

MONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA E TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA UTILIZANDO FIBRA ÓPTICA

M. S. Nogueira, C. P. D'Almeida, A. Cosci, S. Pratavieira e C. Kurachi

*Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo
Av. Trabalhador São-Carlense, 400 - Pq. Arnold Schimdt, São Carlos, Brasil
e-mail: marcelo.saito.nogueira@usp.br

Resumo: O objetivo deste estudo é montar e caracterizar um sistema de espectroscopia e tempo de vida de fluorescência para ser usado em aplicações de diagnóstico clínico. Para o sistema de tempo de vida de fluorescência, foi obtida uma função resposta de cerca de 250 ps. Também foi obtido o espectro e o tempo de vida de fluorescência de uma molécula fluorescente padrão (rodamina), para calibração do sistema. O tempo de vida médio da rodamina foi de $(4,1 \pm 0,3)$ ns, o que coincide com os tempos de vida de fluorescência encontrados na literatura e indica que o sistema está bem calibrado. Foram também medidos os tempos de vida de dois fotossensibilizadores em soluções aquosas em diversas concentrações: o Photogem e a Clorina e6, para referências futuras em medidas em tecidos biológicos. Os tempos de vida obtidos foram de $(11,0 \pm 0,3)$ ns e $(4,0 \pm 0,3)$ ns, respectivamente. O sistema mostrou-se robusto e será utilizado para medidas em lesões neoplásicas de pele.

Palavras-chave: Espectroscopia, fluorescência; tempo de vida.

Abstract: *The objective of this study is to assemble and characterize a spectroscopy and fluorescence lifetime system for clinical diagnostic purposes. An instrument response function of about 250 ps was obtained for the fluorescence lifetime system. In addition, the spectrum and fluorescence lifetime of a standard fluorescent molecule (rhodamine) for calibration of the system was measured. The average lifetime of rhodamine was (4.1 ± 0.3) ns, which matches with the fluorescence lifetimes of rhodamine in the literature and indicates that the system is well calibrated. It was also measured lifetimes of photosensitizers in aqueous solutions in two different concentrations: Photogem and Chlorin e6, for references for future measurements in biological tissue. The measured fluorescence lifetimes were (11.0 ± 0.3) ns and (4.0 ± 0.3) ns, respectively. The system was considered robust and will be used for measurements in neoplastic skin lesions.*

Keywords: *Spectroscopy, fluorescence; lifetime.*

Introdução

A análise do espectro de fluorescência e do tempo de vida de fluorescência em tecidos biológicos vem sendo apresentada como uma técnica com grande potencial

para a caracterização tecidual com finalidade diagnóstica, pois alterações bioquímicas podem modificar a fluorescência emitida pelo tecido. [1,2,3] Existem várias moléculas fluorescentes (fluoróforos) presentes tanto no interior das células quanto na matriz extracelular. Os principais fluoróforos são o NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e o FAD (flavina adenina dinucleotídeo), biomoléculas que, ao serem monitoradas, podem fornecer informações sobre o metabolismo da célula uma vez que estão envolvidas na respiração celular [1,3]. Tanto o NADH quanto o FAD apresentam dois tempos de vida médios diferentes, dependendo de seus estados ligados ou livres. No caso do NADH, o tempo de vida rápido pode ser associado à sua forma livre e o tempo lento à sua forma ligada. Um pensamento similar pode ser feito para o FAD. Os tempos de vida médios dos NADH e FAD livres e ligados mudam de acordo com alterações metabólicas dos tecidos, possibilitando uma investigação clínica não invasiva de lesões, complementando as informações obtidas por espectroscopia de fluorescência. [3] Para monitorar os tempos de vida de fluorescência desses fluoróforos é necessário que o sistema tenha resolução temporal suficiente para medir o tempo de vida mais curto dentre as formas livres e ligadas de ambos e que a excitação seja feita em comprimentos de onda próximos do máximo de absorção pelos fluoróforos (340 nm para o NADH e 450 nm para o FAD).

O principal objetivo deste trabalho é a montagem e caracterização de um sistema de espectroscopia e tempo de vida de fluorescência utilizando fibras ópticas, com base na sua resolução temporal e tempo de vida médio medido para a rodamina, para que possa ser utilizado na avaliação de tecidos biológicos e alterações metabólicas presentes nestes.

Material e métodos

Sistema de Espectroscopia e Tempo de vida de Fluorescência – O sistema de fluorescência resolvida no tempo utiliza dois lasers: um emitindo em 378 nm e outro em 445 nm (BDL-375-SMC e BDL-445-SMC, Becker and Hickl, Berlin, Alemanha), que são usados como fontes de luz para excitação principalmente do NADH e FAD, respectivamente. Os lasers têm taxa de repetição de 20, 50 ou 80 MHz e largura do pulso na ordem de 50 a 100 ps, sendo o tempo de vida médio das moléculas teciduais na ordem de 200-5000 ps. A luz é

conduzida ao tecido e ao fotodetector por meio de uma fibra óptica bifurcada Tipo – Y (Ocean Optics, Dunedin, Flórida, EUA), com uma fibra para entrega da luz de excitação e outra para a coleta da luz reemitida pelo tecido. Um filtro para bloquear a luz do laser é colocado em um suporte posicionado antes do detector. O fotodetector utilizado foi uma fotomultiplicadora híbrida (HPM-100-50, Becker and Hickl, Berlin, Alemanha) praticamente livre do efeito de *after-pulsing*, que pode interferir com as medidas de tempo de vida. A técnica de medida de tempo de vida médio empregada é a correlação temporal na contagem de fóton único (TCSPC, do inglês *Time Correlated Single Photon Counting*). Para a espectroscopia de fluorescência, foram utilizados os mesmos lasers emitindo em 378 nm e 445 nm, além de um laser que emite em 405 nm (Eagle VIO 50mW 405nm, Quantum Tech, São Carlos, Brasil). O espectro de fluorescência é coletado por meio de um espectrômetro portátil Ocean Optics USB2000-FLG (Ocean Optics, Dunedin, Flórida, EUA). A figura 1 mostra um desenho esquemático do setup experimental montado.

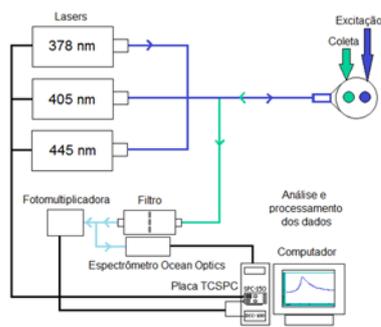


Figura 1: Desenho esquemático dos componentes para a coleta dos espectros e do tempo de vida de fluorescência.

Caracterização do sistema de tempo de vida de fluorescência - As medidas da largura temporal do pulso, ou seja, a função resposta de um detector (ou IRF do inglês *Instrument Response Function*) e do tempo de vida de uma molécula padrão como a rodamina são importantes para saber a resolução temporal do sistema e se este está bem calibrado. Para obter o alargamento temporal devido à utilização de fibras multimodos, a largura temporal do pulso do laser foi medida depois dele percorrer toda a fibra de excitação e a de coleta, sendo incidido em um meio espalhador (solução 0,5% de Lipofundin (Laboratórios B. Braun S.A., Rio de Janeiro, Brasil) em água destilada). Para manter a fibra limpa, foi utilizado um filme de PVC. A solução de rodamina 6G (Sigma Aldrich) 25 µg/ml utilizada para a calibração do sistema foi caracterizada a partir de seu espectro de absorção e espectro de fluorescência utilizando um filtro passa alta 475 nm e excitações em 378 nm e 445 nm. O sistema foi então calibrado comparando-se o tempo de vida médio medido com o encontrado na literatura para a rodamina.

Caracterização de fotossensibilizadores – Foram preparadas soluções aquosas de dois fotossensibilizadores: o Photogem (Photogem, Moscou, Rússia) e a Clorina e6 (Sigma Aldrich) em diversas concentrações. As soluções também foram caracterizadas pelo espectro de absorção e fluorescência com excitação em 378 e 405 nm. O tempo de vida médio de fluorescência foi medido com a excitação em 378 nm.

Processamento dos dados - Cada perfil de decaimento adquirido foi processado através do programa SPCImage (Becker and Hickl, Berlin, Alemanha). Tanto na excitação em 378 nm quanto em 445nm, a curva de decaimento da fluorescência foi aproximada por uma monoexponencial. Então, as médias dos tempos de vida médio τ foram comparadas considerando o desvio padrão entre as medidas.

Resultados

Alargamento temporal dos pulsos - Com a medida da largura temporal do pulso, obteve-se a função resposta do detector ou IRF. A figura 2 representa a largura dos pulsos dos lasers em 378 nm e 445 nm depois de terem percorrido as fibras de coleta e excitação.

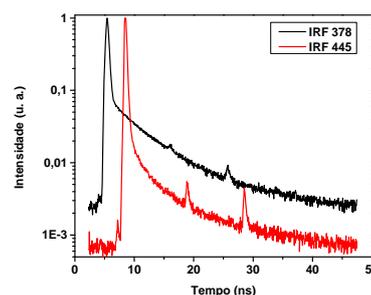


Figura 2: Curvas de IRF obtidas para os lasers de 378 nm e 445 nm. O decaimento é muito mais rápido que o de moléculas presentes em tecidos biológicos.

Calibração do sistema – Os espectros de absorção e fluorescência para a rodamina mostram que a solução está bem padronizada. O tempo de vida médio obtido para a rodamina foi de $(4,1 \pm 0,3)$ ns. Na literatura, encontra-se que o tempo de vida médio da rodamina diluída em água é de, aproximadamente, 4,1 ns[4,5,6,7].

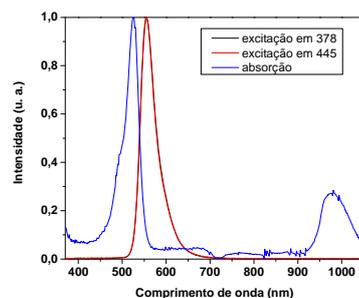


Figura 3: Espectros de absorção e de fluorescência da rodamina com excitação em 378 nm e 445 nm.

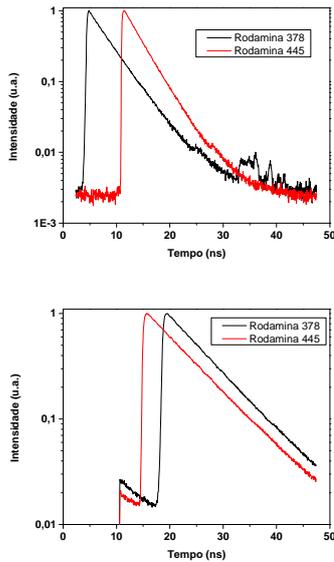


Figura 4: Curvas de decaimento para a rodamina, obtidas com as excitações em 378 nm e 445 nm e taxas de repetição 20 MHz (acima) e 50 MHz (abaixo).

Variações do tempo de vida com o ganho do laser

- Os tempos de vida da rodamina 6G foram medidos com diferentes ganhos do laser, de modo que a taxa de fótons fosse mantida na ordem de 10^5 fótons/s. Com a taxa mantida nessa ordem, o ruído na curva de decaimento temporal da fluorescência se mantém consideravelmente menor, diminuindo também possíveis erros no ajuste exponencial da curva de decaimento, como se observa na diminuição do desvio padrão com taxas mais elevadas que não saturam a contagem de fótons pelo detector.

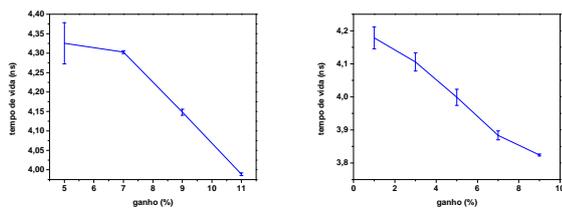


Figura 5: Variação do tempo de vida com excitação da rodamina em 378 nm e taxa de repetição 20 MHz (à esquerda) e 50 MHz (à direita).

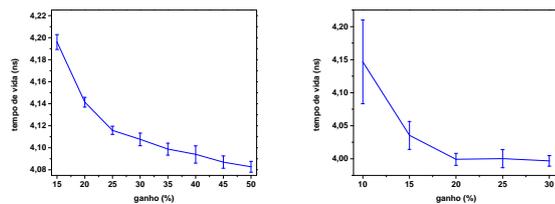


Figura 6: Variação do tempo de vida com excitação da rodamina em 445 nm e taxa de repetição 20 MHz (à esquerda) e 50 MHz (à direita).

Soluções de Photogem e Clorina e6 – Os espectros de absorção e de fluorescência medidos são típicos de soluções aquosas de Photogem e Clorina e6. Os tempos de vida obtidos para as soluções de Photogem foram de $(11,0 \pm 0,3)$ ns e $(4,0 \pm 0,3)$ ns, respectivamente.

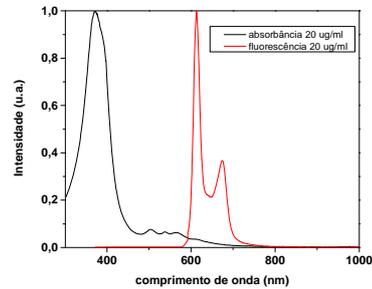


Figura 7: Espectro de absorção e fluorescência para a solução de Photogem (20 µg/ml). Observa-se a banda de Soret e as bandas Q de absorção típicas do Photogem.

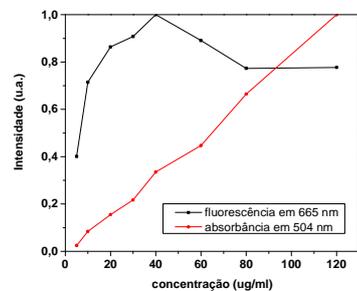


Figura 8: Intensidade de absorção em 504 nm e fluorescência em 665 nm para diversas concentrações de Photogem.

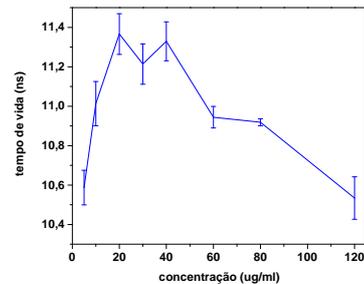


Figura 9: Tempo de vida de fluorescência para diversas concentrações de Photogem. Observa-se uma correlação entre as intensidades e o tempo de vida de fluorescência.

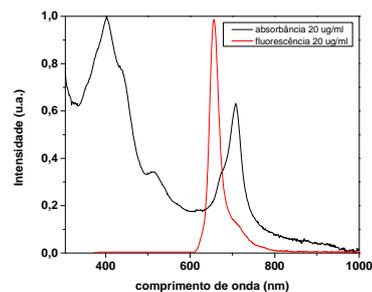


Figura 10: Espectro de absorção e fluorescência para a solução de Clorina e6 (20 µg/ml).

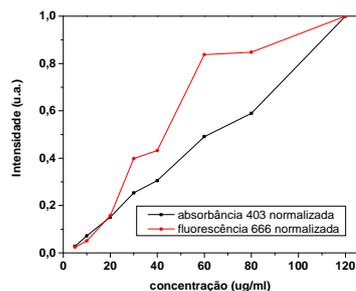


Figura 11: Intensidade de absorção em 403 nm e fluorescência em 660 nm para diversas concentrações de Clorina e6.

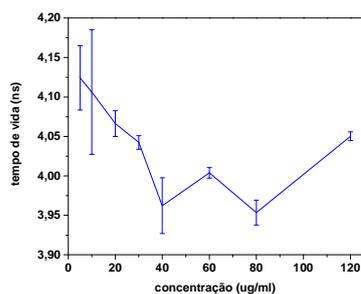


Figura 12: Tempo de vida de fluorescência para diversas concentrações de Clorina e6. O tempo de vida de fluorescência tem um comportamento diferente em relação às intensidades de fluorescência.

Discussão

A IRF medida mostrou que a largura temporal do pulso laser é de cerca de 250 ps. Nesse caso, a resolução temporal é acima de 250 ps, o que implica que é possível medir o tempo de vida médio da grande maioria das moléculas presentes em tecidos biológicos (200-5000 ps). Em particular, a resolução temporal permite distinguir o tempo de vida mais curto entre os fluoróforos a serem futuramente monitorados em tecidos biológicos (NADH e FAD), que pode chegar a 300 e 400 ps.

O tempo de vida da rodamina foi de $(4,1 \pm 0,3)$ ns, o que indica que o sistema está devidamente calibrado em relação a outros sistemas para determinação do tempo de vida de fluorescência, não havendo perda de resolução para tempos de vida longos.

Tanto o desvio padrão quanto as variações nos tempos de vida medidos em função do ganho são minimizados para ganhos maiores que não saturam o detector e mantêm a taxa de fótons em 10^5 fótons/s.

A intensidade de fluorescência do Photogem cresce até a concentração de 40 µg/ml, decai logo em seguida e se mantém constante para concentrações acima de 80 µg/ml. O tempo de vida tem o mesmo comportamento, mas continua decaindo, mesmo para altas concentrações. Já para a Clorina e6, apesar da absorbância e fluorescência crescerem com o aumento da concentração, o tempo de vida decai e tende a oscilar para concentrações mais altas.

Conclusão

O sistema de tempo de vida foi calibrado, obtendo-se um tempo de vida de $(4,1 \pm 0,3)$ ns para a rodamina, que coincide ao descrito na literatura.

A IRF foi determinada (250 ps), mostrando que o sistema pode medir o tempo de vida de grande parte moléculas em tecidos biológicos, incluindo as moléculas de NADH e FAD, monitoradas pelos bons resultados de diagnóstico encontrados na literatura [1,2,3].

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte proporcionado pelas agências de fomento brasileiras Capes, CNPq (INOF – INCT: 573587/2008-6) e aos financiamentos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: 2013/07276-1 (CEPOF).

Referências

- [1] Skala MC, Riching KM, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, White JG, and Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(49):19494–19499.
- [2] Vishwasrao HD, Heikal AA, Kasischke KA, Webb WW. Conformational Dependence of Intracellular NADH on Metabolic State Revealed by Associated Fluorescence Anisotropy. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(26):25119–25126.
- [3] Pires L, Nogueira MS, Pratavieira S, Moriyama LT, Kurachi C. Time-resolved fluorescence lifetime for cutaneous melanoma detection. *Biomedical Optics Express*. 2014; 5(9): 3080–3089.
- [4] Hanley QS, Subramaniam V, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Fluorescence Lifetime Imaging: Multi-point Calibration, Minimum Resolvable Differences, and Artifact Suppression. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. 2001; 43(4): 248–260.
- [5] Harris JM, Lytle FE. Measurement of subnanosecond fluorescence decays by sampled single-photon detection. *Review of Scientific Instruments*. 1977; 48:1469–1476.
- [6] Magde D, Rojas GE, Seybold PG. Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. *Photochemistry and Photobiology*. 1999; 70: 737–744.
- [7] Lakowicz JR, Berndt KW. Lifetime-selective fluorescence imaging using an RF phase-sensitive camera. *Review of Scientific Instruments* 1991; 62:1727– 1734.