



Micro-laboratório de fluidos biológicos

O sector da Saúde é hoje um dos mais dinâmicos e onde a capacidade de inovação é um imperativo estratégico e operacional. Neste artigo apresenta-se um micro-laboratório num chip para análise espectrofotométrica de fluidos biológicos. Permite, especificamente, a determinação selectiva da concentração de várias biomoléculas nesses fluidos, em tempo real, no próprio local, com baixas concentrações, com pequenos volumes de ensaio (dezenas de microlitros) e a baixo custo.

G. Minas, J. H. Correia*

O dispositivo possui um sistema de filtragem e detecção colorimétrica de elevada eficiência e sensibilidade. Este sistema possibilita a medição utilizando uma fonte de luz branca convencional como iluminação, evitando assim o uso de sistemas de análise complexos e economicamente dispendiosos como sistemas que incluem um espectrofotómetro, por exemplo. Esta característica torna o micro-laboratório portátil, assegura análises com resultados instantâneos e permite realizá-las em consultórios médicos no decorrer da consulta, na casa dos pacientes (permitindo o despiste da sua situação clínica) e nos próprios laboratórios de análises ou hospitalares.

O micro-laboratório fornece como resultado das medições um sinal digital com um formato adequado para aquisição num computador, ou, em alternativa, permite mostrar num *display* o valor medido. Sendo de pequenas dimensões, baixo consumo de energia, portátil e utilizando quantidades reduzidas de reagentes e de amostras apresenta, apesar de tudo, resultados com a mesma fiabilidade e precisão dos sistemas de análises de fluidos biológicos existentes, actualmente, nos laboratórios de análises clínicas. Os pacientes são os seus beneficiários directos, uma vez que a sua existência permite mais e melhor informação, novas e superiores formas de relacionamento e acompanhamento pelos prestadores dos cuidados de saúde. Estes vêem facilitado o diagnóstico, e passam a ter acesso instantaneamente a informação crítica para a sua actividade e tomada de decisões. Os ganhos associados à simples possibilidade de aceder à informação instantaneamente são evidentes: poupança de tempo na consulta médica, controlo de custos, tempos e tarefas, minimização de erros clínicos, aumento da fundamentação da decisão clínica e maximização da “disponibilidade clínica” dos prestadores dos cuidados de saúde.

Princípio de operação

A medida do valor da concentração de biomoléculas presentes nas amostras dos fluidos biológicos baseia-se na detecção colorimétrica por absorção óptica. A utilização do micro-laboratório (ver figura 1) requer que um feixe de luz branca seja direccionado para as câmaras de detecção nas quais se encontram as amostras a medir (mistura de um reagente com a amostra do fluido biológico). Esse feixe, com várias

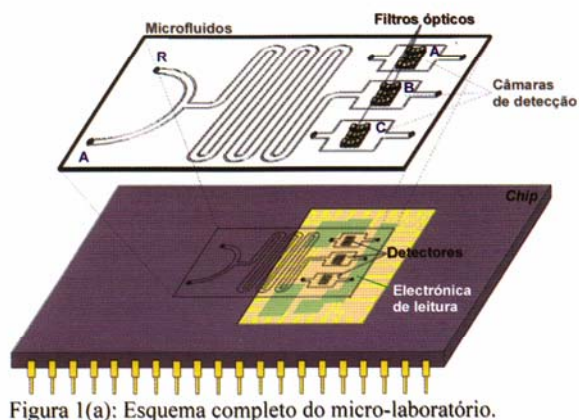


Figura 1(a): Esquema completo do micro-laboratório.

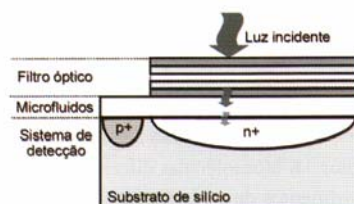


Figura 1(b): Esquema da estrutura do micro-laboratório, vista em corte.

componentes espectrais, é filtrado, através de filtros ópticos, obtendo-se uma banda muito estreita com apenas algumas componentes espectrais e centrada no comprimento de onda adequado à biomolécula que se pretende analisar. A intensidade da luz associada às diferentes componentes espectrais que atravessam a amostra é proporcional à concentração das biomoléculas em análise. É medida através de fotodetectores colocados por baixo dos microcanais e alinhados verticalmente com os filtros ópticos. Um conversor luz – frequência, integrado com os fotodetectores, converte o sinal analógico dos fotodetectores num sinal digital que possibilita a aquisição e processamento dos dados num computador.

Projecto e fabrico do micro-laboratório

O micro-laboratório combina num único chip os microcanais, os filtros ópticos, os detectores e a electrónica de leitura (ver figura 1). O microcanal principal tem 500 μm de largura, 70 μm de comprimento e 500 μm de profundidade. Tem duas entradas e uma saída para permitir a mistura do reagente (R) com a amostra (A) de uma forma automática. As câmaras de detecção têm 2 mm de largura, 3 mm de comprimento e 500 μm de profundidade. A profundidade é crucial para medições por absorção óptica. A câmara de detecção A contém o reagente e permite obter a linha de referência e calibrar a fonte de luz. A câmara de detecção B contém a mistura em análise. A câmara de detecção C é necessária

para calibrar a concentração da biomolécula a medir (com um padrão de concentração conhecida) e também para compensar as oscilações da fonte de luz. O formato dos microcanais é rectangular devido à reflexão da luz, uma vez que o processo de medição é por absorção óptica. São fabricados recorrendo a técnicas de SU-8. O photoresist SU-8 é um material fotossensível com boas propriedades mecânicas, boa resistência química e muito boa biocompatibilidade [1]. Permite ainda a construção de microcanais com uma rugosidade muito baixa, o que é extremamente vantajoso para medições por absorção óptica. O fabrico de microcanais em SU-8 é compatível com a fotolitografia ultravioleta dos semicondutores, com a vantagem de que não necessita de máscaras dispendiosas, uma transparência como as utilizadas no fabrico de circuitos impressos é suficiente. Em adição, o sistema de microfluidos pode ser descartável, evitando assim os custos associados à lavagem dos microcanais e evitando também a contaminação entre análises. Os filtros ópticos encontram-se sobre as câmaras de detecção (ver figura 1). São aí depositados, por técnicas de PVD (*Physical Vapor Deposition*), filmes finos de material dieléctrico, SiO_2 e TiO_2 , que formam filtros ópticos passa-banda. Estes filtros ópticos têm como função seleccionar o comprimento de onda, dentro do espectro electromagnético de luz visível, adequado à biomolécula que se pretende analisar. O uso de filtros ópticos no micro-laboratório permite que as medições sejam realizadas com uma fonte de luz convencional,

evitando assim as tradicionais e dispendiosas fontes de luz dependentes do comprimento de onda (por exemplo, fonte monocromática). Em vez de um único filtro, é implementada uma matriz de 16 filtros ópticos. Cada filtro tem uma área activa de $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ e é sensível a uma banda muito estreita de comprimentos de onda. O recurso a essa matriz permite analisar 16 biomoléculas diferentes, que varrem comprimentos de onda desde 480 nm a 600 nm em intervalos de 8 nm. Foram projectados para analisar as seguintes biomoléculas: 17 esteróides, cloro, ácido úrico, colesterol, glicose, magnésio, creatinina, ureia, hemoglobina, b-glucuronidase, bilirrubina, leucina aminopeptidase, cálcio, oxalato, proteína total e albumina. Contudo, outras biomoléculas com comprimentos de onda diferentes dos projectados podem ser analisadas. Basta, durante o processo de fabrico dos filtros ópticos, ajustar os tempos de deposição dos filmes finos sem afectar o layout do dispositivo [2].

Os detectores encontram-se por baixo das câmaras de detecção (ver figura 1). São fabricados segundo um processo de microelectrónica CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor). Medem a intensidade do feixe de luz transmitido através da mistura. A sua disposição é em matriz posicionada exactamente debaixo da matriz de filtros ópticos, e, o número de fotodetectores depende do número de filtros ópticos. Os fotodetectores são fotodíodos de junção com uma área activa de $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$. Foi integrado no mesmo processo de fabrico dos fotodetectores a sua electrónica de leitura. Consiste num conversor luz – frequência e num

“A intensidade da luz associada às diferentes componentes espectrais que atravessam a amostra é proporcional à concentração das biomoléculas em análise.”

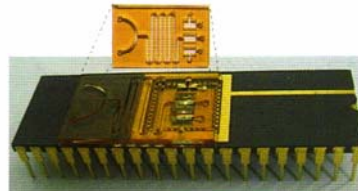


Figura 2: Fotografia do micro-laboratório.

barramento para interface com um computador [3]. A figura 2 mostra uma fotografia do micro-laboratório.

Resultados experimentais

Após ser verificado, utilizando equipamentos de medida convencionais, que a utilização de volumes de ensaio da ordem das dezenas de microlitros não influenciou a resposta do método de medida, e portanto não invalidará a utilização do micro-laboratório, a sua adequada operação é confirmada utilizando uma série de experiências que envolvem a medida quantitativa de ácido úrico e proteína total na urina. Contudo, outros fluidos biológicos podem ser utilizados, tais como o sangue, a saliva, o fluido cefalorraquidiano, etc. Nos testes foi utilizada uma lâmpada convencional de filamento incandescente como fonte de luz. A mistura completa e homogénea nos microcanais da urina com o reagente específico para a determinação quantitativa da biomolécula é obtida em cerca de 40s. A razão é de 50 de reagente para 1 de amostra, com um volume total de solução de $20\ \mu\text{l}$. A determinação quantitativa de ácido úrico e proteína total na urina foi testada para concentrações que compreendem a gama de valores normais e anormais na urina humana [4].

Na figura 3 e na figura 4 encontram-se as curvas de calibração obtidas. A tabela 1 apresenta os parâmetros do ajuste linear da curva de calibração. Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões: (1) com coeficientes de correlação acima de 0.980 o método produz resultados lineares dentro das gamas de concentrações descritas na tabela. Para concentrações superiores, a amostra deve ser diluída e reanalisada multiplicando o resultado pelo factor de diluição; (2) a intensidade da cor produzida pela mistura é

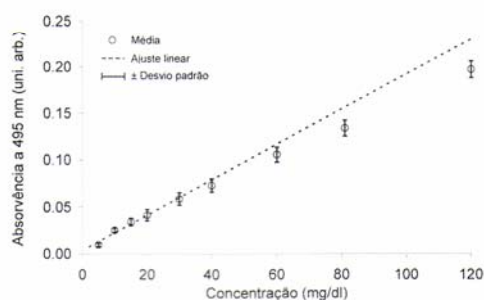


Figura 3: Absorvência em função da concentração de ácido úrico utilizando apenas uma luz branca como fonte de luz do micro-laboratório (média \pm desvio padrão, n = 10)

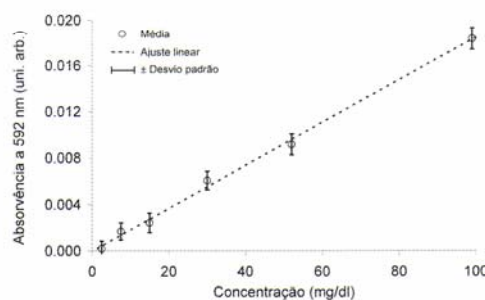


Figura 4: Absorvência em função da concentração de proteína total utilizando apenas uma luz branca como fonte de luz do micro-laboratório (média \pm desvio padrão, n = 10).

Tabela 1. Resultado do ajuste linear da curva de calibração medida no micro-laboratório quando iluminado com uma fonte de luz branca.

Gama de concentrações medidas (mg/dl)	$\lambda_{\text{máximo de absorvência}}$ (nm)	Gama de concentração linear (mg/dl)	Inclinação ((uni. arb.) dl/mg)	Intersecção (uni. arb.)	Coefficiente de correlação (R^2)
Úric acid (0-120)	495	0 – 30	$(1.9 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(3 \pm 2) \times 10^{-3}$	0.98016
Total protein (0-100)	592	0 – 100	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(-0.5 \pm 2) \times 10^{-4}$	0.99665

Nota: Os valores \pm representam \pm o desvio padrão.

directamente proporcional à concentração da biomolécula, uma vez que obedece à lei de Lambert-Beer; (3) o espectro de absorvência do ácido úrico e da proteína total apresentam um pico máximo a $\lambda = 495$ nm e $\lambda = 592$ nm, respectivamente; (4) os coeficientes de variação da repetitividade e reprodutibilidade para 10 medições e 10 ensaios diferentes são menores que 10%; (5) o limite mínimo de detecção do micro-laboratório é de aproximadamente 0.5 mg/dl e a sensibilidade obtida de 2 mg/dl, para ambas as análises. Os resultados confirmam a proporcionalidade directa entre a intensidade da cor produzida pela mistura e a concentração da biomolécula em análise, e, estão de acordo com os obtidos recorrendo a equipamentos de medida utilizados, actualmente, nos laboratórios de análises clínicas. Em conclusão, obteve-se o mesmo desempenho, precisão, fiabilidade e sensibilidade das análises realizadas actualmente nos laboratórios de análises clínicas. O micro-laboratório pode, por isso, ser

utilizado para a determinação da concentração de biomoléculas na urina.

No futuro, prevê-se o desenvolvimento de uma nova geração do micro-laboratório que integre um sistema para comunicações sem fios.

Para além da aplicação descrita, um micro-laboratório num chip encontra uma vasta área de aplicação para fluidos em geral, tais como: análises ambientais (qualidade do ar e água), teste a comida e identificação imediata de drogas. ☒

*Universidade do Minho, Dept. de Electrónica Industrial
gminas@dei.uminho.pt