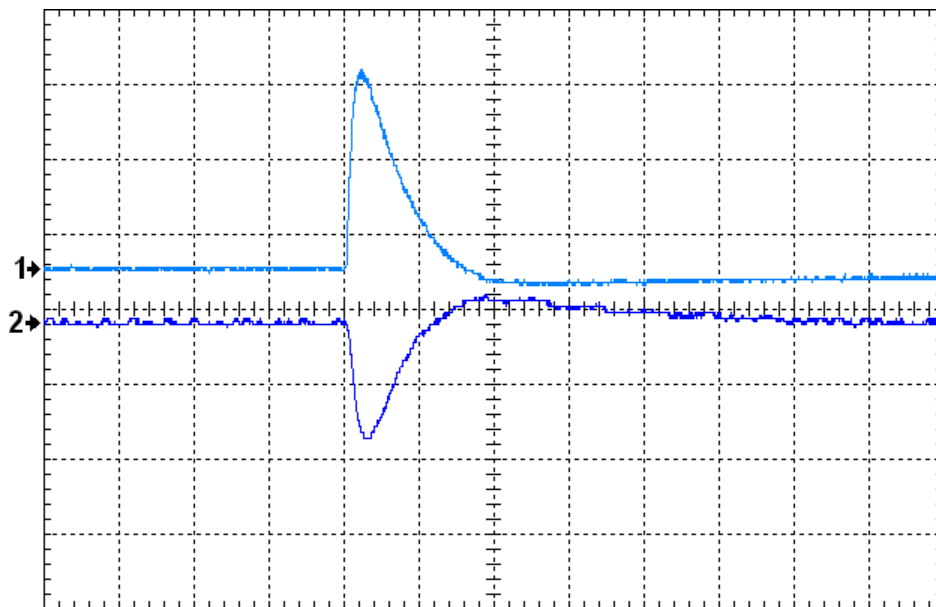


Figura 4.12: Exemplo de tensões no capacitor de teste, canal 1, e na saída do pré-amplificador de carga atual, canal 2. Escala de tempo: $25 \mu\text{s}$; escala de tensão do canal 1: 200 mV ; escala de tensão do canal 2: 5 V .

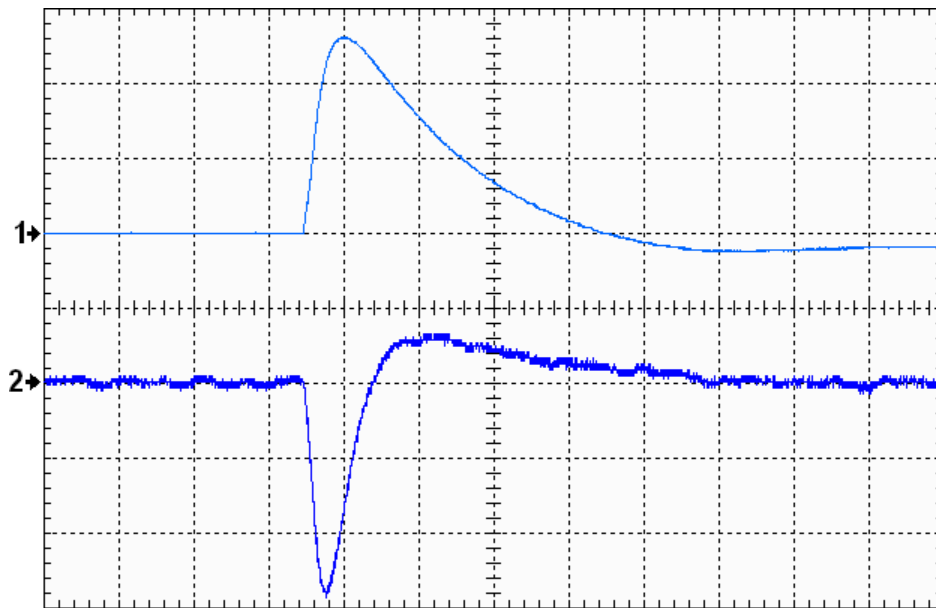


Figura 4.13: Exemplo de tensões no capacitor de teste, canal 1, e na saída do pré-amplificador de carga prévio, canal 2. Escala de tempo: 10 μ s; escala de tensão: 500 mV.

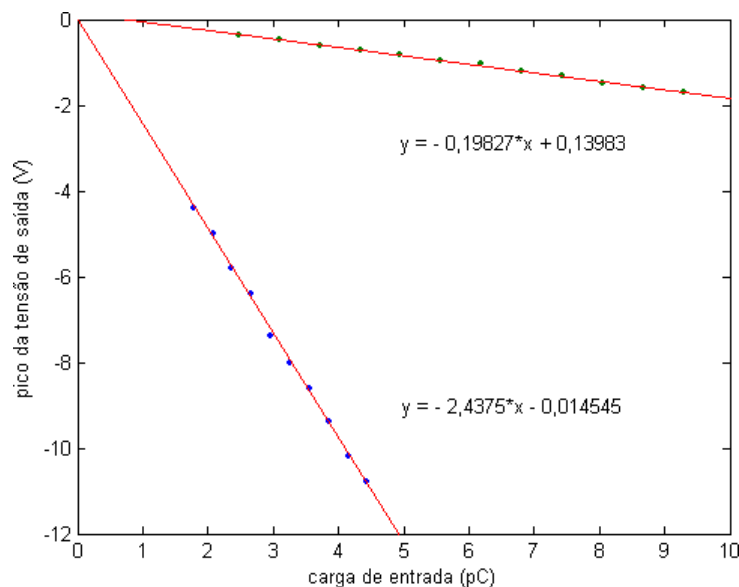


Figura 4.14: Sensibilidade dos pré-amplificadores de carga atual, curva inferior, e prévio, curva superior.

4.1.4 Espalhamento Frontal: Amplificador Conformador

Na Figura 4.15, tem-se um exemplo de pulsos do espalhamento frontal resultantes da passagem de partículas pelo sistema. Observam-se, no canal 2, pulsos na saída do pré-amplificador de carga; enquanto, no canal 1, observam-se os mesmos pulsos na saída do amplificador conformador. Na saída do pré-amplificador de carga, os pulsos possuem uma longa cauda resultante do descarregamento dos capacitores

de realimentação. Esta cauda é eliminada pelo amplificador conformador para reduzir a probabilidade de haver sobreposição.

O gráfico dos valores adquiridos na avaliação do ganho em função da frequência do amplificador conformador utilizado no espalhamento frontal está apresentado na Figura 4.16.

O ganho máximo do amplificador conformador do espalhamento frontal foi de 32 vezes, e as frequências de corte inferior e superior foram estimadas em 26,4 kHz e 251,3 kHz. Os valores teóricos eram de 33 vezes para o ganho máximo, de 48,2 kHz para a frequência de corte inferior máxima e de 268 kHz para frequência de corte superior. O ganho e a frequência de corte superior foram próximos do valor teórico, entretanto a frequência de corte inferior foi bastante diferente da prevista. Como o importante é o formato do pulso, este desacordo torna-se irrelevante.

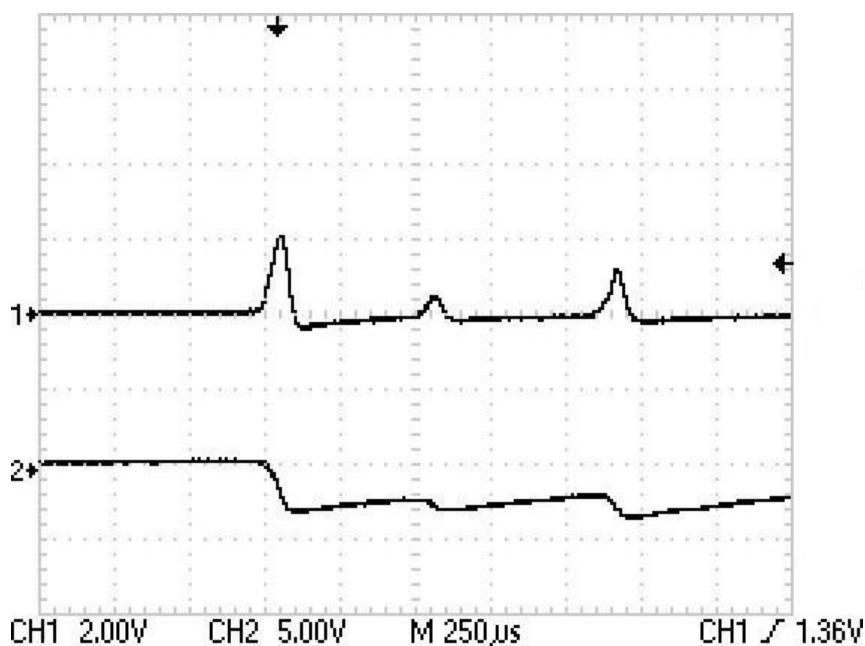


Figura 4.15: Exemplo de pulsos do espalhamento frontal resultantes da passagem de microesferas de 15 μm de diâmetro nominal pelo citômetro de fluxo. No canal 2, observam-se pulsos na saída do pré-amplificador de carga. No canal 1, observam-se pulsos na saída do amplificador conformador.

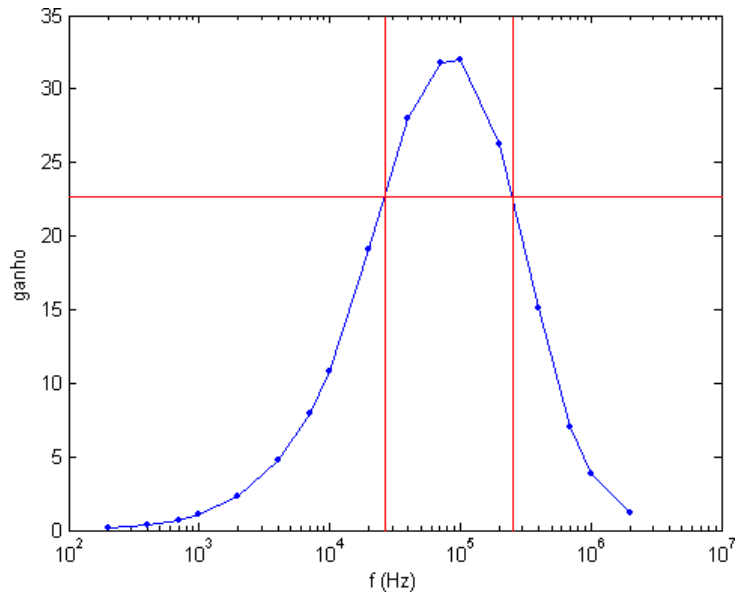


Figura 4.16: Ganho do amplificador conformador do espalhamento frontal em função da frequência. As retas verticais indicam a frequência de corte, e a horizontal, o ganho acima do qual se tem a banda do amplificador.

4.1.5 Espalhamento Lateral: Amplificador Conformador

Na Figura 4.17, tem-se um exemplo de pulso do espalhamento lateral resultante da passagem de partícula pelo sistema. Observa-se, no canal 2, o pulso na saída do pré-amplificador de corrente interno ao *PMT*; enquanto, no canal 1, observa-se o mesmo sinal na saída do amplificador conformador. Ressalta-se a baixa relação sinal-ruído do sinal proveniente do *PMT*.

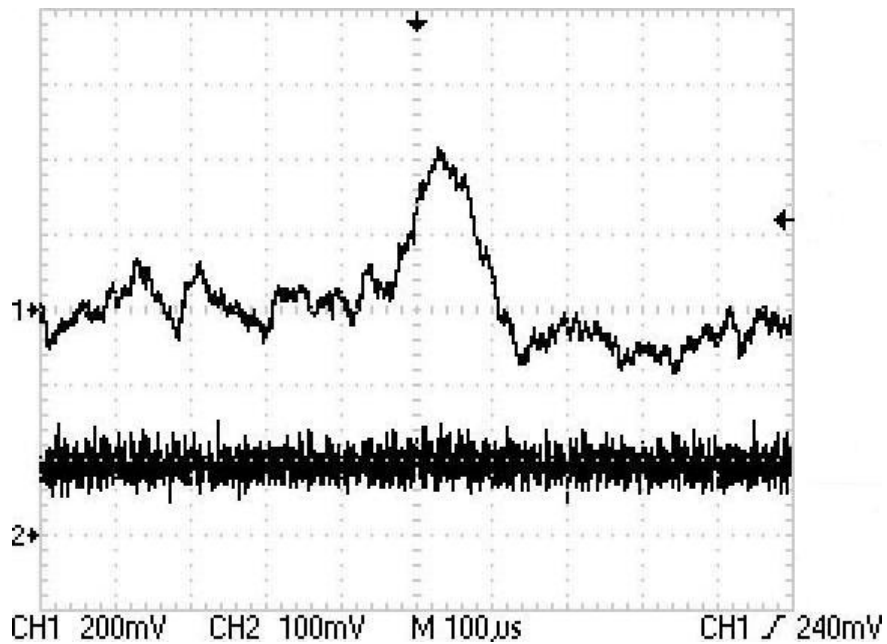


Figura 4.17: Exemplo de pulso do espalhamento lateral resultante da passagem de microesfera de 10 μm de diâmetro nominal pelo citômetro de fluxo. No canal 2, observa-se o sinal na saída do pré-amplificador de corrente interno ao *PMT*. No canal 1, observa-se o sinal na saída do amplificador conformador.

O gráfico dos valores adquiridos na avaliação do ganho em função da frequência do amplificador conformador utilizado no espalhamento lateral está apresentado na Figura 4.18.

O ganho máximo foi de 92 vezes com frequências de corte de 454,8 Hz e 5,9 kHz. Seus valores teóricos eram de 100 vezes para o ganho máximo, e 336,6 Hz e 4,8 kHz para as frequências de corte.

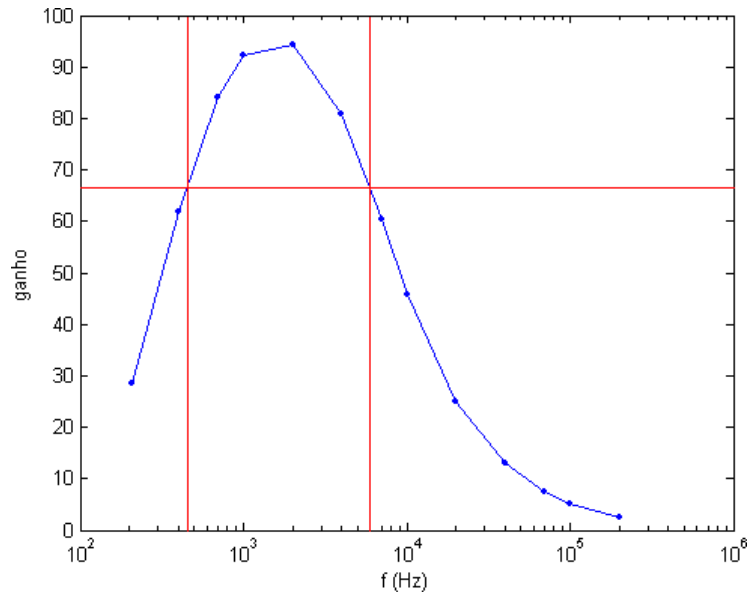


Figura 4.18: Ganho do amplificador conformador do espalhamento lateral em função da frequência. As retas verticais indicam a frequência de corte, e a horizontal, o ganho acima do qual se tem a banda do amplificador.

4.2 Avaliação do Citômetro de Fluxo Biparamétrico

4.2.1 Focalização Hidrodinâmica

A Figura 4.19 apresenta micrografias realizadas pela *webcam* do sítio de observação dentro do capilar em diversas situações de funcionamento do citômetro de fluxo. Em A, observam-se bolhas de ar dentro do capilar, com iluminação externa, antes do acionamento das pressões nos vasos da amostra e do fluido de revestimento. Estas bolhas são provenientes de água que passou anteriormente pelo aparelho. Após a pressão no vaso do fluido de revestimento ser acionada, acontece a situação B, na qual se observam apenas as paredes do capilar. Com certa pressão no vaso da amostra, acontece a situação C, na qual se observa um ponto vermelho no centro, associado à passagem de partículas. Ao se aumentar a pressão no vaso da amostra, aumenta-se a vazão da amostra e ocorre a situação D.

Pelo acompanhamento de experimentos com um osciloscópio, percebeu-se que, na situação na qual ocorre baixa taxa de sobreposição de pulsos com boa taxa

de passagem de partículas, não se consegue visualizar as partículas dentro do capilar pela *webcam*. A imagem desta situação é parecida com a da Figura 4.19-B.

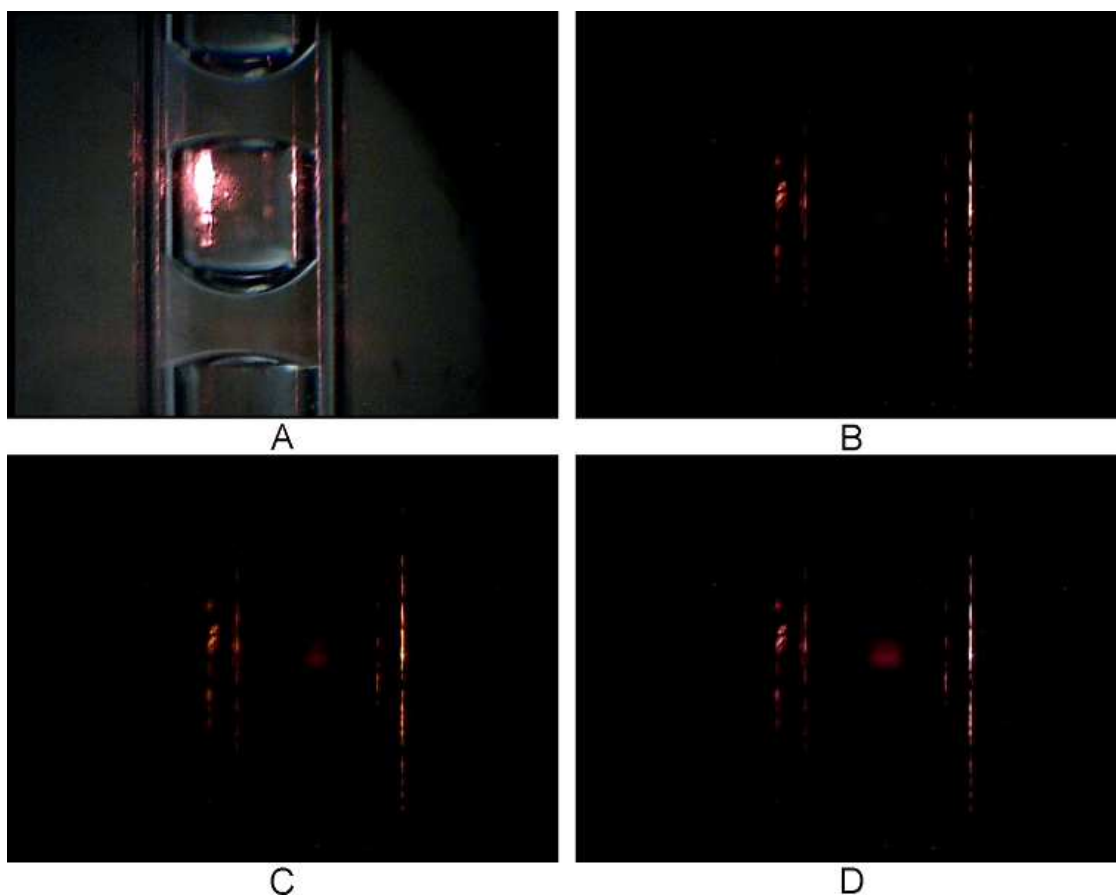


Figura 4.19: Micrografias do capilar: Em A se verifica o capilar com bolhas de ar e iluminação externa; em B há fluido de revestimento passando; em C ocorre focalização hidrodinâmica; em D ocorre focalização hidrodinâmica de qualidade inferior.

Na realização do trabalho, foram testados vários valores de pressão nos vasos da amostra e do fluido de revestimento que ocasionavam a focalização hidrodinâmica. Optou-se por utilizar nos experimentos seguintes as tensões de controle das eletroválvulas de 1,016 e 0,752 V. De acordo com a equação (3.1), estas tensões equivalem a, aproximadamente, 3,05 e 2,26 psi, sendo a maior pressão aplicada ao vaso do fluido de revestimento.

4.2.2 Espalhamento Frontal

Inicialmente as aquisições do espalhamento frontal foram adquiridas com cerca de 0,5 cm de distância entre o capilar e a lente responsável por convergir o sinal

luminoso ao fotodiodo. Posteriormente, a distância entre o capilar e a lente foi aumentada para cerca de 2 cm, e foram obtidos novos histogramas. O objetivo do aumento da distância foi a redução do ângulo de captação do *laser*, pois, consoante MULLANEY *et al.* (1969), a intensidade do espalhamento em pequenos ângulos, de 0,5 a 2°, obedece uma proporção, grosseira, com o volume da partícula. Além disso, consideram o tamanho da partícula entre 5 e 20 μm , e seu índice de refração entre 1,05 a 2. Entretanto no presente trabalho foi difícil medir o ângulo de captação devido à montagem opto-mecânica utilizada.

4.2.2.1 Distância entre capilar e lente do fotodiodo: 0,5 cm

Nesta situação, o histograma do ruído de fundo, Figura 4.20, foi adquirido num experimento com duração de 20 minutos no qual tanto a amostra quanto o fluido de revestimento eram água destilada. Pode-se perceber que este histograma se assemelha ao de uma distribuição exponencial, com baixa contagem de pulsos de grande amplitude.

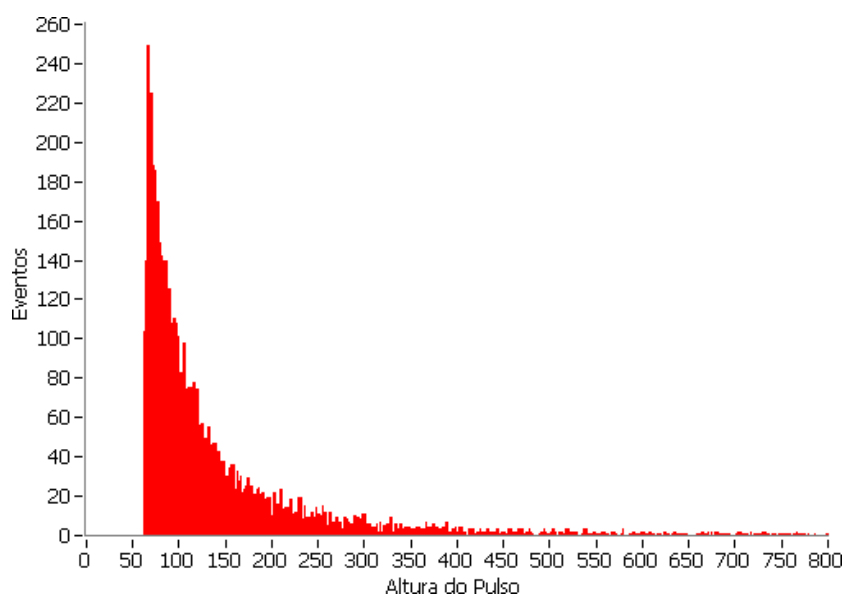


Figura 4.20: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de água destilada por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 10.637.

Na Figura 4.21, observa-se o histograma proveniente da análise, com duração de 20 minutos, da amostra com partículas de 6 μm de diâmetro nominal, e na Figura

4.22 o histograma da análise de partículas com 10 μm de diâmetro nominal. Nota-se que o histograma da Figura 4.21 mostra 2 picos: um com contagem de quase 8.000 pulsos, pouco acima do canal de altura de 100 unidades e outro com contagem perto de 1.000 acima do canal de altura 200. Já o histograma Figura 4.22 apresentou 2 picos com contagens comparáveis: um perto do canal 300 e o outro perto do canal 500. Apresentou também uma alta contagem de pulsos no liminar inferior de detecção.

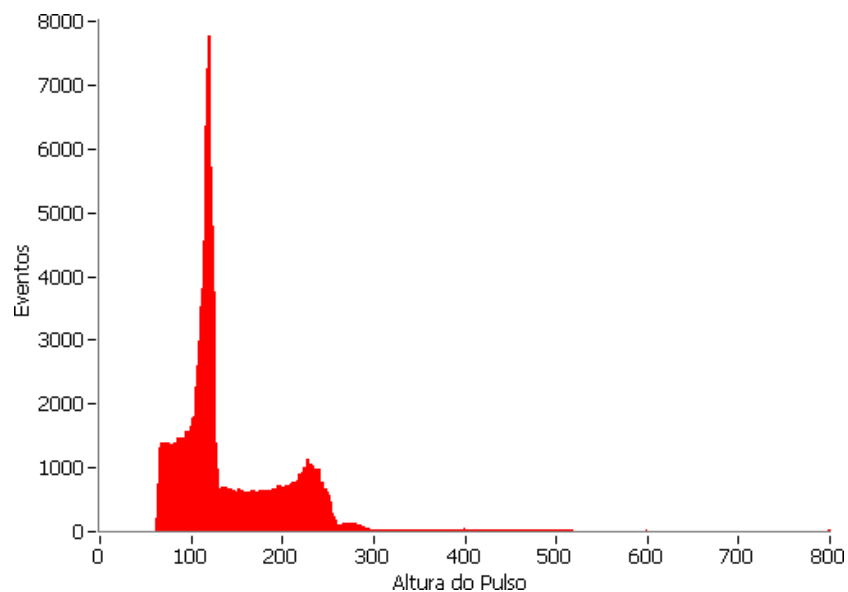


Figura 4.21: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 6 μm de diâmetro nominal por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 254.034.

A Figura 4.23 apresenta o histograma obtido pela análise da amostra com partículas de 6 e de 10 μm de diâmetro nominal durante 20 minutos. Observa-se que este histograma se assemelha à soma dos 2 histogramas anteriores, Figuras 4.21 e 4.22, – resultado esperado, tendo em vista que esta foi a análise conjunta das 2 populações.

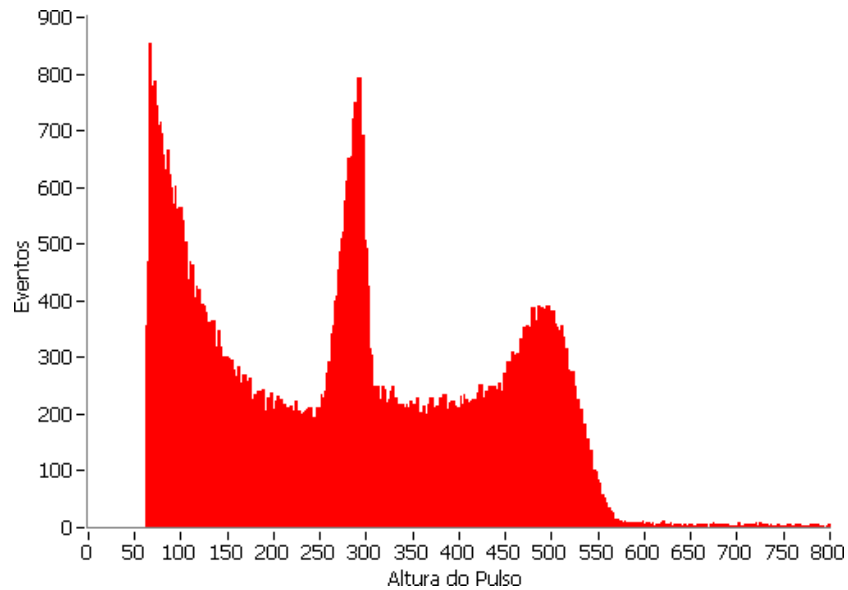


Figura 4.22: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 10 μm de diâmetro nominal por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 153.226.

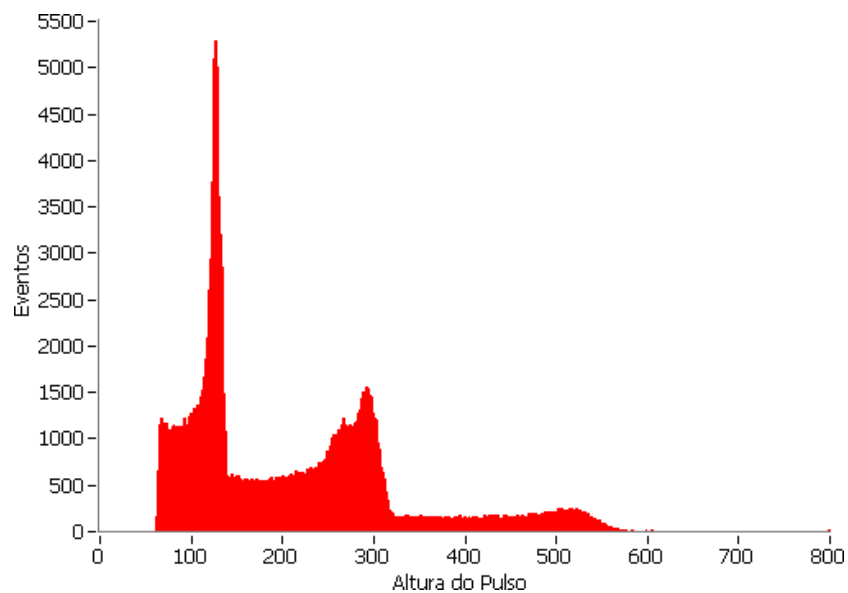


Figura 4.23: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 6 e de 10 μm de diâmetro nominal por 20 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 0,5 cm. Contagem total: 308.699.

4.2.2.2 Distância entre capilar e lente do fotodiodo: 2 cm

O ruído de fundo foi medido novamente depois da mudança da distância entre o capilar e lente que converge o sinal luminoso ao fotodiodo. A duração deste experimento foi de 5 minutos e seu histograma está apresentado na Figura 4.24. Da mesma forma que na análise anterior do ruído de fundo, este histograma se assemelha ao de uma distribuição exponencial.

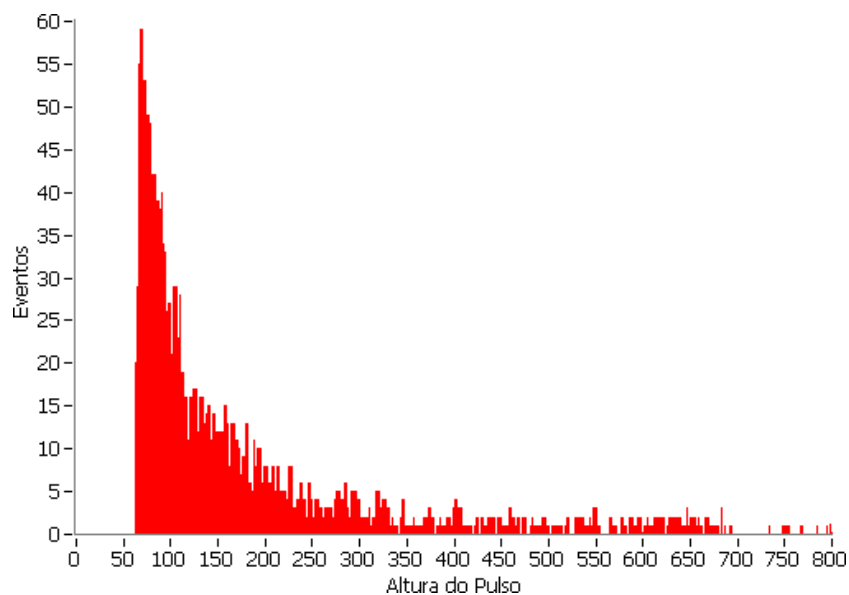


Figura 4.24: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de água destilada por 5 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 2 cm. Contagem total: 3.054.

Na Figura 4.25, pode-se observar o histograma referente à análise durante 5 minutos de partículas com 6 μm de diâmetro nominal. E na Figura 4.26, o histograma das partículas de 10 μm . Ambos os histogramas apresentaram uma alta contagem de pulsos no limiar de detecção. Ademais, o das partículas menores teve um pico perto do canal de altura 300 e o das partículas maiores, perto do canal 650. Estes picos são associados a partículas de tamanho definido.

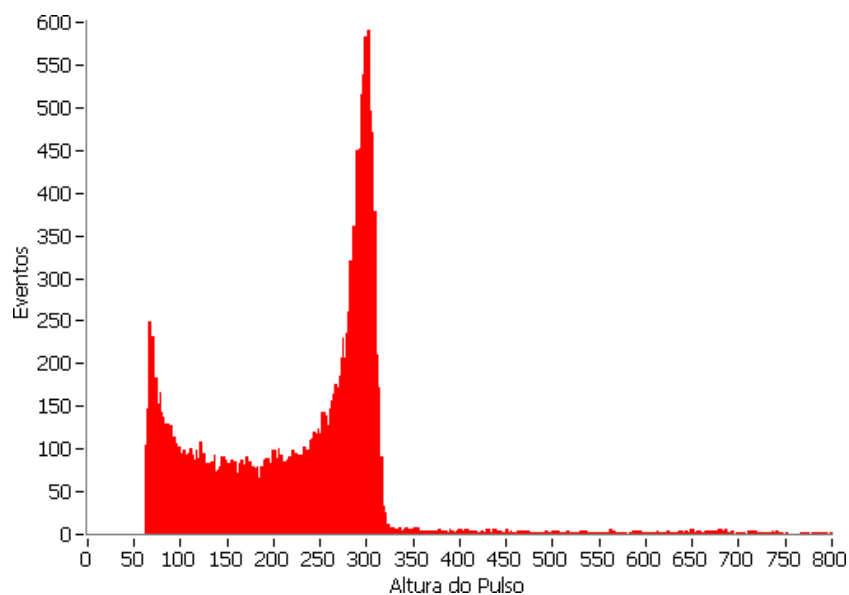


Figura 4.25: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 6 μm de diâmetro nominal por 5 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 2 cm. Contagem total: 37.095.

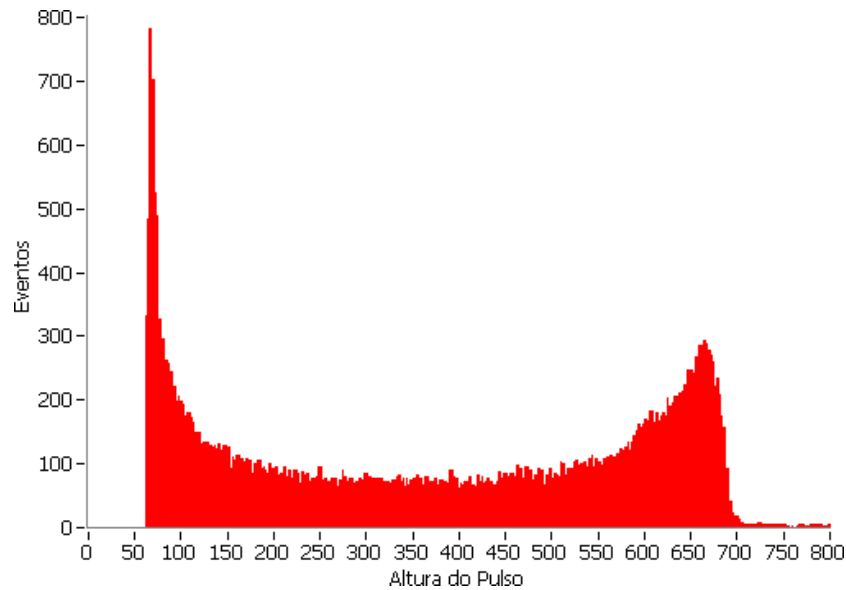


Figura 4.26: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas de 10 µm de diâmetro nominal por 5 minutos. Distância entre o capilar e a lente na frente do fotodiodo: 2 cm. Contagem total: 74.851.

4.2.2.3 Experimentos com o FACScan

Foram realizados experimentos de espalhamento frontal com um citômetro de fluxo comercial, o FACScan (BD, EUA). A análise resultante está apresentada na Figura 4.27. No histograma à esquerda, tem-se a análise de partículas com 6 µm e no histograma à direita, a análise de partículas com 10 µm. Da mesma forma que os histogramas adquiridos pelo citômetro de fluxo desenvolvido neste trabalho com a distância de 2 cm entre capilar e lente do fotodiodo, os histogramas adquiridos pelo FACScan possuem uma alta contagem de pulsos de baixa amplitude e um pico. A contagem de baixa amplitude é associada ao ruído de fundo e o pico, às partículas de tamanho definido.

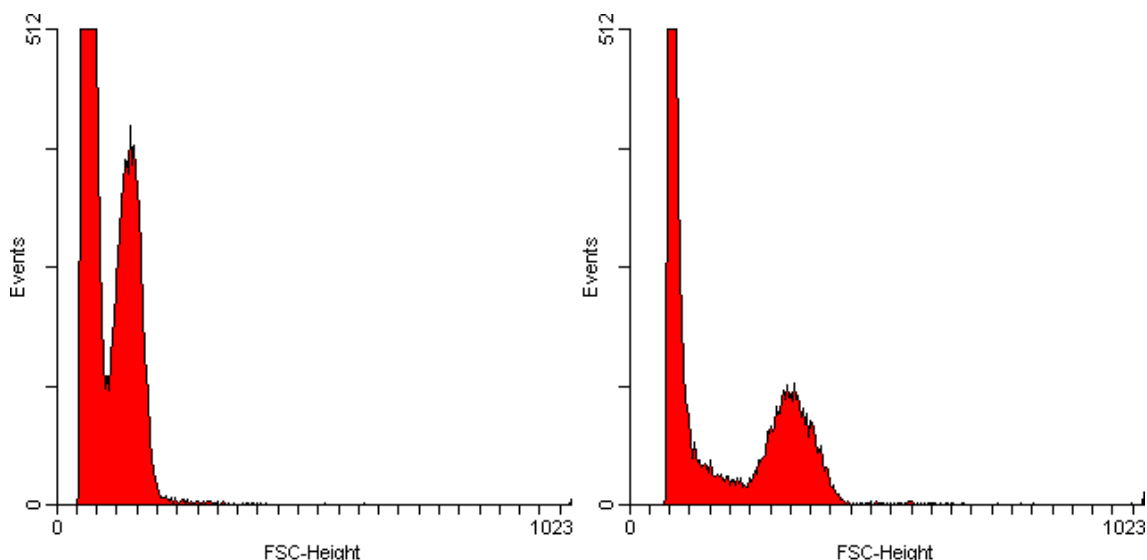


Figura 4.27: Histograma do espalhamento frontal resultante da análise de microesferas pelo citômetro de fluxo FACScan (BD, EUA). À esquerda, observa-se a análise de partículas de 6 μm de diâmetro nominal; e, à direita, a análise de partículas de 10 μm de diâmetro nominal.

4.2.3 Espalhamento Lateral

Utilizou-se água destilada como amostra e como fluido de revestimento num experimento para avaliar o ruído de fundo do espalhamento lateral. A aquisição durou 5 minutos e seu resultado está apresentado na Figura 4.28. Este histograma, assim como os outros já obtidos para o ruído de fundo do espalhamento frontal, se parece com o de uma distribuição exponencial, com baixa contagem de pulsos de grande amplitude.

Na Figura 4.29, observa-se o histograma do espalhamento lateral com partículas de 6 μm e duração de 5 minutos. Este histograma apresentou uma distribuição exponencial assim como o do ruído de fundo, indicando que os pulsos gerados pelas partículas não possuíam amplitudes maiores que o próprio ruído do sistema. Esta baixa relação sinal-ruído já foi observada anteriormente na avaliação do amplificador conformador do espalhamento lateral, seção 4.1.5.

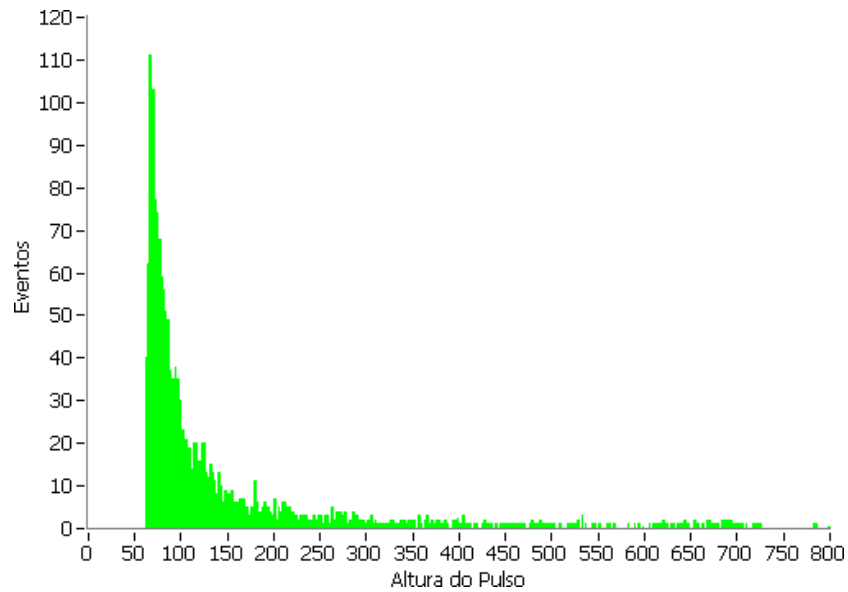


Figura 4.28: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de água destilada por 5 minutos. Contagem total: 3.143.

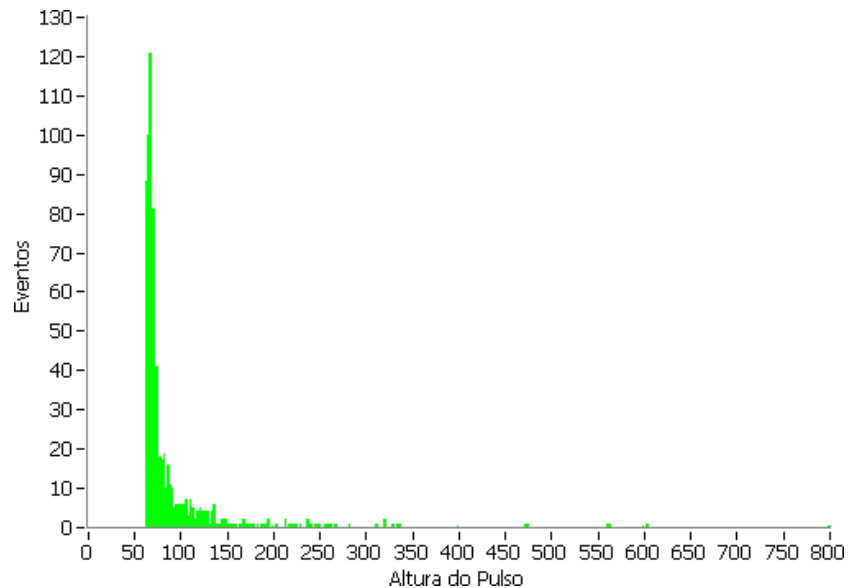


Figura 4.29: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de microesferas de 6 µm de diâmetro nominal por 5 minutos. Contagem total: 1.333.

O histograma do espalhamento lateral provocado pelas partículas de 10 µm durante 5 minutos está apresentado na Figura 4.30. Este histograma apresentou uma contagem bem maior que o do ruído de fundo e o das partículas de 6 µm. Seu máximo aconteceu no limiar de contagem com pouco mais de 1.200 eventos, cerca de 10 vezes maior que o máximo, também no limiar, das partículas menores. Entretanto, assim como nos outros histogramas do espalhamento lateral, não apresentou o pico associado a uma população definida de partículas. Pode-se perceber ainda que a

configuração do histograma apresentou uma leve mudança. Estes 2 fatores indicam que alguns pulsos das partículas de 10 μm foram contados pelo sistema, entretanto ainda apresentou uma baixa relação sinal-ruído.

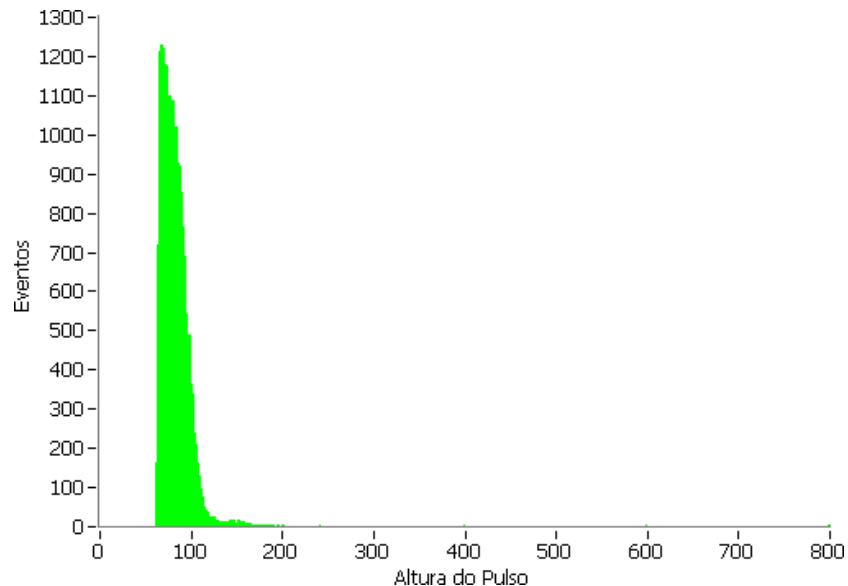


Figura 4.30: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de microesferas de 10 μm de diâmetro nominal por 5 minutos. Contagem total: 36.214.

4.2.3.1 Experimentos com o FACScan

Experimentos com as partículas de 6 e de 10 μm também foram realizados com o citômetro de fluxo comercial, o FACScan (BD, EUA). Os resultados estão apresentados na Figura 4.31. À esquerda, está o histograma adquirido pela análise das partículas menores e à direita, o histograma das partículas maiores. Estes histogramas possuem conformações menos suaves que os do espalhamento frontal, Figura 4.27, entretanto ainda é possível perceber populações definidas de partículas.

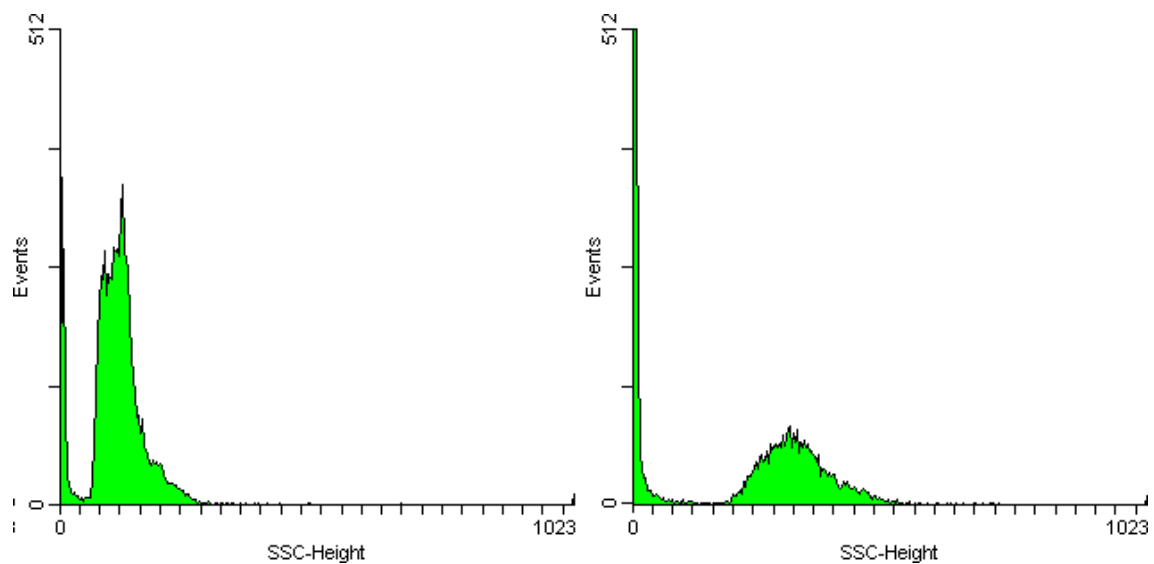


Figura 4.31: Histograma do espalhamento lateral resultante da análise de microesferas pelo citômetro de fluxo FACScan (BD, EUA). À esquerda, observa-se a análise de partículas de 6 μm de diâmetro nominal; e, à direita, a análise de partículas de 10 μm de diâmetro nominal.

Capítulo 5

Discussão

Os preços dos citômetros de fluxo e a inexistência no mercado de aparelhos mais simples para aplicações específicas torna inviável a existência de ao menos um aparelho em cada hospital público. Este fator torna importante dominar a tecnologia no país com a finalidade de se desenvolverem citômetros de fluxo mais simples e baratos. Por este motivo, o Laboratório de Instrumentação Biomédica do PEB/UFRJ começou em 2004 pesquisas nesta área com o desenvolvimento de um citômetro de fluxo monoparamétrico por WANDERLEY (2006). O presente trabalho deu continuidade ao projeto, aprimorando o protótipo do citômetro de fluxo e acrescentando o sistema de medição do espalhamento lateral. A seguir, são analisados os resultados obtidos de cada parte desenvolvida para o novo protótipo e, em seguida, os resultados obtidos com o aparelho como um todo.

De acordo com os resultados dos experimentos de calibração das válvulas eletrônicas de pressão expressos nas Figuras 4.1 e 4.2, as válvulas se apresentaram lineares. Entretanto, durante os experimentos, notou-se que estas não apresentavam reprodutibilidade nas pressões ao serem religadas, o que implicava na necessidade de se reajustarem as pressões aos valores estabelecidos para a focalização hidrodinâmica. Apesar da necessidade deste reajuste, as válvulas eletrônicas representaram uma melhoria significativa na facilidade de controle das pressões em relação às válvulas manuais utilizadas no trabalho anterior (WANDERLEY, 2006).

Quanto ao *laser*, foi verificado que seu feixe divergia consideravelmente. Daí adveio a necessidade de se ter um colimador. No entanto, com a presença deste, há perda de potência no feixe de saída, pois parte da energia emitida fica retida dentro do

próprio colimador, *vide* Figura 3.11. Como consequência, a curva de calibração do *laser*, Figura 4.6, apresentou uma eficiência diferencial de 0,12 W/A, quatro vezes menor que o valor nominal, 0,5 W/A, resultando numa potência máxima de 1,45 mW. Vale ressaltar ainda que, no citômetro de fluxo, se utilizou uma íris para estreitar o feixe do *laser*, a qual não se utilizou durante o experimento de calibração. Esta íris reduziu ainda mais a potência útil no sistema. WANDERLEY (2006) já havia comentado sobre a possibilidade de trocar o *laser* por um mais potente para propiciar um aumento na relação sinal-ruído. Além do mais, seria desejável a aquisição de um *laser* com comprimento de onda de 488 nm para se realizarem experimentos com fluorescência. Entretanto – por questões financeiras, uma vez que *lasers* deste comprimento de onda custam mais de US\$ 6.000 – o citômetro de fluxo biparamétrico permaneceu usando como fonte de excitação o mesmo *laser* do trabalho anterior.

Ainda sobre o *laser*, a Tabela 4.1 indica que o dispositivo se mostrou *multi-line* por diversos momentos durante o experimento de calibração, isto é, não emitia num comprimento de onda estável. Provavelmente isso ocorreu devido à ausência de um sistema de refrigeração que deixasse sua temperatura constante. Variações térmicas conferem variações em parâmetros intrínsecos aos dispositivos semicondutores. Por exemplo, consoante o *datasheet*, a corrente liminar é de 20 mA a 25°C e de quase 30 mA a 40°C. De acordo com o mesmo, o comprimento de onda emitido varia cerca de 0,5 nm a cada 4°C com a potência fixa em 5 mW.

Apesar das variações no comprimento de onda do *laser*, o novo circuito de alimentação e controle tornou sua potência mais estável. E, mesmo com a baixa potência útil, foi possível a obtenção de resultados satisfatórios, discutidos adiante, para o espalhamento frontal.

A Figura 4.14 apresenta o resultado do experimento de aferição da sensibilidade dos pré-amplificadores de carga utilizados no espalhamento frontal do trabalho atual e do projetado por WANDERLEY (2006). Analisando a figura, pode-se verificar que a sensibilidade do pré-amplificador de carga atual foi de -2,44 V/pC. Este

valor implica em uma capacitância equivalente de 0,41 pF, enquanto o valor teórico – calculado pelos valores estimados de cada um dos capacitores, Figuras 4.6 a 4.8 – foi de 0,30 pF. Tal diferença pode ser associada à própria implementação, tendo em vista que se trata de um valor comparável às capacitâncias parasitas inerentes aos próprios dispositivos e ao *layout* do circuito. Exemplificando, de acordo com o *datasheet*, a capacitância de entrada do amplificador operacional utilizado, o LF356, possui valor típico de 3 pF. Não obstante a diferença entre os valores teórico e medido da capacitância de realimentação, o novo pré-amplificador de carga alcançou um aumento de 12,3 vezes na sensibilidade em relação ao pré-amplificador de carga do trabalho anterior.

Subseqüente ao pré-amplificador de carga do espalhamento frontal, há um amplificador conformador. De acordo com HIEBERT e SWEET (1985, p. 137), na maioria dos sistemas de processamento de sinal utilizados em citometria de fluxo, conformam-se os pulsos pela limitação da banda de freqüência com a finalidade de se reduzir o ruído eletrônico. Em outras palavras, a relação sinal-ruído pode ser maximizada pelo ajuste da banda de freqüência. Ademais, na saída do pré-amplificador de carga, os pulsos decaem vagarosamente, o que aumenta a taxa de sobreposição. Com o fito de diminuí-la, os pulsos precisam passar por um circuito conformador que elimine a longa cauda (NICHOLSON, 1974, p.150). Tendo em vista estes fatores, nota-se que os exemplos, apresentados na Figura 4.15, de pulsos na saída do pré-amplificador de carga e na saída do amplificador conformador, provenientes de experimentos com microesferas, indicam que este se apresentou apropriado aos sinais característicos na saída do pré-amplificador de carga.

O espalhamento lateral também foi equipado com um amplificador conformador. O ajuste de sua banda de freqüência tinha por finalidade maximizar a relação sinal-ruído. Entretanto o gráfico da Figura 4.17, obtida durante experimentos com microesferas dos sinais na saída do pré-amplificador de corrente interno ao *PMT*

e na saída do amplificador conformador, mostra que a relação sinal-ruído permaneceu baixa após a melhor conformação obtida.

Nas Figuras 4.18-A, B e C são apresentadas micrografias do capilar em diferentes estados de focalização hidrodinâmica. Estas figuras ratificam o resultado já obtido no trabalho de WANDERLEY (2006) de que a célula de fluxo desenvolvida pelo mesmo executa adequadamente a focalização hidrodinâmica. Durante os testes de focalização hidrodinâmica, pode-se verificar que há várias pressões em que uma boa focalização hidrodinâmica ocorre, o importante é manter uma certa relação entre as vazões dos fluidos de amostra e de revestimento.

Quanto ao espalhamento frontal, a comparação dos histogramas apresentados nas Figuras 4.21 e 4.22 com os apresentados nas Figuras 4.25 e 4.26, obtidos pela análise das microesferas de 6 e de 10 μm , mostra que há diferenças quando se altera a distância entre o capilar e a lente responsável por convergir o sinal luminoso ao fotodiodo. Este resultado é devido à mudança do ângulo de captação. De acordo com MULLANEY *et al.* (1969), a intensidade do espalhamento frontal tem uma certa proporcionalidade com o volume das partículas quando o ângulo de captação fica entre 0,5 e 2°, levando em consideração o tamanho das partículas de 5 a 20 μm e seu índice de refração de 1,05 a 2.

Com o capilar e a lente distanciados por 2 cm – ou seja, com menor ângulo de captação –, os histogramas do espalhamento frontal resultantes das análises de microesferas de 6 e de 10 μm , mostrados nas Figuras 4.25 e 4.26, apresentaram uma alta contagem de pulsos de baixa amplitude e um pico. Os picos são associados às partículas de tamanho definido, 6 ou 10 μm ; enquanto a contagem de pulsos com baixa magnitude é atribuída às impurezas presentes no sistema, aos fragmentos das próprias partículas em análise, e aos ruído e interferência inerentes à própria eletrônica de *front-end*.

Já os histogramas do espalhamento lateral, Figuras 4.29 e 4.30, não apresentam distribuições associadas somente às partículas em análise. Apesar disso,

nota-se diferença entre os histogramas das microesferas de 6 e de 10 μm . Os pulsos das partículas menores ficaram totalmente dentro da contagem de artefatos, Figura 4.28; enquanto alguns pulsos das partículas maiores ficaram um pouco acima, aumentando significativamente a contagem na região entre 50 e 100 unidades de altura de pulso. O motivo para a não identificação de partículas pelo sistema medição do espalhamento lateral foi a baixa relação sinal-ruído obtida mesmo após a melhor conformação possível. Acredita-se que tal fato não esteja relacionado somente à eletrônica de *frontend*, mas também a detalhes ópticos da captação do sinal de espalhamento lateral, os quais necessitam ser aprimorados em versões futuras do equipamento.

Ao se comparar o protótipo do citômetro de fluxo biparamétrico com o FACScan (BD, EUA), percebe-se que os histogramas dos espalhamentos frontais, Figuras 4.25 a 4.26, se assemelharam, ambos apresentando a distribuição do ruído de fundo e o pico associado às partículas analisadas. Entretanto os histogramas dos espalhamentos laterais mostraram diferenças, pois os do protótipo do citômetro de fluxo não apresentaram as distribuições associadas às partículas em análise.

Capítulo 6

Conclusão

Este trabalho teve por objetivo aprimorar o protótipo do citômetro de fluxo desenvolvido por WANDERLEY (2006) no Laboratório de Instrumentação Biomédica do PEB/UFRJ, visando o desenvolvimento de uma tecnologia nacional e a possibilidade de disponibilizá-la no mercado com aparelhos mais simples e baratos. Dentro dos objetivos estavam previstas melhorias em relação à pressurização dos vasos da amostra e do líquido de revestimento, e em relação ao pré amplificador de carga utilizado no espalhamento frontal, bem como a construção do sistema de medição do espalhamento lateral, a implementação de um *software* para aquisição e exibição de dados, e a validação do equipamento.

A primeira melhoria realizada concerniu à substituição de válvulas manuais de pressão por válvulas eletrônicas. Aquelas apresentavam histerese e eram de difícil controle. As válvulas eletrônicas, controladas por tensão, representaram uma facilidade em se atingir a focalização hidrodinâmica. Entretanto variações de pressão ocorriam quando as válvulas eram religadas, tornando necessário o reajuste das pressões. Em vista disso, sugere-se implementar um novo circuito de controle que forneça realimentação externa às válvulas.

Quanto ao circuito de alimentação e controle do *laser* de excitação, verificou-se que o circuito anterior não propiciava estabilidade na potência emitida e outro foi desenvolvido. Apesar do novo circuito garantir maior estabilidade ao dispositivo, os resultados experimentais apontaram que a emissão do *laser* se apresentou, por vezes, multilinha e que a potência útil era inferior à especificada pelo fabricante. Seria,

portanto, desejável a substituição do diodo *laser*. Considerando-se o acréscimo de canais de fluorescência, seria bom substituí-lo por outro de diferente comprimento de onda, preferencialmente de 488 nm, em vista da existência de diversos fluorocromos excitados por tal.

A montagem óptica do protótipo do citômetro de fluxo foi construída na própria oficina mecânica do PEB/UFRJ por ser uma solução simples e barata. Apesar de se ter conseguido montar e manipular o aparelho, a montagem apresentou problemas decorrentes da dificuldade no posicionamento e acréscimo de dispositivos ópticos e fotônicos. Esta montagem pode ser aperfeiçoada com a utilização de uma mesa *breadboard* – comum em experimentos envolvendo óptica –, posicionadores ópticos, estágios de translação bi e tri-dimensionais, íris ajustáveis e filtros ópticos.

Os resultados obtidos com o pré-amplificador de carga e o amplificador conformador do espalhamento frontal mostraram-se adequados ao condicionamento dos pulsos provenientes deste espalhamento. Isto propiciou a aquisição de histogramas relacionados a amostras de tamanhos conhecidos que se assemelharam aos obtidos por um citômetro de fluxo comercial. Ficou validado, destarte, o sistema de medição do espalhamento frontal.

Ademais, com os resultados da avaliação da focalização hidrodinâmica e com os do espalhamento frontal, pôde-se constatar a funcionalidade da câmara de focalização hidrodinâmica desenvolvida no trabalho de WANDERLEY (2006).

Os resultados obtidos com o sistema de medição do espalhamento lateral indicaram uma baixa relação sinal-ruído, sinalizando a necessidade da continuação do desenvolvimento da parte relativa à medição deste espalhamento, preferencialmente nas partes óptica e fotônica. Sugere-se uma alteração na topologia de seu amplificador conformador, de modo a inverter-se as posições dos filtros passa-alta e passa-baixa. Sugere-se também utilizar um *laser* mais potente e possibilitar um melhor ajuste de posicionamento dos dispositivos ópticos e fotônicos.

No presente trabalho, cada espalhamento teve de ser avaliado separadamente devido à placa *PHA* disponível. Para a análise dos dois canais ou até mais simultaneamente, é necessário adquirir uma nova placa analisadora de altura de pulso e adequar o *software* de controle e aquisição desenvolvido neste projeto.

Conclui-se que o presente estudo contribuiu para o desenvolvimento de um futuro citômetro de fluxo nacional que possa reduzir o custo de exames diagnósticos relacionados à contagem e análise de células.

Referências Bibliográficas

ADS. Cambridge, Massachusetts, United States, The Smithsonian/NASA Astrophysics Data System. Contém banco de dados bibliográfico sobre física em geral. Disponível em: <<http://adsabs.harvard.edu/abs/1934Sci....80..188M>>. Acesso em: 15 ago. 2008.

ANDRADE, A.L.S.S., PARADA, J.C.B., 1987, "A citologia como método de rastreamento em doenças sexualmente transmissíveis em centro de saúde", *Cad Saúde Coletiva*, v. 4, n. 6, p. 45-55.

BARLOGIE, B., RABER, M.N., SCHUMANN, J. *et al.*, 1983, "Flow cytometry in clinical cancer research", *Cancer Res*, v. 43, p. 3982-3997.

BARNETT, J.A., 2003, "Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research", *Microbiology*, n. 149, p. 557-567.

BENINI, V., 1997, "Citometria de fluxo em transplante renal" *J Bras Nefrol*, v. 19, n. 4, p. 429-432.

BERNE, R.M., LEVY, M.N., 2000, *Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

BERTHO, A.L., [entre 2001 e 2004], *Apostila de Citometria de Fluxo*. Disponível em: <<http://picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc>>. Acesso em: 8 set. 2006.

BIO-MANGUINHOS. Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos pertencente à Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz. Contém informações institucionais, notícias, projetos e serviços. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/>>. Acesso em: 30 out. 2006.

- BONNER, W.A., HULETT, H.R., SWEET, R.G. *et al.*, 1972, "Fluorescence activated cell sorting", *Rev Sci Instrum*, v. 43, n. 3, p. 404-409.
- CARTER, A., CROSLAND-TAYLOR, P.J., STEWART, J.W., 1968, "Measurement of mean corpuscular and packed cell volumes with a Coulter cell counter", *J Clin Pathol*, v. 21, n. 2, p. 222-224.
- CERIZZA, A., FAZZI, A., VAROLI, V., 2004, "Performances of operational amplifiers in front-end electronics for nuclear radiation detectors", *Nuclear Science Symposium Conference Record*, v. 3, p. 1399-1402.
- COULTER, W.H. *Means for counting particles suspended in a fluid*. US Patent No. 2.656.508, 20 out. 1953. Disponível em: <<http://www.uspto.gov/>>. Acesso em: 9 out. 2006.
- COUTINHO, S.G., 2000, "The beginning and expansion of flow cytometry in Brazil", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 3, p. 435-436.
- COVERT, N.M. *A history of Fort Detrick, Maryland*. Frederick, Maryland, Estados Unidos, 2000. Disponível no sítio do *Fort Detrick*: <http://www.detrick.army.mil/cutting_edge/index.cfm?chapter=titlepage>. Acesso em: 8 out. 2006.
- CROSLAND-TAYLOR, P.J., 1953, "A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube", *Nature*, v. 171, p. 37-38.
- CROSLAND-TAYLOR, P.J., STEWART, J.W., HAGGIS, G., 1958, "An electronic blood-cell-counting machine", *Blood*, v. 13, n. 4, p. 398-409.
- CUI, H.H., VALDEZ, J.G., STEINKAMP, J.A., 2003, "Fluorescence lifetime-based discrimination and quantification of cellular DNA and RNA with phase-sensitive flow cytometry", *Cytometry*, v. 52A, n. 1, p. 46-55.

- DAVEY, H.M., KELL, D.B., 1996, "Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses", *Microbiol Rev*, v. 60, n. 4, p. 641-696.
- DICMAXI, 1998. *Dicionário multimídia Michaelis, versão 5.1*. DTS Software. 1 CD-ROM.
- FERREIRA, A.B.H., 1999, *Dicionário da língua portuguesa de Aurélio Buarque de Holanda Ferreira*. 3 ed. São Paulo: Nova Fronteira.
- FERRY, R.M., FARR JR., L.E., HARTMAN, M.G., 1949, "The preparation and measurement of the concentration of dilute bacterial aerosols", *Chem Rev*, v. 44, p. 389.
- FIDEL JR, P.L., VAZQUEZ, J.A., SOBEL, J.D., 1999, "Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. Albicans", *Clin Microbiol Rev*, v. 12, n. 1, p. 80-86.
- FULWYLER, M.J., 1965, "Electronic separation of biological cells by volume", *Science*, v. 150, p. 910-911.
- GADELHA, C., AZEVEDO, N., 2003, "Inovação em vacinas no Brasil: experiências recentes e constrangimentos estruturais", *Hist Cienc Saúde–Manguinhos*, v. 10, n. 2, p. 697-724.
- GARCÍA, O.F.D., 2005, "Historia de George Papanicolau y de la tinción que lleva su nombre", *Elementos: Ciência y Cultura*, n. 58, p. 19-23.
- GEORGE, C.R.P., 2003, "The cellular history of the glomerulus", *J Nephrol*, v. 16, p. 949-957.
- GRAY, P.R., MEYER, R.G., 1993, *Analog and design of analog integrated circuits*. 3 ed. Berkeley: John Wiley & Sons.

- GREENWOOD, S.A., MACHADO, M.F.A.S., SAMPAIO, N.M.V., 2006, "Motivos que levam mulheres a não retornarem para receber o resultado de exame papanicolau", *Rev Latino-Am Enfermagem*, n. 14, v. 4, p. 503-509.
- GUCKER JR., F.T., O'KONSKI, C.T., 1949, "Electronics methods of counting aerosol particles", *Chem Rev*, v. 44, p. 373.
- GUCKER JR., F.T., O'KONSKI, C.T., PICKARD, H.B. *et al.*, 1947, "A photoelectric counter for colloidal particles", *J Am Chem Soc*, v. 69, p. 2422-2431.
- HERZENBERG, L.A., PARKIS, D., SAHAF, B. *et al.*, 2002, "The history of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford", *Clin Chem*, v. 48, n. 10, p. 1819-1827.
- HIEBERT, R.D., SWEET, R.G., 1985, "Electronics for flow cytometers and sorters". In: VAN DILLA, M.A., DEAN, P.N., LAERUM, O.L. *et al.* *Flow cytometry: instrumentation and data analysis*, cap. 4, London, Academic.
- HOGG, J., 1871, *The Microscope: its history, construction and application*. 8 ed. Londres: George Routledge and Sons.
- INSTITUTO BUTANTAN. São Paulo, 2006. Contém informações institucionais, notícias, projetos e serviços. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/>>. Acesso em: 30 out. 2006.
- LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA TROPICAL. Laboratório pertencente ao IMTSP, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Disponível em: <<http://www.imt.usp.br/labhemat.htm>>. Acesso em: 11 nov. 2006.
- LILLIE, R.D., 1978, "Romanowsky-Malachowski stains the so-called Romanowsky stain: Malachowski's 1891 use of alkali polychromed methylene blue for malaria plasmodia", *Stain Technol*, v. 53, n. 1, p. 23-28.

LIP. Laboratório de Instrumentação e Física Experimental de Partículas. Laboratório português situado na cidade de Lisboa que investiga a física experimental de altas energias e a instrumentação associada. Disponível em: <<http://www.lip.pt/>>. Acesso em: 30 nov. 2006.

MILLER, J.T., RAHIMI, S.Y., LEE, M., 2005, "History of infection control and its contributions to the development and success of brain tumor operations", *Neurosurg Focus*, v. 18, n. 4, p. 1-5.

MULLANEY, P.F., VAN DILLA, M.A., COULTER, J.R. *et al.*, 1969, "Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination", *Rev Sci Instrum*, v. 40, n. 8, p. 1029-1032.

MURMANN, J.P., 2000, "Knowledge and competitive advantage in synthetic dye industry", *Enterprise Soc*, v. 1, n. 4, p. 699-704.

NICHOLSON, P.W., 1974, *Nuclear Electronics*. Norwich: John Wiley & Sons.

NIKON Microscopy. Contém informações sobre óptica e tecnologia de imageamento. Contém informações sobre microscopia óptica, imageamento digital e fotomicrografia. Disponível em: <<http://www.microscopy.com/>>. Acesso em: 9 out. 2006.

NOBELPRIZE.ORG. Contém informações sobre o Prêmio Nobel e biografias de seus ganhadores. Disponível em: <<http://nobelprize.org/>>. Acesso em: 8 nov. 2006.

PASTEUR (1822-1895): fondateur de la microbiologie. . [S.l. : s.n.]. Disponível no sítio da Ambassade de la France au Canadá: <<http://www.ambafrance-ca.org/spip.php?article1517>>. Acesso em: 1 jul. 2008.

- PICF. Rio de Janeiro, Programa Integrado em Citometria de Fluxo da Fiocruz. Contém informações sobre os citômetros de fluxo da Fiocruz, os laboratórios que os utilizam, as linhas de pesquisa e o primeiro laboratório de citometria de fluxo no Brasil. Disponível em: <<http://picf.ioc.fiocruz.br/>>. Acesso em: 8 set. 2006.
- PINKEL, D., STOVEL, R., 1985, "Flow chambers and sample handling". In: VAN DILLA, M.A., DEAN, P.N., LAERUM, O.L. *et al.* *Flow cytometry: instrumentation and data analysis*, cap. 3, London, Academic.
- PORTER, J.R., 1976, "Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his Discovery of bacteria", *Bacteriol rev*, v. 40, n. 2, p. 260-269.
- REZENDE, S.M., 1996, *A física de materiais e dispositivos eletrônicos*. Recife: Universitária da UFPE.
- RHODIUS, C.A., THIJS, A., 2003, "Van microscopie naar flowcytometrie", *Ned Tidschr Geneeskd*, v. 6, n. 2, p. 33-35.
- ROCHA, J., 2006, *Por trás desses óculos....* Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=779&sid=7>>. Acesso em: 29 out. 2006.
- SEDRA, A.S., SMITH, K.C., 2000, *Microeletrônica*. 4 ed. São Paulo: Pearson Education.
- SHAPIRO, H.M., 2003, *Practical flow cytometry*. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- SPENDELER, L., 2005, "Organismos alterados genéticamente: una nueva amenaza para la seguridad alimentaria", *Rev Esp Salud Publica*, v. 79, n. 2, p. 271-282.
- VAN DILLA, M.A., 1985, "Overview of flow cytometry: instrumentation and data analysis". In: VAN DILLA, M.A., DEAN, P.N., LAERUM, O.L. *et al.* *Flow cytometry: instrumentation and data analysis*, cap. 1, London, Academic.

VERSO, M.L., 1964, "The evolution of blood-counting techniques", *Med Hist*, v. 8, n. 2, p. 149-158.

VISION Biomed. Sítio da empresa Vision Biomed com um breve histórico da microscopia. Disponível em: <http://www.visionbiomed.com/microscope_history.php>. Acesso em: 15 ago. 2008.

VISSER, J.W.M., JONGELING, A.A.M., TANKE, H.J., 1979, "Intracellular pH-determination by fluorescence measurements", *J Cell Physiol*, v. 27, n. 1, p. 32-35.

WANDERLEY, H.V., 2006, *Construção e validação de um citômetro de fluxo monoparamétrico*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.

WANDERLEY, H.V., SOUZA, M.N., 2006, "Construção de uma célula de fluxo para diferenciação de tamanhos de partículas por citometria de fluxo". In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 20.*, São Pedro, SP. *Anais...* 1 CD-ROM.

WHEELESS JR., L.L., KAY, D.B., 1985, "Optics, light sources, filters, and optical systems". In: VAN DILLA, M.A., DEAN, P.N., LAERUM, O.L. *et al. Flow cytometry: instrumentation and data analysis*, cap. 2, London, Academic.

WIKIPEDIA. Enciclopédia virtual. Disponível em: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Laser>>. Acesso em: 5 jul. 2008.

Apêndice A

Circuito de Controle do *Laser*: Potência e Realimentação

Nesta seção será calculada a potência do *laser* fornecida pelo circuito de controle, para verificar a eficácia da realimentação em manter a potência constante. Para a dedução, como referencial de tensão foi considerado o terminal no coletor de Q_1 ao invés do nó superior, onde está conectado o terra. Este deslocamento não provoca nenhuma modificação no funcionamento do circuito, já que se trata de um deslocamento fixo na tensão de todos os nós. Ademais, será considerado que as variações ocorrem em baixa frequência, ou seja, os capacitores serão modelados como circuitos abertos. Esta simplificação do circuito é apresentada na Figura A.1.

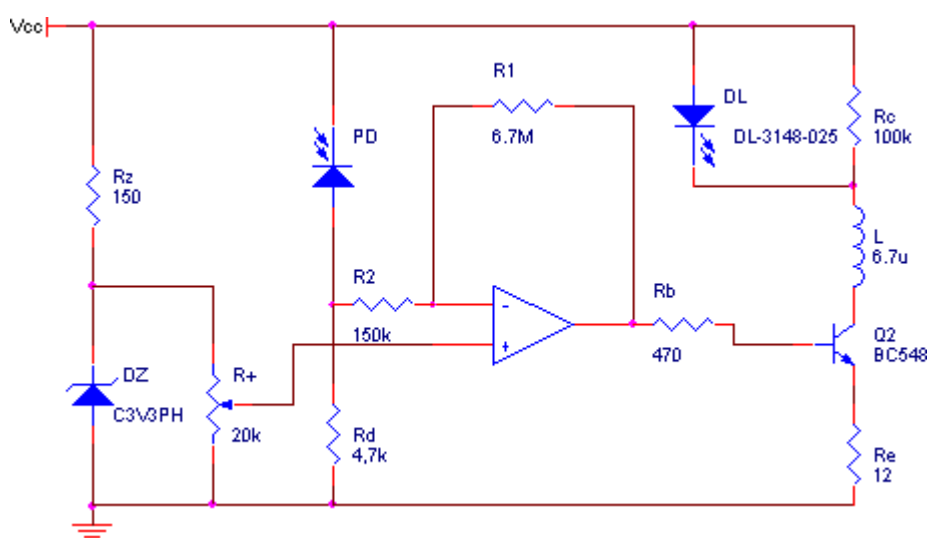


Figura A.1: Circuito elétrico simplificado de alimentação e controle do *laser* de diodo.

Defina v_O como a tensão na saída do amplificador operacional. Aplicando a lei das correntes de Kirchoff da saída do amplificador operacional ao terra passando pelo transistor Q_2 , obtém-se a equação (A.1).

$$v_O = i_B R_b + v_{BE} + i_E R_e \approx v_{BE} + i_C \left(\frac{R_b + \beta R_e}{\beta} \right) \quad (\text{A.1})$$

Aplicando a lei das correntes no terminal inversor do amplificador operacional, obtém-se (A.2), onde v_+ é a tensão nos terminais inversor e não-inversor, e v_D é a tensão sobre o resistor R_d .

$$\frac{v_O - v_+}{R_1} = \frac{v_+ - v_D}{R_2} \therefore v_O = v_+ \left(\frac{R_1 + R_2}{R_2} \right) - v_D \frac{R_1}{R_2} \quad (\text{A.2})$$

Substituindo (A.1) em (A.2), encontra-se (A.3).

$$v_{BE} + i_C \left(\frac{R_b + \beta R_e}{\beta} \right) \approx v_+ \left(\frac{R_1 + R_2}{R_2} \right) - v_D \frac{R_1}{R_2} \quad (\text{A.3})$$

A lei das correntes, no nó adjacente ao fotodiodo e às resistências R_2 e R_d , resulta em (A.4), onde i_D é a corrente luminosa proveniente do fotodiodo acoplado ao *laser*.

$$i_D = \frac{v_D - v_+}{R_2} + \frac{v_D}{R_d} \therefore v_D = \frac{R_d R_2 i_D + v_+ R_d}{R_2 + R_d} \quad (\text{A.4})$$

O fotodiodo acoplado ao *laser* pode ser modelado como uma fonte de corrente proporcional à potência luminosa emitida pelo *laser*, relação expressa por (A.5), em que P é a potência luminosa.

$$i_D = K_1 P \quad (\text{A.5})$$

A substituição direta de (A.5) em (A.4) resulta em (A.6).

$$v_D = \frac{R_d R_2 K_1 P + v_+ R_d}{R_2 + R_d} \quad (\text{A.6})$$

Em correntes baixas, o *laser* de diodo não atua como *laser*, e sim similar ao *LED*, com emissão espontânea. Acima da corrente liminar, ocorre a emissão

estimulada, o *laser* se torna efetivamente *laser*. Nesta faixa de *laser*, sua corrente pode ser aproximada por uma reta afim em função da potência emitida. Como o *laser* está em paralelo com uma resistência alta, 100 kΩ, a corrente no coletor de Q₂ pode ser aproximada como a própria corrente no *laser*, resultando em (A.7), onde K_3 é a corrente liminar e K_2 é o recíproco da eficiência diferencial, (A.8).

$$i_C \approx i_{DL} \approx K_2 P + K_3 \quad (\text{A.7})$$

$$\text{eficiência diferencial} = \frac{1}{K_2} = \frac{dP}{di_{DL}} \quad (\text{A.8})$$

Substituindo (A.6) e (A.7) em (A.3) e isolando P , chega-se à (A.9).

$$P \left(K_2 \frac{R_b + \beta R_e}{\beta} + K_1 \frac{R_d R_1}{R_2 + R_d} \right) \approx v_+ \left[\frac{R_1 + R_2}{R_2} + \frac{R_1 R_d}{R_2 (R_2 + R_d)} \right] - v_{BE} - K_3 \frac{R_b + \beta R_e}{\beta} \quad (\text{A.9})$$

Do *datasheet* do transistor sabe-se que β está entre 110 e 800 e, para a corrente de trabalho do *laser*, $v_{BE} \approx 0,8 \text{ V}$. Do *datasheet* do *laser*, sabe-se que

$$\begin{cases} 0,016 \text{ } \mu\text{W} \leq K_1 \leq 0,1 \text{ } \mu\text{W} \\ K_2 \sim 2 \text{ } \mu\text{W} \\ K_3 \leq 35 \text{ mA} \end{cases} .$$

Com estes valores tabelados, pode-se fazer os cálculos limites expressos por (A.10), resultando em (A.11).

$$\begin{cases} 25 \text{ } \mu\text{W} < K_2 \frac{R_b + \beta R_e}{\beta} < 33 \text{ } \mu\text{W} \\ 3250 \text{ } \mu\text{W} < K_1 \frac{R_d R_1}{R_2 + R_d} < 20350 \text{ } \mu\text{W} \end{cases} \Rightarrow K_1 \frac{R_d R_1}{R_2 + R_d} \gg K_2 \frac{R_b + \beta R_e}{\beta} \quad (\text{A.10})$$

$$PK_1 \cdot 203,6 \text{ k}\Omega \approx v_+ \cdot 47 - 0,8 \text{ V} - K_3 \frac{R_b + \beta R_e}{\beta} \quad (\text{A.11})$$

Com os mesmos valores tabelados, pode-se ainda estimar que o valor do último termo de (A.11) não ultrapassa 0,6 V. E, da prática, sabe-se que v_+ típico é maior que 2 V. Estes dados levam à aproximação expressa por (A.12).

$$PK_1 \cdot 203,6 \text{ k}\Omega \approx v_+ \cdot 47 \quad (\text{A.12})$$

De (A.12), conclui-se que o sistema de controle do *laser* independe dos parâmetros variáveis do próprio circuito; a potência emitida é função da tensão de referência – v_+ –, dos resistores de realimentação – R_1 , R_2 e R_d – e do parâmetro K_1 do fotodiodo, o qual é aproximadamente constante para cada dispositivo. Em outras palavras, a realimentação é adequada para manter a potência do *laser* constante.

Apêndice B

Suporte do *Laser* e da Lente de Focalização

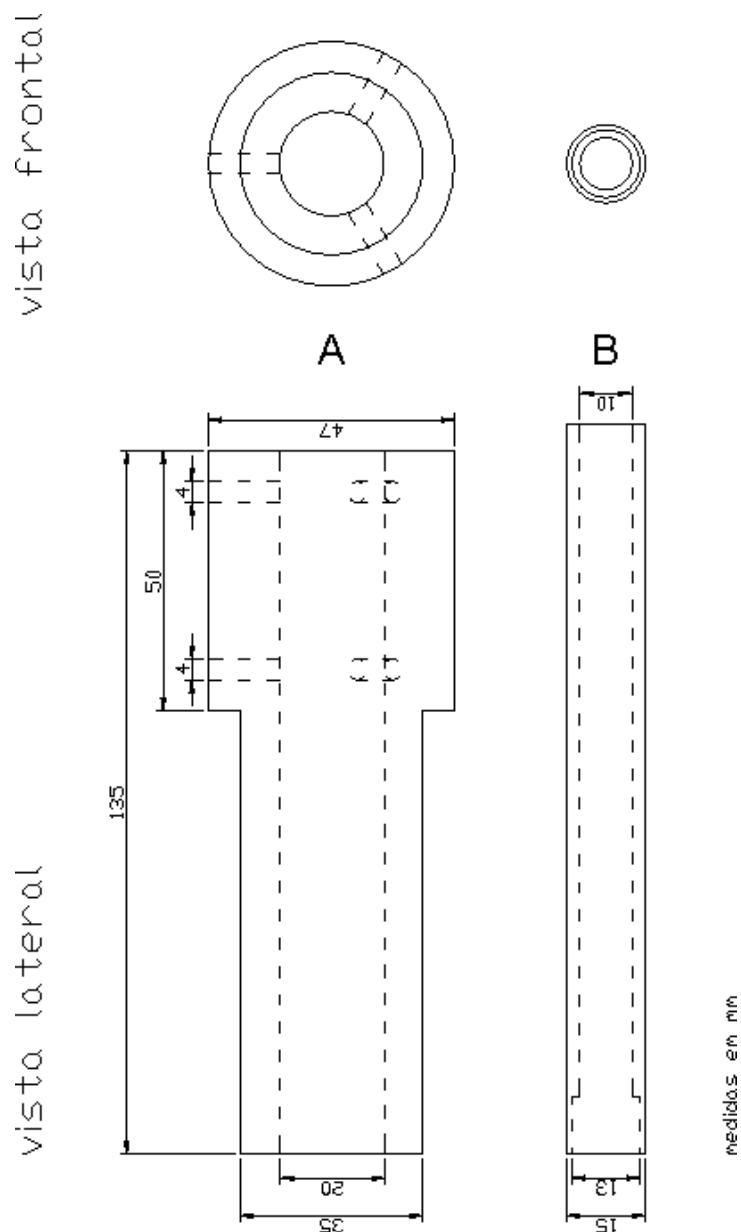


Figura B.1: Vistas ortogonais do suporte do *laser* e da lente de focalização. Na extremidade inferior da peça B é encaixado o *laser* acoplado a seu colimador; e pela extremidade superior passa o cabo dos sinais de alimentação e controle. Esta peça é fixa na parte interna da peça A por 6 parafusos, divididos em 2 planos paralelos e espaçados de 180° em cada plano, para proporcionar um melhor ajuste direcional do feixe do *laser*. Ademais na parte inferior da peça A é fixa a lente convergente, com a íris, para focalizar o *laser* no capilar.

Apêndice C

Pré-Amplificador com Malhas de Capacitores e Resistores em T

O pré-amplificador de carga utilizado está reapresentado de forma mais simplificada na Figura C.1, sem o fotodiodo e seu circuito de polarização. Há uma corrente $-I_c$ na malha de capacitores e outra $-I_r$, na de resistores.

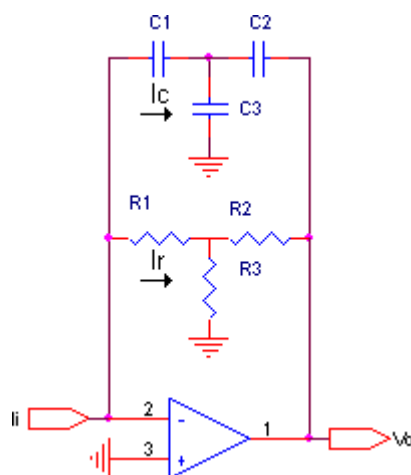


Figura C.1: Pré-amplificador de carga simplificado utilizado no projeto do citômetro de fluxo.

Podemos generalizar a malha em T chamando as impedâncias de Z , como apresentado na Figura C.2. Calculemos agora a impedância vista entre a entrada e a saída nesta malha, assumindo que o amplificador operacional seja ideal.

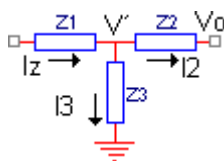


Figura C.2: Malha em T genérica.

Pela lei de ohm, obtêm-se as equações (C.1), (C.2) e (C.3). E pela lei das correntes de Kirchhoff, (C.4).

$$V' = -I_Z Z_1 \quad (C.1)$$

$$I_2 = \frac{V' - V_o}{Z_2} \quad (C.2)$$

$$I_3 = \frac{V'}{Z_3} \quad (C.3)$$

$$I_Z = I_2 + I_3 \quad (C.4)$$

Aplicando (C.2), (C.3) e depois (C.1) em (C.4), resulta na equação (C.5).

$$I_Z = \frac{V' - V_o}{Z_2} + \frac{V'}{Z_3} = \frac{-I_Z Z_1 - V_o}{Z_2} - \frac{I_Z Z_1}{Z_3} \quad (C.5)$$

Reorganizando os termos de (C.5), chega-se a (C.6), que expressa a impedância equivalente entre entrada e saída da malha em T.

$$Z = \frac{V_o}{-I_Z} = \frac{Z_2 Z_3 + Z_1 Z_3 + Z_1 Z_2}{Z_3} \quad (C.6)$$

Fazendo agora Z_1 e Z_2 de valores idênticos, a impedância total resume-se à (C.7).

$$Z = Z_1 \left(2 + \frac{Z_1}{Z_3} \right) \quad (C.7)$$

Se as impedâncias forem todas resistivas, a resistência equivalente é dada por (C.8).

$$R = R_1 \left(2 + \frac{R_1}{R_3} \right) \quad (C.8)$$

Se as impedâncias forem todas capacitivas, basta trocar Z_k por C_k , conforme (C.9), e obtêm-se a capacitância equivalente expressa por (C.10).

$$Z_k = \frac{1}{sC_k} \quad (C.9)$$

$$C = \frac{C_1}{2 + \frac{C_3}{C_1}} \quad (\text{C.10})$$

Na prática, R_1 é diferente de R_2 , assim como C_1 é diferente de C_2 . Destarte, a resistência equivalente é dada pela equação (C.11) – por substituição de Z_k por R_k em (C.6) – e a capacitância equivalente é dada pela equação (C.12) – por substituição de (C.9) em (C.6).

$$R = \frac{R_2 R_3 + R_1 R_3 + R_1 R_2}{R_3} \quad (\text{C.11})$$

$$C = \frac{C_1 C_2}{C_1 + C_2 + C_3} \quad (\text{C.12})$$

Apêndice D

Análise do Amplificador do Espalhamento Lateral

O amplificador do espalhamento lateral inicia por um estágio passa-banda de ganho 10 e banda de 4,82 kHz a 482 kHz, teóricos. Sua função de transferência, desprezando efeitos da não idealidade do amplificador operacional, é aproximada pela equação (D.1).

$$H_1(s) = 10 \frac{s}{s + 2\pi \cdot 4,82 \cdot 10^3} \frac{2\pi \cdot 482 \cdot 10^3}{s + 2\pi \cdot 482 \cdot 10^3} \quad (\text{D.1})$$

Tendo em vista que as frequências de interesse estão abaixo de 482 kHz, pode-se retirar o termo relativo a esta frequência, restando:

$$H_1(s) \approx 10 \frac{s}{s + 2\pi \cdot 4,82 \cdot 10^3} \quad (\text{D.2})$$

Entre este estágio e o seguinte, há um controle de ganho variável de 0 a 1. Sem perda de generalidade, pode-se considerar o circuito com ganho máximo. O próximo estágio é um filtro passa-baixa com ganho 150 e frequência de corte de 321,5 Hz. Sua função de transferência é explicitada pela equação (D.3).

$$H_2(s) = 150 \frac{2\pi \cdot 321,5}{s + 2\pi \cdot 321,5} \quad (\text{D.3})$$

Em seguida, há um acoplamento AC para a placa *PHA* com frequência de corte de 338,6 Hz, cuja função de transferência é expressa por (D.4).

$$H_{AC}(s) = \frac{s}{s + 2\pi \cdot 338,6} \quad (\text{D.4})$$

A função de transferência do amplificador completo é a multiplicação de (D.2), (D.3) e (D.4), resultando em (D.5).

$$H(s) = 1500 \frac{2\pi \cdot 321,5}{s + 2\pi \cdot 321,5} \frac{s}{s + 2\pi \cdot 338,6} \frac{s}{s + 2\pi \cdot 4,82 \cdot 10^3} \quad (D.5)$$

Mapeando s na frequência, obtém-se:

$$H(f) = 1500 \frac{321,5}{jf + 321,5} \frac{jf}{jf + 338,6} \frac{jf}{jf + 4,82 \cdot 10^3} \quad (D.6)$$

Para os cálculos do ganho aproximado do circuito, pode-se dividir o espectro de frequência em 3 regiões, como apresentado em (D.7).

$$\left\{ \begin{array}{l} f \ll 321,5; 338,6 \ll 4,82 \cdot 10^3 \Rightarrow H(f) \approx 1500 \frac{jf}{338,6} \frac{jf}{4,82 \cdot 10^3} \\ 321,5; 338,6 \ll f \ll 4,82 \cdot 10^3 \Rightarrow H(f) \approx 1500 \frac{321,5}{jf} \frac{jf}{4,82 \cdot 10^3} \approx 100 \\ 321,5; 338,6 \ll 4,82 \cdot 10^3 \ll f \Rightarrow H(f) \approx 1500 \frac{321,5}{jf} \end{array} \right. \quad (D.7)$$

Os cálculos foram realizados para o circuito com ganho máximo, entretanto o potenciômetro o multiplica por um fator entre 0 e 1. Em resumo, este amplificador pode ser aproximado por um passa-banda com ganho variável de 0 a 100 vezes e frequências de corte de 338,6 Hz e 4,82 kHz.

Apêndice E

Estrutura Interna do *Software* de Aquisição e Apresentação de Dados

A estrutura interna do *software* é apresentada na Figura E.1. Dentro deste, podem-se verificar alguns subVIs²² especialmente desenvolvidos para este *software*: MCB OK?, teste de funcionamento da placa PHA; Mail Write, escrita de comando na placa; Read Without Message, leitura de resposta a comando; e Data Read, leitura das contagens. As estruturas internas destes subVI's auxiliares estão respectivamente apresentadas nas Figuras E.2, E.3, E.4 e E.5.

²² SubVI: *sub-virtual instrument*, como são chamadas as sub-rotinas dentro de um *software* desenvolvido em LabVIEW.

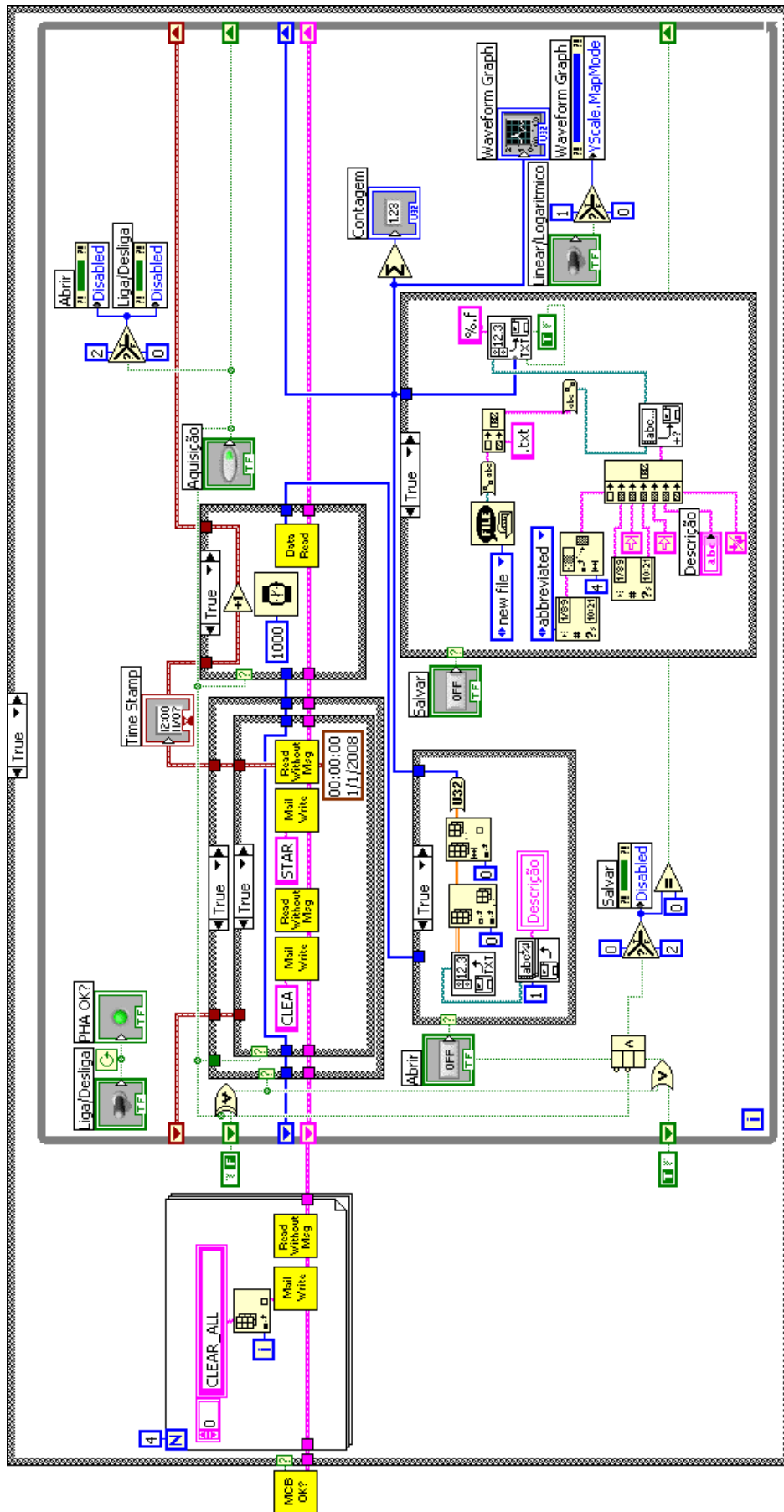


Figura E.1: Estrutura interna do software de aquisição e apresentação de dados.

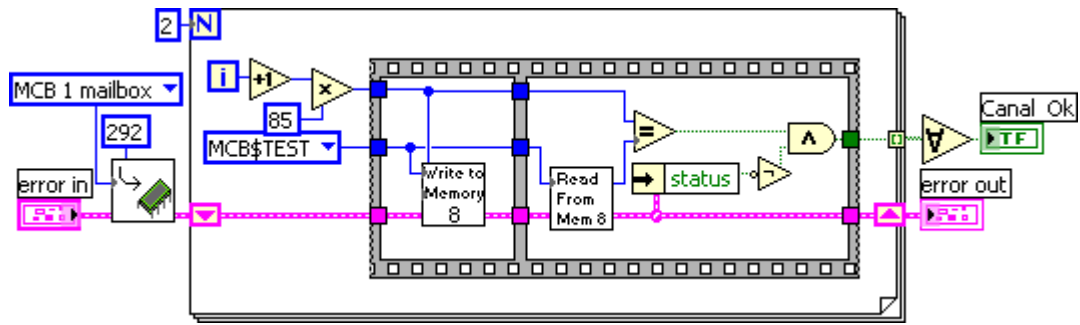


Figura E.2: SubVI MCB OK?: testa o funcionamento da placa PHA.

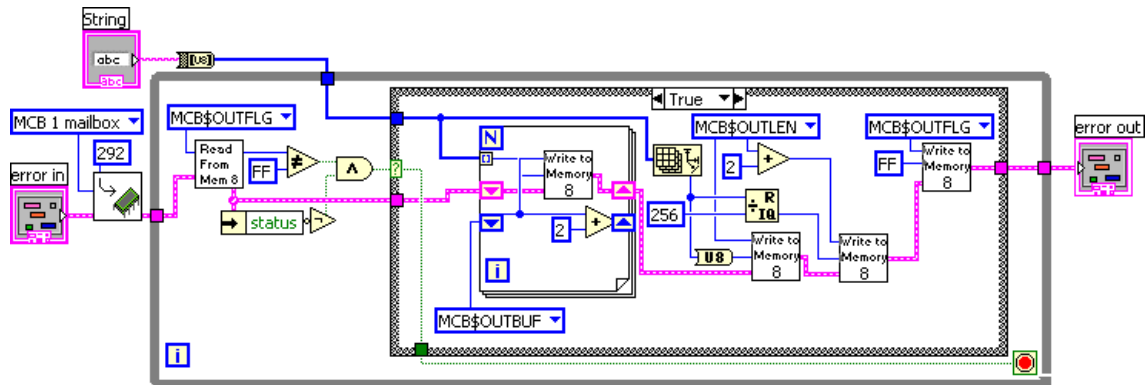


Figura E.3: SubVI Mail Write: escreve comando na placa PHA.

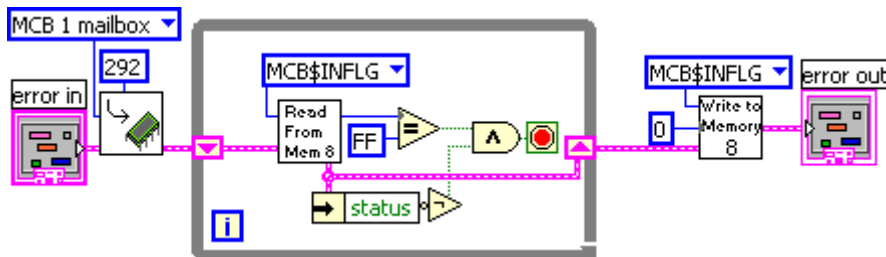


Figura E.4: SubVI Read Without Message: lê resposta da placa PHA a um comando.

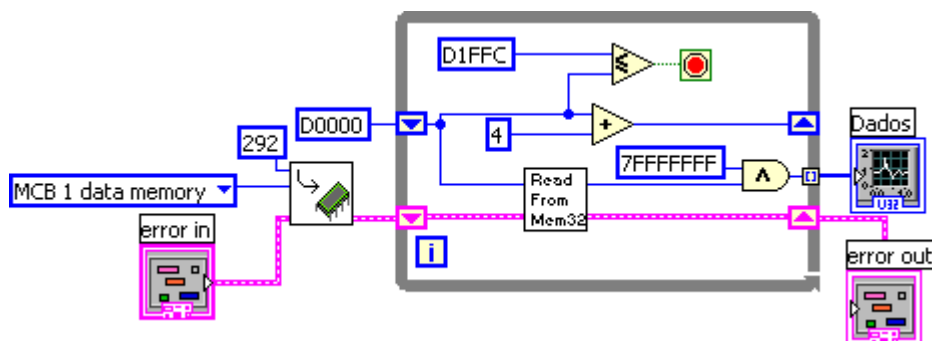


Figura E.5: SubVI Data Read: lê as contagens das alturas dos pulsos armazenadas na placa PHA.