

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0513018-2 A**

(22) Data de Depósito: 01/07/2005  
(43) Data de Publicação: 22/04/2008  
(RPI 1946)



(51) *Int. Cl.:*  
**G01N 21/05 (2008.04)**  
**G01N 21/31 (2008.04)**  
**G01N 33/487 (2008.04)**  
**B01L 3/00 (2008.04)**

(54) **Título: MICROLABORATÓRIO PARA A ANÁLISE DE FLUIDOS BIOLÓGICOS USANDO LUZ BRANCA COMO FONTE DE EMISSÃO**

(30) Prioridade Unionista: 05/07/2004 PT 103159

(71) Depositante(s): Universidade do Minho (PT)

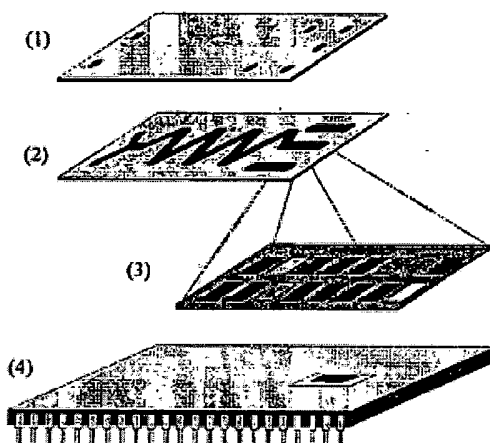
(72) Inventor(es): José Higinio Gomes Correia, Graça Maria Henriques Minas, José Carlos de Almeida Ribeiro

(74) Procurador: Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT IB2005/052200 de 01/07/2005

(87) Publicação Internacional: WO 2006/006113 de 19/01/2006

(57) **Resumo:** MICROLABORATÓRIO PARA ANÁLISE DE FLUIDOS BIOLÓGICOS USANDO LUZ BRANCA COMO FONTE DE EMISSÃO A presente invenção diz respeito a um micro-sistema laboratorial portátil para análise, em tempo real, de fluidos biológicos, em especial a medição da concentração de biomoléculas nesses fluidos, para aplicação em análises clínicas. Este dispositivo combina num único micro-sistema os microcanais, os filtros ópticos, os detectores e a eletrônica de leitura, ficando habilitado para quantificar a concentração de biomoléculas usando a luz branca como fonte de luz, evitando assim o recurso a uma fonte de luz monocromática específica vinda de um laser, por exemplo. O princípio de funcionamento baseia-se na detecção colorimétrica por absorção óptica. Um feixe de luz branca é direcionado para a câmara de detecção, na qual se encontra a mistura a analisar. Esse feixe é filtrado por um filtro óptico de banda estreita no comprimento de onda adequado. A intensidade da luz transmitida através da mistura, proporcional à concentração da biomolécula em análise, é medida por um fotodetector colocado por baixo da câmara de detecção.



MICROLABORATÓRIO PARA ANÁLISE DE FLUIDOS BIOLÓGICOS USANDO  
LUZ BRANCA COMO FONTE DE EMISSÃO

Domínio da Técnica

A invenção diz respeito a um micro-sistema  
5 laboratorial portátil para análise de fluidos biológicos  
(tais como a urina, o sangue, a saliva, o fluido  
cerebrospinal, etc.), em especial a medição da concentração  
de biomoléculas nesses fluidos (tais como o ácido úrico, a  
albumina, a proteína total, etc.).

10 Estado da Técnica pertinente e sua avaliação

São diversos os equipamentos automatizados utilizados  
nos laboratórios de análises clínicas. Esses equipamentos  
são bastante sofisticados, complexos, precisos, fiáveis e  
podem realizar até vários testes em simultâneo para cada  
15 fluido biológico. Contudo, esses equipamentos usam  
reagentes em grandes quantidades tornando os sistemas de  
análise economicamente dispendiosos. Além disso, realizar  
estas análises pode demorar algumas horas ou mesmo dias.

Os médicos prescrevem análises a fluidos biológicos,  
20 que são realizados em laboratórios de análises clínicas.  
Todo este processo é moroso em termos de tempo, não  
permitindo ao médico um diagnóstico fidedigno na hora da  
consulta (apenas após a recepção do resultado das análises  
requeridas). Para além da demora, existem ainda problemas  
25 de possíveis enganos logísticos, tais como etiquetagem  
errada, ou perda de amostras, o que podem atrasar  
significativamente o diagnóstico.

Para a realização de análises clínicas de rotina a  
fluidos biológicos (à urina e ao sangue), fora do ambiente  
30 laboratorial, existem comercialmente disponíveis as

chamadas fitas reagentes. Estas podem ser usadas, lidas e interpretadas diretamente pelos próprios pacientes e por outros profissionais de saúde. Estas fitas estão quimicamente impregnadas com reagente e permitem

5 quantificar o valor da concentração de determinadas biomoléculas na urina, utilizando um processo de comparação visual codificado por cores. Os tempos de reação das biomoléculas químicas nas fitas estão padronizados para cada categoria de fita. Atualmente estas fitas reagentes

10 funcionam como laboratórios em miniatura, contudo são poucas as biomoléculas que se podem analisar pelas fitas reagentes (pH, proteína total, glicose, cetonas, bilirrubina, nitrito e hemoglobina) e a leitura manual da cor, mesmo com controles, não é precisa.

15 Existem vários métodos de detecção da concentração de biomoléculas, tais como: fluorescência, eletroquímico e absorção óptica. O método de detecção por fluorescência possui elevada sensibilidade de detecção. Porém, o tempo de luz fluorescente emitido pelas moléculas é extremamente

20 curto. Para além disso, é muito difícil encontrar biomoléculas com fluorescência própria, sendo necessário encontrar reagentes que contenham compostos fluorescentes, quando as moléculas a analisar não os tiverem, O método eletroquímico possui também uma elevada sensibilidade de

25 detecção, mas a sua aplicação está limitada a apenas alguns compostos. O método de detecção por absorção óptica pode ser aplicado a uma larga gama de análises e tem a vantagem de não necessitar de compostos fluorescentes para a detecção.

30 As patentes US2003017079 - "Absorbance detection

system for lab-on-a-chip" e US6048498 - "Microfluidic devices and systems" - utilizam o método de absorção óptica para a detecção da concentração de biomoléculas, necessitando de uma fonte emissora de luz monocromática e, para além disso, a patente US2003017079 utiliza fibras ópticas para conduzir a luz. A presente invenção não necessita de fibras ópticas para conduzir a luz e não precisa de uma fonte de luz monocromática específica, pois apenas necessita de uma fonte emissora de luz branca, sendo selecionado o comprimento de onda pretendido através de filtros ópticos.

A patente W00170400 - "Multiblock micro-arrays or macro-arrays with lab-on-a-chip" - necessita de micromisturadores para misturar os reagentes. O fabrico desses misturadores nesta patente é muito complexo devido à construção de multi-estruturas na vertical. A presente invenção não utiliza micromisturadores, uma vez que a mistura é feita por difusão, o que simplifica em muito o fabrico do dispositivo.

A patente US2003052281 - "Apparatus to collect, classify, concentrate, and characterize gas-borne particles" - necessita de uma fonte emissora de luz UV. Os detectores de radiação UV são muito difíceis de construir em silício. A presente invenção utiliza uma fonte emissora de luz branca, usando filtros ópticos para a filtragem, e detectores de radiação visível que são simples de construir em silício.

As patentes US6129896 - "Biosensor chip and manufacturing method" - e US5755942 - "Partitioned microelectronic device array" - necessitam de recorrer a

fibras ópticas para conduzir a luz, necessitando de uma fonte emissora de luz monocromática. A presente invenção não necessita de fibras ópticas para conduzir a luz e não precisa de uma fonte de luz monocromática específica.

5           A patente U56100973 - "Methods and apparatus for performing microanalytical techniques using photolithographically fabricated substrates having narrow band optical emission capability" - tem a limitação de só poder ser aplicada a alguns compostos, devido ao fato de  
10 utilizar o método de detecção por fluorescência. A presente invenção utiliza o método de detecção por absorção óptica, podendo ser aplicado a uma larga gama de compostos e consequentemente análises e não necessita de compostos fluorescentes para a detecção.

15           Nenhum destes documentos antecipa o objeto do pedido de patente que agora se pretende proteger.

#### Objectivo da invenção e vantagens

O objectivo da invenção é permitir a determinação na hora e no local do valor da concentração de biomoléculas em  
20 fluidos humanos, utilizando como fonte emissora uma fonte de luz branca vulgar, como por exemplo, uma lâmpada fluorescente comercial, a baixo custo e sem recorrer a sistemas de análise complexos e economicamente dispendiosos como o espectrofotómetro.

25           A presente invenção é um equipamento microlaboratorial portátil para diagnósticos clínicos, combinando num único micro-sistema os microcanais, os filtros ópticos, os detectores e a eletrônica de leitura. Este dispositivo é capaz de quantificar a concentração de biomoléculas sem  
30 recorrer a componentes externos. O equipamento permitirá

realizar análises clínicas em consultórios médicos no decorrer da consulta médica, em tempo útil {Point Of Care}, nos respectivos laboratórios de análises e na própria casa dos pacientes, permitindo assim a determinação exata da  
5 concentração de biomoléculas em fluidos biológicos.

O fato de conseguir medir o valor das concentrações usando a luz branca como fonte de luz, recorrendo a filtros ópticos, representa uma importante vantagem, porque evita o recurso a uma fonte de luz monocromática específica vinda  
10 de um laser, não requer fibras ópticas para condução e direcionamento da luz para polarização e, uma vez que é utilizado o método de detecção por absorção óptica, substitui o recurso a biomoléculas fluorescentes.

A simplicidade da sua utilização permite prever que os  
15 próprios pacientes estarão habilitados a utilizar o equipamento para realizar as suas próprias análises.

Sendo de pequenas dimensões, baixo consumo e portátil, apresenta resultados rápidos com a mesma viabilidade e precisão dos sistemas de análises de fluidos biológicos  
20 existentes, atualmente, nos laboratórios, utilizando quantidades reduzidas de reagentes e de amostras.

#### Breve descrição do desenho

Em anexo junta-se uma folha de desenhos sem qualquer caráter limitativo, em que se representa, de modo  
25 esquemático, o micro-sistema laboratorial para análise de fluidos biológicos.

A Figura 1 representa o microlaboratório decomposto nas suas várias partes, em que (1) representa a lamela de poliestireno que contém os orifícios para a introdução e  
30 remoção dos fluidos, (2) representa a lamela de

poliestireno com os microcanais, (3) representa o conjunto de filtros ópticos colocados por baixo da câmara de detecção (figura ampliada para destacar os 16 filtros ópticos), e (4) representa um circuito integrado com a  
5 pastilha de silício que contém os fotodetectores e restante eletrônica.

A Figura 2 representa o leitor no qual é inserido o micro-laboratório (5). O leitor inclui ainda um display (6) que permite a visualização do resultado quantitativo da  
10 análise.

#### Descrição da invenção

O Microlab consegue determinar o valor da concentração de biomoléculas existentes em fluidos biológicos em tempo real e em qualquer local, combinando num único micro-  
15 sistema os microcanais, os filtros ópticos, os detectores e a eletrônica de leitura, e está esquematicamente representado no desenho da figura 1.

O bloco para a circulação dos fluidos é micromaquinado em poliestireno (usando técnicas de microfresagem para  
20 construir os microcanais, com passivação  $\text{SiO}_2$  e temperar para eliminar as rugosidades e o stress residual) e é composto por duas lamelas (1) e (2) cada uma com 1 mm de espessura, 25 mm de comprimento e 10 mm de largura. A primeira lamela (1) tem os orifícios para a inserção e  
25 remoção dos fluidos dos microcanais e a segunda (2) inclui os microcanais.

O microlaboratório contém basicamente três microcanais: um para obter a linha de referência e para calibrar a fonte de luz, outro para o fluido a analisar,  
30 tendo duas entradas e uma saída para permitir a mistura do

fluido com o reagente de forma automática, e um terceiro microcanal para calibrar a concentração da biomolécula a medir (com um padrão de concentração conhecida). O formato dos microcanais é retangular devido à reflexão da luz, uma vez que o processo de medição é por absorção óptica.

O bloco dos filtros ópticos (3) situa-se por baixo do bloco de circulação dos fluidos, sendo composto por uma lamela de 0,5 mm de espessura. É nesta lamela que serão depositados os filmes finos de materiais dielétricos, com uma estrutura em multicamadas, de maneira a formar filtros ópticos passa-banda estreita. Os filmes finos podem ser depositados por processos de PVD (Physical Vapor Deposition) tais como "sputtering", "electron beam", entre outros.

Os filtros ópticos têm como função seleccionar o comprimento de onda, dentro do espectro eletromagnético de luz visível, adequado à biomolécula que se pretende analisar. O recurso a filtros ópticos faz com que seja possível realizar medições no microlaboratório usando uma fonte de luz branca vulgar (que contém todos os comprimentos de onda, como por exemplo uma lâmpada fluorescente comercial). O número de filtros ópticos depende do número de biomoléculas a analisar, sendo necessário um filtro para cada biomolécula.

O bloco para o sistema de detecção (4) encontra-se por baixo dos outros dois e é fabricado segundo um processo de microeletrónica standard CMOS. Contém uma matriz de fotodetectores para medir a intensidade do feixe de luz transmitido através da mistura. Este feixe com várias componentes espectrais, é filtrado pelos filtros ópticos,



obtendo-se uma banda muito estreita com apenas algumas componentes espectrais. O número de fotodetectores depende do número de filtros ópticos. A matriz de fotodetectores é posicionada exatamente debaixo da matriz dos filtros ópticos. Para converter o sinal analógico dos fotodetectores (fotodíodos) num sinal digital, foi integrado no mesmo processo de fabrico um conversor analógico - digital baseado num modulador sigma delta de 1ª ordem.

Depois de encapsular o sistema de detecção, fabricado em silício, é colocado no seu topo a lamela que contém os filtros ópticos. Este dispositivo é montado num leitor com um display conectado ao circuito integrado que contém o sistema de detecção. O display serve para a visualização dos resultados quantitativos, não sendo necessário ligar o leitor a um computador, o que mais uma vez fornece a vantagem da portabilidade ao microlaboratório. O bloco com os microcanais é encaixado no leitor no devido lugar, com a zona de medição sobre os filtros ópticos. Esse bloco é descartável, evitando assim os custos associados à lavagem dos reagentes. Os restantes blocos e o próprio leitor são utilizados nas várias análises.

O número de biomoléculas cuja concentração é possível determinar com este equipamento depende do número de filtros ópticos colocados na matriz. Num exemplo laboratorial, foi possível determinar a concentração de 16 biomoléculas diferentes em fluidos biológicos, utilizando 16 filtros ópticos (3). As biomoléculas analisadas são indicadas na tabela 1:

Biomoléculas biológicas	Fluído biológico	Pico máximo do espectro da absorção (nm)	Posição do filtro na matriz
17 – Cetosteróides	U	478	1
Aldolase	S	484	2
Ácido úrico	U, FCS	497	3
Colesterol	S	500	4
Glicose	S	504	5
Ácido Glutâmico	S, P, FCS	508	6
Uréia	U, S, P	514	7
Magnésio	S	518	a
Creatinina	U, S, P	523	9
Ácido bílico	S	528	10
Uréia no sangue	S, P	535	11
Salicilatos	S	540	12
Hemoglobina	P	543	13
$\beta$ Glucuronidase	S, U	548	14
Bilirrubina	S	558	15
Leucina	U	567	16

Tabela 1: Biomoléculas analisadas. S (soro), U (urina), B (sangue), P (plasma) e FCS (fluído cerebrospinal). A 4ª coluna indica qual o filtro correspondente à biomolécula a analisar.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Equipamento para a análise biológica dos líquidos pelo absorção ótico, que se usa na fonte clara branca das medidas, caracterizado por compreender um dado que  
5 contivesse os furos para a injeção e remover dos líquidos (1), um dado com os microcanais (2), um dado com os filtros óticos (3), que permite o uso da fonte clara branca como a iluminação, e um circuito integrado convencional (microplaqueta) (4), que inclua fotodetectores, colocou sob  
10 os filtros, e a eletrônica da leitura.

2. Equipamento para biológico líquido análise ótico absorção, de acordo com reivindicação 1, caracterizado por compreender três microcanais, um para obter linha de base referência e para calibrar claro fonte, segundo para  
15 líquido para esta analise e third para calibrar biomolecula concentração com um conhecimento concentração calibrador.

3. Equipamento para a análise biológica dos líquidos pelo absorção ótico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender os furos para a injeção e  
20 remover dos líquidos (1), aqueles furos é alinhado verticalmente com os microcanais e colocado no começo e no fim de cada microcanais.

4. Equipamento para a análise biológica dos líquidos pelo absorção ótico, de acordo com a reivindicação 1,  
25 caracterizado pelo fato do dado do filtro ótico (3) os filtros óticos é depositado por PVD (deposição físico do vapor) e este dado (3) é colocado em tal maneira que os filtros óticos estão sob a área das medidas.

5. Equipamento para a análise biológica dos líquidos  
30 pelo absorção ótico de acordo com algumas das

reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato do material do dado é um material transparente, tal como o vidro, o quartzo e materiais polimérico, com um comprimento igual ou menor de 25 milímetros, um igual largo ou menor de 5 10 milímetros e uma espessura entre 0.5 mm e 1 mm.

6. Equipamento para a análise biológica dos líquidos pelo absorção ótico de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato das micro-canais são micro-máquina dado e exhibe uma forma retangular.

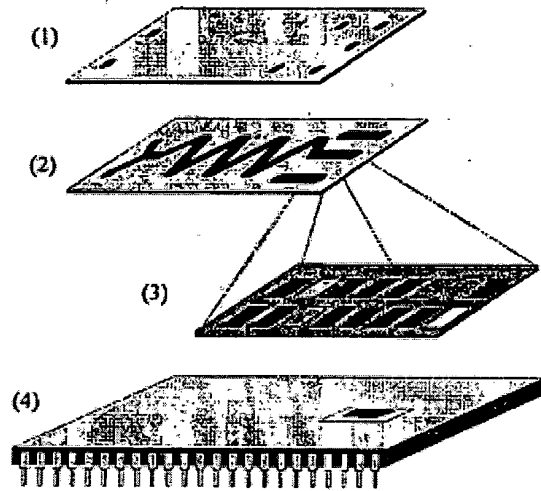


Figura 1

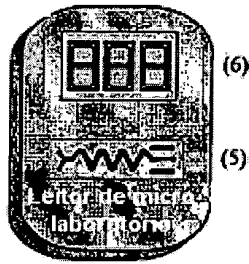


Figura 2

**MICROLABORATÓRIO PARA ANÁLISE DE FLUIDOS BIOLÓGICOS USANDO  
LUZ BRANCA COMO FONTE DE EMISSÃO**

A presente invenção diz respeito a um micro-sistema laboratorial portátil para análise, em tempo real, de fluidos biológicos, em especial a medição da concentração de biomoléculas nesses fluidos, para aplicação em análises clínicas. Este dispositivo combina num único micro-sistema os microcanais, os filtros ópticos, os detectores e a eletrônica de leitura, ficando habilitado para quantificar a concentração de biomoléculas usando a luz branca como fonte de luz, evitando assim o recurso a uma fonte de luz monocromática específica vinda de um laser, por exemplo.

O princípio de funcionamento baseia-se na detecção colorimétrica por absorção óptica. Um feixe de luz branca é direcionado para a câmara de detecção, na qual se encontra a mistura a analisar. Esse feixe é filtrado por um filtro óptico de banda estreita no comprimento de onda adequado. A intensidade da luz transmitida através da mistura, proporcional à concentração da biomolécula em análise, é medida por um fotodetector colocado por baixo da câmara de detecção.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Aparelho para análise de amostras de fluidos biológicos por absorção óptica, caracterizado por utilizar qualquer fonte de luz branca externa como iluminação, e  
5 compreender numa construção modular:

(i) um micro-sistema misturador de fluidos para misturar de forma automática dois ou mais fluidos, compreendendo uma lamela transparente com os orifícios para injeção e remoção dos fluidos (1) e uma lamela com os  
10 microcanais, que estão alinhados verticalmente com os orifícios, sendo os orifícios colocados no início e no fim de cada microcanal, e três câmaras de detecção (2), ou múltiplos de três, em que uma câmara contém o reagente para obtenção da linha de base, outra câmara contém o reagente e  
15 a amostra a analisar, e a outra câmara contém um padrão de concentração conhecida da biomolécula a ser analisada;

(ii) um sistema de filtragem óptica composto por matrizes de filtros ópticos não ajustáveis e extremamente seletivos (3), localizados verticalmente por baixo das  
20 câmaras de detecção que se encontram no micro-sistema de fluidos;

(iii) um micro-sistema com fotodetectores e eletrônica de leitura, ambos integrados no mesmo processo de fabrico (4), colocados sob as matrizes de filtros ópticos;

25 em que o aparelho não necessita de nenhuma calibração prévia, sendo auto calibrado durante a execução das medições por absorção óptica, nas quais é simultaneamente analisada a intensidade da luz que é transmitida através das três câmaras de detecção.

30 2. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato da lamela que compreende os microcanais (2) ser de um material transparente, tal como vidro, quartzo, materiais poliméricos, sendo os microcanais feitos preferencialmente a partir de uma resina sensível à luz e biocompatível, tal como o SU-8, que permita com que as paredes dos microcanais tenham uma rugosidade extremamente baixa, apresentem um perfil vertical retangular profundo e fazendo com que o sistema de microcanais possa ser descartável.

10 3. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da parte reta dos microcanais, onde estão localizadas as câmaras de detecção, ter um comprimento de oito vezes, e uma largura de duas vezes o comprimento e a largura de um filtro óptico da matriz, e  
15 uma espessura em profundidade entre 0,5 mm e 1 mm, fornecendo medições de absorção óptica de elevada sensibilidade.

4. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do número de matrizes ser o mesmo  
20 que o número de câmaras de detecção.

5. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de cada matriz de filtros ópticos, extremamente seletivos, inclui cerca de 1 a 32 filtros ópticos, sendo cada um deles sensível a uma banda espectral  
25 muito estreita, permitindo a análise simultânea de mais que uma amostra de fluido biológico com o mesmo aparelho.

6. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de todos os filtros ópticos da matriz terem o mesmo comprimento e largura, de cerca de 50  
30  $\mu\text{m}$  a cerca de 1 mm, e cada filtro óptico ser composto por



uma pilha de camadas dielétricas de filmes finos, com apenas dois materiais dielétricos diferentes depositados na pilha, tais como dióxido de titânio e dióxido de silício, e cada filtro óptico ter uma espessura fixa.

5           7. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da banda espectral inerente a cada filtro óptico ser devida às diferentes espessuras de uma ou duas camadas dielétricas, as mesmas camadas em todos os filtros ópticos da matriz, obtida durante o processo de  
10 fabrico e manutenção outras camadas dielétricas com a mesma espessura em todos os filtros ópticos da matriz.

          8. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato deste ser colocado num leitor (5) com um visor (6), para visualização dos resultados,  
15 acoplado a um teclado, para introdução dos dados, fornecendo portabilidade e sendo o aparelho livre de qualquer ligação física a um computador.

          9. Aparelho, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato do leitor, do micro-sistema de  
20 detecção e leitura (4) e do sistema de filtragem óptica com as matrizes dos filtros ópticos extremamente seletivos (3), serem os mesmos para várias análises e podendo ser unicamente o micro-sistema de fluidos, lamela (1) e (2), descartável após cada análise.

25           10. Utilização do aparelho definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9, caracterizado por poder ser iluminado por uma luz policromática externa não calibrada, tal como uma lâmpada ligada à rede de energia elétrica, sendo a credibilidade das medições assegurada pelo fato de  
30 o referido aparelho descrito compensar as flutuações

associadas à utilização dessas fontes de luz, através da detecção simultânea das absorções ópticas das amostras dos fluidos quando se encontram nas três câmaras de detecção.

**MICROLABORATÓRIO PARA A ANÁLISE BIOLÓGICA DE LÍQUIDOS****USANDO ILUMINAÇÃO A LUZ BRANCA**

A invenção atual relaciona um microsistema laboratorial para a análise fluida biológica, especial a  
5 medida da concentração dos biomoléculas naqueles líquidos, para a aplicação em análises clínicas. Este dispositivo combina em um único microsistema os microcanais, os filtros óticos, os detectores e a eletrônica da leitura, permitindo a medida da concentração de diversos biomoléculas usando a  
10 fonte clara branca como a iluminação, assim evitando o uso de uma fonte clara dependente do comprimento de onda (tal como um laser, para o exemplo). Sua operação é baseada na detecção colorimétrica pelo absorção ótica. Um feixe luminoso branco é guiado através dos microcanais que contêm  
15 as amostras para analisar. A luz de impressão é filtrada por um filtro passa-banda ótica do estreito no comprimento de onda definido pelo biomolécula que está sendo analisado. A intensidade do componente espectral selecionado transmitido através do líquido, proporcional à concentração  
20 do biomolécula na análise, é medida usando um foto-detector subjacente, alinhado verticalmente com o filtro ótico.