

COMPARAÇÃO ENTRE FONTES DE EXCITAÇÃO VERDE E UV PARA MELHOR DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE R-FICOERITRINA

P.A.Dias*, T.Bassani*, G.Branco**, F.K.Schneider*, H.V.Neto*

*CPGEI/UTFPR, Curitiba, Brasil

** PPGEB/UTFPR, Curitiba, Brasil

phil.adias@gmail.com

Abstract: This paper briefly compares UV and green LEDs as light sources for the detection of R-Phycoerythrin. The most common strategy for fluorescence detection consists in exciting the fluorophore in its best absorption band. However, this study discusses the use of exciters which mainly present wavelengths distant from the fluorescence emission band of the fluorophore. Different dilutions of fluorophore have been tested using a prototype composed by a spot containing the solution illuminated by a high power LED. Then, a photomultiplier tube with a coupled optic filter measured the intensity of luminescence coming from the spot. Using an LED with wavelengths in the UV band, the percentage variations in the presence of fluorescence with respect to a measurement without the fluorophore are larger than the ones measured with a green LED. Although requiring more light intensity, the use of exciters in the UV wavelength band seems promising for further investigation, because their emission is better blocked by the optic filter, possibly providing better results for the detection of fluorescence.

Palavras-chave: fluorescence, immunoassays, phycoerythrin, R-phycoerythrin, exciters.

Introdução

O diagnóstico de doenças é um procedimento de grande importância tanto para o tratamento de indivíduos que apresentam sintomas patológicos desenvolvidos, como para identificar e tratar patologias que ainda não tenham induzido sintomas. A identificação prévia de determinadas doenças infecciosas – caracterizadas pela invasão de um organismo infectante a um hospedeiro e interferência na fisiologia normal do mesmo – pode inclusive evitar possíveis epidemias. Doenças decorrentes de infecções endêmicas são alarmantes em países em desenvolvimento, pois refletem cerca de 1 milhão de óbitos por ano [1].

Nos grandes centros urbanos, os laboratórios locais são equipados com recursos e instrumentação capazes de executar o diagnóstico de diversas doenças, facilitando o acesso da população. Para o caso de regiões mais afastadas e com maiores dificuldades de acesso a recursos físicos, materiais e de informação, reflete-se a necessidade de desenvolver equipamentos que apresen-

tem simplicidade de manuseio, facilidade de transporte e portabilidade, baixo custo de produção e manutenção, e versatilidade.

Dentro desta perspectiva, uma metodologia que apresenta crescente desenvolvimento refere-se ao imunoensaio. Esta técnica detecta a presença de agentes patológicos por meio da procura por complexos antígeno-anticorpo na amostra sanguínea de um paciente [2]. A esta amostra, adiciona-se anticorpos com marcadores acoplados, de cujos respectivos antígenos deseja-se confirmar a presença. Após misturar a amostra com os anticorpos marcados, uma lavagem é realizada de forma que apenas anticorpos acoplados a antígenos (complexo antígeno-anticorpo) permanecem no poço de detecção, removendo anticorpos não acoplados. Portanto, só existirão pares com marcadores no poço caso haja antígenos no sangue do paciente, indicando assim que se trata de um indivíduo infectado.

Uma opção que se mostra potencialmente interessante para produção de marcadores é o uso de fluoróforos, que são substâncias capazes de emitir luz por meio do fenômeno da fluorescência. A fluorescência ocorre quando um elétron excitado por luz, ao retornar a seu estado fundamental de energia, emite um fóton cuja energia é menor que a do fóton incidente. Tratando-se de radiação óptica, uma diferença de energia implica em variação de comprimento de onda de maneira inversamente proporcional. Ou seja, diminuição de energia significa aumento de comprimento de onda e, portanto, a luminescência emitida pelo fluoróforo terá comprimento de onda maior que o da luz que o excitou.

Um dos compostos fluoróforos conhecidos é a ficoeritrina (proteína proveniente de cianobactérias e algas eucarióticas). Duas derivações encontradas comercialmente são a R-ficoeritrina e a B-ficoeritrina, dentre as quais, utilizou-se a R-ficoeritrina para o presente estudo.

Desta forma, discute-se neste artigo, a possibilidade de sensibilização de um fluoróforo fluorescente por meio de uma fonte óptica que o excite em uma região secundária de seu espectro de absorção, distinta da região de maior absorção. Como vantagem, diminui-se a sobreposição espectral entre fonte de excitação e emissão de fluorescência, exigindo filtros de menor precisão e, conseqüentemente, potencializa-se a possibilidade de uma instrumentação mais simplificada. Assim, reduzem-se custos de fabricação e de manutenção, fatores

relevantes para todo tipo de desenvolvimento, em especial tratando-se de dispositivos para saúde pública.

Materiais e Métodos

A instrumentação utilizada para gerar e medir fluorescência baseou-se na técnica de análise de intensidade de emissão. Tal método foi usado por ser de mais simples implementação quando comparado aos métodos de medição por deslocamento de fase e por tempo de decaimento. Utilizou-se fontes de luz adequadas ao espectro de absorção do fluoróforo, um filtro seletor para a emissão da radiação fluorescente que seguia posteriormente para o detector optoeletrônico e um sistema de aquisição e processamento de sinais.

Fluoróforo – O material fluorescente utilizado foi a *R-Phycoerythrin* (R-PE). Este fluoróforo apresenta rendimento quântico de 0,82, parâmetro que é definido como a quantidade de fótons absorvidos que são convertidos em emissão de fluorescência. A faixa de melhor absorção encontra-se entre 450 e 568nm, com picos de absorção em 565nm (principal) e 480nm (secundário). O pico de emissão de fluorescência corresponde a 578nm, com um deslocamento de Stokes na ordem de 10nm em relação ao pico de absorção principal. A Figura 1 apresenta os respectivos valores e faixas de absorção e emissão da R-PE [4].

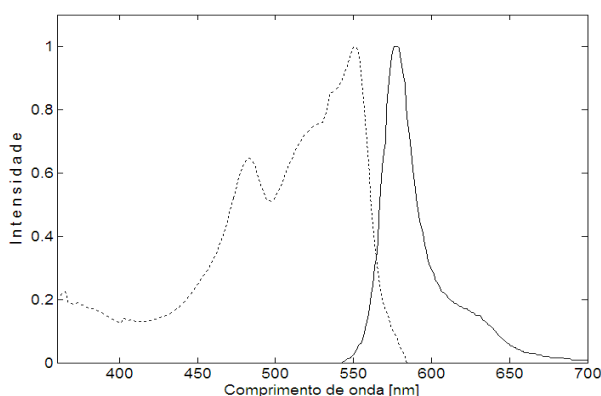


Figura 1: Espectros de absorção e emissão de fluorescência da *R-Phycoerythrin*, retratados pelas curvas tracejada e contínua, respectivamente. Considerando que o eixo Y contém valores normalizados, verifica-se alta absorção na faixa entre 500 e 568nm, e alta emissão de fluorescência na faixa entre 580 e 600nm.

Amostra – Preparou-se uma solução contendo 1 μ L de R-PE e 99 μ L de solvente (solvente PBS – tampão fosfato salino), correspondendo a uma diluição de 1:100 (volume de R-PE em relação ao volume total). De maneira análoga, outras diluições de 1:500 e 1:1000 também foram elaboradas. Uma solução de referência contendo apenas solvente também foi preparada, com o intuito de ser uma saída de referência de casos em que não ocorre emissão de fluorescência.

Poço de iluminação da amostra – No arranjo experimental utilizado, a amostra contendo R-PE em estado aquoso foi colocada num poço centralizado cujo volume é de 10 μ L.

Fonte óptica – De acordo com a Figura 1, observa-se que a região de maior absorção do fluoróforo corresponde à região do espectro visível, incluindo também a faixa do ultravioleta (UV). Assim sendo, como fontes de excitação da amostra, utilizaram-se diodos emissores de luz (LED), um deles com pico de emissão em 400nm (região do UV) e outro em 520nm (região do verde). Como os LEDs utilizados possuem tamanhos e dimensões semelhantes, foi possível intercambiá-los sem alterar o restante da estrutura de detecção de fluorescência.

Na Figura 2, apresentam-se os espectros dos LEDs ultravioleta e verde escolhidos sobrepostos ao espectro de absorção da R-PE.

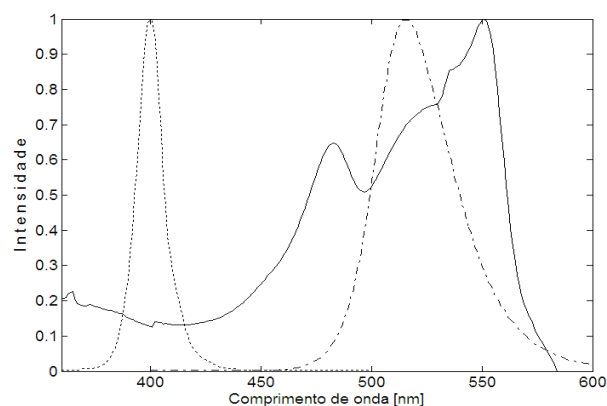


Figura 2: Espectros dos LEDs e da absorção da R-PE sobrepostos. A curva contínua refere-se à absorção da R-ficoeritrina, enquanto as curvas pontilhada e tracejada correspondem aos LEDs ultravioleta e verde, respectivamente. O primeiro LED possui emissão na região de 400 \pm 20nm [5] e o segundo, na região de 520 \pm 50nm [6].

Sistema de detecção – A detecção foi realizada por uma válvula fotomultiplicadora (PMT - *Photomultiplier Tube*) do tipo miniatura, localizada perpendicularmente ao caminho óptico (a fim de reduzir a quantidade de luz de excitação que atinge o detector). À saída da válvula fotomultiplicadora foi acrescido um amplificador de transimpedância (o amplificador utilizado foi o LM318) [3], de maneira que a saída em tensão (valor de pico) foi registrada através de um osciloscópio digital modelo TDS 220 (Tektronix, Beaverton, OR, U.S.A.), no modo de aquisição por médias de 64 pontos.

Para reduzir radiações externas espúrias e, principalmente, a quantidade de luminescência da fonte óptica que atinge o detector, utilizou-se um filtro óptico justaposto à PMT [7]. Conforme a Figura 3, a transmitância do filtro encontra-se na faixa entre o verde e o amarelo (580 \pm 10nm).

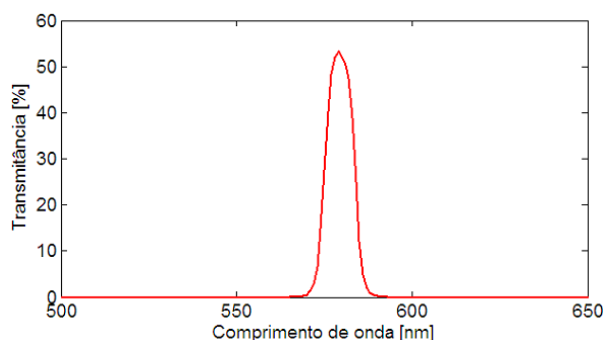


Figura 3: Espectro do filtro óptico utilizado.

Metodologia – A fonte óptica foi chaveada por um trem de pulsos de tensão, com frequência de 1kHz (período de 1ms) e ciclo de trabalho de aproximadamente 30%. A amplitude do sinal foi ajustada para cada fonte óptica de maneira que a intensidade luminosa fornecida pelo LED UV foi aproximadamente o dobro da gerada pelo LED verde, conforme valores de referência obtidos em situação sem fluoróforo, apresentados nas Tabelas 1 e 2. Estes sinais foram obtidos por meio de um gerador de sinais de saída ajustável tipo AFG3021 (Tektronix, Beaverton, OR, U.S.A.). A utilização de amplitudes distintas para as fontes decorre do espectro de absorção da R-ficoeritrina, em que se observa uma absorção maior para a faixa do verde do que para a faixa de UV (Figura 2). Adicionalmente, o chaveamento por pulsos permite observar periodicamente, quando da excitação da amostra com indicador, uma variação no nível da amplitude no nível lógico alto, que corresponde à detecção da emissão fluorescente associado ao valor de referência.

Resultados

Todas as medidas foram realizadas sobre uma mesma lâmina contendo um poço de 10 μ L. A Tabela 1 apresenta os resultados para o LED verde, enquanto que a Tabela 2 para o UV. Um percentual de alteração da amplitude do nível alto de acordo com o fator de diluição (três diluições disponíveis) foi calculado em relação ao nível de referência do nível alto sem fluoróforo. Variações positivas indicam o aparecimento de uma emissão extra de fluorescência em relação ao referencial $\Delta V_{pp}^{\text{fator de diluição}} / V_{pp}^{\text{referencia}}$ (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Resultados obtidos com o LED verde.

Fator de diluição	$V_{\text{pico}}(\text{V})$	$\Delta V_{pp}^{\text{fator de diluição}} / V_{pp}^{\text{referencia}}$
Apenas solvente (Ref.)	0,0344	0,00%
1:100	0,0416	20,9%
1:500	0,0400	16,3%
1:1000	0,0392	14,0%

Tabela 2: Resultados obtidos com o LED UV.

Fator de diluição	$V_{\text{pico}}(\text{V})$	$\Delta V_{pp}^{\text{fator de diluição}} / V_{pp}^{\text{referencia}}$
Apenas solvente (Ref.)	0,0700	0,00%
1:100	0,1240	77,1%
1:500	0,0920	31,4%
1:1000	0,0860	22,9%

Observa-se que ao diluir a R-PE em um solvente não fluorescente, diminui-se a concentração de fluoróforos na solução. Portanto, quanto maior a diluição em análise, menor será a concentração de fluoróforo e menor será também a emissão de fluorescência. Assim, a qualidade (sensibilidade) do sistema pode ser relacionada à capacidade de detecção da menor concentração possível de fluoróforo.

A Figura 4 apresenta um gráfico comparativo entre os resultados obtidos ao empregar os diferentes LEDs como fontes de excitação para a amostra.

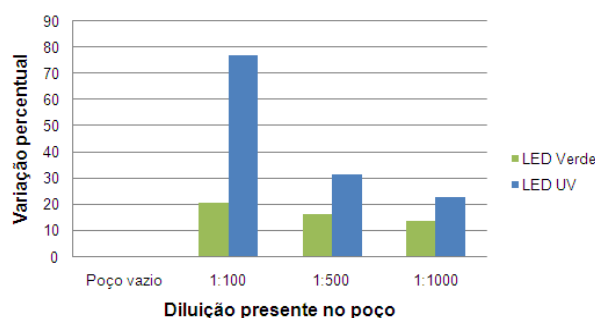


Figura 4: Gráfico da variação percentual da emissão de fluorescência de acordo com as medições das diferentes diluições e fontes ópticas.

Discussão

A leitura realizada sobre o poço contendo apenas solvente representa, na forma de tensão, a quantidade de luz proveniente de fontes não relacionadas à fluorescência que atinge o detector da válvula fotomultiplicadora. Majoritariamente, essa tensão retrata a quantidade de luz fornecida pelo LED que, ao contrário do caso ideal em que seria totalmente bloqueada pelo filtro, chega até o detector. Portanto, utiliza-se tal valor como referência para comparação com os resultados obtidos para as amostras contendo fluoróforo. As tensões acima da referência podem, então, ser atribuídas ao fenômeno da fluorescência. Quanto maior a diferença obtida, aumenta-se a exatidão com que se pode afirmar que foi detectada fluorescência, isto é, aumenta-se a relação sinal-ruído.

Como optou-se por diferentes amplitudes para acionamento de cada um dos LEDs, é mais correto compará-los em termos percentuais ao invés de absolutos. Sob essa análise, verifica-se que para as três diluições testadas os resultados obtidos com o LED UV apresentam maiores variações que os obtidos com LED verde. Des-

taca-se o caso da amostra com diluição 1:100, em que a variação percentual obtida ao excitar-se com fonte na região do ultravioleta apresentou uma diferença além de 50% em relação ao obtido na região do verde. No caso da diluição de 1:1000, que apresenta a menor concentração de fluoróforos dentre as utilizadas e é, portanto, a de mais difícil detecção de fluorescência, observa-se novamente uma diferença percentual bastante razoável (quase 10%) favorável à fonte UV na comparação dos resultados obtidos para cada LED.

Ao analisar-se os espectros de emissão do LED verde e transmitância do filtro utilizado, observa-se que uma faixa de emissão do LED corresponde a uma região em que o filtro permite passagem de luminescência ($580\pm 10\text{nm}$), conforme Figura 5.

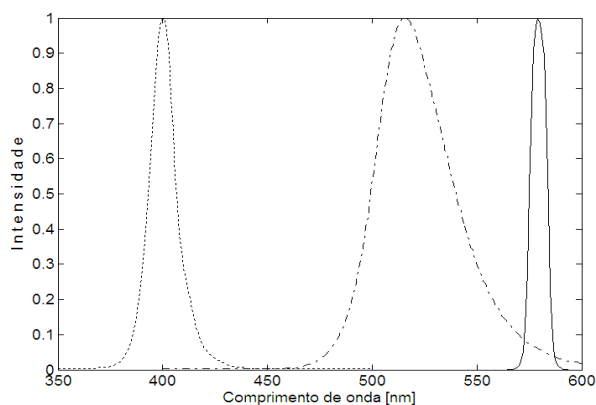


Figura 5: Sobreposição dos espectros dos LEDs verde e UV e da transmitância do filtro óptico utilizado. Observa-se componentes do LED verde na região de elevada transmitância do filtro utilizado.

Por conseguinte, uma quantidade de fótons bastante significativa atinge a entrada da válvula fotomultiplicadora, acarretando a presença de uma maior quantidade de ruído no sinal final obtido. Conforme já exposto, quanto menor a concentração de fluoróforos, menor a intensidade de emissão de fluorescência. Como o ruído decorrente da passagem de fótons provenientes do LED de excitação permanecerá o mesmo independentemente da variação da concentração, para concentrações muito pequenas o sinal final detectado será composto majoritariamente de ruído, apresentando relações sinal-ruído cada vez piores.

Para justificar isso, com base nos espectros de absorção e emissão da R-PE, de transmitância do filtro e de emissão do LED verde, obteve-se através do software MATLAB (The Mathworks, Inc.) uma estimativa das intensidades de fluorescência e de luminescência oriunda do LED verde ao final do processo. Os dados de intensidade indicados na Figura 6 foram obtidos multiplicando-se os valores normalizados referentes ao espectro do filtro pelos valores de emissão da ficoeritrina e, para obtenção do ruído originado diretamente pelo LED verde, multiplicaram-se os valores fornecidos para o LED pelos referentes ao filtro óptico.

Com a utilização do LED ultravioleta, a presença de ruído no sinal final é de menor intensidade e apresenta-

se como nula na simulação, porém na prática ainda apresenta valor diferente de zero. Conforme espectro visualizado na Figura 2, pode-se afirmar que quanto mais afastado de 580nm for o comprimento de onda incidente no filtro, maior o bloqueio realizado pelo filtro sobre essa fonte. Porém, a transmitância do filtro na faixa de UV não é absolutamente nula, permitindo a passagem de alguns poucos fótons que surgem como ruído ao final do processo devido à alta sensibilidade do detector.

De acordo com o exposto sobre os resultados obtidos, um aumento na distância de Stokes – ou seja, a utilização de uma fonte de excitação com comprimento de onda mais afastado dos comprimentos de onda de emissão de fluorescência da substância – proporciona resultados melhores para detecção de fluorescência de R-PE quando há uma disponibilidade de fonte suficiente para compensar a perda de rendimento de absorção.

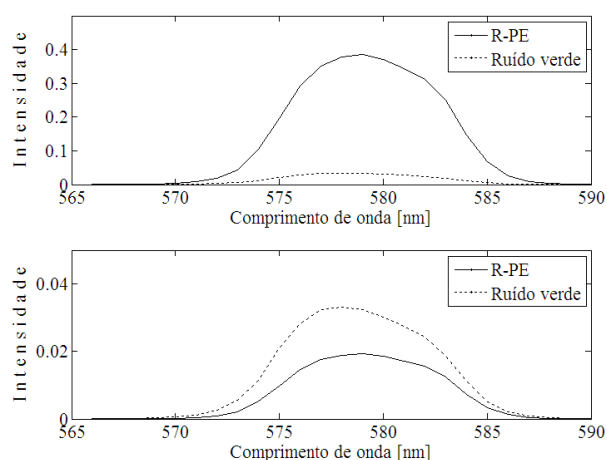


Figura 6: Gráfico que retrata a influência do ruído para diferentes diluições. A linha contínua representa a parcela de sinal referente à fluorescência da R-ficoeritrina, enquanto a linha pontilhada representa a quantidade de luminescência vinda do LED verde que atinge o detector. O gráfico inferior simula uma concentração 100 vezes menor que a do superior, demonstrando que a relação sinal-ruído é comprometida com o aumento da diluição.

Conclusão

Os resultados dos experimentos realizados mostram que, conforme Figura 4, a utilização de fontes de excitação que proporcionem uma maior faixa de Stokes pode trazer melhores resultados na detecção de fluorescência de R-ficoeritrina, quando comparadas às fontes que proporcionam maior rendimento de absorção.

Verificou-se que ao empregar o LED de emissão UV a variação é superior à apresentada no caso do verde, para todas as diferentes diluições. A causa principal para tais resultados é o fato de que a fonte verde apresenta uma faixa de comprimento de onda do seu espectro coincidente com a região de alta transmitância do filtro óptico. Assim, com a utilização de LED verde mais fótons oriundos da excitação atingem o sensor do que no caso do uso de LED UV, comprometendo a relação de sinal-ruído do sinal obtido ao final do processo de detecção.

Conforme exposto na Figura 1, para o caso da R-ficoeritrina o uso de fontes de excitação com comprimentos de onda mais afastados do comprimento de onda de emissão de fluorescência acarreta menores rendimentos, pois implica em faixas de menor capacidade de absorção do fluoróforo. Porém, havendo a disponibilidade de compensar a perda de rendimento por meio da utilização de maior potência nas fontes de excitação, incrementa-se a capacidade do sistema de detectar concentrações cada vez menores. Isso implica em diminuir a quantidade de fluoróforo necessária para o funcionamento do sistema de detecção de doenças via imunoenaios que se deseja elaborar, reduzindo custos – fator importante quando se trata de dispositivos para uso em saúde pública.

Uma importante ressalva a ser feita quanto aos valores apresentados é que os mesmos não são resultados definitivos para validação de uma hipótese, mas que sugerem a realização de novos experimentos com fontes de excitação de comprimentos de onda mais afastados da faixa de emissão de fluorescência da R-ficoeritrina. Portanto, os próximos passos a serem desenvolvidos na pesquisa envolvem a realização de novas medições utilizando LEDs com menores comprimentos de onda – com atenção especial a faixa de ultravioleta – preocupando-se com parâmetros como repetitividade, a fim de determinar com exatidão adequada qual a faixa mais indicada para a excitação de amostras contendo R-PE. Além disso, o uso de uma PMT para detecção contradiz o pressuposto de um sistema de baixo custo, portanto detectores de menor custo serão testados para compor o sistema de detecção final.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro fornecido pelo CNPQ e pelo Ministério da Educação (MEC).

Referências

- [1] Mabey, D., Peeling, R. W., Ustianowsk, A. (2004) “Diagnostics for the developing world”, In: *Nature*, v.2, p.231-40.
- [2] Madelay, C., Peiris, J. (2002) “Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited”, In: *Journal of Clinical Virology*, v.25, p.121-34.
- [3] Branco, G. (1997), *Novo instrumento para a monitorização de oxigênio gasoso através de fosforescência resolvida no tempo*, Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Curitiba.
- [4] *Phycobiliproteins*, Invitrogen Ltd.(2009), UK., Feb. Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp00800.pdf>. Acesso em 28 mai. 2012.
- [5] *Datasheet do LED LZ1-00UA00*, LED Engin., Inc. Disponível em: <http://www.ledengin.com/files/products/LZ1/LZ1-00UA00.pdf>. Acesso em 28 mai. 2012.
- [6] *Datasheet do LED LZ4-00G100*, LED Engin., Inc. Disponível em: <http://www.ledengin.com/files/products/LZ4/LZ4-00G100.pdf>. Acesso em 28 mai. 2012.
- [7] Mik, L., Stepien, J., Jastrzab, M., Kucewicz, W., Sapor, M. (2010) “System for low intensity fluorescence light measurement based on silicon photomultiplier”, In: *International Conference on Signal and Electronic Systems*, p.383-86.