

"MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO
PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR".

Refere-se o presente relatório a uma patente de invenção para um microfluorímetro simplificado, especialmente desenvolvido para servir como equipamento para o estudo de cálcio intracelular.

A prática necessária para a medição da concentração de cálcio intracelular, compreende colocar dentro da célula um indicador fluorescente, tal como uma substância fluorescente que tem seu espectro de emissão ou excitação modificado quando se liga ao cálcio.

Ao se medir a variação da luz emitida por este indicador pode-se então estimar a variação da concentração de cálcio que houve dentro da célula.

Um indicador que tem sido bastante utilizado é o Indo-1. Este indicador tem a propriedade de, ao ser excitado com luz ultra-violeta ($\lambda \sim 350\text{nm}$), emitir luz verde (máximo em $\lambda \sim 500\text{nm}$) quando está em sua forma livre, e luz azul (máximo em $\lambda \sim 400\text{nm}$) quando está ligado ao cálcio.

Medindo-se as intensidades de luz nestes dois comprimentos de onda e fazendo-se a razão podemos obter a concentração de cálcio intracelular usando a fórmula:

$[Ca] = K_d \beta \{(R-R_0)/(R_{sat})\}$, onde:

- $R = I_{400}/I_{500}$ é a razão entre as duas intensidades medidas;

- K_d é a constante de dissociação da reação $\text{Indo-1} + \text{Ca} = \text{com-}$

plexo (Ca Indol):

- β , R_0 e R_{sat} são parâmetros de calibração

Os poucos microfluorímetros atualmente existentes no mercado são equipamentos montados em torno de microscópios invertidos e utilizam a óptica destes microscópios para fazer as três funções: excitação, monitoração e detecção.

A luz de excitação é normalmente fornecida por lâmpadas de arco e filtrada por monocromador. Está luz é guiada por fibra óptica até o interior do microscópio invertido e focalizada sobre a amostra pela objetiva.

A luz emitida pela amostra é captada também pela objetiva e guiada por componentes ópticos até dois fotosensores, um com um filtro verde e outro azul.

Circuitos eletrônicos então transformam os sinais luminosos em elétricos e estes então são enviados a uma placa de conversão analógico/digital, sendo os sinais processados então em um computador.

Uma grande desvantagem dos microfluorímetros atuais é a obrigatoriedade de se trabalhar em torno de um microscópio invertido, os quais são caros e muito delicados, além de ocuparem muito espaço.

Outra desvantagem é o uso de lâmpadas de arco, que além de exigirem uma fonte de alimentação especial, produzem forte ruído eletromagnético quando ligadas e desligadas. Este ruído perturba equipamentos que

estão próximos a ela, como por exemplo computadores, e pode até mesmo provocar a queima de componentes eletrônicos.

Em face do exposto, foi desenvolvido o presente microfluorímetro simplificado, que será

5. pormenorizadamente descrito com referência aos desenhos abaixo relacionados, nos quais:

10. a figura 1 ilustra uma vista em corte e esquemática do presente equipamento, notadamente no que se refere ao seu sub-sistema de óptica de excitação;

a figura 2 ilustra esquematicamente uma vista em corte e esquemática do presente equipamento notadamente no que se refere ao seu sub-sistema de óptica de monitoração;

15. a figura 3 ilustra uma vista esquemática e em corte do presente equipamento, notadamente no que se refere ao seu sub-sistema de óptica de detecção;

20. a figura 4 ilustra esquematicamente e em corte, uma vista global do presente equipamento, compreendendo os seus três sub-sistemas, ou seja, óptica de excitação; óptica de monitoração e óptica de detecção;

25. a figura 5 ilustra um componente que integra a parte eletrônica do presente equipamento, ou seja, uma PMT tipo "side-on", dita vista integra uma seta A, que indica a área fotosensível do referido componente;

- a figura 5a ilustra uma vista esquemática de um fotocátodo de reflexão;
- a figura 6 ilustra uma vista do esquema de alimentação de uma PMT;
5. a figura 7 ilustra uma vista de um esquema de um conversor de corrente/tensão;
- a figura 8 ilustra um esquema elétrico de toda a eletrônica associada às PMT's;
- a figura 9 ilustra um diagrama de blocos do circuito divisor de sinais;
10. a figura 10 ilustra um circuito logarítmico do presente equipamento;
- a figura 11 ilustra um diagrama do circuito antilog- do presente equipamento;

15. De conformidade com o quanto ilustram as figuras acima relacionadas, o microfluorímetro objeto desta patente de invenção, caracteriza-se pelo fato de compreender um sistema óptico, que para facilitar o entendimento da construtividade proposta, será dividido em
20. três partes.

- Optica de Excitação - primeira das três partes do sistema óptico da patente em questão, este sub-sistema tem por função iluminar a amostra com a maior quantidade possível de luz de $\lambda \sim 350\text{nm}$. Sendo que
25. para este item é utilizada uma lâmpada do tipo empregado em farol de automóvel (Halon-Tungstênio), a qual trabalha a 70 Watts, produzindo $\sim 2.0\text{W}$ de luz com λ entre 350 e 370nm.

Da utilização deste tipo de

lâmpada decorrem vantagens com relação às outras, que são:

- custo ~ 20 vezes menor;
- é menos delicada;
- tem alimentação contínua, não produzindo ruído na eletrônica;
- 5. - facilidade de compra.

Como o tipo de lâmpada mencionado tem um área luminosa extensa, da ordem de $1 \times 5 \text{ nm}$, necessitou-se projetar um sistema óptico com diversos componentes para que se tivesse uma intensidade de luz suficiente para excitar as amostras.

Os principais requisitos que se tentou satisfazer foram:

- distância entre o último elemento iluminador e a amostra
- 15. de ~ 200 mm;
- facilidade de colocar e retirar o filtro de interferência do eixo óptico de modo a que se pudesse iluminar o campo com luz branca;
- sistema de resfriamento e ventilação para eliminar o calor e dissipar o ozônio gerado pela luz ultra-violeta;
- 20. - capacidade de obstruir toda a luz, através de um obturador (shutter).

A óptica de excitação, é mostrada na figura 1. A lâmpada 1 tungstênio-halogêneo se mostra dentro de uma caixa de acondicionamento, feita de alumínio com uma tampa traseira 7, com espaçamento para passagem de ar.

Por um pequeno tubo 8, à fren-

te da lâmpada 1 é admitido ar comprimido para refrigeração do sistema e dissipação do ozônio. Separando a caixa do restante do sistema, é provido um disco de nylon que funciona como isolante térmico.

5. Na referida figura 1, pode ser observado que o presente fluorímetro compreende um dubleto condensador 3 e um filtro calórico 3, bem como um espelho dicróico 9, alinhado por um lado com uma lente 4 e seu filtro de interferência 5 ($\lambda = 365\text{nm}$ em suporte removível),
10. através de um obturador (shutter) 6, e por outro lado, com uma objetiva 12 com ampliação de 40x, passível de ser movimentada por um dispositivo para esta finalidade, indicado pela referência numérica 10, dita objetiva encontra-se em um estágio de microscópio 11, sobre o qual está o porta
15. amostras 13.

Um dos componentes do presente fluorímetro, compreende um condensador formado por um dubleto de lentes com distância focal de 32mm e diâmetro de 24mm, espaçadas por 13mm.

20. A função do condensador é formar uma imagem reduzida do filamento, que posteriormente será levada até a objetiva.

- Para um dubleto com lentes iguais de distância focal f e espaçamento de lentes d tem-se
25. que a magnificação M e a distância da imagem à segunda lente " s' " estão relacionados à distância do objeto à primeira lente " s ", por:

$$s' = [d(s-f)-sf]f/(d-f)(s-f)-sf$$

$$M = f^2/(d-f)(s-f)-sf$$

- A distância entre o filamento e a primeira lente é de 64mm o que determina $M = -0.38$ e
5. " s' " = 19.6. O sinal negativo de M indica simplesmente que a imagem é formada invertida, fato não relevante.

- Acoplado ao condensador tem-se um tubo longo onde está posicionada a lente de $f = 90\text{mm}$ e diâmetro de 42mm. Esta lente tem como função coletar a luz
10. da imagem do filamento formada pelo condensador (novo objetivo) e formar uma nova imagem na região da objetiva.

As relações entre a magnificação M , a distância da imagem " s' " e a distância do objeto " s " para uma lente simples são dadas por:

15. $s' = sf/(s-f)$

$$M = f/(f-s)$$

- O objetivo, como foi dito acima é iluminar a amostra com a maior quantidade de luz possível. Pretende-se no entanto, uma iluminação uniforme, ou
20. seja, não deve-se formar a imagem do filamento no campo.

- Projeta-se o sistema baseado em observações feitas em microscópios de fluorescência comerciais, onde a imagem do filamento é formada no lugar onde
25. de a amostra é colocada mas sem a presença da objetiva.

Para viabilizar um relativo ajuste, determinou-se que o tubo que suporta a lente pudesse se movimentar dentro do condensador ($\pm 10\text{mm}$) de modo a

aumentar ou diminuir "s", variando também "s'".

Na posição central, "s" = 120mm
o que determina "s'" = 360mm e M = -3.

Após a lente tem-se o suporte
5. do filtro de excitação. Este filtro tem a função de reduzir a banda passante de luz que vai à amostra para uma faixa de 20nm em torno de 355nm. A peça em questão foi projetada de modo a permitir a fácil retirada do filtro do eixo óptico da montagem, aumentando significativamente a luz que
10. chega à amostra, operação útil no alinhamento do sistema.

Na seqüência, tem-se o obturador manual que intercepta completamente o feixe de luz e uma íris, também manual, que permite controlar a quantidade
15. de luz de excitação. Tem-se então uma peça que acopla a íris ao cubo do espelho dicróico.

O espelho dicróico é um componente que, sendo posicionado a 45 graus de inclinação, com relação ao eixo óptico, funciona como espelho para luz com
20. $\lambda < \lambda_c$ e como uma janela para $\lambda > \lambda_c$. Assim, como um dicróico com $\lambda_c = 390\text{nm}$ pode-se refletir a luz de excitação da lâmpada à mostra e simultaneamente transmitir a luz de emissão da amostra aos detectores.

Para facilitar o alinhamento
25. do dicróico este foi posicionado sobre um dispositivo ajustável com relação a dois ângulos.

Acima do cubo do dicróico tem-se um tubo que chega até dentro do dispositivo manipulador

da objetiva mas que não toca neste, evitando o acoplamento mecânico e a transmissão de vibrações da estrutura da bancada até o granito.

5. O espectro de luz que efetivamente chega até à objetiva é dado pela multiplicação do espectro da lâmpada pelos espectros de transmitância do calorico e do filtro de emissão e do espectro de reflexão do espelho dicróico.

10. Optica de Monitoração - segunda parte do sistema óptico da patente proposta. Para que a amostra seja selecionada, posicionada e posteriormente monitorada, deve-se fazer com que sua imagem, formada pela objetiva chegue a uma câmara de televisão.

15. Como a emissão de fluorescência de amostras biológicas tem baixa intensidade é usual iluminar a célula com luz de outro comprimento de onda e separar esta luz da luz da emissão em algum ponto próximo à câmara.

20. Na presente patente, ilumina-se a célula com um LED de alta luminosidade (75 mW em 660nm), colocado acima do estágio. O referido LED, alimentado por uma bateria de 9 Volts, é montado em um suporte móvel e tem sua luz condensada e focalizada por uma lente, podendo a intensidade desta luz ser ainda controlada por um potenciômetro.
25.

A posição e tamanho da imagem formada por uma objetiva depende de características como distância focal (f), e magnificação (M), mas podem ser

alteradas pela distância de trabalho (d.t.). Isto permite obter diferentes campos de visão com a mesma objetiva, modificando-se a d.t. e as outras distâncias ópticas envolvidas. Esta possibilidade é especialmente vantajosa

5. pois permite trabalhar com amostras de tamanhos diferentes usando a mesma objetiva. A opção por fazer um sistema mais versátil que os comerciais trouxe algumas dificuldades no projeto óptico, que é demonstrado na figura 2.

10. Basicamente a monitoração é feita mediante o ajuste da d.t. da objetiva, fazendo com que a imagem da amostra iluminada com a luz do LED seja formada a aproximadamente 300mm do porta amostras, no plano onde se encontra as fendas ajustáveis. Estas fendas tem a

15. abertura máxima de 12mm, podendo ser controladas manualmente formando campos quadrados ou retangulares até que seja totalmente obstruído o feixe, sendo importante que a imagem seja formada no plano das fendas para que seja possível limpar a imagem obtida bloqueando a luz que vem de

20. outras células, da câmara de perfusão e da solução.

Na figura 2 é possível observar itens como o espelho dicróico $\lambda = 385\text{nm}$; dispositivo para movimentação 10 da objetiva; estágio de microscópio 11; objetiva 12 de 40x; porta amostras 13; chave liga desliga

25. 14; potenciômetro 15; LED com lente focalizadora 16; fendas ajustáveis 17; lente convergente 18; espelho refletor de vermelho RRM 19; câmara de TV tipo CCD 20.

Assim sendo, com as fendas to-

talmente abertas o campo de visão é, nesta posição, de aproximadamente $150\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$. Este tipo de campo é suficiente para que se possa enxergar integralmente a grande maioria das células cardíacas de ratos.

5. A imagem formada pela objetiva é então usada como objeto para uma outra lente colocada abaixo das fendas. Esta forma sua imagem sobre o sensor de uma câmara tipo CCD de $1/3''$ (área sensível de $4,2 \times 3,1\text{mm}$). o campo visto no monitor de vídeo é:

10. campo de visão = dimensões do sensor / magnificação total

- Entre a lente e o sensor tem-se um espelho refletor de vermelho (RRM) que, além de refletir mais de 99% da luz com $\lambda \sim 660\text{nm}$, transmite na média 75% da luz na faixa entre 400 e 420 nm e 85% da luz na faixa entre 480 e 500nm possibilitando assim que a fluorescência chegue aos detectores sem grande atenuação.

15. Para que se obtenha uma magnificação maior, ou seja, diminua o campo de visão, procede-se da seguinte forma: aproxima-se a objetiva da amostra, fazendo-se com que a sua imagem se forme a uma distância maior que 300nm . Rosqueando o tubo que se encontra acima das fendas aumenta-se a distância entre a fenda e a objetiva de modo que a imagem continue sendo formada no plano daquelas. Rosqueando-se o tubo que se encontra abaixo das fendas diminui-se a distância entre esta e a lente, aumentando-se ainda mais a magnificação. Finalmente desloca-se a câmara CCD para trás conseguindo-se assim uma imagem focada.

Optica de Detecção - A função

deste sub-sistema é coletar a luz emitida pelo indicador fluorescente que se encontra dentro da amostra e levá-la, com a menor perda possível até os fotosensores. Boa parte dos componentes ópticos utilizados para tal são também utilizados na parte de monitoração, assim, estando-se obrigados a trabalhar com a imagem formada nas fendas. A figura 3 mostra esquematicamente como a luz de emissão é dirigida até os fotosensores.

10. A imagem formada pela objetiva no plano das fendas é composta por luz vermelha, vinda do LED, e luz na faixa entre 400 e 500nm, emitida pelo indicador fluorescente que se encontra dentro da célula. O RRM separa estas duas faixas refletindo $\lambda = 660\text{nm}$ para a câmera CCD e transmitindo a luz de 400 e 500nm.

Na figura 3, podem ser observados itens como: fendas ajustáveis 17; lente convergente 18; espelho refletor de vermelho RRM 19; câmera de TV tipo CCD 20; espelho dicróico $\lambda = 445\text{nm}$; fotosensor 22 com filtro $\lambda = 405$; e fotosensor 23 com filtro $\lambda = 485$.

Para que se possa utilizar o método da razão a luz de emissão deve ser dividida de modo a que se registre o sinal em dois comprimentos de onda diferentes. Isto é conseguido com o espelho dicróico $\lambda = 450\text{nm}$, que tem reflexividade em torno de 95% para luz na faixa entre 380 e 430nm e transmitância média de 70% entre 475 e 500nm. Na entrada de cada fotosensor tem-se um filtro para minimizar sinais espúrios e estreitar a banda passante. No

fotosensor que recebe o sinal transmitido pelo dicróico 450nm tem-se um filtro de interferência com $\lambda = 495 \pm 10 \text{nm}$. No outro, o filtro, também de interferência, tem $\lambda = 410 \pm 20 \text{nm}$.

- Na figura 4, é ilustrada uma
5. vista global do presente equipamento, integrando os três sub-sistemas já descritos.

- Na referida figura 4, podem ser observados itens como: lâmpada 1; filtro calórico 2; dubleto condensador 3; lente 4; filtro de interferência 5
5. $\lambda = 365 \text{nm}$ em suporte removível; obturador e íris manual 6; tampa traseira 7 com espaçamento para a passagem de ar; entrada de ar 8; espelho dicróico 9 $\lambda = 385 \text{nm}$; dispositivo para movimentação 10 da objetiva; estágio de microscópio 11; objetiva 12 de 40X; porta amostra 13; chave liga-desliga 14; potenciômetro 15; LED 16 com lente focalizadora; fendas ajustáveis 17; lente convergente 18; espelho refletor de vermelho 19; câmera de TV tipo CCD 20; espelho dicróico $\lambda = 445 \text{nm}$; fotosensor 22 com filtro $\lambda = 405$; fotosensor 23 com filtro $\lambda = 485$.

15. O presente equipamento, compreende ainda a sua parte eletrônica, que será dividida em seis itens, para facilitar assim a sua descrição.

- Fotosensores - Dentre os possíveis dispositivos fotosensíveis existentes, optou-se por
20. trabalhar com fotomultiplicadoras (PMT's), por serem tradicionalmente as mais empregadas na área de microscopia de fluorescência. Um tubo fotomultiplicador típico consiste de um catodo foto emissivo, seguido por eletrodos de foca-

lização, um multiplicador de elétrons e um anodo coletor de elétrons. todos os elementos envolvidos em um tubo a vácuo, tal como pode ser observado nas figuras 5 e 5a, respectivamente representativas de ilustrações de um tubo fotomulti-
5. plicador (PMT) tipo "side-on" e de um fotocatodo de reflexão.

Na figura 5, a seta A indica a área fotosensível do referido tubo fotomultiplicador, enquanto que na figura 5a, as setas B, C e D indicam respectivamente o modo de reflexão do fotocatodo, a direção da luz que incide sobre o mesmo, e o fluxo de fotoelétrons no mesmo.
10.

Existem no mercado diversos fabricantes de PMT's cada qual produzindo vários modelos diferentes. Neste caso, optou-se pelo modelo R4220 fabricado pela empresa Hamamatsu Photonics K.K.. Esta é uma PMT do tipo "side-on", de alta sensibilidade, relativamente baixo custo, freqüentemente utilizada em microscopia de fluorescência.
15.

Eletrônica Associada às PMT's
- A alimentação de uma PMT deve ser feita com uma fonte de alta tensão ~1000 Volts e um divisor que distribui esta tensão pelos diodos. Optou-se por adquirir junto com as PMT's os socketes acoplados com divisores de tensão (modelo E717-21) e as fontes de HV (modelo C6260).
20.
25.

A alimentação da fonte de HV é feita simplesmente com uma tensão de 15 Volts. A tensão gerada por ela pode ser variada de 0 a 1250 Volts ajustan-

do-se um potenciômetro externo.

A saída de uma PMT é um sinal de corrente que dentro de uma determinada faixa é linear com a intensidade de luz nela incidente. Como as PMT's são normalmente acopladas a dispositivos que usam tensão como sinal de entrada (registradores, polígrafos, micro computadores) deve-se fazer a conversão corrente/tensão antes de qualquer ligação.

A princípio uma PMT é uma fonte de corrente ideal, logo esta conversão poderia ser feita simplesmente com uma resistência de carga.

Com uma fonte ideal pode-se obter qualquer tensão de saída aumentando-se a resistência. Na prática, o que se observa é que se utilizarmos resistências acima de um certo valor, deteriora-se a linearidade do sinal de saída com relação à corrente.

Uma maneira simples de fazer a conversão corrente/tensão evitando o problema acima é utilizar-se um amplificador operacional como no circuito mostrado na figura 7. Para este circuito tem-se a tensão de saída: $V_o = I_p \times R_f$

Para se obter uma tensão de saída de 5 Volts em $1 \mu A$ deve-se utilizar uma resistência $R_f = 5M\Omega$. O amplificador operacional utilizado foi o modelo LF 351.

O circuito final com toda a eletrônica associada às PMT's é ilustrado na figura 8.

Filtros - Foi construída uma

caixa com dois filtros tipo "Butterworth", com oito polos e $f_c = 25\text{Hz}$. O circuito básico de filtros tipo "Butterworth" é bem descrito na literatura.

5. Divisor de Sinal-O divisor de sinais é um circuito cuja função é realizar a divisão entre dois sinais positivos, variáveis ou não (E_1 e E_2) e multiplicar o resultado por um terceiro sinal positivo, E_3 .

O princípio de funcionamento do circuito baseia-se na seguinte propriedade da função logarítmica: $\log a + \log b - \log c = \log a \cdot b / c = k$.

15. Fazendo-se o antilog k , obtém-se ab/c . Assim, para efetuar $(E_1 \times E_2) / E_3$, o circuito faz o log de E_1 (bloco 1), soma este resultado com o log de E_2 (bloco 2), subtrai este valor do log de E_3 (bloco 3) e o antilog deste sinal é efetuado no bloco 4, conforme diagrama em blocos apresentado na figura 9.

No referido diagrama da figura 9, os blocos 1, 2 e 3 utilizam os chamados amplificadores logarítmicos para efetuar o log da tensão de entrada. Estes circuitos utilizam um transistor na malha de realimentação do amplificador operacional. A relação entre a corrente de coletor e a tensão base-emissor para um transistor é tipicamente logarítmica numa faixa que se estende desde alguns picoamperes até alguns miliamperes.

25. Quando se introduz na malha de realimentação do amplificador operacional um transistor na configuração base-comum, obtém-se então o circuito logarítmico, representado na figura 10.

Ao se analisar o circuito da figura 10, temos que $V_{out} = \ln V_{in}$.

O bloco quatro utiliza um amplificador antilog para fazer o antilog do sinal de entrada. O amplificador antilog é um circuito semelhante ao amplificador log, com a única diferença de possuir o resistor e o transistor com suas posições invertidas. O circuito antilog pode ser visto na figura 11, sendo que do referido circuito, obtém-se a seguinte expressão da tensão de saída:

10. $V_{out} = e^{V_{in}}$

Aquisição do Sinal: O presente microfluorímetro fornece três sinais, dois sinais proporcionais às intensidades de luz incidentes em cada fotomultiplicadora e um sinal proporcional à razão entre estes dois.

15. Durante a operação do equipamento estes sinais podem ser adquiridos em registrador, em osciloscópio ou em computador, dependendo da preferência do usuário.

O equipamento em questão, compreende ainda componentes como uma fonte da lâmpada: fonte estabilizadora, com tensão ajustável de saída de 0.1 a 30 Volts e corrente máxima de 6A; fonte de alimentação dos filtros, divisor e estimulador; câmera e monitor de TV modelo OSL-100 da CCD Observation System, com sensor CCD de 1/3", sensibilidade de 1 lux.

O funcionamento do presente equipamento, compreende a sua utilização da seguinte forma:
- a amostra deve ser posta dentro de uma câmara de acríli-

- co cujo fundo é formado por uma laminula de vidro:
- a câmera e o monitor devem ser ligados;
 - as fendas devem ser abertas de modo que a imagem da amostra seja formada no sensor da câmera e visualizada no monitor.
5. Neste ponto pode ser necessário algum ajuste de foco.
- o indicador fluorescente deve ser introduzido na amostra;
 - as fontes de alimentação das fotomultiplicadoras, dos filtros, do divisor de sinais e da lâmpada do iluminador devem ser ligadas;
10. - o shutter do iluminador deve ser aberto de modo que a luz-violeta incida sobre a amostra. Neste ponto os três sinais de saída já podem estar sendo adquiridos;
- modificando as condições nas quais a amostra se encontra (estimulação elétrica; exposição a substâncias químicas)
15. pode-se medir as alterações da concentração de cálcio em seu interior medindo-se as variações da razão $R=I_{400}/I_{500}$.

O microfluorimetro assim construído, traz ao seu usuário diversas vantagens com relação aos equipamentos atualmente em uso:

20. - custo inferior;
- tamanho compacto, possibilitando com que o usuário trabalhe em uma condição mais confortável;
 - dispensa o microscópio, fazendo com que o equipamento seja mais robusto e apresente uma manutenção mais fácil;
25. - utiliza lâmpada halogênica, que apresenta um custo baixo, facilmente substituível, e pode ser adquirida também de forma fácil, não necessitando de uma fonte especial, além de não gerar ruídos eletromagnéticos, característica esta

das lâmpadas de arco.

Cabe salientar, que apesar de ter sido ilustrado e descrito, o presente equipamento poderá ser alvo de adequações de ordens diversas, que se levadas a efeito considerarão o teor do originalmente requerido, bem como o escopo da proteção pretendida.

REIVINDICAÇÕES

1. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", caracterizado pelo fato de compreender um sistema óptico composto por três sub-sistemas, sendo o primeiro definido como óptico de excitação, o segundo como óptico de monitoração, e o terceiro como óptico de detecção; o sub-sistema óptico de excitação destina-se a iluminar a amostra com a maior quantidade possível de luz de λ 350nm, compreendendo uma lâmpada do tipo Halon-tungstênio, que trabalha a 70Watts, produzindo ~ 2.0W de luz com entre λ 350 e 370nm; dito sistema óptico de excitação é montado em uma caixa de acondicionamento, produzida preferivelmente em alumínio, com uma tampa traseira (7), com espaçamento para passagem de ar, sendo que, por um tubo (8) à frente da lâmpada (1) é admitido ar comprimido para a refrigeração do sistema e dissipação do ozônio; separando a caixa do restante do sistema é provido um disco de nylon que atua como isolante térmico; dito sub sistema de excitação compreende um dubleto condensador (3) e um filtro calórico (2), bem como um espelho dicróico (9), alinhado por um lado com uma lente (4) e seu filtro de interferência (5) $\lambda = 365\text{nm}$ em suporte removível, através de um obturador (6), e por outro lado, com uma objetiva (12) com ampliação de quarenta vezes, passível de ser movimentada por um dispositivo (10) para esta finalidade, dita objetiva encontra-se em um estágio de microscópio (11), sobre o qual está o porta amostras (13); o segundo sub-sistema do presente ou sub-sistema óptico de monitoração permite que a

- amostra seja selecionada, posicionada e posteriormente monitorada, sendo que para isto deve-se fazer com que a imagem, formada pela objetiva chegue a uma câmara de televisão
5. dito sub-sistema de monitoração compreende um LED de alta luminosidade (75mW em 660nm), colocado acima do estágio; o referido LED é alimentado por uma bateria de 9 Volts, e montado em um suporte móvel tendo sua luz condensada e focalizada por uma lente, podendo a intensidade dessa luz ser ainda controlada por um potenciômetro; dito sub-sistema óptico de monitoração compreende um espelho dicróico (9); dispositivo para movimentação da objetiva (10); estágio de microscópio (11); objetiva (12); porta amostra (13); chave liga desliga (14); potenciômetro (15); LED(16) com lente focalizadora; fendas ajustáveis (17); lente convergente (18);
10. espelho refletor de vermelho (19); e câmara de TV tipo CCD (20); o terceiro sub-sistema do presente equipamento, ou seja, sub-sistema de detecção tem por finalidade coletar a luz emitida pelo indicador fluorescente que se encontra dentro da amostra e levá-la, com menor perda possível até
15. os fotosensores; dito sub-sistema conta com fendas ajustáveis (17); lente convergente (18); espelho refletor de vermelho RRM (19); câmara de TV tipo CCD (20); espelho dicróico (21); fotosensores com filtro (22) e (23).

2. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que o sub-sistema

25. óptico de excitação compreende um condensador formado por um duplete de lentes com distância focal de 32mm e diâmetro

de 24mm, espaçadas por 13mm, dito condensador tem por função formar uma imagem reduzida do filamento, que posteriormente será levada até a objetiva, dito dubleto tendo suas lentes indicadas pelas referências (S') e (S).

5. 3. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivindicado em 1 e 2, caracterizado pelo fato de que acoplado ao condensador, é montado um tubo longo onde está posicionada a lente de $f=90\text{mm}$ e diâmetro de 42mm, dita lente tem como
10. função coletar a luz da imagem do filamento formada pelo condensador (novo objetivo) e formar uma nova imagem na região da objetiva.

15. 4. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que o sub-sistema óptico de excitação compreende um filtro de excitação que tem por função reduzir a banda passante de luz que vai à amostra para uma faixa de 20nm em torno de 355nm, dito filtro pode ser retirado do eixo óptico da montagem.

20. 5. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de compreender um obturador manual que intercepta completamente o feixe de luz e uma íris, também manual, que permite controlar a quantidade de luz de excitação, tendo-se também um peça que acopla-se a íris ao cubo do espelho dicróico.
- 25.

6. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivin-

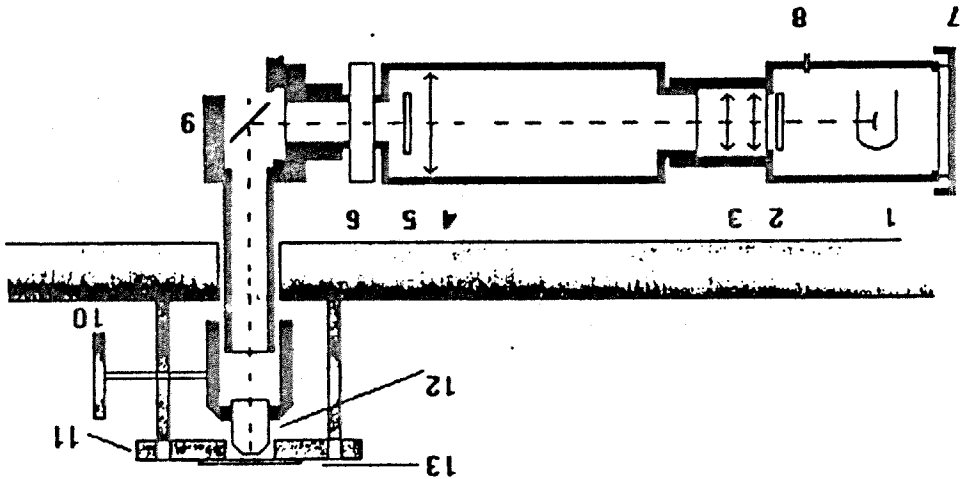
dicado em 1 e 5, caracterizado pelo fato de que o espelho dicróico é posicionado a 45 graus de inclinação, com relação ao eixo óptico, funcionando como espelho para luz com $\lambda < \lambda_c$ e como uma janela para $\lambda > \lambda_c$ assim como um dicróico com $\lambda_c = 390\text{nm}$ pode-se refletir a luz de excitação da lâmpada à amostra e simultaneamente transmitir a luz de emissão da amostra aos detectores.

7. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que o equipamento em questão utiliza-se de fotossensores do tipo fotomultiplicadores (PMT's) da variedade "side-on" e de fotocatodo de reflexão.

8. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que o presente equipamento compreende ainda itens de eletrônica associada às PMT's, notadamente no que se refere à alimentação dos referidos fotossensores, que compreende a utilização de uma fonte de alta tensão (~1000 Volts) e um divisor que distribui esta tensão pelos diodos.

9. "MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", segundo o reivindicado em 1 e 8, caracterizado pelo fato de que o presente equipamento conta ainda com filtros tipo "Butterworth", com oito polos e $f_c = 25\text{Hz}$.

FIG-1



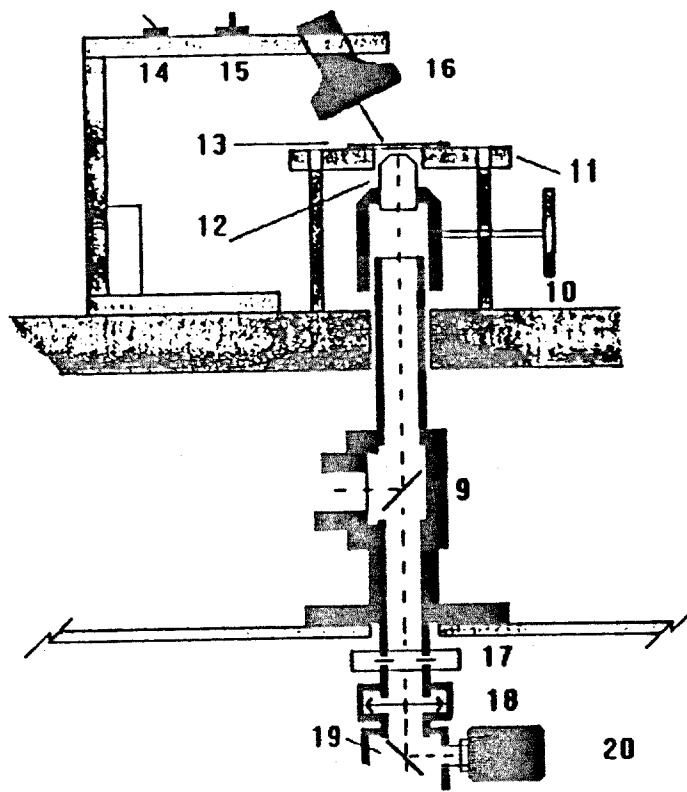
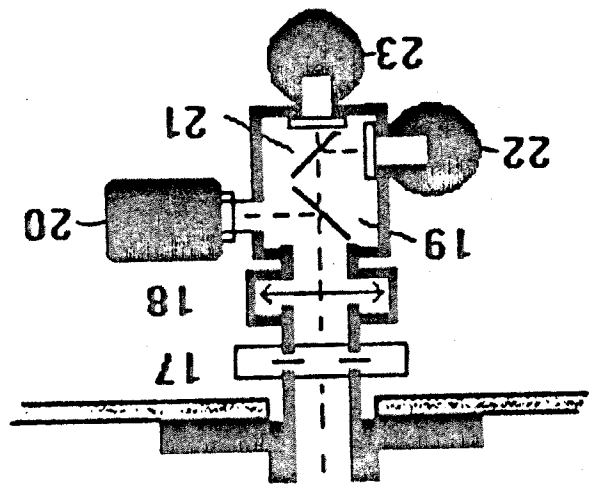


FIG.-2

FIG. 3



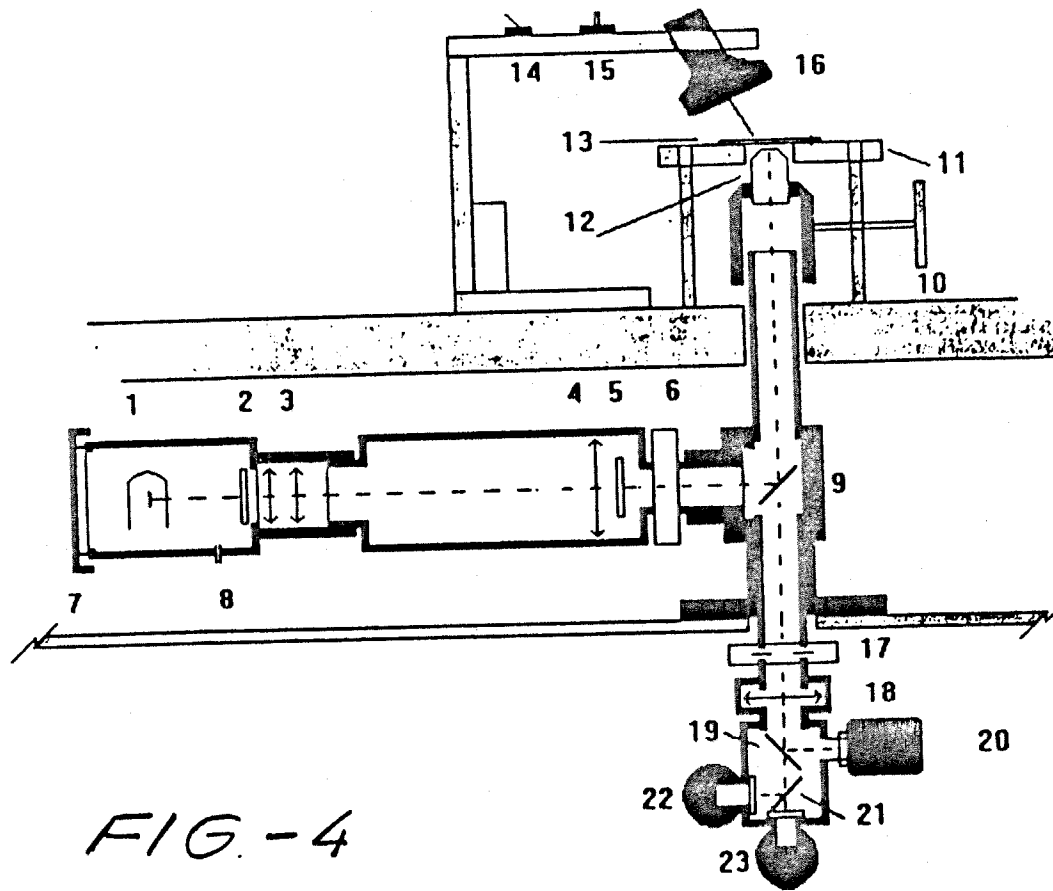


FIG-4

FIG-5

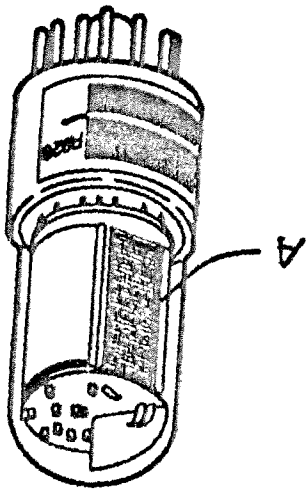


FIG.-5a

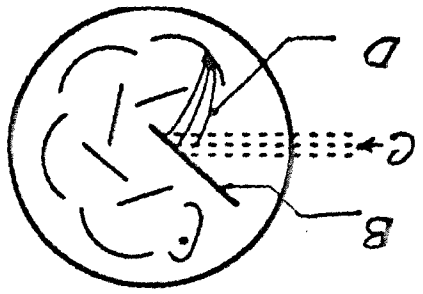


FIG. 6

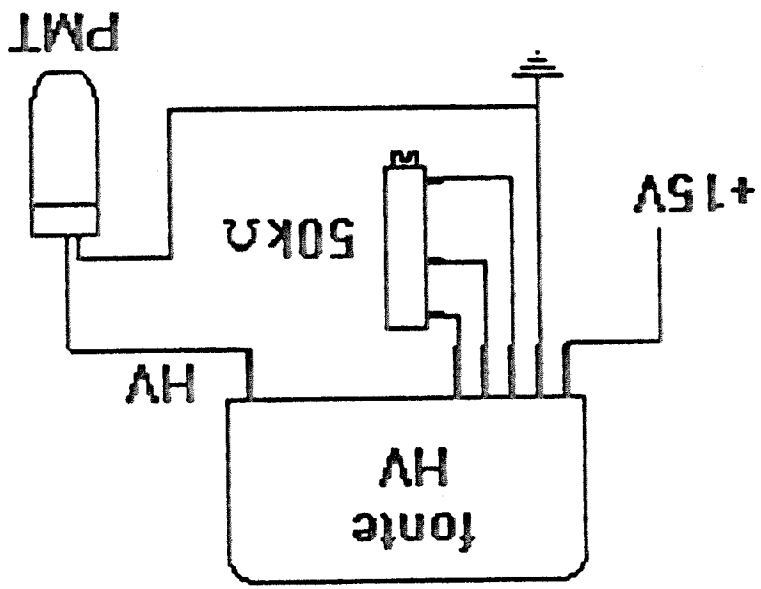
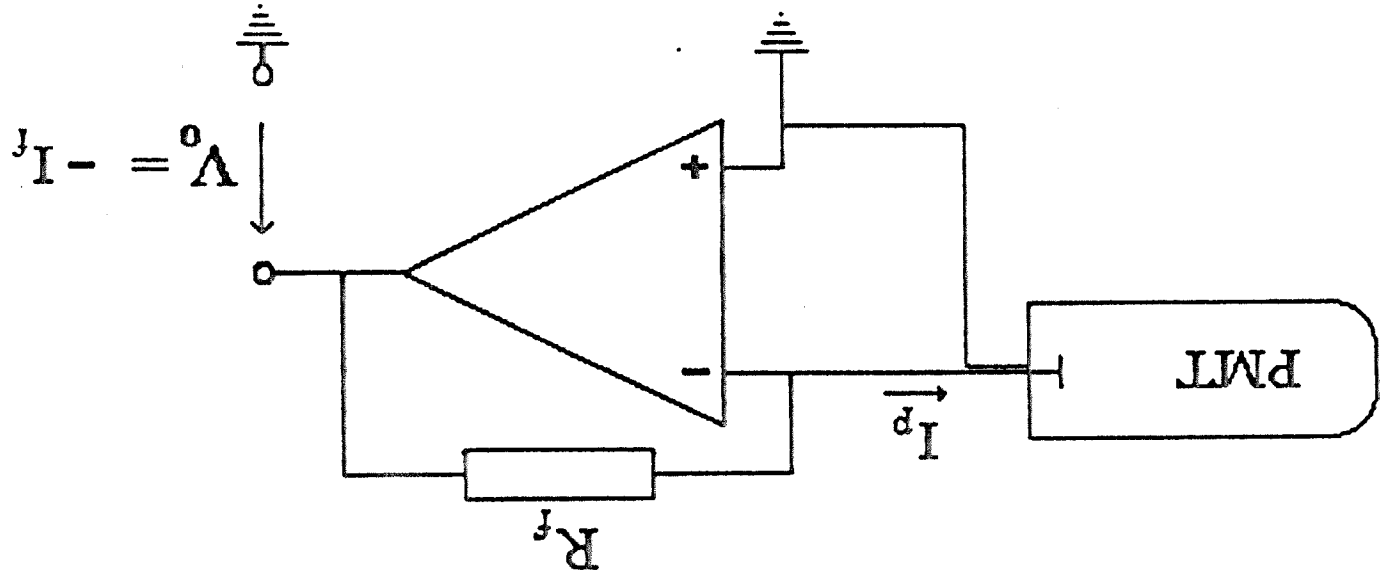


FIG - 7



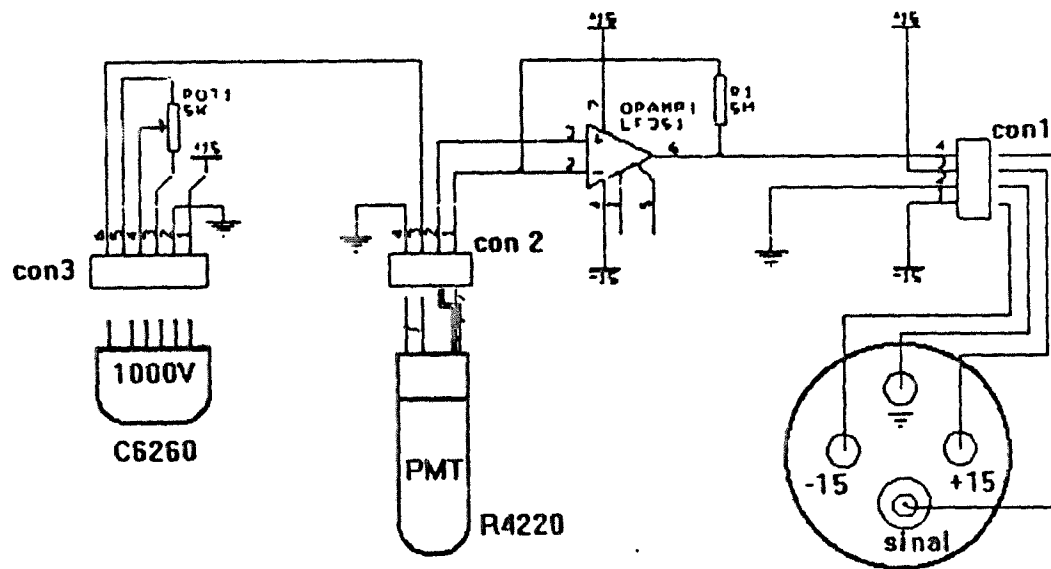


FIG.-8

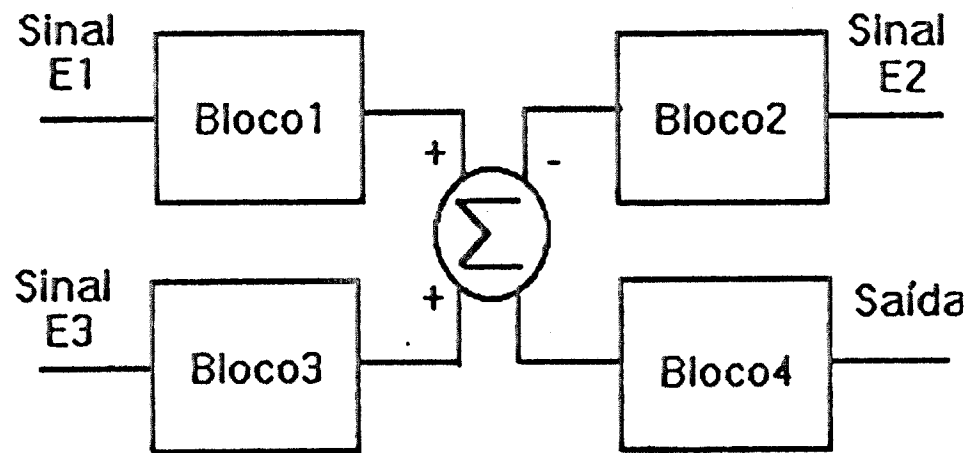


FIG.-9

FIG.-10

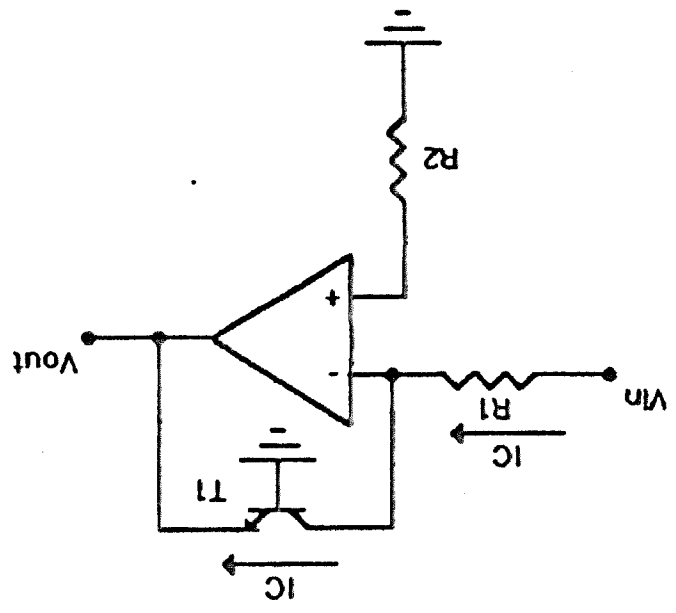
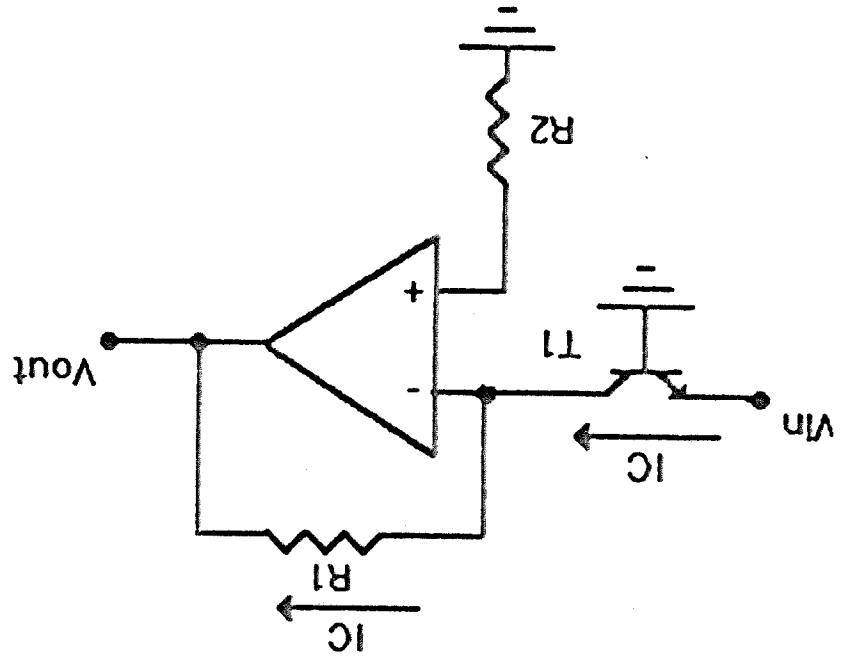


FIG.-11



RESUMO

"MICROFLUORIMETRO SIMPLIFICADO PARA ESTUDO DE CALCIO INTRACELULAR", compreendendo um sistema óptico, que é dividido em três sub-sistemas, sendo o primeiro identificado como sub-sistema de excitação; o segundo como sub-sistema de monitoração e o terceiro como sub-sistema óptico de detecção.