

Sistema de espectroscopia e tempo de vida de fluorescência para diagnóstico clínico

Marcelo S. Nogueira^{1*}, Camila P. D'Almeida², Sebastião Pratavieira³, Cristina Kurachi⁴

1. Mestrando do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – IFSC/USP; *marcelo.saito.nogueira@usp.br
2. Estudante de Iniciação Científica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – IFSC/USP;
3. Pós-Doutorando do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – IFSC/USP;
4. Professora doutora e pesquisadora do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – IFSC/USP, São Carlos/SP

Palavras Chave: *Espectroscopia, tempo de vida, fluorescência.*

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. [1,2,3] 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 estados ligados ou livres, cada um com tempos de vida médios diferentes. O monitoramento desses tempos possibilita uma investigação clínica não invasiva de lesões e complementa as informações obtidas por espectroscopia de fluorescência. [3] Para isso, 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 fluoróforos.

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.

Resultados e Discussão

Alargamento temporal dos pulsos: A função resposta do detector ou IRF (do inglês, *Instrument Response Function*) foi medida incidindo-se os pulsos dos lasers de 378 nm e 445 nm em meio espalhador (figura 1).

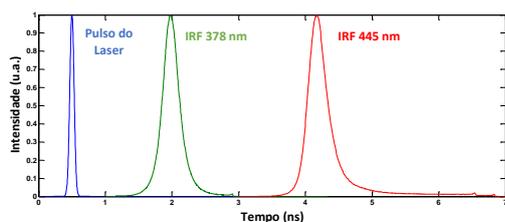


Figura 1. Curvas de IRF obtidas para os lasers de 378 nm e 445 nm em comparação ao pulso do laser.

Calibração do sistema: Para calibrar o sistema utilizamos Rodamina 6G como molécula padrão (espectros de absorção e fluorescência apresentados na figura 2).

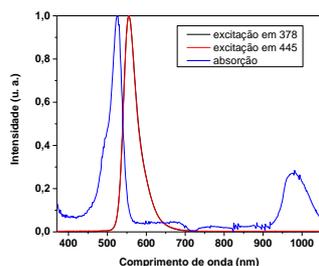


Figura 2. Espectros de absorção e de fluorescência da rodamina com excitação em 378 nm e 445 nm.

Na figura 3, apresentamos as curvas de decaimento da fluorescência obtidas. O tempo de vida de fluorescência obtido foi de $(4,1 \pm 0,3)$ ns.

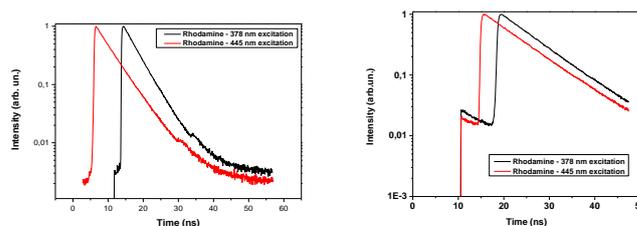


Figura 3. Curvas de decaimento para a rodamina, obtidas com as excitações em 378 nm e 445 nm e taxas de repetição 20 MHz (acima) e 50 MHz (abaixo).

Conclusões

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 [4,5].

A IRF foi determinada (300 ps), mostrando que o sistema pode medir o tempo de vida de grande parte moléculas em tecidos biológicos (200 a 5000 ps), incluindo as moléculas de NADH e FAD, monitoradas pelos bons resultados de diagnóstico descritos na literatura [1,2,3].

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte proporcionado pelas agências de fomento brasileiras Capes, CNPq (Universal 475322/2011-8, INCT/INOF 573587/2008-6) e aos financiamentos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: 2013/07276-1 (CEPOF), 2014/16154-0, 2013/26205-8.

[1] Skala MC, Ricking 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): 248–260.9

[5] Magde D, Rojas GE, Seybold PG. Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. *Photochemistry and Photobiology*. 1999; 70: 737–744.