

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Sara Filomena Ribeiro Pimenta

**Desenvolvimento de um sistema à escala
reduzida para determinação do tipo de
sangue humano**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Sara Filomena Ribeiro Pimenta

Desenvolvimento de um sistema à escala reduzida para determinação do tipo de sangue humano

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Área de Especialização em Eletrónica Médica

Trabalho realizado sob a orientação da
Professora Doutora Filomena Soares

Outubro de 2012

DECLARAÇÃO

Nome: Sara Filomena Ribeiro Pimenta

Endereço eletrónico: a52567@alunos.uminho.pt

Telefone: 911990768

Número do Bilhete de Identidade: 13503608

Título da Tese: Desenvolvimento de um sistema à escala reduzida para determinação do tipo de sangue humano

Orientadora: Professora Doutora Filomena Soares

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, ___ / ___ / _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

O meu profundo e sincero agradecimento vai para as minhas orientadoras, Professoras Doutoras Filomena Soares e Graça Minas, por todo o apoio, orientação, amizade, simpatia e dedicação que sempre demonstraram ao longo da realização desta dissertação. Tenho também a agradecer os desafios e sugestões dadas ao longo da minha formação que em muito contribuíram para o meu desenvolvimento académico.

Ao Instituto Português do Sangue, em especial ao Doutor António Duran, o meu sincero agradecimento pela colaboração e disponibilidade demonstrada na realização deste projeto.

Aos técnicos das oficinas do Centro Algoritmi em Azurém, em especial ao Senhor Carlos Torres, um muito obrigada pelos esclarecimentos e apoio prestados ao longo deste último ano.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Gualtar, um grande obrigada pela ajuda, amizade, apoio e pelas palavras de incentivo. O muito bom ambiente de trabalho, assim como a boa disposição de todos ajudaram em muito o meu percurso.

Aos meus amigos, um profundo obrigada pela amizade e apoio sincero que me prestaram ao longo desta jornada, estando sempre ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu namorado, João, um muito obrigada pelo amor, paciência, ajuda e apoio incondicionais.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais e irmão, Filomena, Fernando e Luís, o meu maior obrigada pelo grande amor, esforço, paciência e suporte que me deram ao longo destes cinco anos de percurso académico. Sem eles, não seria possível concluir este grande desafio profissional e pessoal.

Resumo

A determinação do tipo sanguíneo é um dos testes clínicos mais importantes que precede uma transfusão de sangue. Em situações de emergência, as transfusões sanguíneas são críticas, especialmente quando não há tempo para determinar o tipo de sangue do paciente, devido ao seu estado clínico, sendo a transfusão realizada com base no dador universal (tipo sanguíneo O negativo). Esta situação pode acarretar um conjunto de complicações clínicas para o paciente. Os sistemas e métodos existentes, atualmente, para a determinação do tipo sanguíneo apresentam algumas limitações, nomeadamente: subjetividade no caso dos métodos manuais; e elevado custo e tempo de resposta, no caso dos sistemas automáticos.

Assim, no âmbito desta dissertação foi desenhado e construído um dispositivo automático para a determinação do tipo sanguíneo ABO-Rh, com as seguintes características: pequenas dimensões, 150 mm × 120 mm × 70 mm; portátil, permitindo a realização de análises próxima do paciente; baixo custo, em relação aos sistemas automáticos existentes no mercado; e tempo de resposta curto, permitindo a realização de uma análise em menos de 5 minutos. Estas características tornam o dispositivo vantajoso para operar especialmente em situações de emergência e fora dos laboratórios de análises clínicas, minimizando algumas das limitações dos sistemas/métodos atuais. O dispositivo implementado recorre à espectrofotometria, por absorção ótica, para detetar a reação de aglutinação em amostras sanguíneas, previamente preparadas e introduzidas no sistema. O protocolo experimental utilizado baseia-se na preparação de quatro amostras de teste, recorrendo ao protocolo convencional em lâmina, em que são utilizadas amostras de sangue total misturadas com soluções comerciais de anticorpos tipo A, B, AB e D. Uma vez introduzidas, simultaneamente, as amostras de teste no dispositivo, este determina três valores de densidade ótica (DO) por amostra, em comprimentos de onda específicos. Com base nestes valores, o sistema classifica cada uma das amostras em aglutinada ou não aglutinada e determina o tipo sanguíneo em análise, por aplicação de um algoritmo de decisão implementado no dispositivo. Os elementos base do dispositivo são: um sistema de LEDs e a sua eletrónica de controlo; fotodíodos e a sua eletrónica de leitura e um microcontrolador com display tátil (interface do utilizador com o dispositivo).

O sistema foi testado e validado em ambiente laboratorial utilizando amostras padronizadas cedidas pelo Instituto Português de Sangue, correspondentes a diferentes tipos de sangue ABO-Rh.

Abstract

Blood type determination is one of the most important clinical tests that precede a blood transfusion. In emergency situations, blood transfusions are critical, once usually, due to the patient condition there is no time to blood typing and it is administered the universal donor blood type (O negative). This situation can bring some clinical risks to the patient. The systems and methods available nowadays to blood typing have some limitations, such as, the subjectivity of the manual tests and the high cost and time response of the automatic systems.

Therefore, in this thesis, it is presented an automatic electronic device to ABO-Rh human blood typing with the following features: miniaturized, 150 mm × 120 mm × 70 mm; portable, allowing blood type determination near the patient; low-cost, comparing to the automatic systems available today; and fast response time, allowing performing analysis in less than 5 minutes. With these features the system is especially advantageous to operate in emergency situations and outside a conventional clinical laboratory, decreasing some limitations of the existents systems/methods. The developed device is based on a spectrophotometric approach and in the detection of agglutination reaction in the test samples, previously prepared and introduced into the device. The experimental procedure is based on the conventional plate protocol, i.e., preparation of four test samples by mixing blood samples with commercial antibodies solutions type A, B, AB and D. The samples are, simultaneously, introduced into the system and three discrete values of optical density (for each sample) are obtained at specific wavelengths. Based on these values, the device classifies each sample in agglutinated or non-agglutinated and determines the blood type by the application of a decision algorithm, based on the samples classification. The basic elements of the implemented device are: a group of LEDs and its electronic control system, photodiodes and their electronic reading system and a microcontroller with a touchscreen (user interface with the device).

The system has been tested and validated in the laboratory using standardized samples, corresponding to different blood types ABO-Rh, provided by the Portuguese Blood Institute.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XIX
Nomenclatura	XXI
Acrónimos	XXI
Variáveis	XXI
Constantes.....	XXIII
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Sangue Humano: constituição.....	1
1.2 Grupos Sanguíneos.....	3
1.2.1 Sistema ABO	4
1.2.2 Sistema Rhesus (Rh).....	6
1.3 Estado da Arte: métodos para determinação do tipo de sangue	7
1.3.1 Métodos Manuais	7
1.3.1.1 Teste em Lâmina	7
1.3.1.2 Teste em Tubo.....	9
1.3.1.3 Teste em Microplaca	9
1.3.1.4 Tecnologia de Aglutinação em Coluna.....	10
1.3.2 Sistemas Automáticos para determinação do tipo sanguíneo	11
1.3.2.1 Sistema TIC Auto-Analyzer.....	12
1.3.2.2 Sistema Groupamatic.....	13
1.3.2.3 Sistema AutoGrouper	14
1.3.2.4 Sistema Olympus	14
1.3.2.5 Sistema Immucor Galileo.....	15
1.3.2.6 Sistema ORTHO AutoVue Innova.....	16
1.3.2.7 Sistema TANGO Optimo	17
1.3.2.8 Sistema Techno TwinStation.....	17
1.3.2.9 Sistema Plus ID-GelStation	18

1.3.2.10 Sistema Qwalys.....	19
1.3.3 Métodos recentes para determinação do tipo de sangue.....	20
1.3.3.1 Tecnologia MDmulticard.....	20
1.3.3.2 Abordagem Molecular.....	21
1.3.3.3 Abordagem espectrofotométrica.....	21
1.3.3.4 Tecnologia em investigação.....	22
1.4 Motivação e Objetivos.....	24
1.5 Resultados da atividade científica desenvolvida.....	25
1.6 Estrutura da dissertação.....	26
Capítulo 2 – Fundamentos teóricos.....	27
2.1 O espectro eletromagnético.....	27
2.2 Lei de Beer-Lambert.....	28
2.3 Medições da absorvência.....	29
2.4 Princípios das abordagens espectrofotométricas para a determinação dos tipos sanguíneos ABO-Rh.....	30
2.5 Teoria da dispersão e propriedades óticas do sangue.....	35
2.5.1 Teoria de dispersão angular.....	38
2.5.2 Teoria de Mie.....	38
2.5.3 Efeito do <i>setup</i> experimental no espectro dos eritrócitos.....	40
2.5.4 Efeito das características dos eritrócitos no espectro obtido.....	42
Capítulo 3 – Testes experimentais: metodologia em cuvette.....	43
3.1 Protocolos experimentais em cuvette.....	43
3.2 Resultados experimentais e discussão.....	46
3.2.1 Com aplicação do protocolo I no <i>setup</i> experimental.....	46
3.2.1.1 Sistema ABO.....	47
3.2.1.2 Sistema Rh.....	51
3.2.2 Com aplicação do protocolo I num espectrofotômetro comercial.....	52
3.2.2.1 Sistema ABO.....	53
3.2.2.2 Sistema Rh.....	56
3.2.3 Comparação entre protocolos I e II.....	57
3.3 Análise final da metodologia implementada.....	59

Capítulo 4 – Testes experimentais: metodologia em lâmina	61
4.1 Protocolo experimental em lâmina	61
4.2 Resultados experimentais e discussão	62
4.3 Posicionamento de componentes e a sua influência no espectro de DO.....	66
Capítulo 5 – Especificação e Implementação do Protótipo	69
5.1 Sistema de LEDs	69
5.2 Componentes eletrônicos do sistema	73
5.3 Teste global dos componentes eletrônicos.....	77
5.4 Programação do Microcontrolador – Interface	77
5.5 Procedimento experimental.....	80
5.6 Estudo do ADC	82
5.7 Projeto do sistema.....	83
5.8 Implementação do sistema	90
5.9 Requisitos de Energia	91
5.10 Custo do protótipo implementado	94
Capítulo 6 – Testes Experimentais ao Protótipo Implementado	97
6.1 Testes experimentais para determinação das variáveis	97
6.2 Testes Finais ao Protótipo	100
Capítulo 7 – Conclusões e Trabalho Futuro	105
Bibliografia	109
Anexos	114
Anexo I – Gráficos metodologia em cubete.....	114
Anexo II – Gráficos metodologia em lâmina	116
Anexo III – Caracterização dos LEDs	118

Índice de Figuras

Figura 1.1 Reação de aglutinação. Sangue do tipo A num recetor do mesmo tipo não causa aglutinação porque os anticorpos tipo B do recetor não combinam com os antígenios tipo A do dador. Pelo contrário, sangue do tipo A num recetor tipo B causa aglutinação porque os anticorpos tipo A do recetor combinam com os antígenios tipo A do dador (adaptado de [1]).	5
Figura 1.2a Reagentes DiaMed® para determinação do tipo sanguíneo: a – Anti-A, b – Anti-B, c – Anti-AB, d – Anti-D (adaptado de [12]).	8
Figura 1.2b Teste em lâmina aplicado a uma amostra sanguínea tipo A negativa, a reagir com Anti-A (A-/A), Anti-B (A-/B), Anti-AB (A-/AB) e Anti-D (A-/D).	8
Figura 1.3 Microplaca de teste.	10
Figura 1.4 ID-Gel Card (adaptado de [13]).	11
Figura 1.5 Montagem do sistema Auto-Analyzer (adaptado de [15]).	13
Figura 1.6 Sistema Olympus PK7300 [21].	15
Figura 1.7 Sistema Immucor Galileo (adaptado [23]).	16
Figura 1.8 Sistema ORTHO AutoVue® Innova (adaptado de [25]).	17
Figura 1.9 Sistema TANGO® Optimo (adaptado de [26]).	17
Figura 1.10 Sistema Techno TwinStation [27].	18
Figura 1.11 Sistema clássico Plus ID-GelStation [28].	18
Figura 1.12 Sistema Qwalys (adaptado de [29]).	19
Figura 1.13 Observação da reação para identificação dos grupos ABO e Rh (adaptado de [30]).	19
Figura 1.14 MDMulticard com tecnologia de fluxo lateral (adaptado de [31]).	21
Figura 2.1 Constituição do espectro eletromagnético (adaptado de [35]).	27
Figura 2.2 Fenómeno de absorção quando um feixe de radiação atravessa uma solução (adaptado de [35]).	29
Figura 2.3 Espectro de absorção ótica para o tipo sanguíneo A (adaptado de [32]).	31
Figura 2.4 Partícula de pequenas dimensões: dispersão de Rayleigh (adaptado de [41]).	36
Figura 2.5 Partícula de grandes dimensões: dispersão de Mie (adaptado de [41]).	36
Figura 2.6 Contribuições espectrais (DO/Coeficiente de extinção em função do comprimento de onda (nm)) de todos os componentes do sangue. O espectro de cada um dos compostos está dependente das suas propriedades como o tamanho e a composição (adaptado de [39]).	37
Figura 2.7 Representação do ângulo de aceitação. O raio do detetor e a sua distância à amostra determina a quantidade de luz dispersa capturada pelo espectrofotómetro (adaptado de [40]).	38

Figura 2.8 Espectro de DO em função do comprimento de onda (nm) de eritrócitos em suspensão e de hemoglobina em solução, obtidos pelo espectrofotômetro Agilent 8453 Diode Array (adaptado de [40]).	40
Figura 2.9 Espectro de DO em função do comprimento de onda (nm) de eritrócitos em suspensão e de hemoglobina em solução, obtidos pelo espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 900 (adaptado de [40]).	40
Figura 2.10 Espectro de DO em função do comprimento de onda (nm), de eritrócitos em suspensão e de hemoglobina em solução obtidos pelo espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 18 (adaptado de [40]).	41
Figura 3.1 Montagem experimental completa, para aquisição dos espectros de DO.	46
Figura 3.2 Setup experimental do sistema ótico, evidenciando-se os vários componentes.	46
Figura 3.3 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).	47
Figura 3.4 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo B a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).	47
Figura 3.5 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo O a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).	48
Figura 3.6 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).	48
Figura 3.7 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul clara).	49
Figura 3.8 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo B a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul claro).	49
Figura 3.9 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo O a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul claro).	49
Figura 3.10 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue Rh positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja).	51
Figura 3.11 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue Rh negativo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja).	52

Figura 3.12 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul), com reagente monoclonal Anti-A (curva vermelha) e com reagente monoclonal Anti-B (curva verde).	53
Figura 3.13 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo B a reagir com PBS (curva azul), com reagente monoclonal Anti-A (curva vermelha) e com reagente monoclonal Anti-B (curva verde).	53
Figura 3.14 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O a reagir com PBS (curva azul), com reagente monoclonal Anti-A (curva vermelha) e com reagente monoclonal Anti-B (curva verde).	54
Figura 3.15 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul), com reagente monoclonal Anti-A (curva vermelha) e com reagente monoclonal Anti-B (curva verde).	54
Figura 3.16 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul) e com reagente monoclonal Anti-AB (curva azul claro).	55
Figura 3.17 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul) e com reagente monoclonal Anti-AB (curva azul claro).	55
Figura 3.18 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue Rh positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente polyclonal Anti-D (curva laranja).	56
Figura 3.19 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue Rh negativo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente polyclonal Anti-D (curva laranja).	56
Figura 3.20 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo A positivo a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde), por aplicação do protocolo I.	57
Figura 3.21 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo A positivo a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde), por aplicação do protocolo II.	58
Figura 3.22 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo A positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja), por aplicação do protocolo I.	58
Figura 3.23 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo A positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja), por aplicação do protocolo II.	58

Figura 4.1 Setup experimental do sistema ótico, evidenciando-se os vários componentes.	62
Figura 4.2 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A positivo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).	63
Figura 4.3 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O positivo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).	63
Figura 4.4 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo B negativo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).	64
Figura 4.5 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo AB negativo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).	64
Figura 4.6 Setup experimental do sistema ótico, evidenciando-se o aumento da distância entre a lâmina e a caixa que contém o fotodíodo.	66
Figura 4.7 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A negativo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).	67
Figura 4.8 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O positivo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).	67
Figura 5.1 Setup experimental com a utilização de LEDs.....	70
Figura 5.2 Valores de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo A negativo, com a utilização de uma série discreta de três LEDs.	71
Figura 5.3 Valores de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo B positivo, com a utilização de uma série discreta de três LEDs.....	71
Figura 5.4 Valores de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo O positivo, com a utilização de uma série discreta de três LEDs.....	71
Figura 5.5 Valores de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo AB negativo, com a utilização de uma série discreta de 3 LEDs.....	72
Figura 5.6 Diagrama de blocos do sistema automático.	73
Figura 5.7 Circuito controlador de tensão e corrente no LED.....	74
Figura 5.8 Conversor corrente-tensão.	76

Figura 5.9 Circuito utilizado para a conversão dos valores de corrente no fotodiodo em tensões, posteriormente adquiridas pelo microcontrolador (adaptado de [53]).	76
Figura 5.10 Valores de DO discretos obtidos para uma amostra de sangue tipo B negativo, com o acoplamento de todos os componentes eletrônicos.	77
Figura 5.11 Interface do dispositivo com o utilizador – exemplo de teste.	81
Figura 5.12 Curvas teórica e real de conversão do ADC.	83
Figura 5.13 Configuração do sistema protótipo em AutoCAD.	84
Figura 5.14 Configuração das placas PCBs em relação à lâmina de teste.	85
Figura 5.15 Tampa das placas de poliestireno normalmente utilizadas para cultura de células.	85
Figura 5.16 Lâmina de teste utilizada no protótipo implementado.	86
Figura 5.17 Valores de Transmitância para uma lâmina convencional em vidro (curva azul) e para uma lâmina de poliestireno obtida a partir de uma tampa de uma placa de cultura de células.	86
Figura 5.18 Lâmina com quatro regiões de teste produzida através do processo de termoformação.	87
Figura 5.19 PCB com sistema de iluminação (LEDs, resistências e multiplexer): esquemático (a) e respetiva board (b).	88
Figura 5.20 PCB com sistema de leitura (fotodiodos e conversor corrente-tensão): esquemático (a) e respetiva board (b).	89
Figura 5.21 PCB com sistema de iluminação (LEDs, resistências e multiplexer).	90
Figura 5.22 PCB com sistema de leitura (fotodiodos e conversor corrente-tensão).	90
Figura 5.23 (a) Componentes do sistema protótipo; (b) Configuração do sistema (dimensões exteriores do dispositivo: 150 mm × 120 mm × 70 mm); (c) mecanismo de inserção da placa de teste.	91
Figura 5.24 Circuito regulador de tensão (5V) implementado (adaptado de [59]).	92
Figura 5.25 PCB com circuito regulador: esquemático (a) e respetiva board (b).	92
Figura 5.26 Sistema de energia utilizado para alimentação dos multiplexers e conversores corrente-tensão.	93
Figura 5.27 Circuito regulador de tensão (3,3 V) implementado [61].	94
Figura 6.1 Valores discretos de DO para uma amostra de sangue tipo A negativa na presença: Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva violeta).	98
Figura 6.2 Valores discretos de DO para uma amostra de sangue tipo O positiva na presença: Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva violeta).	98
Figura 6.3 Sistema final: (a) vista exterior; (b) vista superior do dispositivo sem a tampa de proteção, evidenciando-se os componentes.	100
Figura 6.4 Saída do microcontrolador, como resultado de um teste de tipagem sanguínea a uma amostra de sangue tipo AB negativo.	101

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Sistema sanguíneo ABO [5].....	4
Tabela 1.2 Reações de aglutinação ABO [11].....	8
Tabela 1.3 Reações de aglutinação Rh [9].	9
Tabela 1.4 Métodos para determinação do tipo sanguíneo.	23
Tabela 3.1 Tipo de amostras obtidas através da reação de amostras de sangue ABO-Rh com reagentes anticorpos (X – amostra aglutinada).	45
Tabela 5.1 Variação média de DO entre os comprimentos de onda discretos, para amostras aglutinadas e não aglutinadas.....	72
Tabela 5.3 Estimativa dos custos de implementação do protótipo.	95
Tabela 6.1 Variação média das diferenças entre os valores discretos de DO para as amostras aglutinadas e não aglutinadas.	98
Tabela 6.2 Desvio padrão das diferenças entre os valores discretos de DO para as amostras aglutinadas e não aglutinadas.....	99
Tabela 6.3 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo AB negativo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).....	101
Tabela 6.4 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo A positivo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).....	102
Tabela 6.5 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo B negativo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).....	102
Tabela 6.6 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo O positivo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).....	102

Nomenclatura

Acrónimos

Acrónimo	Significado
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
DO	Densidade Ótica
LEDs	<i>Light Emission Diodes</i>
u. a.	Unidades de absorvência
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
IA	Índice de Aglutinação
PEG	<i>Polyethylene Glycol</i>
IPS	Instituto Português do Sangue
ADC	<i>Analog-Digital Converter</i>
PCB	<i>Printed Circuit Board</i>
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i>
NiMH	<i>Nickel-Metal Hydride</i>

Variáveis

Símbolo	Significado	Unidade S.I
λ	Comprimento de onda	m
ν	Frequência	Hz
c	Velocidade da radiação	m/s
E	Energia da radiação	J
I_o	Intensidade de radiação do feixe incidente	W/m ²
I	Intensidade de radiação do feixe transmitido	W/m ²
T	Transmitância	
A	Absorvência	u. a.

$I_{\text{solução}}$	Corrente/Tensão do feixe de radiação transmitido através da solução	A ou V
I_{solvente}	Corrente/Tensão do feixe de radiação transmitido através do solvente	A ou V
A_{ex}	Absorvência experimental	u. a.
m	Índice de refração complexo	
n	Índice de refração da partícula	
n_0	Índice de refração do meio	
κ	Coefficiente de absorção da partícula	
$\tau(\lambda)$	Componentes de absorção e dispersão da luz para um determinado comprimento de onda e para uma dada partícula	
N_p	Número de partículas por unidade de volume	m^3
D	Diâmetro da partícula	m
$f(D)$	Função distribuição do tamanho das partículas	m
Q_{dis}	Componente de dispersão de Mie	
Q_{abs}	Componente de absorção de Mie	
α	Parâmetro relacionado com o diâmetro da partícula	
V_r	Queda de tensão na resistência de controlo	V
V_{LED}	Queda de tensão no LED	V
I_{LED}	Corrente elétrica que atravessa o LED	A
Den_{Ot}	Vetor que contém os três valores de DO de uma amostra para os comprimentos de onda 406 nm, 566 nm e 956 nm.	
$diferença_1$	Diferença de DO entre os comprimentos de onda 406 nm e 566 nm	u. a.

<i>diferença_2</i>	Diferença de DO entre os comprimentos de onda 566 nm e 956 nm	u. a.
<i>limite_maior</i>	Valor limite experimental obtido baseado na variável <i>diferença_1</i>	u. a.
<i>limite_menor</i>	Valor limite experimental obtido baseado na variável <i>diferença_2</i>	u. a.
<i>diferença_média_total</i>	Média das diferenças: <i>diferença_1</i> e <i>diferença_2</i>	u. a.
<i>limite_total</i>	Valor limite experimental obtido baseado na variável <i>diferença_média_total</i>	u. a.

Constantes

Símbolo	Significado	Valor
<i>h</i>	Constante de Planck	$6,626176 \times 10^{-34}$ J.s

Capítulo 1 – Introdução

O presente capítulo apresenta uma pequena descrição dos conceitos teóricos associados ao sangue humano, ou seja, a sua constituição e os seus vários tipos. Para além disso, são abordados os sistemas e métodos já existentes para determinação do tipo sanguíneo, bem como as suas vantagens e desvantagens. São ainda relatados a motivação e os objetivos da dissertação bem como a estrutura deste documento. Apresentam-se, no final do capítulo, os resultados da atividade científica desenvolvida no âmbito do trabalho.

1.1 Sangue Humano: constituição

O sangue é um componente essencial à vida [1]. Este apresenta inúmeras funções no corpo humano, sendo as principais o controlo da temperatura corporal e a viabilidade celular, através do transporte de calor, oxigénio, nutrientes, dióxido de carbono e produtos resultantes do metabolismo celular [2, 3]. O corpo humano possui cerca de cinco litros de sangue que circulam continuamente numa rede de vasos [1, 2]. O sangue constitui cerca de 8% do peso corporal total [1]. No entanto, a sua quantidade depende de vários fatores, entre os quais a idade, o sexo, o peso, entre outros [2].

O sangue é constituído por um fluido principal, o plasma sanguíneo, e por um conjunto de componentes celulares, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas [1]. Todos estes elementos apresentam uma função bem definida [2, 3]. Para além disso, estes compostos podem ser isolados e testados em laboratório dando informações vitais do estado de saúde de cada pessoa [1, 2]. De facto, a análise do sangue é a principal forma de diagnóstico de doenças e contribui para o sucesso de procedimentos que visam o salvamento de vidas, como as transfusões sanguíneas e os transplantes de medula [2].

Cerca de 40% do volume sanguíneo é constituído por eritrócitos, também designados de glóbulos vermelhos [3]. Estas células não têm a capacidade de se movimentar ativamente, pelo que apenas se movem através das forças responsáveis pela circulação sanguínea. São continuamente produzidos na medula óssea e a sua forma, se no estado normal, assemelha-se a uma esfera bicôncava com um diâmetro médio de 7,5 μm , com as extremidades mais espessas que o centro da célula [1, 3]. Os glóbulos vermelhos têm características específicas, uma vez que necessitam de resistir à elevada pressão nos grandes vasos sanguíneos e, ao mesmo tempo, ter uma elevada elasticidade para circular nos pequenos capilares [3]. O componente principal dos glóbulos vermelhos é uma proteína molecular designada hemoglobina.

Esta ocupa cerca de um terço do volume total da célula e é responsável pela sua cor vermelha [1]. A principal função dos eritrócitos é o transporte de gás no sangue, ou seja, a transferência de oxigénio, dos pulmões para os tecidos, e de dióxido de carbono, dos tecidos para os pulmões. Tal capacidade deve-se à presença de hemoglobina nos eritrócitos [1-3]. Por fim, é ainda de referir que cerca de 2,5 milhões de eritrócitos são destruídos por segundo, sendo uma perda pouco significativa, uma vez que existem cerca de 25 triliões contidos na circulação de um adulto normal. Para além disso, os eritrócitos destruídos são substituídos por outros, em cada segundo, por um processo designado por eritropoiese¹ [1].

Os leucócitos ou também chamados de glóbulos brancos representam cerca de 1% do volume sanguíneo [3]. São células claras ou esbranquiçadas, com um núcleo, responsáveis pela proteção do corpo contra os microrganismos invasores, como bactérias, vírus e fungos [1, 3]. Para além disso, têm a capacidade de remover células mortas e corpos estranhos do organismo. Ao contrário dos eritrócitos, anteriormente abordados, a maioria dos leucócitos tem a capacidade de se movimentar através de projeções irregulares do citoplasma. Tendem a acumular-se nos locais de infeção, fagocitando bactérias e corpos estranhos. Existem cinco tipos de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos [1]. Cada um destes tipos é responsável por uma função específica e apresentam um diâmetro médio na gama de 7,5 – 22 µm. À semelhança dos eritrócitos, os leucócitos são produzidos na medula óssea e o seu tempo de vida pode ser muito variável, podendo ir de apenas a algumas horas até mais do que um ano [3].

As plaquetas, usualmente designadas por trombócitos, são os elementos sanguíneos mais pequenos, com um diâmetro médio de 3 µm e em forma de disco. A sua principal função é a capacidade de paragem de uma hemorragia [1, 3]. Esta habilidade é realizada pela formação de um agregado plaquetário que tem como função ocluir ruturas nos vasos e impedir o fluxo de sangue através das mesmas [1]. O processo de paragem de uma hemorragia é bastante complexo e envolve a participação de vários tipos de fatores de coagulação, existentes no plasma, que interagem com as plaquetas. Outra das funções das plaquetas é a estimulação do sistema imunitário [3]. É ainda de referir que as plaquetas são produzidas na medula e têm cerca de 5 a 9 dias de vida.

¹ Processo pelo qual novos eritrócitos são produzidos na medula óssea, em vários estágios e a partir de uma célula mãe, o hemacitoblasto [1] S. Rod, P. Tate, and S. Trent, *Anatomia & Fisiologia*, 1º ed., Lisboa: Lusodidacta, 2001, [2] K. Rogers, *Blood: Physiology and Circulation*, 1º ed., New York: Britannica Educational Publishing, 2011.

Por fim, o plasma representa cerca de 55% do volume sanguíneo. É uma solução complexa composta por mais de 90% de água, onde os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas se encontram dispersos [1, 2]. É também constituído por lípidos, açúcares, vitaminas, minerais, enzimas, hormonas, fatores de coagulação, proteínas e anticorpos [1, 3]. Uma vez que o sangue está em constante circulação por todo o corpo, o plasma é capaz de transportar alimento para as células sanguíneas e remover os produtos resultantes do metabolismo celular [2, 3]. Desempenha também um papel importante no transporte dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas e no controlo da pressão sanguínea e da homeostasia [2]. Dos restantes 10% das substâncias que constituem o plasma, as proteínas são as mais abundantes, sendo a proteína albumina a mais usual. Esta é importante na regulação do movimento da água entre os tecidos e o sangue [1, 2]. É ainda de referir que o volume plasmático mantém-se aproximadamente constante, uma vez que a quantidade de água absorvida pelo sistema digestivo corresponde à água excretada pelos rins, pulmões, tubo digestivo e pele [1]. Um conceito também importante é o significado de soro sanguíneo, que se refere a plasma sanguíneo no qual os fatores de coagulação do sangue foram removidos [3].

1.2 Grupos Sanguíneos

Se uma grande quantidade de sangue for perdida do organismo, o volume de sangue deve ser aumentado. Caso contrário, o doente poderá entrar em colapso cardiovascular, choque irreversível ou até mesmo morrer [4]. O processo de transferência de sangue é designado por “transfusão”. Contudo, os primeiros procedimentos realizados neste sentido traziam muitos problemas para o recetor, pois originavam reações pós-transfusionais graves, podendo mesmo originar a morte do doente. Sabe-se atualmente que tais reações são devidas às interações entre antigénios, presentes na superfície dos eritrócitos, e anticorpos, que se encontram no plasma sanguíneo. Os anticorpos são moléculas muito específicas que apenas combinam com um tipo de antigénio muito bem definido [1]. Portanto, quando um anticorpo do plasma se liga ao seu correspondente antigénio na superfície dos eritrócitos, ocorre um processo designado de aglutinação, ou seja há a formação de uma ponte molecular entre eritrócitos provocando a sua agregação [1, 3]. Para além disso, a interação anticorpo-antigénio (aglutinação) pode originar outras reações graves como a rutura dos eritrócitos [1].

Os antigénios presentes na superfície dos eritrócitos podem ser muito variados. Tais antigénios definem os grupos sanguíneos [1, 5]. A existência de tipos sanguíneos foi descoberta

no início do século XX, quando Landsteiner notou que o plasma de certos indivíduos aglutinava eritrócitos de outros [6].

Atualmente são reconhecidos várias dezenas de grupos de sangue, em que muitos são raros de encontrar. Os sistemas ABO e Rh são, atualmente, os mais importantes, no que diz respeito às transfusões sanguíneas [1, 5, 7]. No entanto, existem também outras classificações mais raras, como: Lewis, Duffy, MN, Kidd, Kell e Luterano [1]. Uma vez que o objetivo do presente trabalho é a criação de um dispositivo para identificação dos tipos sanguíneos ABO e Rh, apenas estes serão abordados seguidamente.

1.2.1 Sistema ABO

O sistema sanguíneo ABO – tabela 1.1 – é definido pela existência de antígenos na superfície dos eritrócitos do tipo A (sangue do tipo A), do tipo B (sangue do tipo B) ou ambos os tipos (sangue do tipo AB). Podem existir ainda eritrócitos que não têm antígenos A nem B (sangue do tipo O) [1, 5, 7, 8].

No que diz respeito ao plasma sanguíneo, um indivíduo com sangue do tipo A contém anticorpos do tipo B que atacam os antígenos tipo B. Seguindo a mesma lógica, o plasma sanguíneo de um indivíduo com sangue tipo B contém anticorpos tipo A [1, 7, 8]. Portanto, o plasma de um dado tipo sanguíneo contém o isoanticorpo natural (Anti-A e/ou Anti-B) que corresponde ao antígeno que não está presente na superfície dos seus eritrócitos [5]. Por essa razão o tipo sanguíneo AB não contém nenhum anticorpo no seu plasma e o sangue do tipo O contém os anticorpos A e B [1, 5, 8].

Tabela 1.1 Sistema sanguíneo ABO [5].

Grupos sanguíneos	Antígenos eritrocitários	Anticorpos plasmáticos
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	Não tem
O	Não tem	Anti-A e Anti-B

A definição de dador é aquele que doa sangue para um recetor, que é quem o recebe após perda de grandes quantidades de sangue [1]. Contudo, as transfusões de sangue podem tornar-se perigosas se, por exemplo, é transportado um antígeno para um recetor que contém

anticorpos dirigidos a ele (incompatibilidade ABO), levando à ocorrência de aglutinação ou até mesmo à rutura dos eritrócitos [4, 5]. Outras reações pós-transfusionais graves podem ocorrer como consequência da aglutinação dos eritrócitos, sendo o risco do paciente proporcional à quantidade de sangue incompatível transfundido [4]. Assim, normalmente só se praticam transfusões entre dadores e recetores do mesmo grupo sanguíneo, ou seja, um indivíduo com sangue do tipo A doa a um recetor do tipo A, garantindo que não ocorre reação ABO à transfusão. Pelo contrário, se um dador do tipo A doa sangue a um indivíduo tipo B, por exemplo, haverá reação à transfusão, ou seja, aglutinação, uma vez que o recetor contém anticorpos tipo A que atacam os antígenos tipo A dos eritrócitos fornecidos pelo dador – figura 1.1 [1, 3].

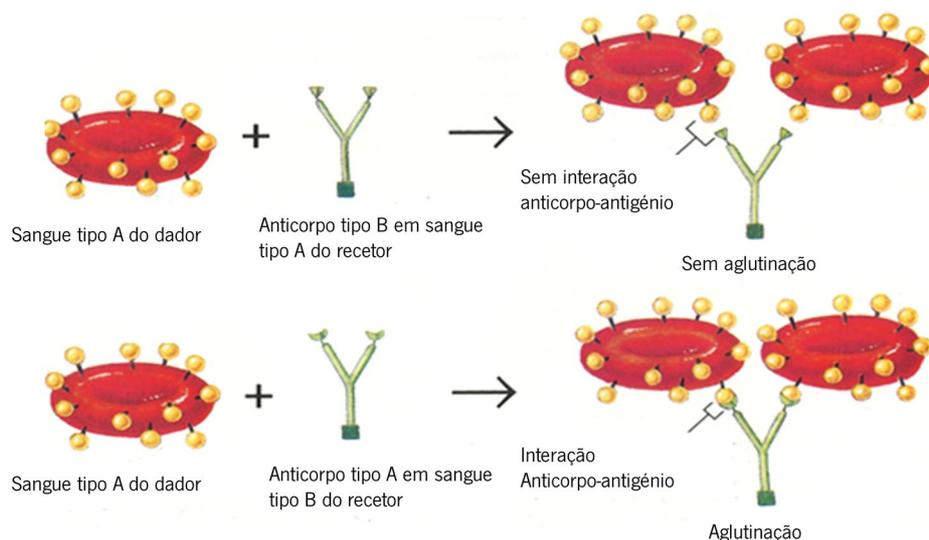


Figura 1.1 Reação de aglutinação. Sangue do tipo A num recetor do mesmo tipo não causa aglutinação porque os anticorpos tipo B do recetor não combinam com os antígenos tipo A do dador. Pelo contrário, sangue do tipo A num recetor tipo B causa aglutinação porque os anticorpos tipo A do recetor combinam com os antígenos tipo A do dador (adaptado de [1]).

Contudo, o tipo sanguíneo O é considerado dador universal, uma vez que não tem antígenos na superfície dos eritrócitos, e por essa razão, é muitas vezes administrado a doentes em que a transfusão se realiza em casos de emergência, ou seja, quando não há tempo suficiente para a determinação do seu tipo sanguíneo. É de realçar no entanto que, o termo dador universal pode ser falacioso, uma vez que podem ocorrer reações transfusionais entre os anticorpos do dador e os antígenos do recetor. Tal facto pode ser possível uma vez que o sangue do tipo O contém anticorpos do tipo A e B, ou seja, quando administrado a uma pessoa

do tipo B, por exemplo, os anticorpos B podem atacar os antígenos B do recetor [1, 5]. Estas reações após transfusão são pouco incidentes, porque os anticorpos do dador são, normalmente, diluídos no sangue do recetor. Ainda assim, são reais e passíveis de ocorrer, e por esta razão não se praticam, salvo em situações de extrema urgência, transfusões entre grupos diferentes [1]. Para terminar, é de referir ainda que as reações inesperadas após transfusão, referidas anteriormente, podem ocorrer quando se leva em conta que o tipo de sangue AB é considerado recetor universal, devido ao facto de este não conter anticorpos no seu plasma [5].

1.2.2 Sistema Rhesus (Rh)

O sistema sanguíneo Rh foi descoberto em 1940, onde cerca de 85% da população era caracterizada como Rh positiva e os restantes 15% como Rh negativa [9]. O sistema sanguíneo Rh é bastante complexo, com vários antígenos. Contudo o termo Rh positivo é normalmente utilizado quando uma pessoa tem um antígeno Rh específico na superfície dos seus eritrócitos, o antígeno D. Pelo contrário, se o antígeno D está ausente então diz-se que o indivíduo é Rh negativo [1, 5, 8, 9]. Os sistemas ABO e Rh são normalmente utilizados em conjunto, ou seja, alguém com um tipo de sangue A positivo, tem sangue tipo A no sistema ABO e Rh positivo no sistema Rh [1].

O sistema Rh não contém anticorpos naturais, ou seja, os anticorpos dirigidos para os antígenos D não se desenvolvem a não ser que um indivíduo Rh negativo receba sangue Rh positivo, portanto, entre em contacto com o antígeno D. O contacto com este antígeno pode ocorrer de duas formas: através de uma transfusão sanguínea de sangue Rh positivo ou em caso de gravidez, em que pode ocorrer transferência de sangue entre um feto Rh positivo e uma mãe Rh negativa. O desenvolvimento de anticorpos D, numa pessoa Rh negativa, pode trazer alguns problemas. Tais complicações ocorrem quando a pessoa Rh negativa recebe uma segunda transfusão sanguínea Rh positiva, desenvolvendo uma reação após transfusão devido ao ataque dos anticorpos D aos antígenos do mesmo tipo. Para além disso, uma nova gravidez pode provocar doença hemolítica do recém-nascido, ou seja, os anticorpos D, que o sangue da mãe Rh negativa desenvolveu anteriormente, podem atravessar a placenta e provocar aglutinação e hemólise dos eritrócitos do feto Rh positivo (com antígeno D). Por estas razões e pelas já explicadas anteriormente, noutras secções deste capítulo, é normalmente administrado sangue do tipo O negativo, em caso de risco de vida e quando não há tempo para a determinação do tipo sanguíneo do doente em risco [1, 5, 7].

1.3 Estado da Arte: métodos para determinação do tipo de sangue

Uma vez explicados os conceitos teóricos associados às principais características do sangue, aos grupos sanguíneos e às transfusões é, de seguida, apresentada uma pequena descrição dos métodos existentes para a determinação do tipo de sangue ABO-Rh. Para tal, serão descritos os métodos manuais e, posteriormente, os vários sistemas que ao longo dos anos surgiram para automatizar esses procedimentos. Para terminar, serão ainda apresentadas um conjunto de abordagens, relativamente recentes, utilizadas para a determinação dos tipos sanguíneos.

A determinação do tipo sanguíneo é um processo no qual o principal objetivo é determinar quais antígenos estão presentes na superfície dos eritrócitos e quais estão ausentes. Este pode ser confirmado através do teste reverso, que consiste em determinar que anticorpos estão presentes no correspondente plasma sanguíneo [10].

1.3.1 Métodos Manuais

Os métodos manuais para a determinação do tipo sanguíneo são métodos que exigem um técnico especializado que realiza os procedimentos do teste e faz a leitura e interpretação dos resultados, ou seja, verifica a presença da interação antígeno-anticorpo ou, por outras palavras, da aglutinação [9, 10].

As técnicas manuais para determinação do tipo de sangue não mudaram radicalmente ao longo dos anos. A grande maioria continua a basear-se na interação antígeno-anticorpo e na consequente observação ou medição da aglutinação.

1.3.1.1 Teste em Lâmina

O procedimento do teste em lâmina consiste na utilização de uma lâmina na qual se mistura sangue, do indivíduo que se pretende determinar o tipo sanguíneo, com reagente específico, uma solução comercial de anticorpos. Para o caso da classificação do grupo sanguíneo ABO-Rh, são normalmente utilizadas quatro lâminas, uma para cada reagente: solução de anticorpos tipo A (Anti-A), tipo B (Anti-B), tipo AB (Anti-AB) e tipo D (Anti-D), representados na figura 1.2a. Após reação de cada mistura procede-se à observação, a olho nu, da presença ou ausência de aglutinação – figura 1.2b Uma reação positiva, ou seja, a existência de aglutinação identifica o antígeno presente na superfície dos eritrócitos que é do mesmo tipo do anticorpo contido no reagente onde se verificou a aglutinação. Portanto, pode dizer-se que é com base na observação da reação do sangue com cada um dos reagentes, ou seja, com base

Capítulo 1

na presença ou ausência de aglutinação, que se consegue concluir o tipo sanguíneo ABO-Rh [10, 11]. As tabelas 1.2 e 1.3 resumem as reações de aglutinação na determinação do sistema ABO e Rh, respectivamente [11].

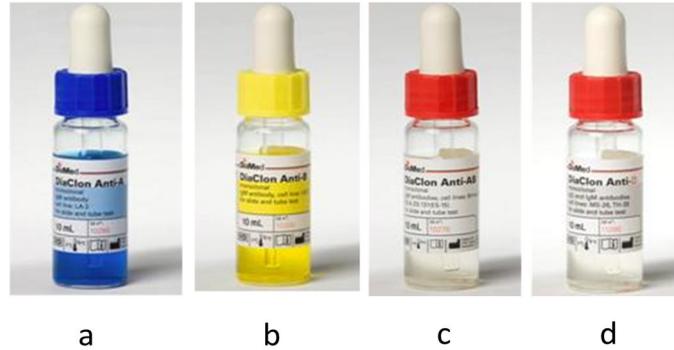


Figura 1.2a Reagentes para determinação do tipo sanguíneo: a – Anti-A, b – Anti-B, c – Anti-AB, d – Anti-D (adaptado de [12]).

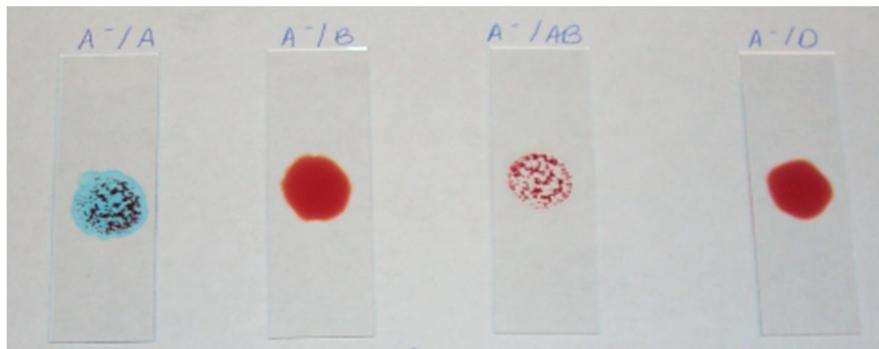


Figura 1.2b Teste em lâmina aplicado a uma amostra sanguínea tipo A negativa, a reagir com Anti-A (A/A), Anti-B (A/B), Anti-AB (A/AB) e Anti-D (A/D).

Tabela 1.2 Reações de aglutinação ABO (X: não ocorrência de aglutinação; ✓: ocorrência de aglutinação) [11].

Reagentes			Grupo sanguíneo
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	
X	X	X	O
✓	X	✓	A
X	✓	✓	B
✓	✓	✓	AB

Tabela 1.3 Reações de aglutinação Rh (X: não ocorrência de aglutinação; ✓: ocorrência de aglutinação) [9].

Reagente Anti-D	Grupo Sanguíneo
✓	Rh positivo
X	Rh negativo

As principais vantagens deste método são o facto de ser um teste rápido, económico, passível de ser automatizado e poder ser executado sem a necessidade de equipamentos específicos. Contudo, é uma técnica com pouca sensibilidade e muito subjetiva, já que o resultado de teste depende do técnico que o realiza a cada momento [10].

1.3.1.2 Teste em Tubo

O teste em tubo é um método muito comum, que tem sido utilizado ao longo dos anos, sendo um procedimento que nos dias de hoje continua em utilização. Este método passa pela mistura de reagentes com o sangue do paciente, num tubo de vidro ou plástico, onde a reação ocorre [10]. Os eritrócitos do paciente devem ser ajustados a uma concentração de 3% a 5% no plasma sanguíneo ou numa solução salina isotónica [10, 11]. Esta suspensão pode ser preparada utilizando sangue total ou apenas eritrócitos [11]. Posteriormente, parte dessa suspensão é misturada com os reagentes anticorpos Anti-A, Anti-B, Anti-AB ou Anti-D, num tubo de teste (um tubo de teste para cada reagente). Em seguida, cada tubo de teste é centrifugado a fim de permitir a aproximação dos glóbulos vermelhos e facilitar a aglutinação. Após a centrifugação, é realizada a leitura macroscópica da aglutinação por parte do técnico analista [9-11]. Em paralelo com o teste direto (determinação dos antígenos eritrocitários), explicado até agora, pode também ser realizado o teste reverso ABO, que consiste em fazer misturar o soro do paciente com uma suspensão de glóbulos vermelhos reagentes e proceder, posteriormente, à centrifugação e observação da aglutinação [10]. Portanto, este teste permite também a identificação de anticorpos no soro sanguíneo do doente.

A principal vantagem do teste em tubo é que é um método bastante sensível. Contudo é um teste difícil de automatizar uma vez que envolve a necessidade de realização de um conjunto de etapas manuais [10].

1.3.1.3 Teste em Microplaca

O teste da microplaca começou a ser utilizado em 1960. Uma microplaca, figura 1.3, pode ser definida como uma matriz de 96 pequenos tubos de teste. Após mistura dos reagentes

com o material do paciente (eritrócitos ou soro sanguíneo no saco do teste reverso) a placa é incubada e centrifugada, formando-se aglomerados, que são ressuspensos por agitação e para examinação da aglutinação [10]. As reações de aglutinação são normalmente lidas por inspeção visual [10]. Ao longo dos anos, foram introduzidas alterações no método da microplaca, entre as quais a criação de microplacas que têm incorporado os reagentes Anti-A, Anti-B e Anti-AB, permitindo que apenas os eritrócitos do paciente sejam introduzidos nas mesmas para posterior reação. Outra das variações é a introdução de enzimas proteolíticas, nos diferentes testes, de forma a aumentar a reatividade e força da reação [10].

As principais vantagens deste procedimento são a grande sensibilidade para as reações e o facto de minimizar o desperdício de reagentes. Para além disso, pode ser utilizado para a determinação tanto dos antigénios na superfície dos eritrócitos, como dos anticorpos presentes no plasma do paciente, pelo teste reverso. Relativamente às desvantagens, em relação aos métodos anteriormente descritos, tem-se o facto de ser mais dispendioso, pelos equipamentos que utiliza, e de normalmente ser um teste mais moroso [10].

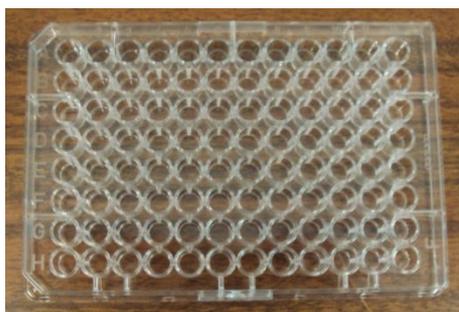


Figura 1.3 Microplaca de teste.

1.3.1.4 Tecnologia de Aglutinação em Coluna

Uma mudança significativa na forma como a aglutinação era visível foi introduzida em 1990 com a tecnologia de aglutinação em coluna, também designada de testes em ID-Gel Cards. Neste método, os aglutinados são capturados num microtubo que contém partículas de gel que irão reter os glóbulos vermelhos aglutinados e permitir que as células não aglutinadas passem através de uma coluna para a parte inferior. O método pode ser modificado para diferentes tipos de teste [10]. Um ID-Gel Card é constituído por seis microtubos fixos numa placa de plástico, figura 1.4.

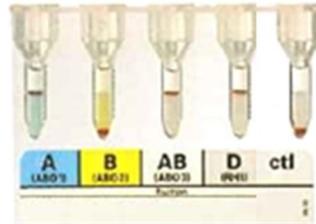


Figura 1.4 ID-Gel Card (adaptado de [13]).

Para o teste de determinação do tipo de sangue, envolvendo a determinação dos antígenos, as microcolunas contêm os reagentes Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D. Para o teste reverso, determinação dos anticorpos presentes no plasma, é utilizado um gel neutro e é colocada uma suspensão de eritrócitos reagentes e soro na parte superior da microcoluna, onde anticorpos e antígenos podem reagir. Após centrifugação e caso haja a ocorrência de aglutinação, os eritrócitos aglutinados são retidos em cima ou na coluna de gel, dependendo da força de reação. Se não ocorrer aglutinação, os glóbulos vermelhos passam através do gel e formam, na parte final do tubo, um sedimento, como pode ser observado no segundo microtubo (B) da figura 1.4 [10].

As principais vantagens deste método são referidas em relação ao teste clássico em tubo. Como principais benefícios destacam-se a facilidade de utilização, mesmo que a experiência laboratorial seja muito pouca; a estabilidade das reações por longos períodos de tempo; a necessidade de volumes de amostras mais reduzidos; e o facto de ser uma tecnologia que facilmente é automatizada. A principal desvantagem desta técnica tem a ver com o facto de ser um método moroso e dispendioso, pelos equipamentos que utiliza [10].

De uma forma geral pode, então, aferir-se que os métodos manuais para determinação do tipo de sangue baseiam-se, essencialmente, na mistura de uma suspensão de células com soluções de anticorpos e na examinação visual de aglomerados (aglutinação), por parte do técnico analista. Dos métodos manuais, o teste em tubo é o mais utilizado, embora o método em microplaca e os testes em ID-Gel Cards tenham uma crescente utilização. O método que permite de forma mais rápida a obtenção de resultados é o teste em lâmina [10].

1.3.2 Sistemas Automáticos para determinação do tipo sanguíneo

Os laboratórios de análise de sangue têm vindo a adotar a automação nos seus procedimentos. No entanto, o elevado custo associado à aquisição de sistemas automáticos, o seu elevado tempo para a produção de resultados (30 minutos no mínimo) e a grande oferta de

técnicos especializados e reagentes a baixo custo, faz com que os sistemas automáticos estejam a ser aplicados gradualmente [10]. Independentemente do procedimento utilizado para a determinação dos tipos sanguíneos, o fundamental é gerar-se sempre o resultado correto, uma vez que os riscos associados a uma transfusão errada podem ser demasiado elevados. Sabe-se que a melhor forma de reduzir a possibilidade de erro num laboratório é reduzir o número de etapas de um processo e reduzir o número de interações entre o analista e o sistema [9, 10]. Assim, a introdução de novos métodos automáticos é um dos passos fulcrais para aumentar a segurança do paciente e minimizar a subjetividade dos métodos manuais para determinação do tipo de sangue [10].

Atualmente existe já no mercado um conjunto de sistemas, que variam desde semiautomáticos até completamente automáticos, sendo que a tendência é a criação de máquinas com a capacidade de realizar cada vez mais etapas automaticamente, a fim de maximizar a eficiência dos procedimentos [10].

1.3.2.1 Sistema TIC Auto-Analyzer

A primeira máquina que surgiu na tentativa de automatizar os testes de determinação do tipo sanguíneo foi o sistema TIC Auto-Analyzer. Este surgiu em 1967 e utiliza uma tecnologia de fluxo contínuo. É capaz de realizar os testes sanguíneos ABO e Rh. Contudo, envolve a intervenção de um técnico para identificar as amostras, ler as reações, interpretar os resultados e registá-los [3, 14, 15]. O sistema TIC AutoAnalyzer foi amplamente divulgado, embora atualmente já não seja comercializado. O seu custo rondava os cerca de trinta mil dólares [14].

Uma montagem do sistema TIC Auto-Analyzer é apresentada na figura 1.5. Os reagentes são introduzidos individualmente no sistema através de tubos de plástico. Estes avançam para uma bomba peristáltica, com velocidade constante, que permite que o conteúdo avance de maneira estável e uniforme. Soros ou células sanguíneas e reagentes são misturados e segmentados por bolhas de ar a fim de evitar a mistura de amostras sucessivas, ou seja, o fluxo contínuo de material é fragmentado. Os reagentes movem-se através de tubos de vidro com formato de bobine que permitem a criação de uma mistura homogénea e facultam o tempo necessário para que a reação antigénio-anticorpo ocorra. Posteriormente, a mistura passa por tubos de sedimentação para que qualquer tipo de aglutinação sedimente. As células aglutinadas são depois filtradas e as restantes são hemolisadas por uma solução específica. Por fim, a densidade ótica do hemolisado é medida num colorímetro de fluxo contínuo e os resultados são

registados. É de referir ainda que a densidade ótica do hemolisado é tanto menor quanto maior o número de células aglutinadas que foram, anteriormente, removidas [16].

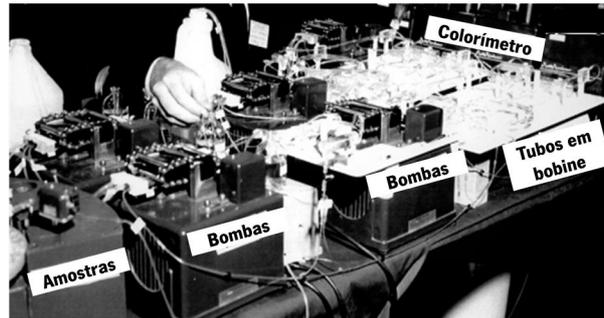


Figura 1.5 Montagem do sistema Auto-Analyzer (adaptado de [15]).

1.3.2.2 Sistema Groupamatic

O sistema Groupamatic surgiu seis anos depois do sistema TIC Auto-Analyzer. Foi desenvolvido em França pelo Centro Nacional de Transfusão Sanguínea e representa uma versão robotizada dos métodos de teste manuais. É um sistema com grande precisão devido ao facto de ter incorporado o processamento de dados [15].

É constituído por duas unidades base: uma eletroquímica para realização das reacções de aglutinação e uma eletrónica para processamento e aquisição de dados. É um equipamento semiautomático, uma vez que a amostra de sangue é centrifugada e posteriormente introduzida manualmente na unidade eletroquímica. Relativamente ao procedimento automático de teste uma suspensão de células é inicialmente incubada com bromelina durante 15 minutos. Após incubação, as células são transferidas para um conjunto de discos e misturadas com reagentes de forma a promover a reacção de aglutinação. As misturas são depois incubadas, centrifugadas e agitadas. Todos estes procedimentos permitem que as células aglutinadas se posicionem na área central do disco e as células livres fiquem em suspensão na periferia. Para terminar, faz-se a leitura das amostras por fotometria, em que cada um dos discos, referidos anteriormente, passa através de um espaço entre uma fonte de luz e um sistema de leitura. Por cada unidade são efetuadas duas leituras, uma na área central e outra na periférica (área anelar), de forma a comparar a opacidade das duas áreas e concluir acerca da presença ou ausência de aglutinação. O processamento dos dados e a impressão de resultados é realizado pela unidade eletrónica permitindo a determinação dos grupos sanguíneos ABO, Rh, Kell, entre outros. Relativamente ao processamento de dados, este passa pela comparação da medição da área central com a da área periférica para cada unidade. Uma reacção negativa (não ocorrência de

aglutinação) caracteriza-se por uma ausência da variação da intensidade da luz. Pelo contrário, uma reação positiva é definida pela variação da intensidade da luz entre as duas áreas. O equipamento produz um resultado positivo ou negativo através da comparação de um valor (variação da intensidade) com um dado *threshold*² que deve ser ajustado experimentalmente. Para terminar, este equipamento tem a capacidade de processar cerca de 340 amostras por hora e atualmente já não se encontra em comercialização [18].

1.3.2.3 Sistema AutoGrouper

De forma a competir com o sistema Groupamatic, a TIC introduziu o sistema AutoGrouper que é uma nova versão do sistema TIC Auto-Analyzer. Em relação à versão anterior, o sistema AutoGrouper incorpora um laser para leitura dos números da amostra e integração desses com a máquina de interpretação de resultados. De facto, estas duas tecnologias (sistemas Groupamatic e AutoGrouper) foram amplamente difundidas pelo mundo a partir do ano de 1970, apesar de hoje em dia já não serem comercializadas [15].

1.3.2.4 Sistema Olympus

No final do ano de 1980 surgiu o sistema Olympus que se baseia numa tecnologia única de microplaca, sem a necessidade de centrifugação. É um sistema automático utilizado para a deteção de reações de aglutinação [15].

Relativamente ao procedimento de teste, a determinação da aglutinação passa pela mistura das células eritrocitárias do paciente com os anticorpos na microplaca e uma incubação da mistura durante 60 minutos a 30°C. Uma reação positiva ou negativa, ou seja, com ou sem aglutinação, é caracterizada consoante a distribuição das células na microplaca. No caso da existência de uma camada homogénea de células o teste é positivo. Pelo contrário, um resultado negativo aparece na forma de agregado compacto e denso de células. Uma câmara CCD (*Charge Coupled Device*) capta a imagem em cada tubo de teste que é posteriormente analisada com vista ao reconhecimento do padrão de distribuição das células, diferenciando assim padrões de aglutinação de padrões não aglutinados [19, 20].

Este sistema tem capacidade para processar cerca de 240 amostras por hora. Para além disso, pode realizar testes aos sistemas ABO, Rh e Kell. Como principal vantagem destaca-se a elevada precisão analítica. Como desvantagens salientam-se o tempo de teste e a dimensão

² Valor limite, a partir do qual é produzido um dado efeito ou resultado, ou ainda é ativada uma resposta [17]
T. F. Dictionary. "Threshold," 10 de Março, 2012; <http://www.thefreedictionary.com/threshold>.

da máquina [19]. Este sistema encontra-se, ainda, no mercado e a figura 1.6 é uma representação da terceira geração da máquina, apresentada em 2005 [21].



Figura 1.6 Sistema Olympus PK7300 [21].

1.3.2.5 Sistema Immucor Galileo

O sistema Galileo, figura 1.7, utiliza a tecnologia de microplaca para determinação dos grupos sanguíneos [10]. Este instrumento é um sistema robotizado e programado para mover todas as microplacas necessárias, reagentes e amostras de sangue para as áreas de processamento de um ensaio imunohematológico, na sequência correta. O programa calcula o valor de cada reação a partir de uma imagem que é capturada nos microtubos de teste, cujo valor é importante para interpretação dos resultados [22]. O sistema Galileo apresenta como principais características: a grande flexibilidade de tarefas, com a capacidade de aceder a amostras e reagentes sem interrupção, realizar múltiplos testes para cada amostra e visualizar resultados mesmo quando em execução de procedimentos; rápida operabilidade; e interface muito intuitiva quer a nível de *software* como *hardware* [22, 23]. Portanto, é de referir que a utilização deste sistema permite a realização de testes de identificação do tipo de sangue com elevada sensibilidade e especificidade quando comparados com os métodos manuais de determinação do tipo de sangue. Para além disso, pode ser utilizado como um sistema independente ou integrado com o sistema de informação do laboratório [22]. Como principais desvantagens salientam-se a dimensão da máquina, e o tempo de teste que representa mais de 60 minutos [22]. É um sistema ainda em comercialização [23].



Figura 1.7 Sistema Immucor Galileo (adaptado [23]).

1.3.2.6 Sistema ORTHO AutoVue Innova

O sistema ORTHO AutoVue Innova, figura 1.8, foi desenvolvido para automatizar um conjunto de testes de imunohematologia como a determinação dos grupos sanguíneos, utilizando a tecnologia de cassetes do sistema Ortho BioVue e a edição de imagem digital [10, 24]. A tecnologia Ortho BioVue assemelha-se ao método de aglutinação em coluna que usa uma matriz de esferas de vidro em vez de esferas de gel, o que permite reduzir o tempo de centrifugação [10]. Este sistema tem a capacidade de automatizar diversas funções como a pipetagem líquida, a incubação, a centrifugação e a interpretação de resultados. À semelhança do sistema abordado anteriormente, pode ser utilizado como um sistema independente ou integrado com o sistema de informação do laboratório. O princípio de medição e classificação é baseado numa câmara CCD que lê as partes da frente e de trás das cassetes BioVue cerca de 25 vezes. A interpretação da reação é feita utilizando um programa de processamento de imagem e um algoritmo de classificação. A imagem original de cada cassete pode ser armazenada num disco ou DVD no formato JPG [24].

O procedimento de teste é baseado na tecnologia de aglutinação em coluna, em que as colunas contêm reagentes e esferas de vidro. Através da centrifugação das cassetes os eritrócitos aglutinados formam uma camada no topo da mistura enquanto que os glóbulos vermelhos não aglutinados depositam-se na parte inferior da coluna. O sistema de cassetes da Ortho BioVue consiste em 6 colunas que contêm reagentes em solução. O tempo de teste é variável. Por exemplo, a identificação do tipo sanguíneo com a determinação dos anticorpos plasmáticos necessita de cerca de 25 minutos. No entanto, se os antígenos presentes na amostra sanguínea forem já conhecidos o tempo de análise pode ser reduzido para 22 minutos [24]. Como principais vantagens deste sistema tem-se a facilidade de utilização e o facto de reduzir a ocorrência de erro, uma vez que apresenta um conjunto de tarefas automatizadas [24, 25].



Figura 1.8 Sistema ORTHO AutoVue Innova (adaptado de [25]).

1.3.2.7 Sistema TANGO Optimo

O sistema TANGO Optimo é baseado na tecnologia de microplacas revestidas com anticorpos para determinação dos grupos sanguíneos [10]. É um sistema automático que requer um número de passos manuais bastante reduzido. Para além disso, combina a facilidade de utilização com a elevada precisão nos testes de imunohematologia. Este sistema é baseado nas técnicas de processamento de imagem para examinação da reação, sendo que o *software* da máquina é bastante intuitivo, pelo que permite uma rápida aprendizagem e controlo do sistema por parte do utilizador. Para terminar, é ainda de referir que pode ser associado ao sistema de informação do laboratório [26]. A figura 1.9 representa o sistema TANGO Optimo, ainda em comercialização.



Figura 1.9 Sistema TANGO Optimo (adaptado de [26]).

1.3.2.8 Sistema Techno TwinStation

O sistema Techno TwinStation, figura 1.10, baseia-se numa combinação das tecnologias ID-Gel Cards e microplacas [10]. Trata-se de um analisador automático e compacto, com elevada flexibilidade e facilidade de utilização. Tem uma elevada capacidade de carga e realiza

todo um conjunto de funções de forma automática, como a incubação, a pipetagem, a centrifugação, a leitura e a interpretação de resultados através de técnicas de processamento de imagem. Todas as operações são monitorizadas por um *software* específico. É capaz de realizar cerca de 360 testes por hora e pode ser utilizado em conjunto com o sistema de informação do laboratório, à semelhança de outros sistemas já abordados. Como principais desvantagens salientam-se a dimensão da máquina e o tempo de teste que representa mais de 60 minutos. Este sistema ainda se encontra em comercialização [27].



Figura 1.10 Sistema Techno TwinStation [27].

1.3.2.9 Sistema Plus ID-GelStation

O sistema Plus ID-GelStation é baseado na tecnologia de aglutinação em coluna, permitindo a determinação dos grupos sanguíneos e a deteção de anticorpos plasmáticos [10]. À semelhança do sistema anterior é um analisador automático, mas mais compacto, capaz de ser utilizado com o sistema de informação do laboratório e realizar todo um conjunto de tarefas automaticamente. Tem a capacidade de pode realizar cerca de 210 testes por hora. É um sistema que ainda se encontra em comercialização e a figura 1.11 é uma representação do mesmo [28].



Figura 1.11 Sistema clássico Plus ID-GelStation [28].

1.3.2.10 Sistema Qwalys

O sistema Qwalys, figura 1.12, é um sistema que utiliza a tecnologia de magnetização de eritrócitos. É utilizado para os testes de determinação dos antígenos eritrocitários e para os testes reversos de determinação dos anticorpos. A tecnologia associada ao sistema Qwalys elimina a necessidade de realização de centrifugação [10]. De entre as várias vantagens associadas a este sistema, destacam-se a elevada robustez, a simplicidade de utilização e a grande autonomia funcional. É um sistema que se encontra em comercialização, sendo utilizado por muitos laboratórios de análise de sangue em todo o mundo [29].



Figura 1.12 Sistema Qwalys (adaptado de [29]).

Relativamente à tecnologia de magnetização das hemácias, esta baseia-se na utilização de microplacas revestidas com reagentes e na utilização de hemácias magnetizadas (uso de partículas magnetizadas que se ligam à superfície das hemácias). Após a aplicação das microplacas numa placa magnetizada, o campo magnético atrai as hemácias magnetizadas para a parte inferior da microplaca, evitando assim a etapa de centrifugação. Após agitação e consoante a ocorrência de uma reação positiva (interação anticorpo-antígeno) ou negativa (ausência de interação) as hemácias têm comportamentos diferentes. Portanto, no caso de uma reação positiva mantêm-se estáveis no fundo da microplaca. Caso não ocorra reação, o aglomerado de glóbulos vermelhos desfaz-se sob o efeito da agitação – figura 1.13 [30].



Figura 1.13 Observação da reação para identificação da presença ou ausência de aglutinação (adaptado de [30]).

Como conclusões dos métodos automatizados, as principais razões para os laboratórios de análise de sangue introduzirem a automação são a necessidade de aumentar a segurança dos seus procedimentos e melhorar a eficiência dos mesmos. Os métodos manuais são, normalmente, subjetivos e necessitam de ser realizados por técnicos especializados. Assim, os métodos automatizados podem minimizar algumas destas desvantagens. Contudo a automação envolve instrumentação complexa, de grandes dimensões e bastante cara, não só na sua implementação como manutenção, e não se conseguem obter resultados tão rapidamente como nos testes manuais em lâmina ou em tubo, o que pode ser crítico, especialmente em situações de emergência.

1.3.3 Métodos recentes para determinação do tipo de sangue

Os métodos descritos seguidamente dizem respeito a técnicas que têm surgido na tentativa de tornar a determinação dos grupos sanguíneos mais simples e minimizar algumas limitações dos métodos anteriormente apresentados. Para além disso, são descritas tecnologias que estão ainda em investigação, algumas com grande potencial para aplicação futura nos laboratórios de análise de sangue [10].

1.3.3.1 Tecnologia MDmulticard

A tecnologia MDmulticard é baseada na tecnologia de fluxo lateral e permite num só ensaio determinar vários parâmetros de teste, nomeadamente determinar os sistemas sanguíneos ABO, Rh e Kell. Relativamente ao procedimento, no método de fluxo lateral são pipetados 100 μ L de sangue diluído ou apenas eritrócitos para a zona de aplicação do MDmulticard, seguido de 300 μ L de solução tampão. Os resultados podem ser obtidos após 5 minutos, pelo técnico de laboratório através de inspeção visual. Os resultados positivos são representados por bandas vermelhas distintas. Pelo contrário, resultados negativos são caracterizados pela ausência da respetiva banda. Tal teste está representado na figura 1.14 [10, 31].

Como vantagens deste método podem destacar-se a sua elevada sensibilidade e especificidade para a identificação dos grupos sanguíneos, a sua simplicidade e rapidez na obtenção de resultados e a não necessidade de realizar a etapa de centrifugação. Para além disso, é bastante útil para situações de emergência. Como principal desvantagem aponta-se o facto de não eliminar a subjetividade dos testes manuais para determinação do tipo de sangue,

uma vez que necessita de um técnico para interpretação e decisão final do resultado de teste [10, 31].

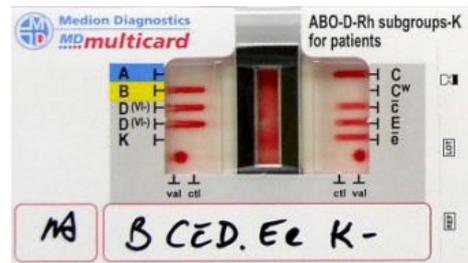


Figura 1.14 MDMulticard com tecnologia de fluxo lateral (adaptado de [31]).

1.3.3.2 Abordagem Molecular

A abordagem molecular tem por base um princípio bastante diferente para a determinação dos grupos sanguíneos. Esta investiga a informação genética no ADN do indivíduo, determinando assim que antígenos se encontram na superfície dos seus eritrócitos. Os métodos moleculares para determinação do tipo sanguíneo tornaram-se válidos há cerca de 10 anos, sendo que desde então as suas aplicações têm sido expandidas. Vários autores afirmam que esta nova abordagem pode combater algumas limitações dos métodos convencionais. A análise do ADN pode ainda determinar os antígenos expressos de forma fraca e alterada no organismo do paciente. De referir ainda que, os métodos moleculares reduzem a necessidade de utilização de reagentes para determinação dos grupos sanguíneos. Contudo, como todos os procedimentos, tem as suas limitações. As principais são as complicações genéticas que levam a que muitas vezes o fenótipo, ou seja, o que é expresso na superfície dos eritrócitos, seja diferente do genótipo, a informação contida nos genes [10].

1.3.3.3 Abordagem espectrofotométrica

Uma nova abordagem para a determinação dos tipos de sangue, baseada em espectrofotometria, foi já descrita por Narayanan *et al.* [32, 33]. Através deste método os autores demonstraram que, a determinação dos grupos sanguíneos é possível, através das diferenças significativas no espectro de DO (densidade ótica), das amostras de sangue tratadas com anticorpos, consoante a presença ou ausência de aglutinação. Para tal, utilizaram amostras de células (eritrócitos) ou amostras de sangue total, com as quais misturaram soluções de anticorpos e, posteriormente, fizeram uma análise da mistura com um espectrofotómetro comercial. Verificou-se que os grupos sanguíneos podem ser distinguidos comparando o declive do espectro de DO das amostras, especialmente entre os comprimentos de onda de 665 nm e

1000 nm. Portanto, os autores concluíram que com uma abordagem espectrofotométrica é possível realizar a distinção dos grupos sanguíneos ABO e Rh [32, 33].

Desde a publicação deste estudo surgiu um conjunto de trabalhos posteriores, com o objetivo de criar sistemas automatizados para determinação do grupo sanguíneo com base numa simples abordagem espectrofotométrica.

Steven Anthony [34] desenvolveu um sistema simples, à escala macro, baseado em apenas alguns comprimentos de onda discretos em gamas de interesse, em vez do espectro total de DO. Para tal utilizou uma combinação de LEDs (*Light Emission Diodes*) e fotodíodo.

Jeremy Lambert [9] desenvolveu um sistema miniaturizado baseado no sistema descrito por Steven Anthony [34] mas explorando a utilização de fibra ótica.

Por fim, Stewart Alexander [3] desenvolveu um sistema integrado microótico e microfluídico à base de material polimérico para deteção da aglutinação e, como consequência, determinação dos grupos sanguíneos. O sistema contém canais para o fluxo dos fluidos e cabos de fibra ótica precisamente colocados entre os canais de forma a detetar células aglutinadas.

1.3.3.4 Tecnologia em investigação

Uma tecnologia experimental que se pensa ser muito interessante para a determinação do tipo sanguíneo é o desenvolvimento de plataformas fluídicas sensíveis à massa/peso das amostras de sangue. Esta plataforma é constituída por uma microbalança de cristal de quartzo biologicamente funcional. O procedimento de teste passa pela imobilização de anticorpos específicos na superfície de um elétrodo de ouro. A adição de amostras de sangue pode originar a ligação anticorpo-antigénio, ou seja, os glóbulos vermelhos ligam-se à superfície do sensor, provocando uma diminuição detetável da frequência de ressonância. Esta abordagem permite obter os grupos sanguíneos de forma rápida e precisa. Para além disso, requer amostras de sangue de pequeno volume [10].

A tabela 1.4 apresenta um resumo de todos os métodos e sistemas existentes para determinação do tipo sanguíneo, bem como o tipo de tecnologia, o princípio de teste e as vantagens e desvantagens de cada um deles.

Tabela 1.4 Métodos para determinação do tipo sanguíneo.

Método/Sistema	Tipo de Tecnologia	Princípio	Principais Vantagens	Principais Desvantagens
Lâmina	Manual	Deteção visual da aglutinação	Rápido e Económico	Subjetivo
Tubo	Manual	Deteção visual da aglutinação	Rápido e Sensível	Subjetivo e difícil de automatizar
Microplaca	Manual	Deteção visual da aglutinação	Muito Sensível	+ Moroso e + Dispendioso
Aglutinação em coluna	Manual	Deteção visual da aglutinação	Fácil de realizar	+ Moroso e + Dispendioso
TIC AutoAnalyzer	Semiautomático	Fluxo contínuo	Automação de algumas etapas de tipagem sanguínea	Necessidade de intervenção humana na interpretação dos resultados
Groupamatic	Semiautomático	Fotometria	Muito preciso	Necessidade de intervenção humana e tempo de teste (> 15 minutos)
Olympus	Automático	Processamento de imagem	Preciso e não necessita de centrifugação	Elevado tempo de teste e grandes dimensões
Immucor Galileo	Automático	Processamento de imagem	Elevada Sensibilidade e Especificidade	Elevado tempo de teste, grandes dimensões e elevado custo.
ORTHO AutoVue Innova	Automático	Processamento de imagem	Fácil de utilizar	Tempo de teste relativamente elevado (\cong 25 minutos)
TANGO Optimo	Automático	Processamento de imagem	Preciso e Fácil de utilizar	Grande dimensão do sistema
Techno TwinStation	Automático	Processamento de imagem	Muito flexível e fácil de utilizar	Elevado tempo de teste e grande dimensão do sistema
Plus ID-GelStation	Automático	Processamento de imagem	Relativamente compacto	Elevado tempo de teste

Qwalys	Automático	Magnetização de eritrócitos	Grande autonomia funcional	Elevada dimensão do sistema
MDMulticard	Manual	Fluxo lateral	Rápido, sensível e não necessita de centrifugação	Subjetivo
Molecular	Manual	Investigação da informação contida no ADN	Não é necessária a utilização de reagentes	Complicações quando fenótipo diferente de genótipo
Espectrofotometria	Manual com possibilidade de automatização	Medição do espectro de DO	Sensível	Medições óticas exigem elevada precisão

1.4 Motivação e Objetivos

A determinação do tipo sanguíneo é um teste crítico, principalmente em situações de emergência, onde se tenta salvar o doente sem os riscos inerentes a uma transfusão errada ou com base no dador universal. Dos vários sistemas existentes, até agora descritos, nenhum deles é capaz de reunir, em simultâneo, as seguintes características: rápido tempo de resposta, automático, portátil, leve, baixo custo, pequenas dimensões e correta determinação do grupo sanguíneo.

Assim, o objetivo principal desta dissertação é o desenvolvimento de um sistema à escala reduzida para determinar o tipo sanguíneo ABO-Rh em situações de emergência. Pretende-se que o sistema tenha um tempo de resposta curto, à semelhança do método manual em lâmina ou tubo; elimine a subjetividade e a probabilidade de erro associada aos testes manuais, portanto seja automático; seja fácil de transportar para qualquer lugar, sem a necessidade de se recorrer a um laboratório convencional para efetuar a análise; tenha um preço acessível, ao contrário da grande parte dos equipamentos que realizam os procedimentos automaticamente; seja compacto; e claro, o mais importante de tudo, que realize uma correta classificação do grupo sanguíneo.

O sistema que se pretende desenvolver será baseado numa abordagem espectrofotométrica, descrita inicialmente por Narayanan *et al.* [32, 33]. Neste sentido e tendo em conta o trabalho já desenvolvido nesta área, é desejável a criação de um sistema que minimize algumas limitações associadas às montagens descritas em [3, 9, 34], tendo sempre em mente o desenvolvimento de um sistema que cumpra os objetivos descritos.

1.5 Resultados da atividade científica desenvolvida

No âmbito desta dissertação foram aprovados três artigos para conferências, dois deles com apresentação oral e um com apresentação em poster, a indicar:

- Apresentação oral:

S. Pimenta, G. Minas and F. O. Soares, "Spectrophotometric approach for automatic human blood typing", published in Proceedings of IEEE-EMBS, 2nd Portuguese BioEngineering Meeting, Coimbra, Portugal, 23-25 February 2012, pp.101-104.

S. Pimenta, F. Soares, G. Minas, "Development of an Automatic Electronic System to Human Blood Typing", published in Proceedings of 34th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society, San Diego, August 28 – September 1, 2012, pp. 2712-2715.

- Apresentação em poster:

S. Pimenta, J. M. Nobrega, F. M. Duarte, G. Minas, F. O. Soares, "Automatic Electronic System to Human Blood Typing", published in Proceedings of Eurosensors 2012, Krakow, September 9-12, 2012.

Um outro artigo foi submetido para uma revista, aguardando-se o resultado:

S. Pimenta, G. Minas, F. O. Soares, "ABO and Rh Human Blood Typing Device", submetido em IEEE Transactions on Biomedical Engineering.

Foram também proferidas outras comunicações orais, entre as quais:

Seminário "Apresentação dos trabalhos de dissertação do grupo de Micro/Nanotecnologias e Aplicações Biomédicas" – Centro Algoritmi, Universidade do Minho, Campus de Azurém, 18 de Abril de 2012.

S. Pimenta, F. Soares, G. Minas, "Automatic Electronic System to Human Blood Typing" Poster session in 4º Workshop on Biomedical Engineering, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, 21 April 2012.

Para além disso, como resultado da investigação científica foi efetuado um pedido provisório de patente:

PPP106367: – Dispositivo eletrónico automático para determinação do tipo sanguíneo de humanos e respetivo método de utilização – por G. Minas, F. O. Soares, S. Pimenta (Departamento de Electrónica Industrial da Universidade do Minho) em 06-06-2012.

Por fim, foi efetuada a candidatura a um projeto e a dois prémios nacionais, aguardando-se o resultado:

Candidatura submetida a Projeto - Título: “Dispositivo Automático para Determinação do Tipo Sanguíneo em Humanos”. Duração do projeto: Outubro de 2012 a Setembro de 2014. Entidade financiadora: Fundação Calouste Gulbenkian – Programa de Apoio a Projetos de Investigação em Saúde 2012. Membro da equipa.

Candidatura ao Prémio BES Inovação 2012.

Candidatura ao Fraunhofer Portugal Challenge 2012, tendo sido selecionada para a fase final (3ª fase) do concurso.

1.6 Estrutura da dissertação

O presente documento encontra-se dividido em sete capítulos. O primeiro capítulo faz uma breve descrição teórica acerca do sangue e dos métodos existentes para a determinação do tipo sanguíneo (estado da arte); para além disso, são apresentados os objetivos, o enquadramento desta dissertação e os resultados científicos da mesma. No segundo capítulo é apresentada uma pequena descrição teórica acerca dos conceitos relacionados com a espectrofotometria e propriedades óticas do sangue. O capítulo três descreve os testes experimentais iniciais, realizados com a implementação de uma metodologia (em cuvette), bem como os resultados e respetiva discussão dos mesmos. A aplicação de uma segunda metodologia experimental (em lâmina), os resultados obtidos e a sua discussão são descritas no capítulo quatro. O capítulo cinco apresenta os detalhes relacionados com a especificação e implementação do protótipo do dispositivo. O capítulo seis apresenta os resultados experimentais obtidos com o protótipo, bem como a discussão dos mesmos. Finalmente, o capítulo sete apresenta as principais conclusões do trabalho realizado, bem como as perspetivas de trabalho futuro.

Capítulo 2 – Fundamentos teóricos

Neste capítulo são abordados os conceitos teóricos relacionados com a utilização da espectrofotometria para distinção dos grupos sanguíneos ABO-Rh, desde as propriedades mais simples do espectro eletromagnético, até às teorias que explicam as propriedades óticas das células sanguíneas.

2.1 O espectro eletromagnético

A radiação eletromagnética é um tipo de energia que é transmitida no espaço a uma dada velocidade. Esta energia pode ser de diversas formas, desde luz visível, a mais conhecida, até raio-x, ultravioleta, microondas, infravermelho, entre outras. Estes vários tipos de radiação podem ser definidos pelo seu comprimento de onda (λ) e frequência (ν). O λ é definido como a distância entre dois pontos máximos (ou mínimos) consecutivos de uma onda eletromagnética. A ν é definida como o número de oscilações por segundo. A figura 2.1 representa os tipos de radiação que constituem o espectro eletromagnético, bem como as características de cada um deles. A unidade do Sistema Internacional (S.I) da ν é o hertz (Hz) e do λ é o metro (m), sendo que normalmente se utiliza o nanómetro (nm). Multiplicando λ por ν obtém-se a velocidade da radiação (c), de acordo com a equação (eq.) 2.1 [35, 36].

$$c = \nu \times \lambda \quad \text{eq. 2.1}$$

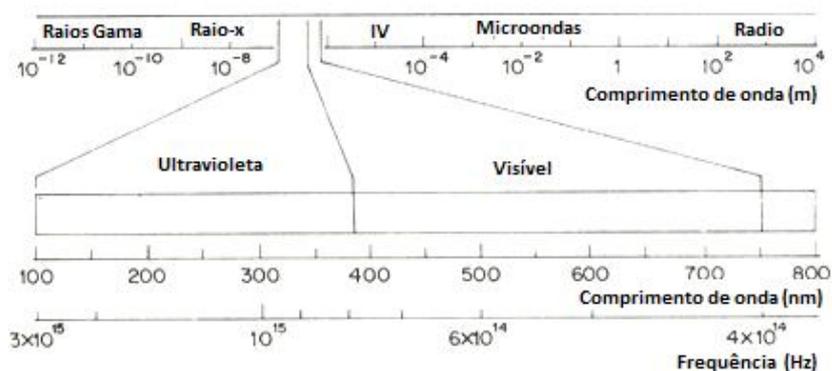


Figura 2.1 Constituição do espectro eletromagnético (adaptado de [35]).

A energia da radiação (E) pode também ser determinada e é diretamente proporcional à frequência da radiação correspondente, como pode ser representado pela equação 2.2 [35-37].

$$E = h \times \nu \quad \text{eq. 2.2}$$

Onde h é uma constante, designada de constante de Planck, cujo valor é $6,626176 \times 10^{-34}$ Joule vezes segundo. Portanto, à medida que λ diminui, ou seja, ν aumenta, a energia da radiação vai aumentando [35, 36].

A espectrofotometria é uma técnica que se baseia na interação da radiação eletromagnética com a matéria. Quando um feixe de radiação passa através de um meio podem ocorrer 4 processos fundamentais que o podem alterar: reflexão, refração, absorção e transmissão. A reflexão é um fenómeno que ocorre quando um feixe de luz incide numa superfície refletora fazendo com que a energia incidente retorne à região de origem. A refração é caracterizada pela mudança de direção do feixe de luz quando este atravessa a fronteira entre meios com características diferentes. A transmissão é a quantidade de energia que não sofre absorção nem reflexão quando um feixe de luz atravessa um meio. Por fim, a absorção é a energia que permanece no meio após a passagem de um feixe de luz [38].

O fenómeno de absorção é dos mais importantes, sendo que os espectrofotómetros são, na sua maioria, projetados para medir a absorvência de um solvente, compensando os efeitos restantes. O termo “densidade ótica” (DO) é utilizado quando se pretende medir a absorvência de uma solução, uma vez que o espectro de uma solução é sempre influenciado por uma componente de absorção mas também dispersão devido à presença de partículas (mesmo que sejam de pequenas dimensões) que provocam a dispersão do feixe incidente. Embora a componente de absorção, seja, quase sempre, predominante é importante considerar a componente de dispersão para uma correta interpretação dos espectros de DO obtidos. A DO é medida em unidades de absorvência (u. a.). A espectrofotometria por absorção ótica permite medir a absorção de uma amostra em função da frequência ou comprimento de onda, permitindo identificar a presença de uma dada substância ou até mesmo quantificar a sua concentração numa solução [38, 39].

2.2 Lei de Beer-Lambert

Quando um feixe de luz atravessa uma solução, a intensidade de radiação do feixe incidente (I_0) é reduzida para uma dada intensidade do feixe transmitido (I) [35, 36], tal como é representado na figura 2.2.

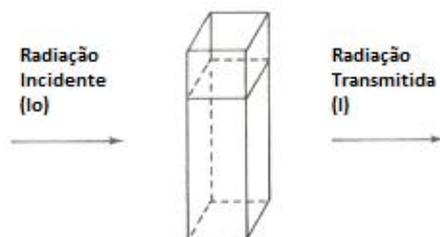


Figura 2.2 Fenômeno de absorção quando um feixe de radiação atravessa uma solução (adaptado de [35]).

A razão entre I e I_0 , ou seja, entre a radiação transmitida e a incidente respectivamente define-se como transmitância (T), de acordo com a equação 2.3.

$$T = I / I_0 \quad \text{eq. 2.3}$$

Uma medida mais usual para a medição da quantidade de radiação que é absorvida por uma amostra é a absorvência (A) [35-37]. Esta pode ser obtida através da equação 2.4.

$$A = \log_{10} (I_0 / I) = \log_{10} (1 / T) \quad \text{eq. 2.4}$$

2.3 Medições da absorvência

Na grande maioria das vezes, a equação 2.4 não é aplicada de forma direta, uma vez que a solução em estudo está contida num recipiente (por exemplo, uma cuvete) fazendo com que haja uma interação entre a radiação e as paredes da cuvete e uma consequente perda de intensidade. Assim I_0 e I não podem ser diretamente obtidos. Para corrigir este efeito a intensidade do feixe de radiação transmitido através da solução ($I_{\text{solução}}$) em estudo é comparada com a intensidade do feixe que passa através de uma cuvete contendo apenas o solvente da solução (I_{solvente}). Com estas duas intensidades, é possível calcular a absorvência experimental (A_{ex}) – equação 2.5 – que, por sua vez, é muito próxima da verdadeira absorvência da solução [35].

$$A_{\text{ex}} \approx \log_{10} (I_{\text{solvente}} / I_{\text{solução}}) \quad \text{eq. 2.5}$$

2.4 Princípios das abordagens espectrofotométricas para a determinação dos tipos sanguíneos ABO-Rh

Como já referido anteriormente, a determinação dos grupos sanguíneos com base numa abordagem espectrofotométrica foi descrita por Narayanan *et al.* [32]. Neste método os tipos sanguíneos são determinados comparando os espectros de DO, obtidos entre 665 nm e 1000 nm, de diferentes misturas de sangue com as soluções comerciais de anticorpos. O espectro de DO de uma mistura aglutinada difere de uma mistura não aglutinada. A fim de se obter tais diferenças de espectro, no procedimento descrito por Narayanan *et al.* [32], foram utilizadas amostras de eritrócitos. Estas foram diluídas no fator de 1:16 numa solução de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). Soluções comerciais Anti-A e Anti-B foram também diluídas nos fatores de 1:16 e 1:8, respetivamente, numa solução de PBS. Soluções comerciais Anti-D não foram diluídas, sendo diretamente utilizadas. As diluições foram realizadas de forma a diminuir a força de reação, permitindo a obtenção de resultados viáveis nas medições espectrofotométricas. Apenas o reagente Anti-D não foi diluído devido ao facto da sua reação ser naturalmente fraca.

Nesse procedimento foram preparadas dois tipos de amostras, a amostra de controlo e as três amostras de teste (uma para cada reagente), para cada tipo sanguíneo que se pretendia determinar. Relativamente à amostra de controlo esta foi preparada misturando 100 μ L de eritrócitos diluídos com 100 μ L de PBS. Esta mistura foi incubada durante 1 minuto e uma pequena porção desta solução, cerca de 25 μ L, foi adicionada numa cuvete com 2,5 mL de PBS. O espectro da amostra foi medido. No que diz respeito às amostras de teste, misturam-se 100 μ L de solução de anticorpos diluídos com 100 μ L de eritrócitos diluídos. Esta mistura foi incubada durante 1 minuto e posteriormente introduziu-se 25 μ L da mesma numa cuvete com 2,5 mL de PBS. Por fim, obteve-se o espectro da amostra [32].

De forma a obter os espectros correspondentes apenas aos componentes sanguíneos, foram preparadas soluções de PBS e de anticorpos. O primeiro passou pela medição do espectro de 2,5 mL de PBS que foi depois subtraído ao espectro da amostra de controlo. A solução de anticorpos foi preparada misturando volumes iguais de PBS e anticorpos diluídos. Posteriormente 25 μ L dessa mistura foi introduzida numa cuvete com 2,5 mL de PBS. Para terminar o espectro obtido foi subtraído aos espectros das amostras de teste [32].

Todos os espectros de DO obtidos por Narayanan *et al.* foram medidos num espectrofotómetro comercial (*Diode Array 8453, Hewlett Packard*) na gama dos 200 nm a

1100 nm. Os espectros obtidos foram relativamente lineares entre os comprimentos de onda 665 nm e 1000 nm. Assim, Narayanan *et al.* calcularam os declives dos espectros nessa gama para todas as amostras (amostra de controlo e três amostras de teste) com base nos valores da DO nos dois comprimentos de onda referidos (665 nm e 1000 nm). Com estes declives, calcularam para cada amostra um índice de aglutinação (*IA*), por aplicação da equação 2.6, onde o controlo diz respeito à amostra de sangue com PBS.

$$IA = 100 - (\text{declive da amostra de teste}) / (\text{declive da amostra controlo}) \times 100 \quad \text{eq. 2.6}$$

Relativamente aos resultados obtidos pelos autores, a figura 2.3 apresenta o espectro de DO, ou seja, os valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de eritrócitos tipo A na presença de PBS (Controlo), Anti-A e Anti-B.

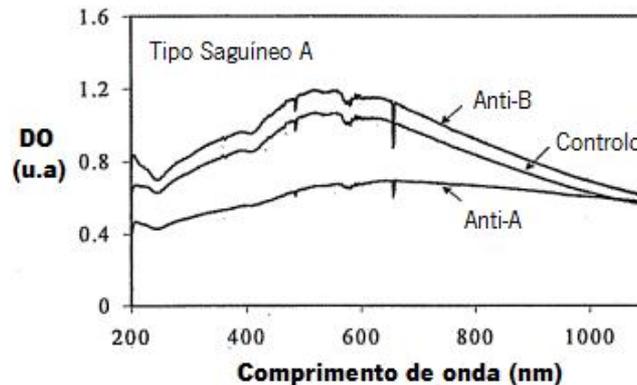


Figura 2.3 Espectros de DO para o tipo sanguíneo A (adaptado de [32]).

Como pode ser observado na figura 2.3, uma amostra aglutinada (sangue tipo A aglutina com o reagente Anti-A) apresenta um espectro mais achatado, ou seja, com um menor declive na região linear, e possui menores valores de DO. Além disso, o seu espectro é bastante distinto do espectro da amostra de controlo. Pelo contrário uma amostra não aglutinada apresenta um espectro muito semelhante à amostra de controlo, nomeadamente com declives muito próximos. Tais diferenças são devidas, segundo os autores, ao fenómeno de dispersão da luz (em amostras aglutinadas) que pode ser explicado pela teoria da dispersão de Mie [32]. O modelo de dispersão de Mie será abordado na próxima secção do presente capítulo.

É de reter que, de facto, com uma abordagem espectrofotométrica os autores conseguiram realizar uma determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh através da obtenção de baixos valores de *IA* para amostras não aglutinadas e de elevados valores de *IA* para amostras

aglutinadas. É ainda de referir que Narayanan *et.al.* realizaram diversas experiências de forma a estudar as condições ideais para a realização do procedimento, nomeadamente a quantidade de anticorpos que permitiria a visualização da aglutinação. Assim, conseguiram chegar aos fatores de diluição referidos.

Num segundo estudo publicado por Narayanan *et al.* [33], os autores avaliaram a capacidade da abordagem espectrofotométrica para determinar subgrupos sanguíneos A (A_2 e A_2B) e Rh. Para além disso, tentaram alterar o protocolo experimental, anteriormente utilizado, de forma a conseguir uma determinação dos grupos sanguíneos, utilizando amostras de sangue total (eliminando assim a necessidade de uma etapa de centrifugação, para separar eritrócitos de plasma sanguíneo). Estas foram diluídas no fator de 1:8 numa solução de PBS. Soluções comerciais Anti-A e Anti-B foram também diluídas nos fatores de 1:16 e 1:8, respetivamente, numa solução de PBS. Soluções comerciais Anti-D não foram diluídas. À semelhança da abordagem anterior, foram preparadas dois tipos de amostras: a amostra de controlo e três amostras de teste. Relativamente à preparação da amostra de controlo, misturaram-se 100 μ L de sangue diluído com 100 μ L de PBS. Esta mistura foi incubada durante 1 minuto e posteriormente adicionou-se 25 μ L da solução a uma cuvete com 2,5 mL de PBS, obtendo-se depois o espectro da amostra. Quanto às amostras de teste, misturaram-se 100 μ L de solução de anticorpos diluídos com 100 μ L de sangue diluído. Esta mistura foi incubada durante 5 minutos e posteriormente inseriu-se 25 μ L da mesma numa cuvete com 2,5 mL de PBS. Por fim, obteve-se o espectro da amostra. Mais uma vez, foram considerados os espectros de DO de soluções de PBS e anticorpos de forma a obter os espectros referentes apenas aos componentes sanguíneos.

Com esta nova abordagem os autores concluíram que é possível realizar uma determinação dos tipos sanguíneos ABO-Rh utilizando amostras de sangue total, uma vez que a gama de valores de índices de aglutinação obtidos foi bastante próxima da anteriormente obtida e a classificação dos grupos sanguíneos foi também coerente. Para além disso, aplicando um protocolo descrito em [33] foi possível determinar subgrupos sanguíneos, como os tipos A_2 e A_2B através da análise dos índices de aglutinação obtidos para cada amostra sanguínea, na presença dos reagentes Anti-A e Anti-B. A determinação dos tipos sanguíneos Rh foi também efetuada através da utilização de um composto (PEG - *Polyethylene Glycol*) que facilita a reação de aglutinação sem alterar o espectro característico da amostra. Isto é especialmente importante

em amostras de sangue onde a presença do antígeno D é preferencialmente fraca, apesar de existir e de ser necessário determiná-la.

O procedimento referido pelos autores não será explorado detalhadamente uma vez que é objetivo principal desta dissertação apenas a criação de um sistema que determine os tipos sanguíneos ABO-Rh, ficando a questão dos subgrupos para trabalho futuro. Numa fase posterior à publicação destes estudos surgiram um conjunto de trabalhos baseados nesta abordagem, dos quais será apresentado um breve resumo.

O primeiro trabalho surgiu no ano de 2005, desenvolvido por Steven Anthony [34]. Esta investigação baseou-se na implementação de uma abordagem simplificada do método descrito anteriormente por Narayanan *et al.*, substituindo a utilização do espectrofotómetro comercial por uma série de LEDs e fotodiodo, numa determinada gama de comprimentos de onda de interesse. Para tal, o autor estudou, detalhadamente, todos os componentes do espectrofotómetro *Agilent 8453 Diode Array* de forma a criar um sistema experimental que reproduzisse resultados muito semelhantes. Relativamente ao procedimento experimental, a abordagem seguida foi muito semelhante à documentada por Narayanan *et al.* no caso de utilização de amostras de sangue total, apenas com duas alterações: a primeira foi a aplicação de fatores de diluição diferentes para o caso dos reagentes Anti-A (1:8) e Anti-B (1:2), uma vez que foi verificada a necessidade de aumentar a sua concentração devido às fracas reações verificadas; a segunda, foi a utilização de uma simples cuvete com 2,5 mL de PBS como referência para todas as amostras, uma vez que o autor conclui que a utilização de soluções de anticorpos como referência, na gama 500 nm a 1000 nm (gama de interesse), era equivalente à utilização de soluções de referência de PBS. No que diz respeito aos resultados obtidos, conseguiu-se obter espectros semelhantes aos obtidos com o espectrofotómetro (na gama 600 nm a 1000 nm). Contudo, verificou-se a existência de valores de DO ligeiramente menores e de menores diferenças nos índices de aglutinação entre amostras reativas e não reativas. Relativamente à implementação do sistema, os autores relataram a necessidade de um alinhamento ótico mais preciso entre os componentes, necessário para produzir um sistema com maior sensibilidade. Apesar disso, foi possível a determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh.

Um segundo trabalho surgiu em 2006, realizado por Jeremy Lambert [9], que propôs uma extensão do trabalho anteriormente realizado por Steven Anthony [34], na tentativa de desenvolver um sistema miniaturizado com base na utilização de fibra ótica. O sistema pretendia reproduzir os mesmos resultados que o espectrofotómetro *Agilent 8453 Diode Array* mas consistente com o método simplista anteriormente desenvolvido. Para tal, o autor analisou os componentes do espectrofotómetro e a configuração ótica explorada por Steven Anthony, de forma a encontrar os fatores que contribuem para o tamanho do sistema e, se possível, arranjar formas de minimizar os mesmos. Assim, o autor explorou a utilização de fibra ótica e de lentes convexas de forma a conseguir uma maior aproximação dos componentes do sistema e assim miniaturizar a configuração. A abordagem utilizada passou pelo acoplamento de fontes de luz com um cabo de fibra ótica de forma a não ser necessário considerar um alinhamento da amostra, cada vez que a fonte de luz mudasse. No que diz respeito ao procedimento experimental, este baseou-se na mesma abordagem seguida anteriormente por Steven Anthony [34] e Narayanan *et al.* [32]. Relativamente aos resultados obtidos, o sistema experimental conseguiu reproduzir efeitos bastante próximos do espectrofotómetro com uma boa distinção entre amostras aglutinadas e não aglutinadas, especialmente ao nível da determinação do sistema ABO. A determinação do fator Rh não foi contudo tão esclarecedora, ou seja, não existiu uma distinção tão significativa dos índices de aglutinação entre amostras aglutinadas e não aglutinadas.

Por fim, um trabalho realizado em 2007 por Stewart Alexander [3] documenta o desenvolvimento de um sistema microfluídico capaz de identificar e distinguir células sanguíneas livres de células sanguíneas aglutinadas. O sistema desenvolvido, à base de um material polimérico, contém um canal, perpendicular a dois cabos de fibra ótica, que permite o fluxo de um fluido (amostra). A mistura circula entre os dois cabos de fibra ótica. Quando um feixe de luz (fibra ótica emissora) atravessa uma célula eritrocitária, parte deste é absorvido e/ou dispersado pela célula e o restante é recebido pela fibra ótica recetora. Quando um glóbulo vermelho aglutinado passa através do espaço entre as fibras maior quantidade de luz é absorvida e/ou dispersada que no caso anterior, ou seja a fibra ótica recetora adquire menor quantidade de luz. Portanto, é com base nesta redução significativa da quantidade de luz que é transmitida entre as fibras que se consegue detetar as amostras aglutinadas e, como consequência, fazer a distinção dos grupos sanguíneos. É assim, uma abordagem relativamente diferente das anteriores, no

sentido em que não se baseia na forma do espectro de DO mas sim na grandeza dos valores obtidos nos espectros de transmissão, aquando da interação da luz com as células. O protocolo experimental seguido pelo autor foi muito semelhante aos já referenciados em outras abordagens, com preparação de amostras de teste e de um controlo (amostra de sangue em solução salina). No que diz respeito aos resultados obtidos, conseguiu-se distinguir amostras aglutinadas de não aglutinadas. As principais limitações descritas são a deteção de aglutinações fracas, uma vez que exige uma maior aproximação dos dois cabos de fibra ótica (emissora e recetora).

Pode concluir-se que desde a publicação do estudo de Narayanan *et al.* em que foi verificado a distinção dos grupos sanguíneos ABO-Rh com base numa abordagem espectrofotométrica e na ocorrência da reação de aglutinação, surgiram um conjunto de trabalhos baseados em duas características chave: a primeira baseada na diferença de declive do espectro de DO de amostras aglutinadas; a segunda assente na grandeza dos valores obtidos pelos espectros de transmissão, ou seja, na quantidade de luz recebida pelo detetor. As duas apresentaram potencial para a determinação dos grupos sanguíneos.

Relativamente à abordagem utilizada nesta dissertação, esta foi relativamente distinta das apresentadas até ao momento na literatura, sendo que será abordada no capítulo 4 do presente documento.

2.5 Teoria da dispersão e propriedades óticas do sangue

O espectro de DO ou absorvência de uma solução com partículas em suspensão depende não só de uma componente de absorção mas também de uma componente de dispersão. O espectro de um pequeno cromóforo³ em solução é maioritariamente composto por uma componente de absorção, enquanto que as partículas de grandes dimensões exibem uma maior componente de dispersão. Tais características fazem com que as soluções com partículas em suspensão sejam difíceis de modelizar. Para além disso, o espectro produzido torna-se difícil de interpretar [40].

³ Grupo químico capaz de absorver grandes quantidades de luz em determinados comprimentos de onda (T. F. Dictionary. "chromophore," 31 de Outubro, 2011; <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/chromophore>).

A dispersão é um fenómeno provocado por partículas suspensas num sistema, que desviam um determinado feixe de luz do seu caminho regular. Existem duas grandes classes de luz dispersa, a dispersão de Rayleigh e a dispersão de Mie [37, 41].

Quando uma partícula tem uma dimensão inferior a um décimo do comprimento de onda da luz incidente, esta exhibe dispersão de Rayleigh ou também designada de dispersão molecular [37, 41]. Este tipo de dispersão é caracterizada por ser simétrica, como pode ser observado na figura 2.4, e pela intensidade da luz dispersa ser inversamente proporcional ao comprimento de onda da luz incidente [41].



Figura 2.4 Partícula de pequenas dimensões: dispersão de Rayleigh (adaptado de [41]).

Quando uma partícula tem uma dimensão superior a um décimo do comprimento de onda da luz incidente então exhibe dispersão de Mie. A luz dispersa num ponto da partícula está desfasada em relação a outro ponto na mesma, fazendo com que a distribuição angular da luz dispersa deixe de ser simétrica, figura 2.5. Com o aumento do tamanho da partícula a quantidade de luz dispersa na direção frontal aumenta. A diferença entre a dispersão frontal e anterior é designada de dissimetria. Portanto, pode aferir-se que as propriedades de dispersão de uma partícula estão intimamente dependentes da morfologia da mesma [41, 42].

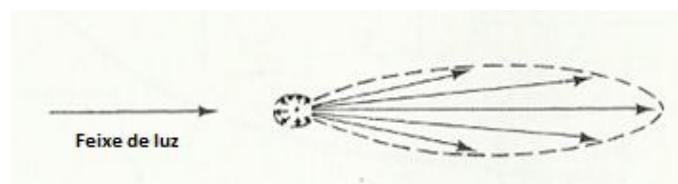


Figura 2.5 Partícula de grandes dimensões: dispersão de Mie (adaptado de [41]).

O sangue é uma solução complexa com partículas em suspensão, sendo os eritrócitos as partículas presentes em maior quantidade [39, 40]. Estes, como já referido, contêm principalmente a proteína hemoglobina, um forte cromóforo. Apesar do espectro característico do sangue ser influenciado pelas contribuições espectrais de todos os componentes que o constituem (plaquetas, glóbulos brancos, eritrócitos e plasma) [39] a DO natural dos eritrócitos e a sua abundância fazem com que estes sejam os compostos principais na caracterização ótica

do sangue [40]. Portanto, a contribuição dos glóbulos vermelhos no espectro de DO do sangue é predominante, como pode ser observado pela figura 2.6.

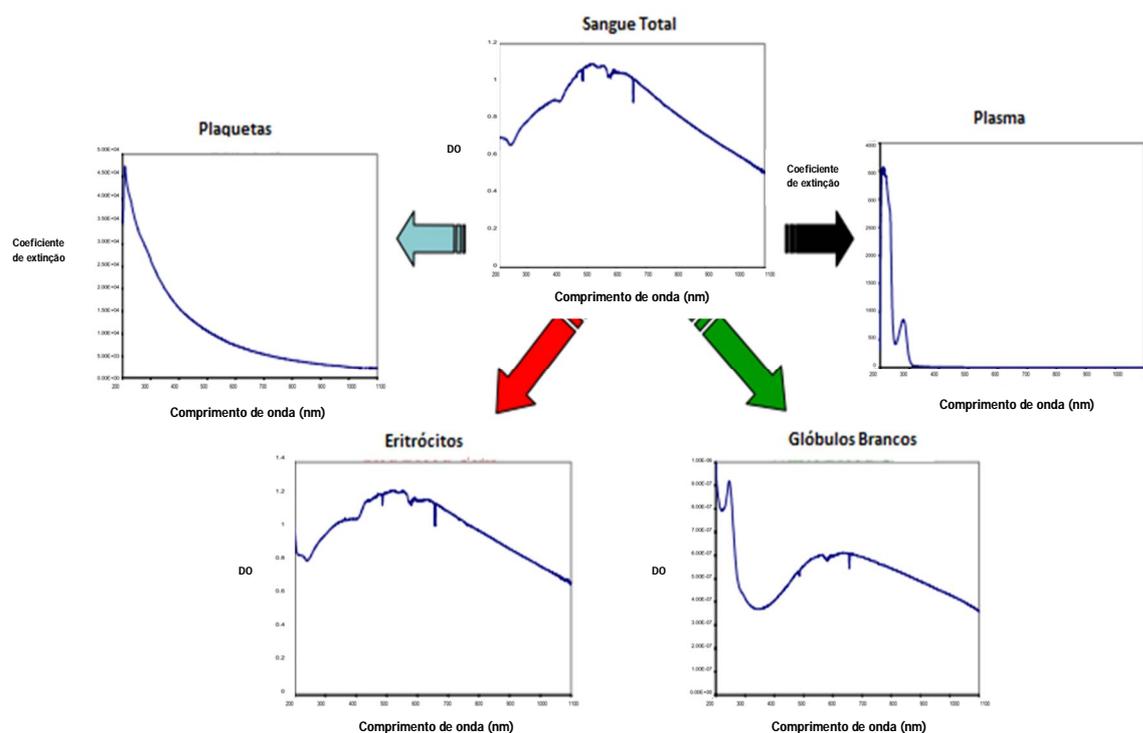


Figura 2.6 Contribuições espectrais (DO/Coefficiente de extinção⁴ em função do comprimento de onda) de todos os componentes do sangue. O espectro de cada um dos compostos está dependente das suas propriedades como o tamanho e a composição (adaptado de [39]).

Nonoyama *et al.* [39, 40] desenvolveram um estudo das propriedades óticas dos eritrócitos, no qual tentaram modelar o espectro de DO dos glóbulos vermelhos utilizando a teoria da radiação eletromagnética que contabiliza as componentes de absorção e dispersão no espectro de DO obtido, possibilitando assim prever as alterações no espectro para diferentes valores de concentração de hemoglobina, de tamanho das partículas e de sistema óticos utilizados na obtenção desses espectros. Para tal, foram considerados dois parâmetros principais: caracterização dos eritrócitos e *setup* experimental. Relativamente ao *setup* experimental utilizado para a obtenção dos dados, a caracterização dos eritrócitos está muito dependente da forma como os dados são recolhidos, ou seja, distintas configurações experimentais levam à captura de diferentes quantidades de luz dispersa gerando características espectrais variáveis [39, 40].

⁴ Coeficiente que representa a capacidade de uma substância para absorver luz a um determinado comprimento de onda (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 28 de Setembro, 2012; <http://web.expasy.org/protparam/protparam-doc.html>)

2.5.1 Teoria de dispersão angular

Como já referido, a interação da luz com as partículas leva à existência de dois fenómenos principais: a absorção e a dispersão. As partículas dispersam luz em todas as direções, e dependendo da direção dessa dispersão em relação à direção da luz incidente e da própria montagem experimental, podem chegar ao detetor diferentes quantidades de luz. A resolução angular da luz dispersa está muito dependente do ângulo de aceitação do detetor da montagem experimental. Assim, a resposta do detetor é proporcional a uma média ponderada da intensidade de luz dispersa ao longo da sua abertura, determinada pelo ângulo de aceitação. Este está definido na figura 2.7, e relaciona-se com o raio do detetor e a distância deste à amostra [39, 40].

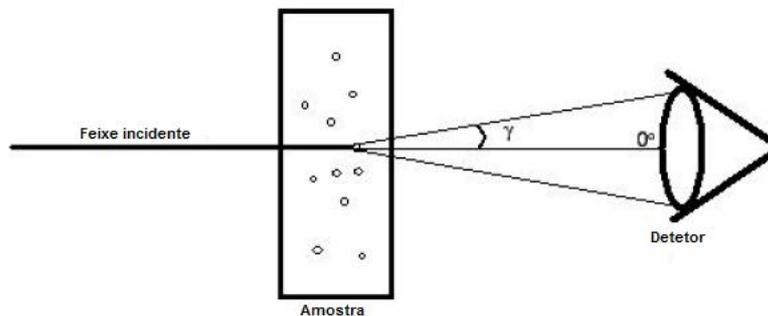


Figura 2.7 Representação do ângulo de aceitação. O raio do detetor e a sua distância à amostra determina a quantidade de luz dispersa capturada pelo espectrofotómetro (adaptado de [40]).

Portanto, pode suspeitar-se que o ângulo de aceitação do detetor tem uma forte influência na caracterização ótica dos glóbulos vermelhos e como consequência do sangue. Serão apresentados, na secção 2.5.3, os efeitos do *setup* experimental no espectro de DO dos eritrócitos.

Uma vez que o resultado da luz que atinge o detetor não depende apenas de uma componente de absorção, mas também de dispersão, a avaliação do espectro de DO deve ser feita tendo em conta um modelo completo, que considere não só a absorção mas também a dispersão. Tal modelo diz respeito à teoria de Mie [39, 40].

2.5.2 Teoria de Mie

A teoria de Mie foi publicada em 1907 e representa uma solução exata das propriedades de absorção e dispersão de partículas esféricas. Pode, no entanto, ser aplicada a outros tipos de morfologias de partículas, como por exemplo, esfera bicôncavas, entre outras [39, 42]. Contém informações não só do tamanho das partículas mas também dos índices de refração e

coeficientes de absorção dos materiais que constituem as mesmas, bem como das componentes de absorção e dispersão da luz transmitida. É uma teoria bastante completa e geral que inclui a dispersão de Rayleigh como um caso especial [37, 39-41]. As propriedades do material são definidas através do índice de refração complexo ($m(\lambda)$) - equação 2.7 [39, 40].

$$m(\lambda) = (n(\lambda) + ik(\lambda)) / n_o(\lambda) \quad \text{eq. 2.7}$$

$n(\lambda)$: índice de refração da partícula;

$n_o(\lambda)$: índice de refração do meio;

$\kappa(\lambda)$: coeficiente de absorção da partícula.

A equação 2.8 relaciona o tamanho da partícula e o índice de refração complexo com as componentes de absorção e dispersão da luz para um determinado comprimento de onda ($\tau(\lambda)$) [39, 40].

$$\tau = N_p \int_0^\infty \frac{\pi}{4} D^2 Q_{dis}(\alpha, m(\lambda)) f(D) dD + N_p \int_0^\infty \frac{\pi}{4} D^2 Q_{abs}(\alpha, m(\lambda)) f(D) dD \quad \text{eq. 2.8}$$

N_p : número de partículas por unidade de volume (m^3);

D : diâmetro da partícula (m);

$f(D)$: função distribuição do tamanho da partícula (m);

$Q_{dis}(\alpha, m(\lambda))$: componente de dispersão de Mie.

$Q_{abs}(\alpha, m(\lambda))$: componente de absorção de Mie.

α : parâmetro relacionado com o tamanho da partícula, mais especificamente com o seu diâmetro – equação 2.9.

$$\alpha = \pi D / \lambda \quad \text{eq. 2.9}$$

O modelo de Mie representado pela equação 2.8 foi implementado computacionalmente por Nonoyama *et al.* [39, 40] de forma a obter o espectro (190 nm a 1100 nm) de eritrócitos normais e modificados. Os cálculos teoricamente realizados permitiram estudar a sensibilidade do espectro a variações do tamanho dos eritrócitos e da concentração de hemoglobina.

2.5.3 Efeito do *setup* experimental no espectro dos eritrócitos

Nonoyama *et al.* [39, 40] efetuaram medições de espectros de DO de eritrócitos, usando três sistemas diferentes: 1) espectrofotômetro *Agilent 8453 Diode Array* que capta radiação dispersa a um ângulo de aceitação de cerca de 2° ; 2) espectrofotômetro *Perkin-Elmer Lambda 900* que capta a ângulos maiores que 2° (espectro de transmissão difuso); 3) espectrofotômetro *Perkin-Elmer Lambda 18* que capta a luz dispersa proveniente de todos os ângulos. As figuras 2.8, 2.9 e 2.10 apresentam os espectros obtidos com os diferentes sistemas, respectivamente.

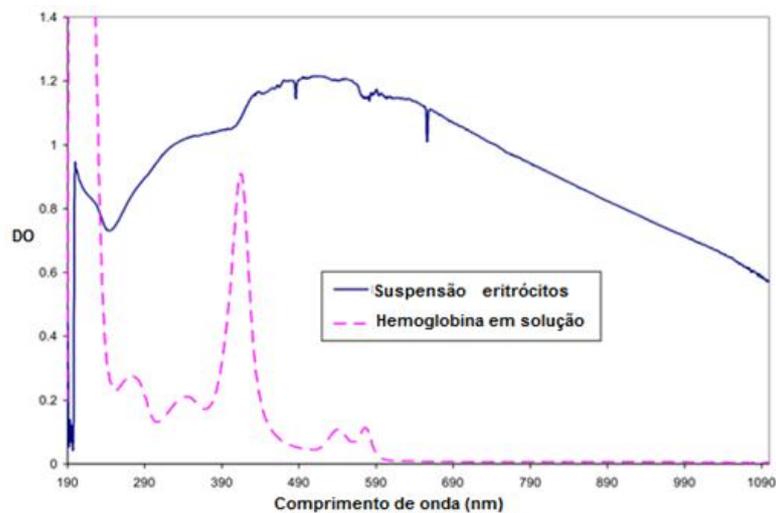


Figura 2.8 Espectro de DO em função do comprimento de onda de eritrócitos em suspensão e de hemoglobina em solução, obtidos pelo espectrofotômetro *Agilent 8453 Diode Array* (adaptado de [40]).

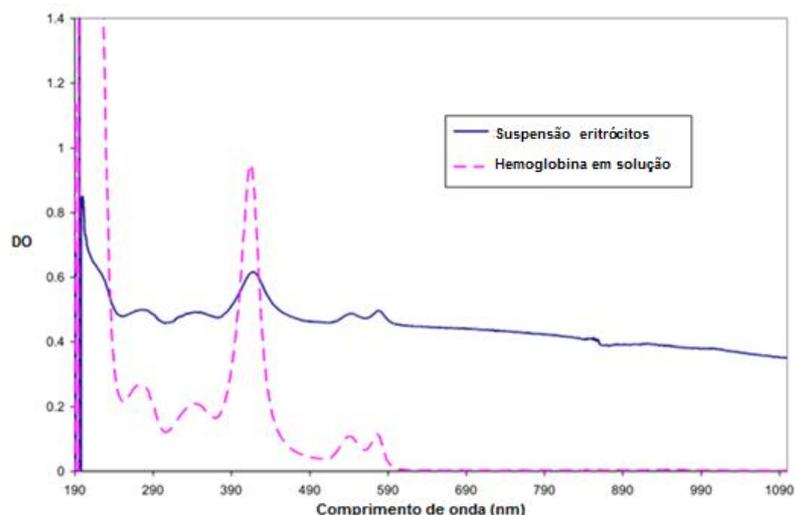


Figura 2.9 Espectro de DO em função do comprimento de onda de eritrócitos em suspensão e de hemoglobina em solução, obtidos pelo espectrofotômetro *Perkin-Elmer Lambda 900* (adaptado de [40]).

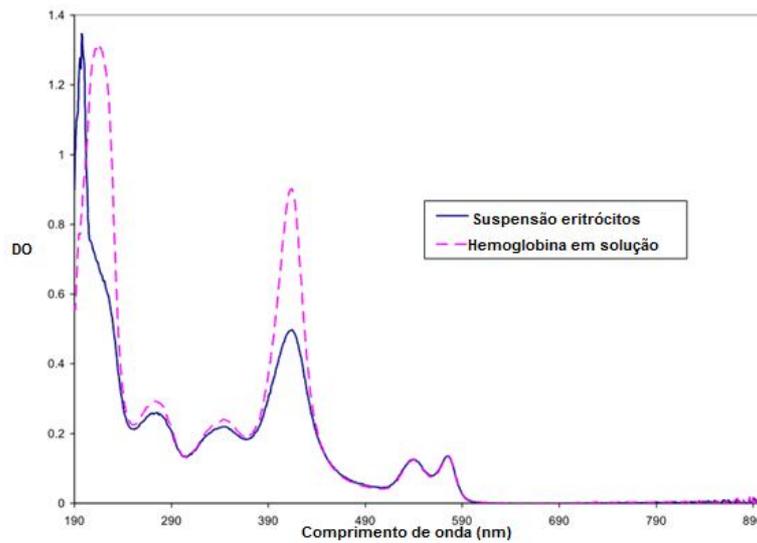


Figura 2.10 Espectro de DO em função do comprimento de onda de eritrócitos em suspensão e de hemoglobina em solução obtidos pelo espectrofotômetro *Perkin-Elmer Lambda 18* (adaptado de [40]).

Por observação das figuras 2.8 à 2.10 pode notar-se duas características essenciais à medida que se aumenta o ângulo de aceitação do detetor nos espectrofotômetros. A primeira é a presença dos picos característicos da hemoglobina no espectro dos eritrócitos em suspensão. A segunda é a diminuição do valor de DO ao longo de todo o espectro. Tais características estão de acordo com o esperado, uma vez que à medida que o ângulo de aceitação aumenta maior quantidade de luz dispersa chega ao detetor (uma vez que, neste caso, este deteta luz dispersa proveniente de vários ângulos), levando a uma diminuição da DO. Contudo, perde-se alguma informação da componente de dispersão, uma vez que a intensidade de luz dispersa representa uma média ao longo de todos os ângulos aceites pelo detetor, ou seja, este deixa de ser seletivo à luz dispersa apenas na direção frontal - figura 2.10. Na mesma figura, pode notar-se ainda que a intensidade da grande parte dos picos no espectro dos eritrócitos é ligeiramente menor que a do espectro da hemoglobina. Vários autores explicam estas diferenças através do conceito de hipocromicidade molecular. Contrariamente, um *setup* com um ângulo de aceitação pequeno permite obter um espectro com maior informação das componentes de absorção e dispersão, que é o caso do espectrofotômetro *Agilent 8453 Diode Array* [39, 40]. Este foi também utilizado nos experimentos de Narayanan *et al.* [32, 33] para determinação dos grupos sanguíneos.

É ainda de notar que as diferenças de espectros devidas às distintas configurações experimentais apenas se verificam em grandes dispersores de luz (como os eritrócitos), ou seja, o espectro característico de pequenas partículas como a hemoglobina não é alterado uma vez

que a componente de dispersão é praticamente nula. Tal facto está de acordo com a teoria de dispersão de Mie [40].

2.5.4 Efeito das características dos eritrócitos no espectro obtido

Para além do estudo dos efeitos do *setup* experimental, Nonoyama *et al.* realizaram experiências práticas de forma a examinar as consequências da variação do tamanho das células e da concentração de hemoglobina no espectro. O sistema experimental foi composto pelos espectros dos eritrócitos normais e modificados. Os dados foram obtidos a partir de um espectrofotómetro com um ângulo de aceitação de 2° . Os espectros experimentais foram depois comparados com os obtidos através das simulações realizadas, por aplicação computacional do modelo de Mie.

De acordo com os resultados obtidos pelos autores, pode aferir-se que um aumento na concentração de hemoglobina provoca um aumento da DO global. Tal evidência está de acordo com o teoricamente esperado, uma vez que a hemoglobina é um forte cromóforo. Já as variações de tamanho das células têm uma contribuição mais subtil nos espectros, havendo uma ligeira diminuição da DO com o aumento do tamanho das células em suspensão, o que está de acordo com a teoria, já que as partículas de grandes dimensões dispersam uma maior quantidade de luz na direcção frontal.

Portanto, a teoria de dispersão eletromagnética pode ser utilizada para modelar ou simular as características espectrais dos eritrócitos, considerando dois coeficientes aditivos (absorção e dispersão). Para além disso, este modelo permite estudar as consequências espectrais quando se varia o tamanho das células e a concentração de hemoglobina uma vez que as componentes Q_{dis} e Q_{abs} são dependentes do tamanho e índice de refração complexo.

Assim, a caracterização ótica dos eritrócitos (e como consequência do sangue) leva à necessidade de expandir a definição de absorvência ou DO, ou seja, leva à certeza da existência de fenómenos de absorção e dispersão que afetam os espectros de DO obtidos.

Capítulo 3 – Testes experimentais: metodologia em cuvette

Neste capítulo é apresentada a metodologia implementada nas análises experimentais iniciais. Para além disso, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Numa fase final são ainda apontadas as principais vantagens e limitações da utilização deste protocolo de teste no sistema a desenvolver.

3.1 Protocolos experimentais em cuvette

A primeira etapa prática do presente trabalho passou pela realização de um conjunto de testes experimentais de forma a averiguar se é de facto possível distinguir os vários tipos sanguíneos através dos espectros de DO de amostras de sangue total, na presença de reagentes específicos. Para além disso, pretendeu-se ajustar os protocolos experimentais às características do sistema a implementar.

Nos testes experimentais utilizaram-se amostras de sangue total, fornecidas pelo IPS (Instituto Português do Sangue). A utilização de amostras totais de sangue, e não de amostras de eritrócitos, teve como objetivo a simplificação do processo. A obtenção de eritrócitos implica centrifugar a amostra de sangue durante cerca de 20 minutos, operação a evitar num dispositivo que se pretende que seja portátil e de resposta rápida. Tal como descrito e justificado por Narayanan *et al.* [32], as amostras de sangue foram diluídas num fator de 1:8 numa solução de PBS, adquirida à empresa *Sigma Aldrich* (pH=7.2 a 25°C). Os reagentes utilizados, soluções comerciais de anticorpos (Anti-A, Anti-B e Anti-AB e Anti-D) foram adquiridos à empresa *HosLab Diagnóstica*. Esses reagentes, Anti-A, Anti-B e Anti-AB foram diluídos nos fatores de 1:8, 1:2 e 1:8 respetivamente. O reagente Anti-D não foi diluído, tal como sugerido por Narayanan *et al.* [32]. A utilização do reagente Anti-AB para determinação dos grupos sanguíneos ABO não foi até agora documentada. No entanto, é objetivo deste trabalho avaliar, em que medida, este pode ser importante para a distinção dos grupos sanguíneos, nomeadamente o tipo sanguíneo AB. A escolha dos fatores de diluição teve em conta a documentação já referida e a observação de reações de aglutinação fracas ou demasiado fortes.

Outra questão importante a considerar, é avaliar de que forma a incubação das amostras é essencial para a ocorrência da reação, e se é possível a criação de uma abordagem que permita distinguir os diferentes tipos de sangue sem a utilização de uma incubadora. Este objetivo é bastante importante, no sentido em que o dispositivo pode ser aplicado num ambiente

diferente de um laboratório convencional. Assim, foram considerados dois protocolos muito semelhantes, sendo a diferença entre eles apenas o facto de, no primeiro as reações entre amostra de sangue e o reagente se efetuarem à temperatura ambiente e no segundo as reações ocorrerem a 37°C no interior de uma incubadora, a fim de simular as condições no interior do organismo e facilitar a reação de aglutinação. De salientar que a utilização de uma incubadora foi considerada em todos os protocolos experimentais até agora referidos na literatura [3, 9, 32-34].

Os protocolos considerados foram os seguintes:

- **Protocolo I** – com amostras de sangue total, sem incubação:
 - Preparação do controlo: juntar 100 µL de sangue diluído com 100 µL de PBS e deixar a reação ocorrer durante um minuto. Juntar 25 µL da mistura com 2,5 mL de PBS. Proceder à medição espectral.
 - Preparação das amostras de teste: juntar 100 µL de sangue diluído com 100 µL de reagente e deixar a reação ocorrer durante 5 minutos. Juntar 25 µL da mistura com 2,5 mL de PBS. Proceder à medição dos espectros.
- **Protocolo II** – com amostras de sangue total, com incubação.
 - Preparação do controlo: juntar 100 µL de sangue diluído com 100 µL de PBS. Incubar durante 1 minuto a 37°C (banho seco numa incubadora). Juntar 25 µL da mistura a 2,5 mL de PBS. Proceder à medição espectral.
 - Preparação das amostras de teste: juntar 100 µL de sangue diluído com 100 µL de reagente previamente diluído. Incubar durante 5 minutos a 37°C (banho seco numa incubadora). Juntar 25 µL da mistura a 2,5 mL de PBS. Proceder às medições espectrais.

Fazendo reagir amostras de sangue total com cada um dos reagentes anticorpos podem ser obtidas dois tipos de amostras: aglutinadas, se há interação anticorpo-antigénio; ou não aglutinadas, se a mesma interação não ocorrer. A tabela 3.1 apresenta o tipo de amostras obtidas para cada um dos grupos sanguíneos ABO-Rh a reagir com os anticorpos. O tipo de amostra (aglutinada ou não aglutinada) produzirá diferenças ao nível do espectro de DO obtido.

Tabela 3.1 Tipo de amostras obtidas através da reação de amostras de sangue ABO-Rh com reagentes anticorpos (✓: amostra aglutinada; X: amostra não aglutinada).

Grupos Sanguíneos	Reagentes			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
A positivo	✓	X	✓	✓
A negativo	✓	X	✓	X
B positivo	X	✓	✓	✓
B negativo	X	✓	✓	X
AB positivo	✓	✓	✓	✓
AB negativo	✓	✓	✓	X
O positivo	X	X	X	✓
O negativo	X	X	X	X

As medições experimentais iniciais foram efetuadas num *setup* experimental construído no laboratório, tendo em conta a utilização de uma fonte de luz comercial de tungsténio, um monocromador, um fotodíodo (S1336-5BQ da *Hamamatsu* [43]) e um picoamperímetro – figura 3.1. Não foram consideradas, nesta fase, apreciações relacionadas com o posicionamento dos componentes. Tentou-se, apenas, a olho nu, alinhar o feixe de luz com o fotodíodo e a amostra, e aproximar o mais possível os três componentes de forma a minimizar a quantidade de luz perdida. Para além disso, minimizou-se, tanto quanto possível, as interferências de luz externa, através da colocação de uma caixa preta à volta da montagem, como pode ser observado na figura 3.1. Assim, garantiu-se que grande parte da luz incidente no fotodíodo provém da fonte de luz. A figura 3.2 apresenta, em detalhe, o sistema ótico utilizado (fibra ótica, amostra e fotodíodo).

Para além das medições no sistema laboratorial, foram realizados testes experimentais por aplicação do protocolo I mas utilizando um sistema automático comercial para a obtenção dos espectros de DO, de forma a validar os resultados do *setup* experimental utilizado.

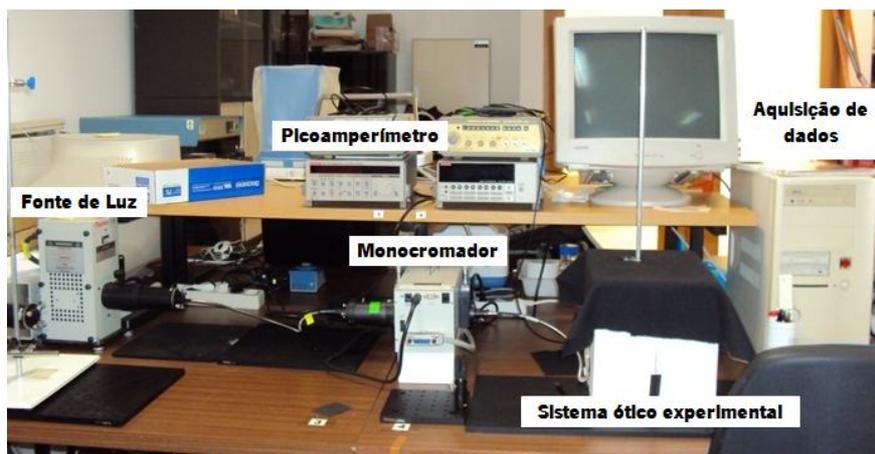


Figura 3.1 Montagem experimental completa, para aquisição dos espectros de DO.

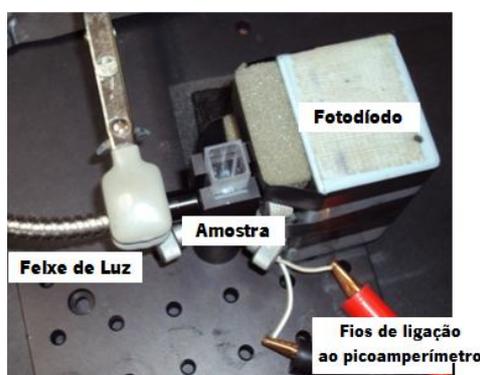


Figura 3.2 Setup experimental do sistema óptico, evidenciando-se os vários componentes.

3.2 Resultados experimentais e discussão

Esta secção apresenta os resultados obtidos nas análises experimentais óticas utilizando os protocolos descritos anteriormente, aplicados em média a dez amostras sanguíneas ($n=10$), em cada situação de teste (tipo de protocolo e/ou sistema de medição).

3.2.1 Com aplicação do protocolo I no *setup* experimental

Inicialmente foi aplicado o protocolo I que não recorre ao uso de incubadora nem de centrífuga, de forma a verificar se, com uma abordagem mais rápida e simples, era possível a distinção dos vários tipos sanguíneos. Para cada amostra de controlo e teste relativa a cada amostra sanguínea ABO-Rh foram obtidos os valores de corrente do fotodíodo (em A) em função do comprimento de onda (400 nm a 1000 nm), e o respetivo espectro de DO, por aplicação da equação 2.5. O solvente considerado foi a solução comercial de PBS, ou seja, os valores de corrente do fotodíodo obtidos por uma cuvete com 2,5 mL de PBS. Tais valores foram utilizados para a obtenção dos espectros de DO de todas as amostras (controlo e teste). Alguns exemplos

de espectros de DO obtidos são, de seguida, apresentados. O anexo I apresenta os gráficos intermédios, relativos aos valores de corrente no fotodíodo para algumas das amostras efetuadas e para a amostra de referência (solução de PBS).

3.2.1.1 Sistema ABO

As figuras 3.3 à 3.6 apresentam os resultados obtidos por aplicação do protocolo I a quatro amostras do tipo sanguíneo ABO.

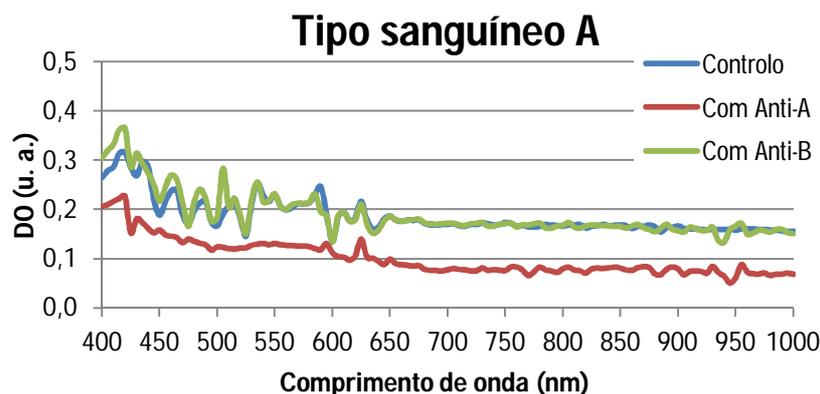


Figura 3.3 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

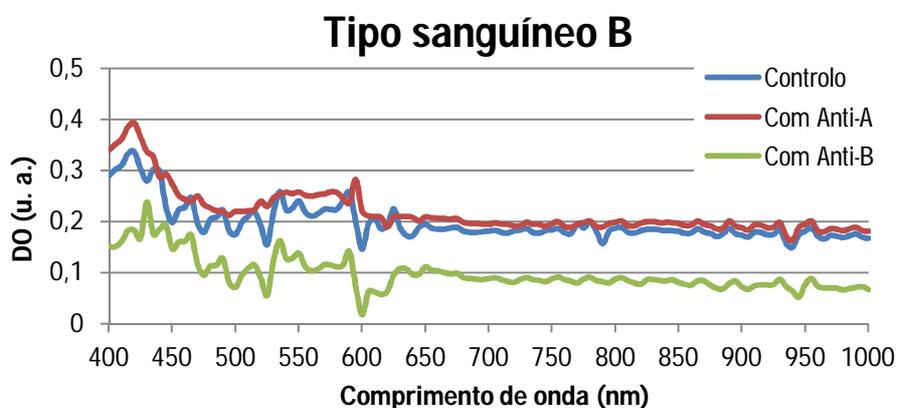


Figura 3.4 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo B a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

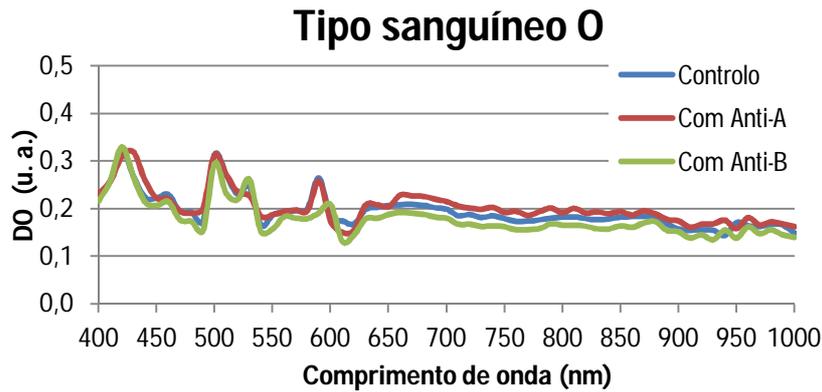


Figura 3.5 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

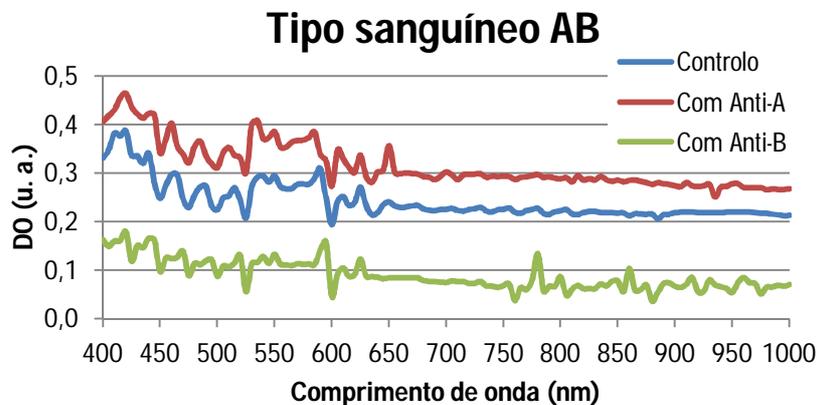


Figura 3.6 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

Testes com introdução do reagente Anti-AB

Os resultados obtidos para a classificação de um grupo AB, de um grupo com apenas um dos antigénios (A ou B) e de um grupo O, com a introdução do reagente Anti-AB, são apresentados nas figuras 3.7 à 3.9, respetivamente.

Tipo sanguíneo AB

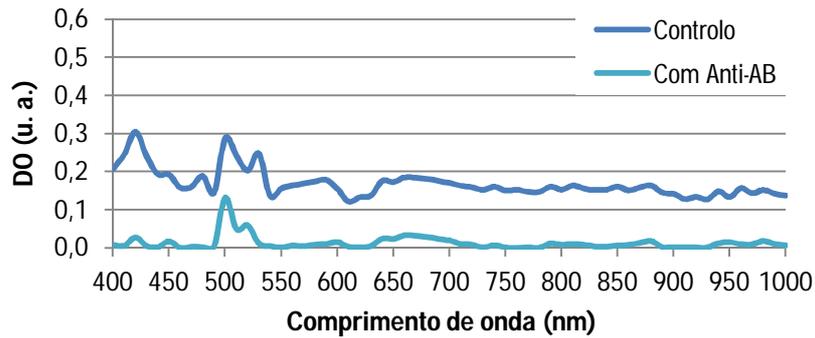


Figura 3.7 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul clara).

Tipo sanguíneo B

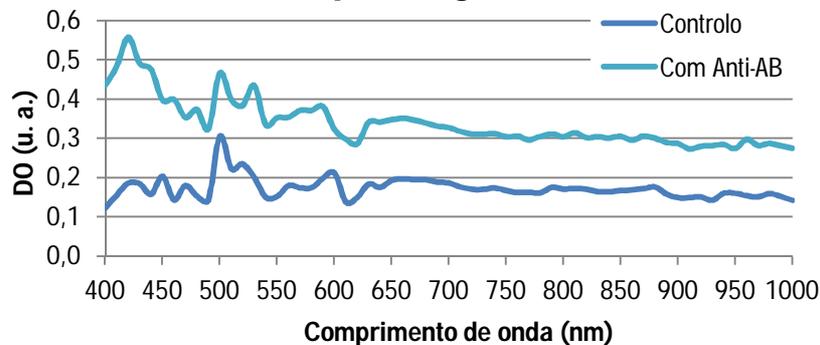


Figura 3.8 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo B a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul claro).

Tipo sanguíneo O

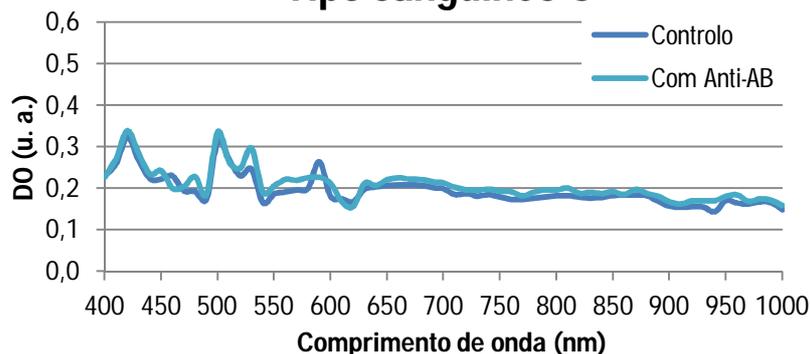


Figura 3.9 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul claro).

Relativamente aos resultados apresentados nas figuras 3.3 à 3.6, pode constatar-se que é possível distinguir os tipos sanguíneos ABO uma vez que os valores de DO são menores para as amostras aglutinadas, comparativamente com a amostra de controlo e as restantes amostras

de teste. No caso do grupo sanguíneo O, como seria de esperar, os valores de DO são muito próximos para todas as amostras pois o fenómeno de aglutinação não ocorre em nenhuma reação – figura 3.5. Os menores valores de DO são devidos ao facto de que, as amostras aglutinadas não apresentam uma turbidez tão significativa como a amostra de controlo e amostras não aglutinadas, apresentando uma aspeto mais translúcido com as células aglutinadas em suspensão, responsáveis por uma maior dispersão da luz, especialmente na direção frontal. Estes dois fatores, dispersão da luz e menor turbidez, têm como consequência a diminuição da DO, uma vez que maior quantidade de luz chega ao fotodetector (fotodíodo). Contudo, os espectros obtidos são ligeiramente diferentes dos documentados, uma vez que possuem valores de DO mais baixos e também uma forma mais irregular. Tais características podem estar relacionadas com as particularidades do sistema de aquisição de dados, nomeadamente do fotodetector, e fazem com que não seja possível a distinção dos diferentes tipos de sangue com base nos declives de uma região linear do espectro, como determinado por Narayanan *et al.* [32, 33]. No entanto, a distinção entre os dois tipos de amostras (aglutinadas ou não aglutinadas) é possível através das diferenças de valores de DO. Para além disso, e tendo em conta que as características espectrais dos eritrócitos são bastante afetadas pela configuração experimental utilizada para a recolha de dados (como explicado no capítulo 2), é bastante provável que o *setup* experimental não esteja preparado para a consideração da componente de absorção e dispersão da mesma forma que a considerada no espectrofotómetro comercial utilizado por Narayanan *et al.* [32, 33]. Como foi abordado, na secção anterior, uma configuração com um ângulo de aceitação pequeno, contém informação mais relevante acerca das componentes de absorção e dispersão. Pelo contrário, se o ângulo de aceitação for elevado perde-se alguma informação acerca da componente de dispersão [39]. Esta pode ser a razão principal para a forma dos espectros obtidos, afastando-se assim dos espectros documentados, uma vez que estes últimos foram adquiridos com configurações de pequeno ângulo de aceitação.

Outra característica importante a realçar é a distinção do grupo sanguíneo AB na figura 3.6, onde se observa um afastamento das amostras de testes da amostra de controlo, mas com algumas particularidades. Uma amostra de sangue tipo AB a reagir com Anti-B gera uma DO menor, como seria de esperar, uma vez que ocorre aglutinação devido à presença do antigénio B; a mesma amostra de sangue a reagir com Anti-A gera um maior valor de DO, quando seria de esperar o mesmo comportamento do reagente Anti-B. Tal comportamento pode estar

relacionado com os fatores de diluição aplicados fazendo com que o reagente Anti-A (mais diluído que Anti-B) não provoque uma aglutinação tão efetiva, gerando células aglutinadas que não atingem uma dimensão muito considerada. Estas não têm a capacidade de provocar grandes quantidades de luz dispersa mas contribuem para o aumento da turbidez da amostra. Como consequência a DO obtida é maior do que na amostra de controlo, pois menor quantidade de luz chega ao detetor.

No que diz respeito à introdução do reagente Anti-AB (figuras 3.7 à 3.9) para a determinação dos grupos ABO, pode de facto aferir-se que este é útil para o esclarecimento do tipo sanguíneo em questão, uma vez que apresenta um comportamento distinto para cada tipo de amostra, permitindo a distinção entre uma amostra AB, uma apenas com um antigénio (A ou B) e sem nenhum dos antigénios (tipo O). Mais uma vez pode notar-se que uma aglutinação fraca (figura 3.8) dá origem a um aumento da turbidez da solução e, como consequência, a uma distinção da amostra de controlo com base num maior valor de DO por parte da amostra aglutinada. Portanto pode aferir-se que a utilização do reagente Anti-AB funciona como uma confirmação do tipo sanguíneo, validando ainda mais a tipagem sanguínea ABO.

3.2.1.2 Sistema Rh

As figuras 3.10 e 3.11 apresentam os resultados obtidos por aplicação do protocolo I a duas amostras do tipo sanguíneo Rh.

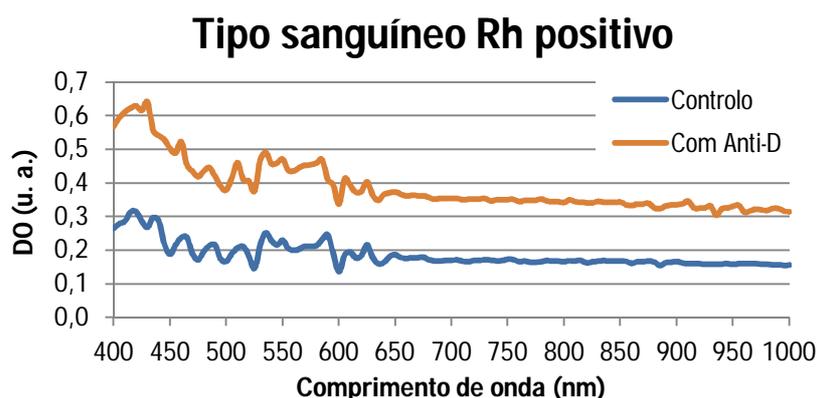


Figura 3.10 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue Rh positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja).

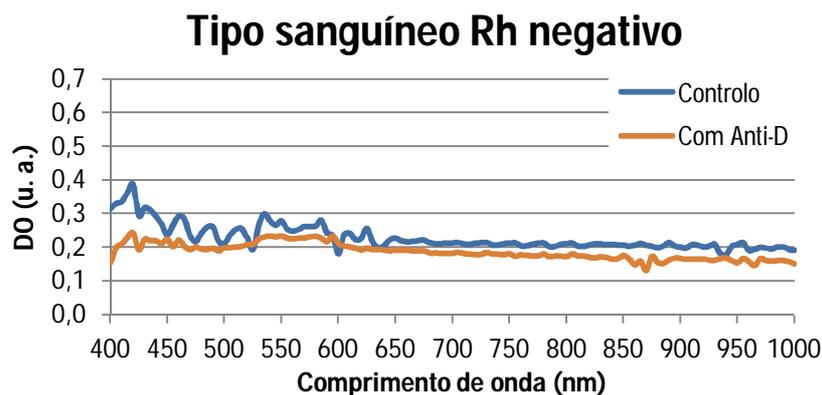


Figura 3.11 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue Rh negativo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja).

Considerando os resultados obtidos para o sistema Rh (figuras 3.10 e 3.11), pode aferir-se que é possível distinguir uma amostra de sangue Rh positiva de uma amostra Rh negativa. Pode constatar-se que no caso da ocorrência de aglutinação, a amostra aglutinada distingue-se da amostra de controlo, produzindo-se um valor de DO superior (figura 3.10). Mais uma vez, acredita-se que esteja relacionado com o facto da reacção com o reagente Anti-D ser naturalmente fraca. De facto, Narayanan *et al.* [33] utilizaram um composto específico para promover a aglutinação (PEG) no caso da utilização de amostra de sangue total com reagente Anti-D. Os valores de DO menores distinguiam-se do controlo, uma vez que a aglutinação era mais efetiva. Portanto, pode aferir-se que os resultados obtidos para o sistema Rh, apesar de não se encontrarem consistentes com os já documentados, permitem distinguir claramente uma amostra de sangue Rh positivo de Rh negativo, sem a necessidade de utilização de compostos que facilitam a aglutinação.

3.2.2 Com aplicação do protocolo I num espectrofotómetro comercial

Apesar dos resultados, até agora apresentados, validarem a utilização da espectrofotometria como método para a determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh, pode de facto notar-se que os espectros de DO obtidos são ligeiramente diferentes dos documentados. Tais diferenças residem na obtenção de menores valores de DO e também na forma dos espectros e podem ser explicadas pelos conceitos teóricos analisados anteriormente no capítulo 2. Ainda assim, foram realizados testes experimentais por aplicação do protocolo I, mas utilizando outro sistema de medição para a obtenção do espectro de DO, neste caso, um sistema automático comercial, tal como realizado por Narayanan *et al.* [32, 33]. O sistema

utilizado foi o espectrofotómetro Ultravioleta/Visível *JASCO V-560*, que possui um feixe de luz duplo e permite fazer um varrimento da amostra entre os comprimentos de onda 190 nm e 900 nm [44], estando disponível no departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. O objetivo destes testes experimentais foi verificar se era possível obter espectros mais próximos dos documentados na literatura, mas também perceber se, a utilização do *setup* experimental anteriormente descrito (figura 3.1) permite a obtenção de resultados válidos e consistentes, ou seja, se permite a distinção entre tipos sanguíneos tendo por base características semelhantes. Os resultados obtidos são de seguida apresentados.

3.2.2.1 Sistema ABO

As figuras 3.12 à 3.15 apresentam os resultados obtidos por aplicação do protocolo I a quatro amostras do tipo sanguíneo ABO e utilizando um espectrofotómetro comercial.

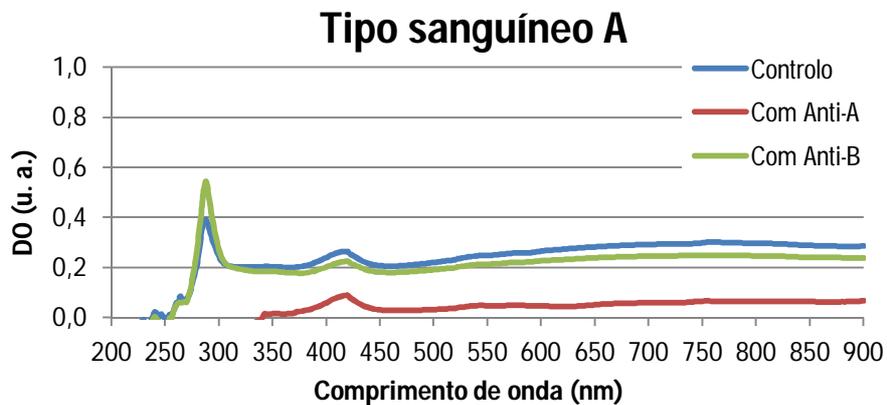


Figura 3.12 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

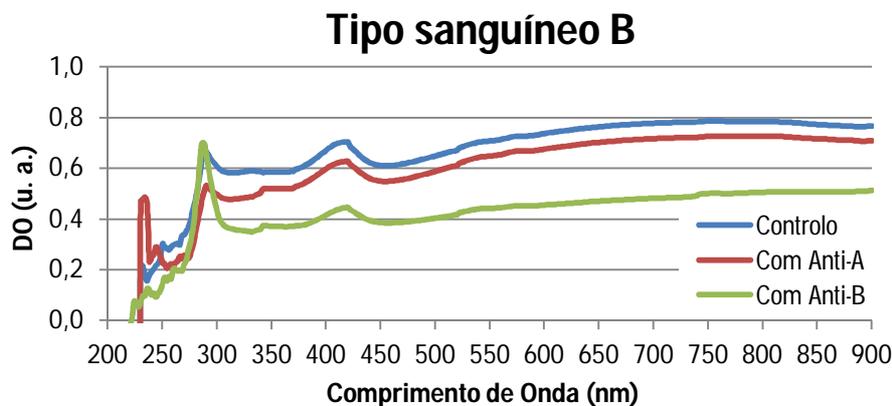


Figura 3.13 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo B a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

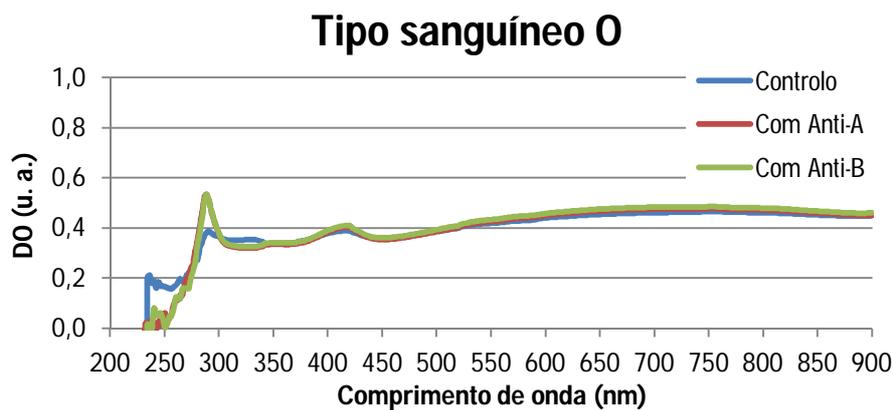


Figura 3.14 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

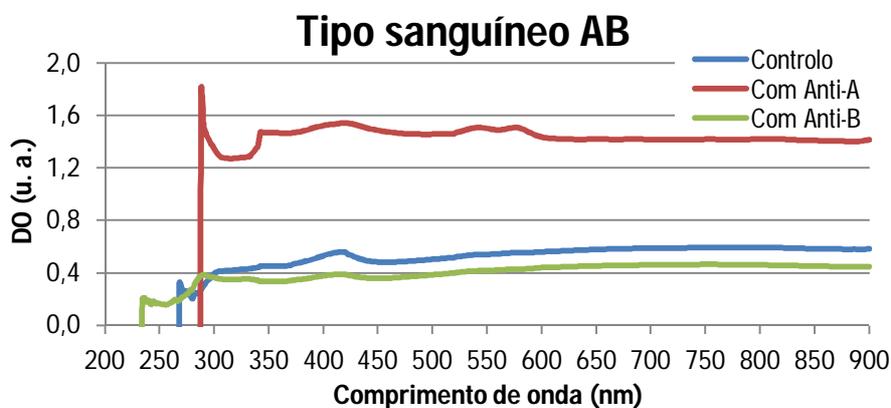


Figura 3.15 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

Testes com introdução do reagente Anti-AB

Os resultados obtidos para a classificação de um grupo AB e de um grupo com apenas um dos antígenos (A ou B), com a introdução do reagente Anti-AB, são apresentados nas figuras 3.16 e 3.17, respetivamente.

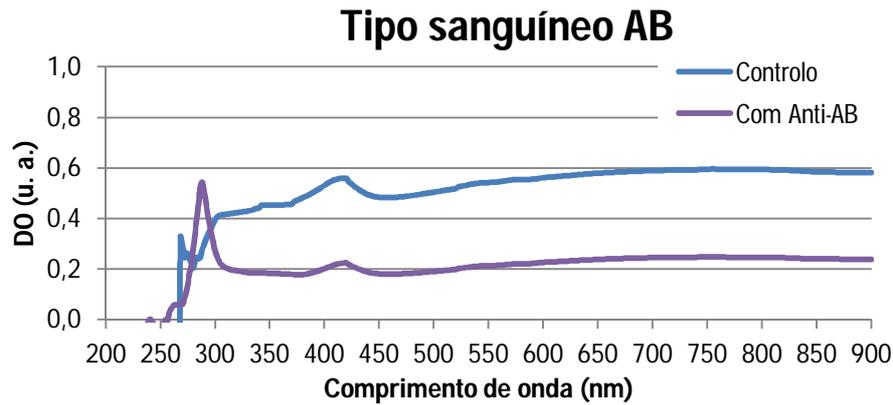


Figura 3.16 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo AB a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul claro).

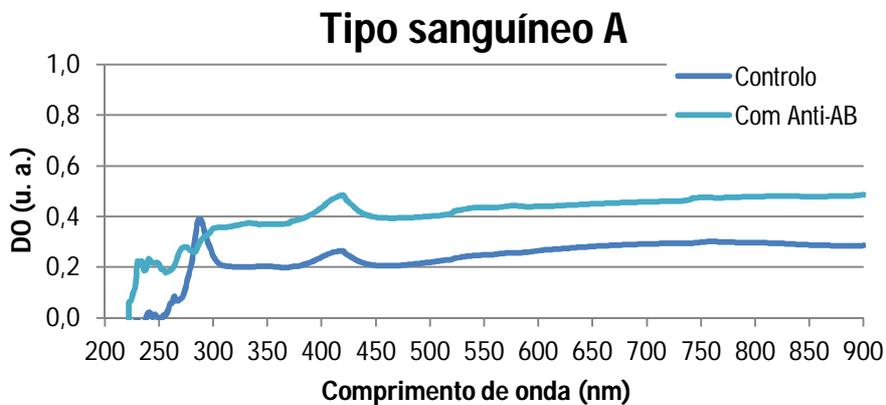


Figura 3.17 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-AB (curva azul claro).

Analisando os resultados obtidos nas figuras 3.12 à 3.15 importa desde já referir que os espectros de DO obtidos são mais regulares que os anteriormente obtidos com o sistema experimental construído no laboratório, como seria de esperar. Assim, nesse sentido aproximam-se mais dos resultados documentados. Relativamente à forma dos espectros, e tendo por base os conceitos teóricos apresentados anteriormente, pode afirmar-se que estes assemelham-se aos espectros de eritrócitos obtidos utilizando um sistema com um ângulo de aceitação ligeiramente maior que 2° (conceitos abordados no capítulo 2 – secção 2.5.3). Tal configuração permite obter informação relevante das duas componentes que afetam a DO (absorção e dispersão), embora não seja a configuração seguida por Narayanan *et al.* [32, 33]. Pode constatar-se que a distinção do grupo sanguíneo pode ser feita com base nos menores valores de DO das amostras aglutinadas em relação à amostra de controlo e às amostras não aglutinadas. Portanto, pode de facto aferir-se que os resultados obtidos estão de acordo com os resultados do *setup*

experimental, validando assim o sistema utilizado para a obtenção dos dados espectrofotométricos. É de referir, no entanto, que há uma ligeira melhoria na distinção entre os dois tipos de amostras, utilizando um espectrofotómetro comercial (maiores diferenças de DO entre elas), podendo esta dever-se às características do sistema de medição utilizado, nomeadamente à regularidade dos espectros obtidos.

No que diz respeito aos restantes resultados, ou seja, a introdução do reagente Anti-AB para determinação do sistema ABO (figuras 3.16 e 3.17) pode constatar-se que estes são bastante consistentes com os obtidos anteriormente, com o *setup* experimental.

3.2.2.2 Sistema Rh

As figuras 3.18 e 3.19 apresentam os resultados obtidos por aplicação do protocolo I a duas amostras do tipo sanguíneo Rh, utilizando um espectrofotómetro comercial.

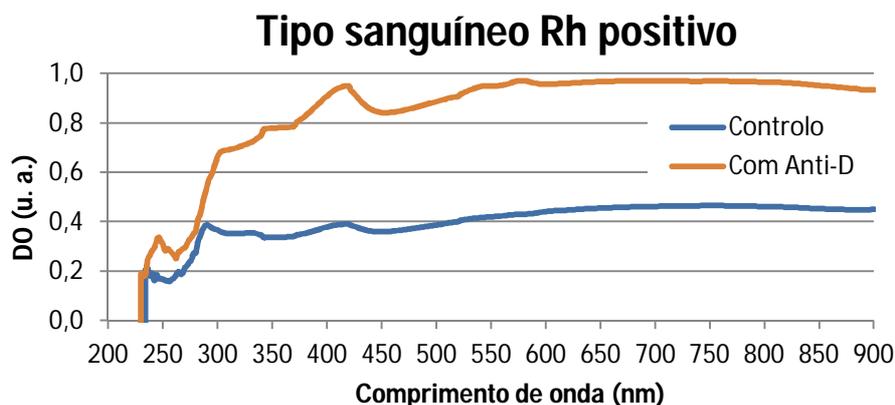


Figura 3.18 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue Rh positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja).

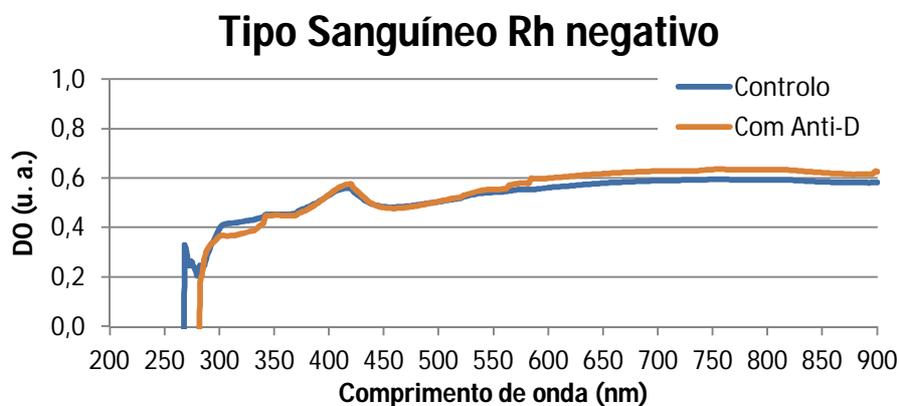


Figura 3.19 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue Rh negativo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja).

Por observação das figuras 3.18 e 3.19 pode aferir-se que os resultados obtidos com o sistema comercial na distinção dos grupos sanguíneos Rh são bastante consistentes com os obtidos anteriormente, com o *setup* experimental (figura 3.1). Assim, no caso da ocorrência de aglutinações que se consideram fracas verifica-se uma distinção da amostra aglutinada, com valores de DO elevados (figura 3.18), facto já explicado anteriormente. Pelo contrário, no caso da existência de uma amostra não aglutinada verifica-se a obtenção de um espectro de DO muito semelhante ao espectro da amostra de controlo (figura 3.19).

3.2.3 Comparação entre protocolos I e II

De forma a verificar a relevância de incubar a amostra para a ocorrência das reações de aglutinação, como aplicado por outros autores [3, 9, 32-34], foram realizados alguns testes experimentais (utilizando o sistema experimental laboratorial – figura 3.1) tendo por base a utilização da mesma amostra de sangue e aplicando os protocolos I e II. Assim, foi possível comparar os resultados obtidos pelas duas situações. Seguidamente é apresentado um exemplo, aplicado a uma amostra de sangue tipo A positivo.

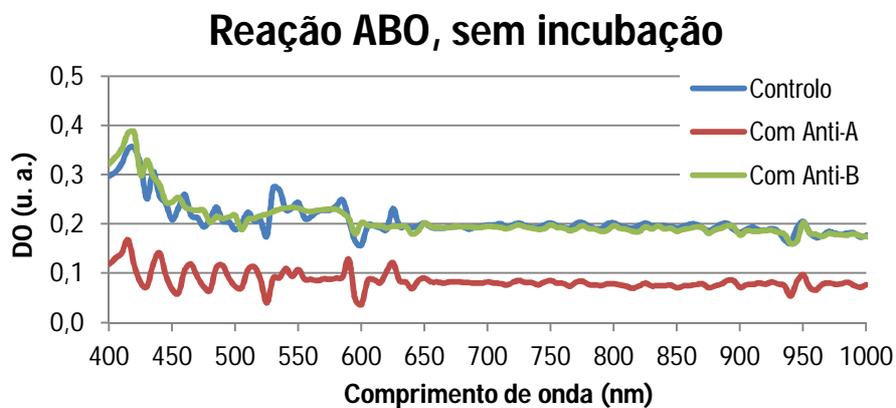


Figura 3.20. Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde), por aplicação do protocolo I.

Reação ABO, com incubação

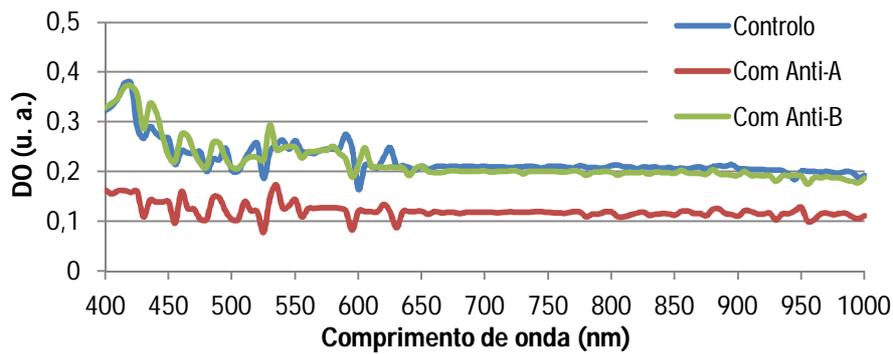


Figura 3.21 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde), por aplicação do protocolo II.

Reação Rh, sem incubação

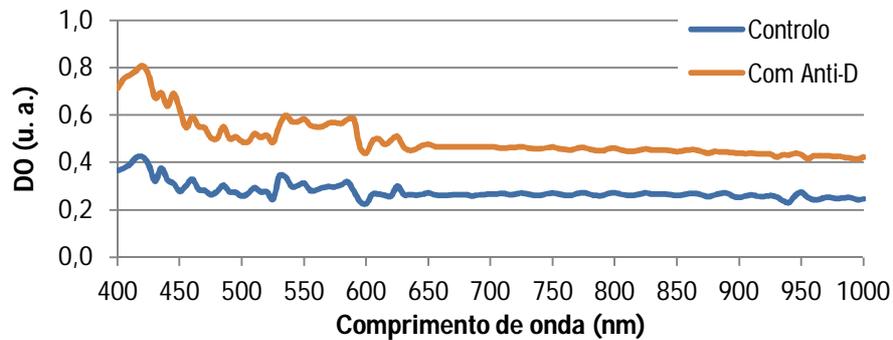


Figura 3.22 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo Rh positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja), por aplicação do protocolo I.

Reação Rh, com incubação

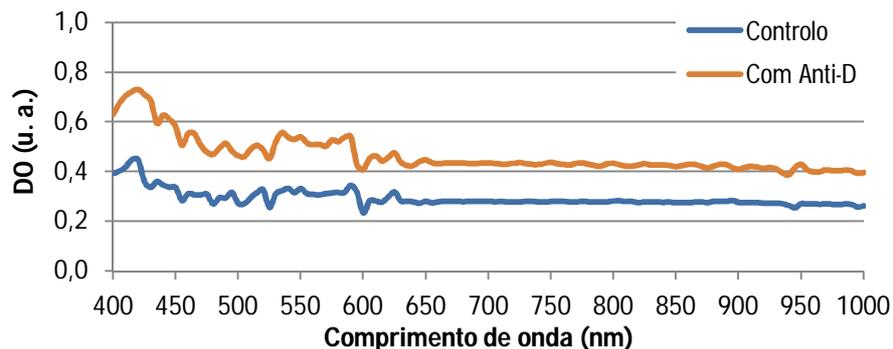


Figura 3.23 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo Rh positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja), por aplicação do protocolo II.

Por observação das figuras 3.20 à 3.23 pode constatar-se que não existem diferenças significativas entre os espectros de DO no caso de utilização de incubadora e no caso de a

recção ocorrer à temperatura ambiente, permitindo a mesma distinção entre as amostras aglutinadas e não aglutinadas. Tal facto está de acordo com o esperado, uma vez que alguns testes de determinação dos tipos sanguíneos realizados em laboratórios (teste em lâmina, tubo, entre outros) são, normalmente, realizados à temperatura ambiente. Esta característica permite obviar a utilização de incubadora para a determinação dos tipos sanguíneos ABO no dispositivo que é pretendido implementar, garantindo assim a sua portabilidade.

3.3 Análise final da metodologia implementada

De uma forma geral, os resultados apresentados na secção 3.2 do presente capítulo, permitem aferir que é possível a determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh recorrendo à medição dos espectros de DO de várias amostras de teste. Contudo, alguns resultados obtidos são ligeiramente diferentes dos documentados, o que pode estar relacionado com uma série de fatores, como as montagens/sistemas utilizados para a obtenção dos espectros, a forma de preparação das amostras e até as condições de reação entre a amostra de sangue e os reagentes. Tais fatores foram abordados, bem como a forma como estes podem afetar os resultados obtidos.

Como conclusão das análises experimentais realizadas, comprova-se que a utilização da espectrofotometria para a determinação dos grupos sanguíneos seguindo o protocolo I (protocolo experimental mais simples) é viável, embora esteja sujeita a um conjunto de fatores que influenciam os resultados.

Assim, através da realização destes testes experimentais iniciais foi possível constatar que a abordagem espectrofotométrica é válida para a determinação dos grupos sanguíneos, embora esteja sujeita a um conjunto de particularidades que têm de ser corretamente controladas e que se podem revelar difíceis de automatizar. As principais são: **a montagem experimental**, ou seja, o ângulo de aceitação do detetor vai influenciar o espectro de DO dos eritrócitos; **a forma de preparação da amostra**, uma vez que se notou ao longo da realização dos testes que, pequenas variações na recolha das amostras produziam diferenças significativas nos resultados obtidos; **a força da reação de aglutinação**, que afeta a forma de distinção da amostra aglutinada em relação ao controlo; **o tempo de preparação da amostra**, uma vez que é necessário realizar um conjunto de diluições e misturas; **e a rapidez de medição do espectro**, uma vez que nas amostras aglutinadas as células têm tendência a depositar-se no fundo da cuvette, pelo que é importante medir o espectro de DO o mais rápido

possível. Esta característica obriga à obtenção de apenas um valor de intensidade de corrente no fotodíodo para cada comprimento de onda, resultando em espectros de DO menos regulares.

Capítulo 4 – Testes experimentais: metodologia em lâmina

Neste capítulo é apresentado um protocolo experimental alternativo, baseado no teste em lâmina, para a distinção dos grupos sanguíneos ABO-Rh através de uma abordagem espectrofotométrica. São ainda expostos e discutidos os resultados obtidos. Para terminar, é explicada a importância do desenvolvimento de um protocolo mais simples e rápido para a concretização deste projeto, comparando estes resultados com os anteriormente obtidos no capítulo 3, com a metodologia em cuvette.

4.1 Protocolo experimental em lâmina

Devido às limitações descritas no capítulo anterior, relativas à determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh, por aplicação do protocolo experimental em cuvette, optou-se por aplicar um protocolo em lâmina, de forma a verificar a sua validade para a distinção dos grupos sanguíneos ABO-Rh. O teste em lâmina é utilizado para tipagem sanguínea manual, em que o resultado de teste é obtido por inspeção visual do técnico que o realiza. Por ser um protocolo bastante simples decidiu-se testar se a decisão de teste poderia ser feita automatizada, através de uma análise ótica de um conjunto de amostras. Assim, o procedimento de preparação das amostras foi baseado no teste convencional em lâmina. É de referir que a literatura não regista a utilização deste protocolo convencional em medições óticas para determinação dos tipos sanguíneos. Contudo, a automatização de um procedimento deste tipo, pode trazer um conjunto de vantagens, entre as quais: a rapidez do teste; a eliminação da subjetividade associada à interpretação dos resultados por parte dos humanos; a simplicidade do método, já que os reagentes e as amostras de sangue não necessitam de ser sujeitas a diluições; e a eliminação de algumas dificuldades verificadas no capítulo anterior, que tornam a tarefa de criação de um sistema automático mais complexa. Apesar de todas as vantagens associadas, o fundamental foi verificar se é possível automatizar este tipo de teste e se os resultados obtidos permitem generalizar a determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh, de forma a construir um sistema eletrónico para o efeito.

Procedimento de teste – realizado à temperatura ambiente:

- Pipetar 50 μL de reagente apropriado (Anti-A, Anti-B, Anti-AB, Anti-D) para uma lâmina de vidro.

- Adicionar sangue total (cerca de um quarto da quantidade de reagente, $\sim 12,5 \mu\text{L}$).
- Utilizar uma vareta de mistura, misturando o sangue e o anticorpo uniformemente, durante alguns segundos, numa área de aproximadamente $2,5 \text{ cm}^2$.
- Proceder às medições espectrais.

Mais uma vez, fazendo reagir amostras sanguíneas com cada um dos reagentes anticorpos, podem ser obtidas dois tipos de amostras de teste, aglutinadas ou não aglutinadas (ver tabela 3.1), o que produzirá diferenças ao nível dos espectros de DO recolhidos.

Relativamente ao sistema de medição utilizado, este foi muito semelhante ao *setup* experimental apresentado no capítulo 3 (figura 3.1), sendo o sistema ótico apenas ajustado para a utilização de uma amostra em lâmina, em vez de cuvete. Mais uma vez, para os testes experimentais iniciais não se teve em conta as distâncias entre os componentes óticos, aproximou-se apenas os componentes o mais possível e alinhou-se o feixe de luz com o fotodíodo. Contudo, a questão das distâncias será considerada seguidamente. A figura 4.1 apresenta, em detalhe, o sistema ótico utilizado.

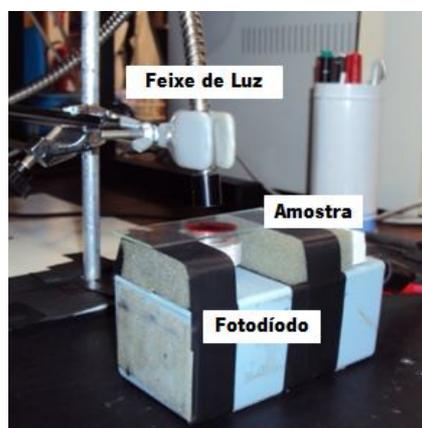


Figura 4.1 *Setup* experimental do sistema ótico, evidenciando-se os vários componentes.

4.2 Resultados experimentais e discussão

A aplicação do protocolo em lâmina foi realizada em dez amostras sanguíneas ($n=10$) de todos os tipos ABO-Rh. Seguidamente são apresentados alguns resultados obtidos. Os espectros apresentados foram obtidos através dos valores de corrente do fotodíodo (em A) em função do comprimento de onda (nm), e por aplicação da equação 2.5. Os valores de corrente referentes ao solvente (I_{solvente}), para cada uma das amostras, foram obtidos utilizando uma lâmina de vidro com um reagente anticorpo específico, ou seja, para obter o espectro relativo apenas a uma

amostra de sangue a reagir com Anti-A, por exemplo, utilizou-se como solvente o reagente Anti-A. O anexo II apresenta os valores de corrente no fotodíodo para cada um dos reagentes (Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D) e para uma das amostras de sangue a seguir apresentadas.

As figuras 4.2 à 4.5 apresentam os espectros de DO obtidos por aplicação do protocolo em lâmina descrito a quatro amostras do tipo sanguíneo ABO-Rh.

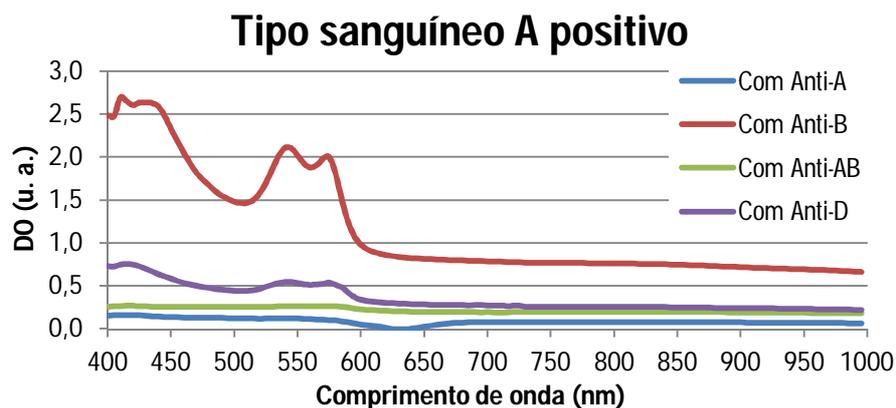


Figura 4.2 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A positivo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e reagente Anti-D (curva roxa).

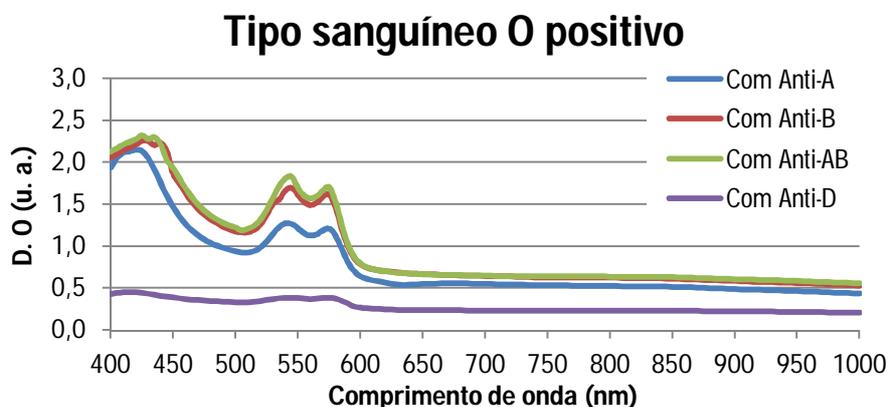


Figura 4.3 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O positivo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e reagente Anti-D (curva roxa).

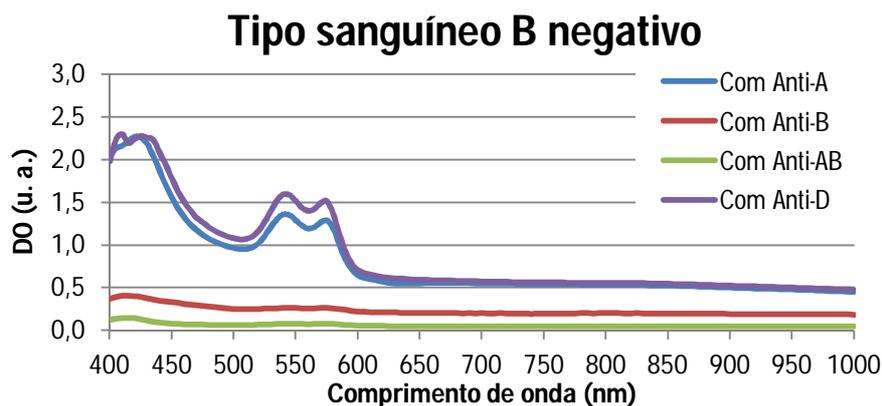


Figura 4.4 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo B negativo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e reagente Anti-D (curva roxa).

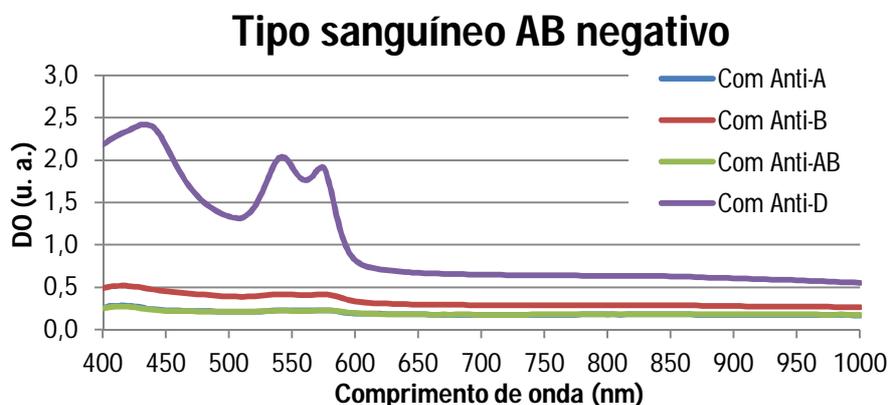


Figura 4.5 Valores de DO em função do comprimento de onda (nm) para uma amostra de sangue tipo AB negativo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e reagente Anti-D (curva roxa).

Por análise dos resultados apresentados nas figuras 4.2 à 4.5 pode verificar-se que a aplicação de um protocolo de teste muito simples, sem a necessidade de diluições, é viável para a distinção dos grupos sanguíneos ABO-Rh. De facto, pode observar-se que uma amostra aglutinada apresenta um espectro de DO bastante distinto de uma amostra não aglutinada, quer na sua forma como na grandeza dos valores obtidos. O fenómeno de aglutinação leva à criação de aglomerados de células, provocando um aumento da quantidade de luz que é dispersa, e como consequência, maior quantidade de luz atinge o detetor, resultando numa diminuição da DO. Para além disso, uma amostra não aglutinada é uma amostra mais homogênea, com maior turbidez, e com partículas mais pequenas que dispersam pequenas quantidades de luz, resultando assim em valores de DO maiores. Relativamente à forma do espectro das amostras

não aglutinadas, esta é bastante semelhante ao espectro de uma suspensão de eritrócitos, em que se evidenciam os picos de absorção da hemoglobina (nos comprimentos de onda 417, 547, e 575 nm [40]). Já os espectros de amostras aglutinadas apresentam uma variação de DO muito pequena, devido aos fenómenos óticos provocados pela aglutinação (dispersão e variação da turbidez) que minimizam o efeito da presença da hemoglobina.

Outra observação importante a fazer é que os espectros obtidos são mais regulares que os anteriormente obtidos com a utilização do protocolo em cuvette (capítulo 3). Tal facto está relacionado com o aumento do número de amostras de corrente no fotodíodo (4 valores de corrente) para cada comprimento de onda, aquando da aquisição dos dados experimentais. Esta capacidade do *setup* experimental pode ser utilizada, neste caso, uma vez que não existe o problema da rápida deposição das células aglutinadas na parte inferior da cuvette. Assim, o tempo de medição do espectro deixa de ser um fator crítico, embora deva ser o mais rápido possível a fim de minimizar o tempo de determinação do tipo de sangue. Ainda relacionado com a questão do tempo de determinação do tipo sanguíneo, o protocolo e os resultados apresentados neste capítulo permitem aferir que esta abordagem seria mais fácil de aplicar no sistema automático e produziria resultados mais rápidos, devido à sua simplicidade de implementação. Para além disso, a preparação das amostras de teste foi realizada por diferentes pessoas (uma vez que a mistura é manual e assim garante-se que não depende do técnico que a realiza), obtendo-se resultados muito semelhantes, o que nos permite aferir que este protocolo não está dependente da preparação da amostra como o anterior, em que pequenas variações produziam diferentes resultados. Outra das características a realçar é que este protocolo permite a determinação do sistema Rh pelo mesmo princípio do sistema ABO, apesar do reagente Anti-D ter uma força de reação naturalmente mais fraca.

A principal limitação desta abordagem é a área de mistura e o posicionamento dessa área em relação aos componentes óticos (feixe de luz e fotodíodo), uma vez que também foi verificado, por teste experimentais, que aumentando a área de mistura, a amostra ficava mais ou menos diluída gerando diferenças de DO. Esta limitação pode ser facilmente ultrapassada criando no sistema automático uma área de mistura constante para todas as amostras de teste.

Assim, a principal vantagem da utilização desta abordagem, para além das já enunciadas, é que permite a distinção clara e objetiva entre uma amostra aglutinada e não aglutinada através da forma do espectro de DO e também dos valores de DO produzidos pelas amostras, ou seja, as diferenças entre os dois tipos de amostras (aglutinada e não aglutinada)

são no mínimo 0,5 u. a., em contraste com os 0,1 a 0,2 u. a. (em média) do protocolo em cuvette. Esta margem de distinção mais elevada, entre as amostras, facilita a automatização do processo de decisão na determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh. Por esta razão e por outras vantagens já enunciadas anteriormente, a determinação dos tipos sanguíneos com base num protocolo experimental em lâmia revela-se uma abordagem mais precisa e conveniente para ser aplicada no sistema eletrónico automático e portátil para determinação dos tipos sanguíneos ABO-Rh.

4.3 Posicionamento de componentes e a sua influência no espectro de DO

Uma vez que o ângulo de aceitação do detetor está relacionado com a sua distância à amostra [39, 40], foram realizados testes experimentais (em 5 amostras sanguíneas, $n=5$) aumentando a distância entre o detetor e a amostra, de forma a reduzir o ângulo de aceitação e verificar a sua influência no espectro de DO. Na primeira montagem, figura 4.1, aproximaram-se o mais possível os componentes óticos, sendo a distância entre a amostra e o detetor cerca de 3 cm, uma vez que o fotodiodo não está à superfície da caixa que o envolve. De forma a diminuir o ângulo de aceitação e mantendo o mesmo fotodiodo, aumentou-se a distância entre o fotodiodo e a amostra para o dobro (6 cm). O sistema ótico alterado é apresentado na figura 4.6.

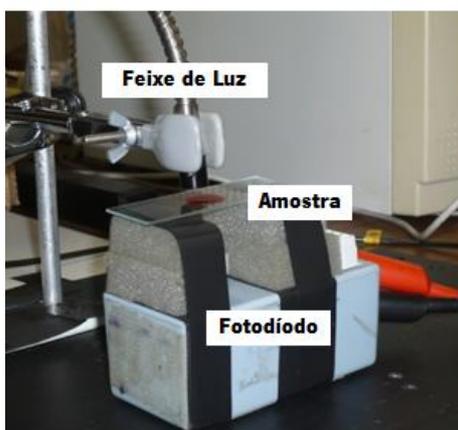


Figura 4.6 *Setup* experimental do sistema ótico, evidenciando-se o aumento da distância entre a lâmina e a caixa que contém o fotodiodo.

Nas Figuras 4.7 e 4.8 são apresentados dois exemplos de espectros obtidos em duas amostras sanguíneas, com a utilização do sistema ótico apresentado na figura 4.6.

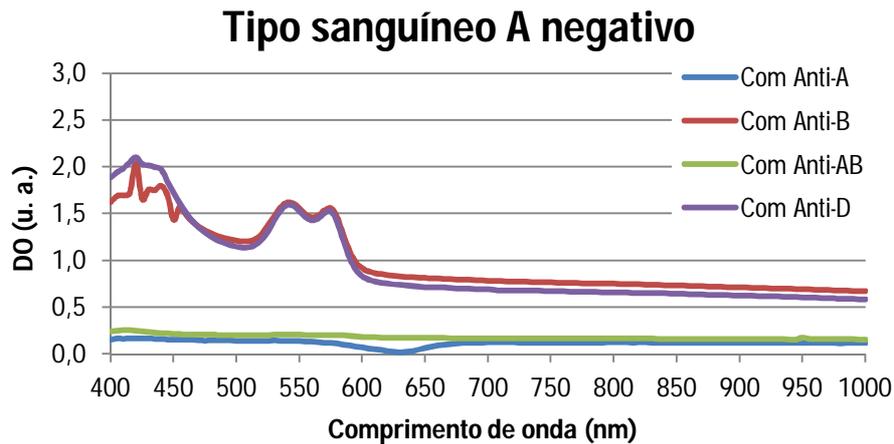


Figura 4.7 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo A negativo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).

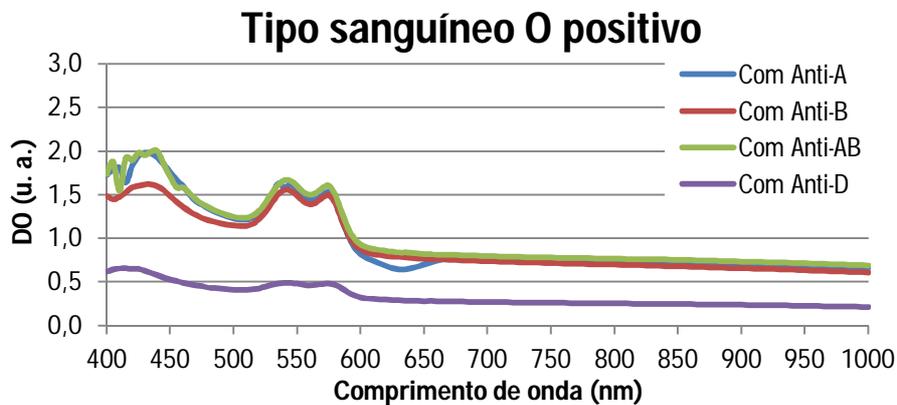


Figura 4.8 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue tipo O positivo a reagir com reagente Anti-A (curva azul), reagente Anti-B (curva vermelha), reagente Anti-AB (curva verde) e com reagente Anti-D (curva roxa).

Por observação das figuras 4.7 e 4.8, pode constatar-se que os espectros são muito semelhantes aos obtidos anteriormente (secção 4.2), sendo que as amostras não aglutinadas apresentam os picos de DO relativos à hemoglobina, e as amostras aglutinadas apresentam um espectro mais constante e com baixos valores de DO devido à forte dispersão provocada pelas células aglutinadas e à menor turbidez característica das soluções.

No entanto pode notar-se que, entre os comprimentos de onda de 600 nm e 1000 nm, é visível outra diferença entre amostras aglutinadas e não aglutinadas, ainda que ligeira. Ou seja, as amostras não aglutinadas apresentam uma zona linear com um determinado declive, muito próximo entre todas elas. Já as amostras aglutinadas apresentam, na mesma zona, um declive muito próximo de 0. Tal resultado está de acordo com as diferenças espectrais entre amostras

aglutinadas e não aglutinadas, relatadas por Narayanan *et al.* [32, 33]. Para além disso, de acordo com o estudo das propriedades óticas do sangue, com o aumento da distância entre amostra e detetor é possível a diminuição do ângulo de aceitação, permitindo assim obter um espectro com uma informação mais relevante da componente de absorção e dispersão (apenas a luz dispersa na direção frontal é contabilizada no espectro de DO). Tal característica pode estar relacionada com o aparecimento destas diferenças no espectro de DO.

Assim, pela realização deste teste experimental pode de facto aferir-se que seria desejável que a amostra ficasse a alguns centímetros de distância do fotodíodo se fosse pretendido criar um sistema com um ângulo de aceitação pequeno, maximizando a informação da componente de absorção e dispersão no espectro de DO, e permitindo a distinção das amostras com base no declive de uma região do espectro. Contudo essa distância não deve ser muito elevada, para não condicionar as reduzidas dimensões do sistema a implementar.

Portanto, uma vez analisados os resultados obtidos, pensa-se que uma abordagem baseada nas diferenças da forma dos espectros entre amostras aglutinadas e não aglutinadas é mas precisa e segura para a distinção das amostras. Sabe-se que seria também viável a utilização dos declives da região aproximadamente linear entre os 600 nm e 1000 nm (abordagem até agora seguida por vários autores). Contudo esta abordagem está sujeita a um controlo rigoroso da distância entre a amostra e o fotodíodo, e pode também por em causa a reduzida dimensão do sistema a construir.

Assim, uma vez que a distinção entre amostras aglutinadas e não aglutinadas será baseada nas diferenças da forma dos espectros de DO obtidos não será tida em conta o aumento da distância entre amostra e fotodíodo, sendo apenas desejável a sua aproximação de forma a minimizar a quantidade de luz perdida e ainda o tamanho do sistema a implementar.

Capítulo 5 – Especificação e Implementação do Protótipo

Neste capítulo são apresentados e especificados todos os componentes eletrônicos necessários para a implementação do sistema de determinação dos grupos sanguíneos ABO-Rh, tendo em vista as características pretendidas (automático, dimensões reduzidas, baixo custo e portátil). Para além disso, são apresentadas todas as etapas desde o *design* do sistema até à sua implementação, bem como uma explicação completa do funcionamento do dispositivo.

5.1 Sistema de LEDs

Após a validação da utilização de um protocolo experimental geral com base no teste em lâmina, descrito no capítulo 4, procedeu-se à implementação de um sistema ótico baseado em LEDs evitando assim a utilização da fonte de luz e do monocromador, componentes de grandes dimensões e de elevado custo. Uma vez que se optou por distinguir as amostras aglutinadas de não aglutinadas através das diferenças na forma dos espectros, nomeadamente a variação da DO ao longo do espectro, decidiu-se escolher três gamas de comprimentos de onda para analisar cada uma das amostras (maximizar essas diferenças). Assim, observando os espectros de DO obtidos anteriormente (na secção 4.1.1), as gamas escolhidas foram: 400 nm a 430 nm, 530 nm a 575 nm e maior que 750 nm. Com esta escolha, espera-se que uma amostra aglutinada tenha uma variação da DO pequena, comparando os três valores discretos de DO das gamas escolhidas. Pelo contrário, pensa-se que uma amostra não aglutinada possua uma variação de DO bastante acentuada ao longo das gamas de interesse, devido à existência dos picos da hemoglobina, e que possua valores de DO mais elevados que uma amostra aglutinada. Em suma, com a aplicação do sistema de LEDs espera-se a obtenção de valores de DO concordantes com os espectros obtidos com a fonte de luz, e como consequência a distinção clara entre amostras não aglutinadas e aglutinadas dos tipos sanguíneos ABO-Rh.

Desta forma, a primeira preocupação foi a escolha de três LEDs que respeitassem as gamas de interesse e que possuísem características específicas e fundamentais para o desenvolvimento futuro do sistema que se pretende construir, tais como: reduzida dimensão; largura de banda relativamente estreita; ângulo de emissão não muito elevado; preço acessível; e baixo consumo. Assim, foram escolhidos três LEDs (circulares e 3 mm de diâmetro) com um pico de emissão nos 406 nm, 566 nm e 956 nm [45, 46][47]. As caracterizações experimentais realizadas sobre os mesmos (determinação do pico de emissão e largura de banda espectral,

utilizando o espectrofotômetro laboratorial descrito no capítulo 3 – figura 3.1) são apresentadas no anexo III.

A figura 5.1 apresenta um exemplo de configuração experimental para os testes de determinação dos tipos sanguíneos, utilizando o *LED* com pico de emissão em 566 nm.

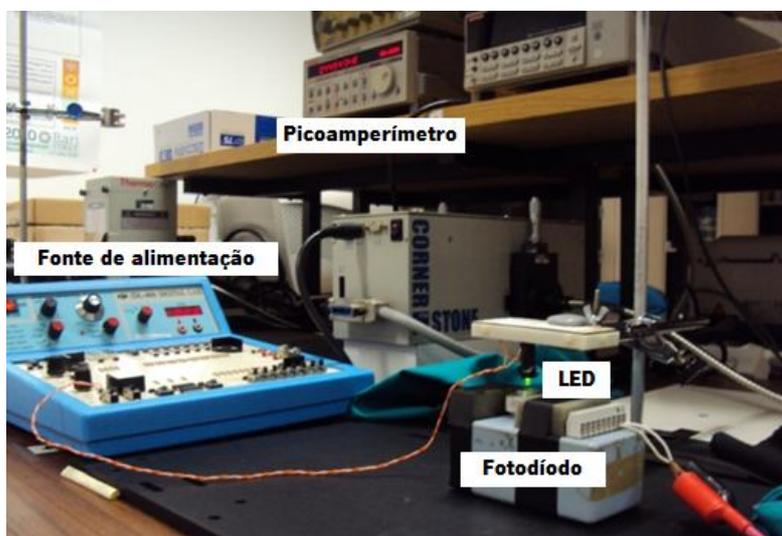


Figura 5.1 Setup experimental com a utilização de LEDs.

Os testes de tipagem sanguínea, utilizando um sistema de LEDs, foram realizados num total de dez amostras ($n=10$) de todos os tipos sanguíneos. Seguidamente são apresentados os valores discretos de DO obtidos para cada comprimento de onda de interesse, para 4 amostras de sangue ABO-Rh.

Os valores de DO são obtidos por aplicação da equação 2.5 (capítulo 2), tendo em conta os valores discretos de corrente no fotodíodo de amostras de teste e respectivos reagentes (soluções de anticorpos: Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D).

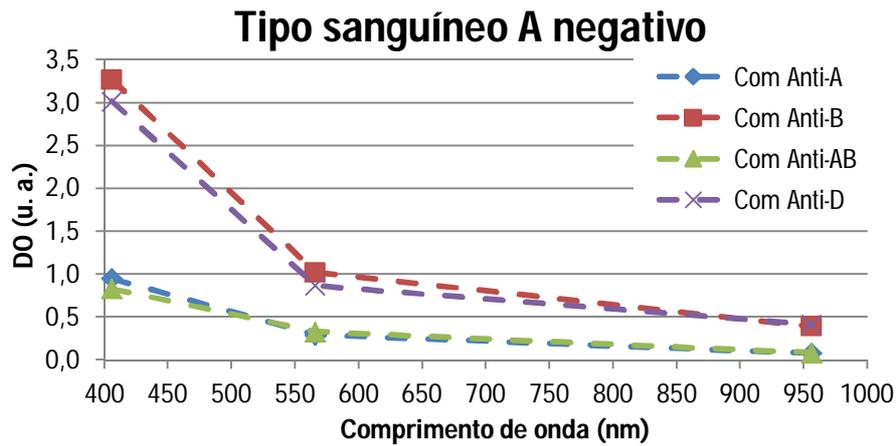


Figura 5.2 Valores discretos de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo A negativo, com a utilização de uma série de três LEDs.

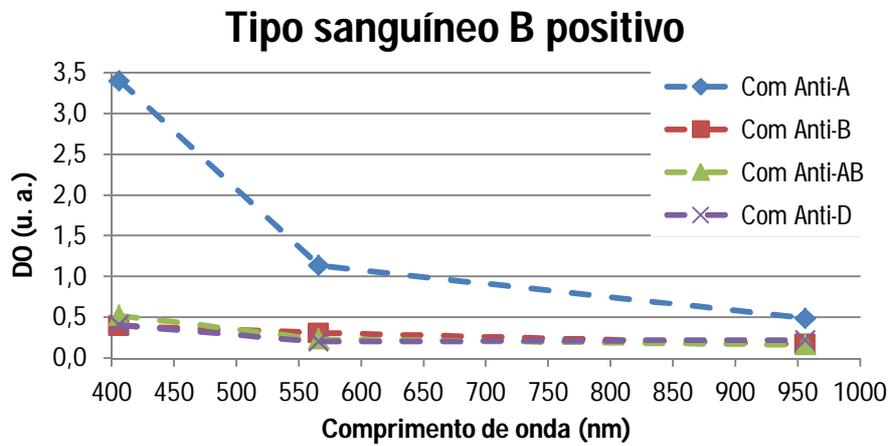


Figura 5.3 Valores discretos de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo B positivo, com a utilização de uma série de três LEDs.

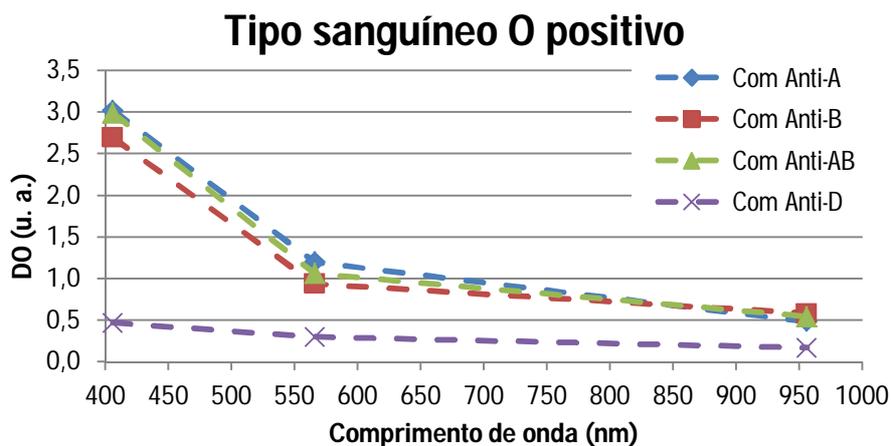


Figura 5.4 Valores discretos de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo O positivo, com a utilização de uma série de três LEDs.

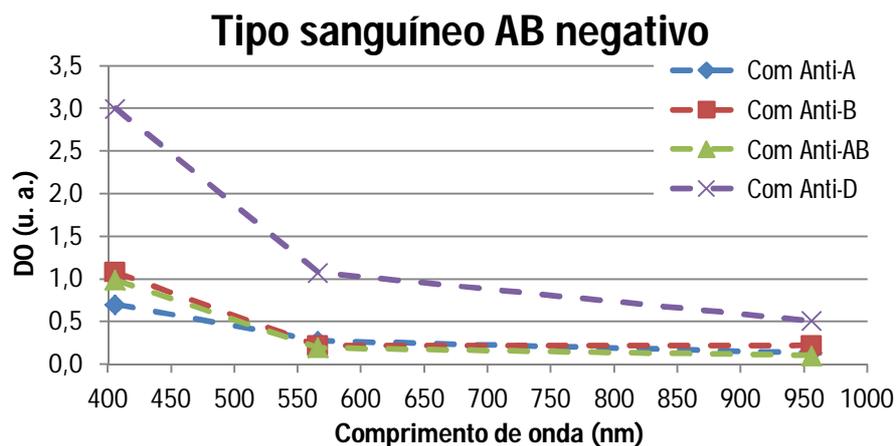


Figura 5.5 Valores discretos de DO obtidos para uma amostra de sangue tipo AB negativo, com a utilização de uma série de 3 LEDs.

A tabela 5.1 apresenta a variação média entre os valores discretos de DO relativos aos picos de emissão dos LEDs, para as amostras aglutinadas e não aglutinadas, obtidas com os testes sanguíneos referentes aos 10 ensaios.

Tabela 5.1 Variação média de DO entre os comprimentos de onda discretos, para amostras aglutinadas e não aglutinadas, obtidas em dez ensaios de teste (dez amostras sanguíneas).

	Variação Média DO (n=10)	
	406 nm – 566 nm	566 nm – 956 nm
Amostras não aglutinadas	2,0136	0,5546
Amostras aglutinadas	0,4433	0,1167

Por observação das figuras 5.2 à 5.5, referentes à determinação dos tipos sanguíneos ABO-Rh recorrendo a um sistema ótico baseado em três LEDs, pode aferir-se que a distinção dos grupos sanguíneos é clara e objetiva. Assim, as amostras não aglutinadas apresentam uma variação acentuada dos valores de DO ao longo das medições discretas nos comprimentos de onda utilizados. Para além disso, apresentam valores de DO elevados, especialmente nos comprimentos de onda de 406 nm e 566 nm, devido à presença da hemoglobina, que absorve grandes quantidades de luz nessa região. Pelo contrário, uma amostra aglutinada apresenta um espectro de DO mais constante ao longo da série discreta de comprimentos de onda, sendo os valores de DO mais baixos e os picos de absorção da hemoglobina menos evidentes. Tal facto, está relacionado com menor turbidez das soluções e com a dispersão de luz provocada pelas

partículas de grandes dimensões (células aglutinadas), fazendo com que o efeito da presença da hemoglobina (picos de absorção) não seja evidente neste caso, uma vez que a quantidade de luz que atinge o detetor é mais elevada.

Para além disso, os valores apresentados na tabela 5.1 confirmam as diferenças espectrais de DO entre amostras aglutinadas e não aglutinadas, sendo que as diferenças são significativamente maiores entre amostras não aglutinadas, especialmente entre os comprimentos de onda 406 nm e 566 nm.

Portanto, fica validada a utilização de um sistema ótico baseado em três LEDs (pico de emissão nos 406 nm, 566 nm e 956 nm) para a distinção dos grupos sanguíneos ABO-Rh.

5.2 Componentes eletrónicos do sistema

Uma vez validada a utilização de LEDs para a distinção dos tipos sanguíneos ABO-Rh, procedeu-se à seleção e especificação dos restantes componentes eletrónicos necessários para a implementação do sistema. Na figura 5.6 é apresentado um diagrama de blocos dos componentes eletrónicos que constituem o protótipo.

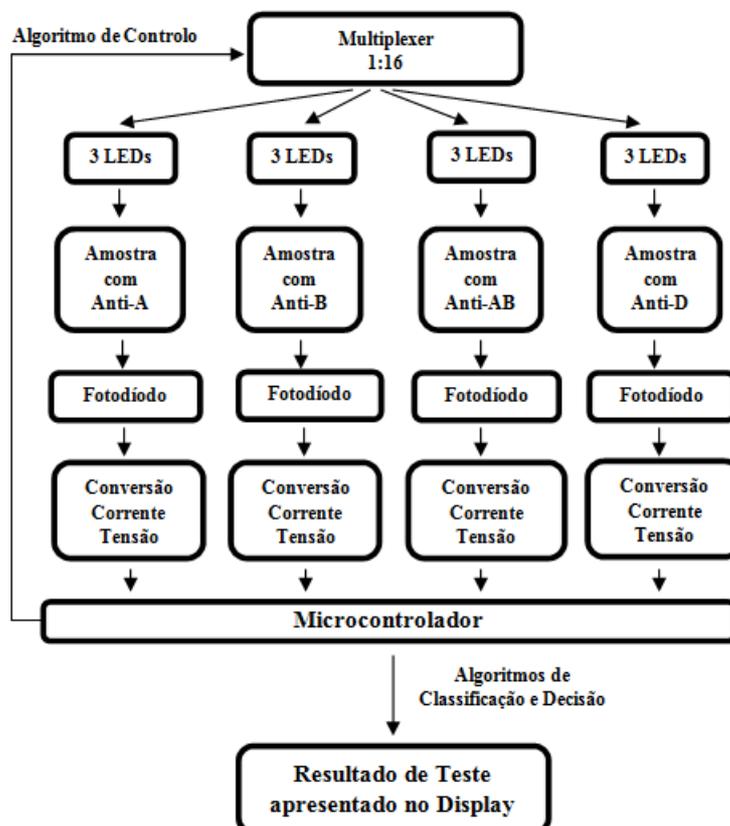


Figura 5.6 Diagrama de blocos dos componentes eletrónicos do sistema.

O sistema inclui quatro regiões de teste, uma para cada reagente anticorpo. São utilizados quatro conjuntos de três LEDs (picos de emissão: 406 nm, 566 nm e 956 nm), perfazendo a quantidade total de doze LEDs. É necessário ainda a utilização de um *multiplexer* de forma a selecionar o *LED* ativo num dado momento. Este controlo é realizado por um microcontrolador, por aplicação de um algoritmo de controlo (explicado na secção 5.4). Assim, foi selecionado um *multiplexer* de dezasseis canais (1:16) da *Analog Devices* (ADG706) [48], sendo as suas características (baixo consumo, gama de operação entre os 1,8 e os 5,5 V) adequadas para a implementação de dispositivos portáteis.

Um *multiplexer* é um circuito que permite colocar na saída um sinal proveniente de uma das suas entradas, através de um sinal de controlo digital (entradas de seleção do *multiplexer*). Uma vez que os *multiplexers* analógicos são bidirecionais, estes podem também funcionar como *desmultiplexers* (caso implementado nesta dissertação), ou seja, colocar numa das entradas o sinal de saída do *multiplexer* [49]. Neste caso, o sinal de saída, que tem um valor de 5 V, é colocado alternadamente em doze entradas do *multiplexer*, de forma a alimentar cada um dos LEDs de forma alternada.

Para além disso, é necessário a utilização de resistências (entre as entradas do *multiplexer* e o sistema de LEDs), figura 5.7, de forma a controlar a corrente que atravessa os LEDs, respeitando as respetivas especificações de tensão e corrente. Considerando como exemplo o *LED* com pico de emissão nos 406 nm, sabe-se que a sua tensão e corrente recomendáveis (V_{LED} e I_{LED}) são 3,4 V e 15 mA, respetivamente.

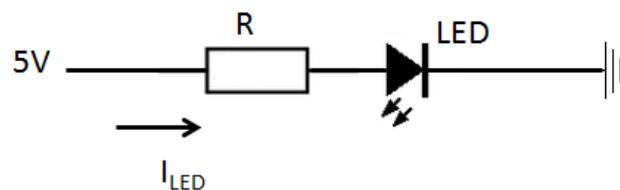


Figura 5.7 Circuito controlador de tensão e corrente no LED.

Assim, sabe-se que:

$$\begin{aligned}5V - V_r - V_{LED} &= 0 \\5V - I_{LED} \times R - V_{LED} &= 0 \\R &= 106,67 \, \Omega\end{aligned}$$

Portanto, de forma a respeitar as especificações técnicas do *LED* com pico de emissão nos 406 nm a resistência (R da figura 5.7) não deverá ser menor que 106, 67 Ω . As mesmas considerações foram tidas em conta para os LEDs com picos de emissão nos 566 nm e 956 nm. As resistências escolhidas foram: 120 Ω , 330 Ω e 220 Ω para os LEDs com pico de emissão nos 406 nm, 566 nm e 956 nm, respetivamente.

Relativamente à escolha dos 4 fotodetetores (fotodíodos) para o sistema (um para cada região de teste), responsáveis por produzirem uma corrente diretamente proporcional à quantidade de luz recebida, esta baseou-se no estudo de certas características do fotodetector como: a largura de banda, que tem de ser compatível com os picos de emissão dos LEDs (406 nm, 566 nm e 956 nm); a sensibilidade, que deve ser elevada; a corrente de fuga que idealmente deve ser muito pequena; a área ativa do fotodíodo; e o preço, sendo que é uma preocupação deste trabalho produzir um sistema de baixo custo. Assim foi selecionado um modelo da *Hamamatsu* (S2386-8K) [43] que tem uma resposta espectral na gama dos 320 nm a 1100 nm, envolvendo assim toda a gama de comprimentos de onda dos LEDs. Relativamente à escolha da sua área ativa, esta baseou-se no facto de que cada conjunto de três LEDs deve ser colocado lado a lado, aquando da aquisição dos valores de DO, pelo que é necessária uma área suficiente para considerar a contribuição do feixe de luz de cada um deles. Para além disso, a forma e tamanho dos LEDs e a área de sensibilidade dos fotodíodos utilizados deve englobar a área de mistura do sangue com o reagente (aproximadamente 2,5 cm² como definido pelo protocolo em lâmina implementado – secção 4.1). Sendo assim, não foi necessário recorrer a componentes eletrónicos mais pequenos.

Um conversor de corrente-tensão é também necessário, de forma a converter os valores de corrente dos fotodíodos (I da figura 5.8) em valores de tensão que possam ser adquiridos pelo microcontrolador (U da figura 5.8). A figura 5.8 apresenta um conversor convencional, que produz uma tensão de saída (em V) diretamente proporcional à corrente gerada pelo fotodíodo. Assim, um amplificador operacional da *Texas Instruments* (TLC2652CN) [50] foi selecionado, devido às suas características adequadas para este tipo de aplicação, tais como: muito baixo *offset*, baixo ruído, elevada precisão e tensão de alimentação entre os 1,9 V e os 8 V. Relativamente à resistência de realimentação (R da figura 5.8), esta deve ser ajustada de acordo com o ganho desejável para a conversão, tendo por base a banda de aquisição de tensões do

ADC (*Analog-Digital Converter*) do microcontrolador (0 a 3,6 V). O microcontrolador utilizado faz parte da família STM32F10, especificamente o STM32F103VET6, um dispositivo com tecnologia ARM® [51, 52]. Contém um ADC com 12 bits de resolução, suficiente para a distinção dos valores de tensão dos dois tipos de amostras de teste (aglutinadas e não aglutinadas) [51, 52].

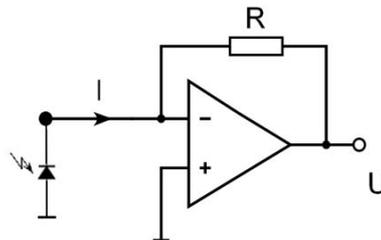


Figura 5.8 Conversor corrente-tensão.

Para além disso, foi implementado um circuito eletrónico específico com o amplificador TLC2652CN selecionado (figura 5.9), de forma a reduzir o ruído devido à alimentação do amplificador operacional e dos componentes eletrónicos [50]. A minimização do ruído nesta aplicação é essencial para garantir uma correta conversão dos valores de corrente do fotodiodo (especialmente os valores mais baixos) em valores de tensão que serão adquiridos pelo microcontrolador. A escolha de um amplificador operacional com muito baixo *offset* e elevada precisão permite também fortalecer esse objetivo.

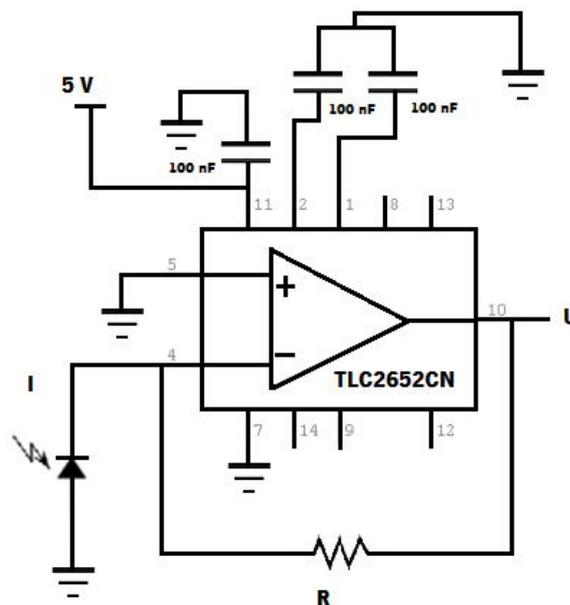


Figura 5.9 Circuito utilizado para a conversão dos valores de corrente no fotodiodo em tensões, posteriormente adquiridas pelo microcontrolador.

Finalmente, o microcontrolador deve obter os valores de tensão e calcular a DO discreta para cada comprimento de onda, baseado nos valores de tensão que formam a linha de base (tensão obtida com os reagentes Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D). Posteriormente, os resultados obtidos são interpretados, por aplicação de um algoritmo de classificação e decisão (explicados na secção 5.4) e é produzida uma saída, ou seja, o tipo sanguíneo ABO-Rh é indicado no *display* do microcontrolador. O *display* táctil constitui a interface do dispositivo com o utilizador.

5.3 Teste global dos componentes eletrónicos

Uma vez realizada a especificação e o teste individual de todos os componentes para a implementação do sistema, e antes de se proceder à construção do dispositivo, procedeu-se à realização de vários testes experimentais, com todos os elementos acoplados (*multiplexer* 1:16 (controlado pelo microcontrolador), sistema de LEDs, fotodiodo e conversor corrente-tensão). A figura 5.10 apresenta, a título exemplificativo, um resultado de teste para uma amostra de sangue tipo B negativo. Por observação do resultado, pode aferir-se que a distinção entre os dois tipos de amostras (aglutinada e não aglutinada) é clara, sendo assim possível a determinação do tipo sanguíneo em análise acoplando todos os componentes eletrónicos.

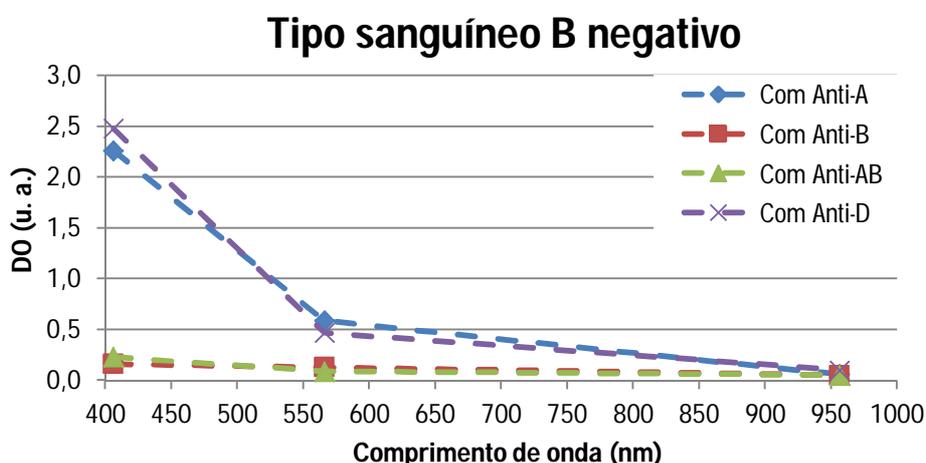


Figura 5.10 Valores de DO discretos obtidos para uma amostra de sangue tipo B negativo, com o acoplamento de todos os componentes eletrónicos.

5.4 Programação do Microcontrolador – Interface

Como já referido anteriormente, o microcontrolador efetua o controlo dos LEDs (para que emitam alternadamente um feixe de luz) e recebe, através do ADC, os valores de tensão para cada um dos fotodiodos (3 valores de tensão para cada fotodiodo correspondentes aos

valores dos 3 LEDs em cada região de teste). Foi desenvolvido e implementado um algoritmo de controlo do estado das entradas de seleção do multiplexer (EN , A_0 , A_1 , A_2 e A_3). Em cada teste, o microcontrolador obtém 12 valores de tensão, 3 para cada amostra de teste (um para o comprimento de onda dos 406 nm, outro nos 566 nm e finalmente para os 956 nm).

Após a aquisição dos valores de tensão são calculadas as densidades óticas para um determinado comprimento de onda e para uma determinada amostra, através do conhecimento dos respetivos valores de tensão de calibração (valores adquiridos na calibração do dispositivo, que será abordada ainda nesta secção). Posteriormente, o microcontrolador executa um algoritmo de classificação, de forma a classificar cada uma das amostras de teste em aglutinada ou não aglutinada.

O algoritmo de classificação é baseado na variação entre os três valores de DO para cada cavidade das regiões de teste, ou seja, para cada amostra de teste. Considerando o vetor Den_Ot que contém os três valores de DO, para os comprimentos de onda de 406 nm, 566 nm e 956 nm, nas posições 0, 1 e 2, respetivamente, para uma amostra:

```
// Módulo das diferenças de DO
diferença_1 = sqrt ((Den_Ot [1] - Den_Ot [0]) * (Den_Ot [1] - Den_Ot [0]))
diferença_2 = sqrt ((Den_Ot [2] - Den_Ot [1]) * (Den_Ot [2] - Den_Ot [1]))

// Classificação das amostras
se (diferença_1 < limite_maior e diferença_2 < limite_menor):
    amostra aglutinada
senão:
    amostra não aglutinada
```

Alternativamente a este algoritmo pode ainda ser utilizado um equivalente que apenas considere uma variável ($limite_total$), que resulte da média das diferenças totais de densidade ótica, para cada amostra (aglutinada ou não aglutinada). Por exemplo:

```
// Módulo das diferenças de DO
diferença_1 = sqrt ((Den_Ot [1] - Den_Ot [0]) * (Den_Ot [1] - Den_Ot [0]))
diferença_2 = sqrt ((Den_Ot [2] - Den_Ot [1]) * (Den_Ot [2] - Den_Ot [1]))
diferença_média_total = (diferença_1 + diferença_2)/2;
```

```
// Classificação das amostras
se (diferença_média_total < limite_total):
    amostra aglutinada
senão:
    amostra não aglutinada
```

Os valores das variáveis *limite_maior*, *limite_menor* e *limite_total* são ajustados de acordo com os valores obtidos pelos testes experimentais ao protótipo, realizados com amostras de sangue previamente conhecido o tipo sanguíneo – secção 6.1.

Por fim, é aplicado o algoritmo de decisão, com base na tabela 3.1 e no resultado do algoritmo de classificação, de forma a concluir-se o tipo sanguíneo em análise. Por exemplo, considerando as quatro amostras de teste, amostra com Anti-A (*a_A*), amostra com Anti-B (*a_B*), amostra com Anti-AB (*a_AB*) e amostra com Anti-D (*a_D*):

```
// Exemplo de decisão
se (a_A = aglutinada e a_B=não aglutinada e a_AB=aglutinada e a_D=aglutinada):
    Tipo sanguíneo A positivo
```

O resultado de teste é apresentado no *display* do microcontrolador, fornecendo assim a informação do resultado ao utilizador.

No *display* tátil estão disponíveis várias opções, desde a calibração do dispositivo, até à realização dos testes de tipagem sanguínea. A interface desenvolvida é universal e intuitiva de forma a facilitar a sua utilização a qualquer utilizador inexperiente.

De realçar que deve ser realizada uma calibração do dispositivo sempre que este seja reiniciado, ou seja, sempre que tenha sido desligado da alimentação de energia. Para tal, o utilizador escolhe a opção de calibração no *display* tátil e procede à inserção de uma lâmina de teste apenas com os reagentes (50 µL de cada solução comercial de anticorpos, uma em cada região de teste). Posteriormente, o dispositivo autocalibra-se de forma automática e rápida (cerca de 1 minuto), através do armazenamento dos valores de tensão referentes apenas aos reagentes Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D (tensões de referência). Seguidamente, o utilizador é informado que o dispositivo está pronto para a realização dos testes de tipagem sanguínea ABO-Rh.

Todo o código desenvolvido na implementação dos algoritmos de controlo, classificação e decisão e ainda da interface com o utilizador foi desenvolvido na linguagem de programação C [51-53].

5.5 Procedimento experimental

Em termos processuais, a análise ao tipo sanguíneo ABO-Rh, no protótipo implementado, realiza-se da seguinte forma – figura 5.11:

- Ligar o dispositivo;
- Selecionar a opção 'Calibrate Device' no *display*;
- Inserir uma lâmina com os reagentes (50 μ L de reagente Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D) de forma a calibrar o dispositivo e selecionar a opção 'Start Calibration' (tempo de calibração – aproximadamente 2 minutos, considerando o tempo de preparação das amostras de referência);
- Após a calibração, selecionar a opção 'Perform Test' e proceder à preparação das amostras:
 - Pipetar 50 μ L de reagente apropriado (Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D) para as 4 cavidades de regiões de teste (numa nova lâmina de teste).
 - Adicionar sangue total com cerca de um quarto da quantidade de reagente, em cada uma das cavidades das regiões de teste (12,5 μ L).
 - Utilizar uma vareta de mistura (por exemplo, um palito), misturando o sangue e o anticorpo uniformemente, durante cerca de 5 segundos.
- Inserir a lâmina de teste com as 4 amostras de teste (sangue total com cada um dos respetivos reagentes) e selecionar a opção 'Star Test';
- O sistema de LEDs e respetivos circuitos eletrónicos entram em funcionamento, sendo que cada um dos LEDs acende alternadamente e é adquirido um valor de tensão (pelo ADC do microcontrolador) para cada um deles. Esse valor é diretamente proporcional à quantidade de luz adquirida pelo fotodiodo em cada medição, gerando uma corrente elétrica que é depois convertida numa tensão pelo bloco de conversão;
- Adquiridos os valores de tensão por parte do microcontrolador, são calculadas os 3 valores de DO para cada amostra (um para cada comprimento de onda de interesse) com base nos respetivos valores de tensão de referência;

- Com base nos valores de DO calculados, o microcontrolador aplica os algoritmos de classificação das amostras e o algoritmo de decisão, de forma a determinar o tipo sanguíneo em causa;

- O resultado de teste é indicado no *display*, informando o utilizador do tipo sanguíneo em análise (tempo de análise – aproximadamente 3 minutos, considerando o tempo de preparação das amostras de teste);

- No final do teste, e caso não se tenha desligado o sistema da alimentação de energia, uma nova análise pode ser efetuada sem a necessidade de realização da etapa de calibração, selecionando a opção 'Perform a New Test'.

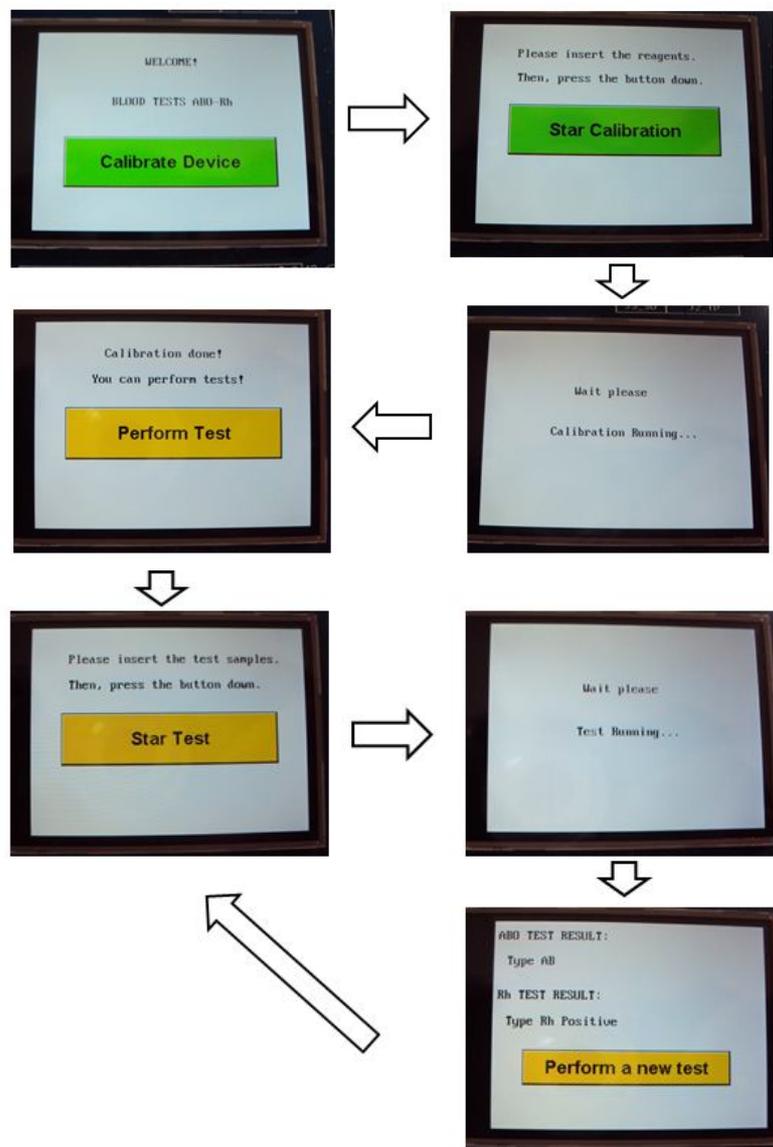


Figura 5.11 Interface do dispositivo com o utilizador – exemplo de teste.

É de referir ainda, que a lâmina de teste, deve ser inserida no sistema sempre no mesmo sentido, ou seja, a região de teste (conjunto LEDs, fotodíodo e conversor) utilizada para a obtenção dos valores de referência do reagente Anti-A, por exemplo, deve ser a mesma que a utilizada para adquirir os valores de tensão referentes à amostra de teste com o respetivo reagente (sangue com Anti-A, neste caso). Assim, é garantido que os valores de tensão para os cálculos das DOs de uma amostra são adquiridos sob as mesmas condições. Esta necessidade é fácil de garantir através da criação de uma lâmina de teste que tenha apenas um sentido de inserção no dispositivo. Para além disso, elimina a necessidade do ajuste da intensidade dos LEDs do mesmo comprimento de onda (nas diferentes regiões de teste) em cada medição, de forma a emitirem a mesma intensidade do feixe de luz.

5.6 Estudo do ADC

Para além dos algoritmos implementados e da interface desenvolvida, foi ainda efetuado um estudo do ADC do microcontrolador, de forma a comparar a sua curva de conversão teórica com a curva real e ainda confirmar a sua linearidade. Tal facto é de extrema importância a fim de verificar a necessidade de introduzir um fator de ajuste no cálculo das DOs (que são obtidas a partir dos valores de tensão adquiridos pelo microcontrolador), caso se verifique uma grande discrepância entre os valores reais e os teoricamente esperados. Assim, utilizando uma fonte de alimentação foram colocados vários valores de tensão nas entradas analógicas do microcontrolador e obtidos os valores decimais adquiridos pelo mesmo (após a conversão analógico-digital). Posteriormente compararam-se esses valores com os teoricamente previstos. A figura 5.12 apresenta as curvas de conversão do ADC, teórica e real. Como já referido o ADC do microcontrolador tem uma resolução de 12 bits e uma escala máxima de 3,6 V, sendo assim o menor valor que consegue distinguir cerca de 0,879 mV.

Curvas ADC

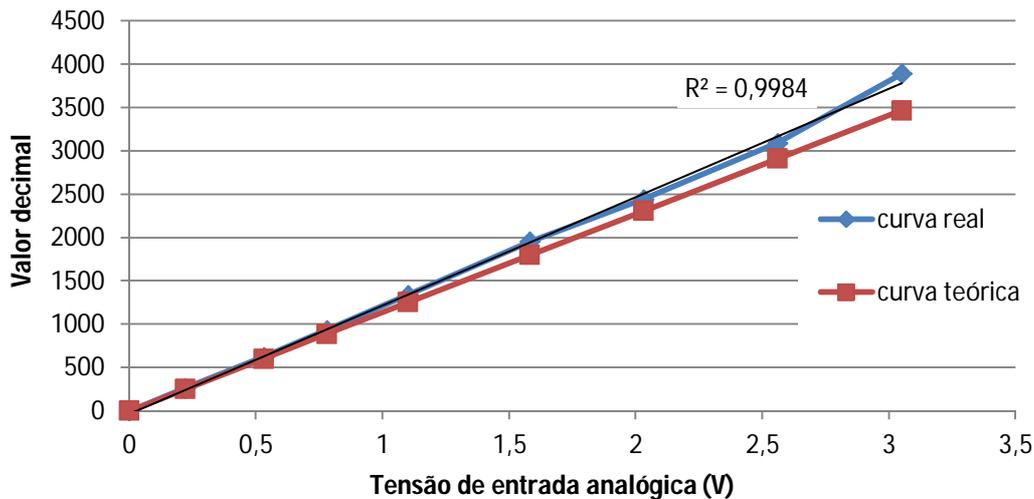


Figura 5.12 Curvas teórica e real de conversão do ADC.

Como pode ser observado na figura 5.12, foi ainda adicionada uma linha de tendência linear à curva real do ADC (curva preta da figura 5.12) e obtido o valor do coeficiente de determinação (R^2), que é um parâmetro que permite aferir sobre a linearidade da curva real. O R^2 é um parâmetro que nos dá a aproximação entre os valores obtidos (curva real de conversão do ADC) e os valores da estimativa (linha de tendência linear) [54]. Assim, pode concluir-se que o comportamento do ADC é bastante linear, o que é confirmado pelo valor de R^2 próximo da unidade.

Relativamente ao desvio da curva real em relação à curva teórica pode aferir-se que é pouco significativo para o caso em estudo, uma vez que nesta dissertação apenas se trabalha com diferenças entre os valores de DOs, sendo estas bastante significativas entre os dois tipos de amostras que se pretendem distinguir, aglutinadas e não aglutinadas. No entanto, caso os valores de DO obtidos fossem utilizados para medições mais precisas, como o cálculo de concentrações moleculares, seria necessário a introdução de um fator de ajuste na conversão do ADC, que se obteria tendo em conta o desvio entre os valores decimais obtidos e os teoricamente esperados.

5.7 Projeto do sistema

No projeto do protótipo foi utilizado o *software AutoCAD* de modo a facilitar a sua posterior construção. Os desenhos evidenciando a configuração do sistema, assim como a disposição dos componentes são apresentados seguidamente.

A figura 5.13 representa a configuração do sistema (1), sendo as dimensões do sistema total (160 mm × 120 mm × 70 mm), ajustadas ao tamanho da lâmina de teste (126 mm × 80 mm × 2 mm) e ao espaço necessário para o acoplamento de toda a eletrônica. A lâmina de teste (2) deve ser descartável, evitando assim contaminações entre análises. O sistema é constituído por um suporte (3) que fica na região central de forma a fixar a lâmina com as quatro regiões de teste. Na parte superior da caixa ficam acoplados o microcontrolador e as baterias. O sistema tem ainda uma tampa (4) de forma a isolar a luz externa para que esta não afete as medições óticas.

As placas PCB (*Printed Circuit Board*), com os sistemas eletrônicos de iluminação (1) e de leitura (3) ficam na parte superior e inferior da lâmina de teste (2) respetivamente, tal como pode ser observada a sua configuração na figura 5.14. Esta configuração permite ainda garantir o alinhamento entre os feixes de luz, as amostras e os fotodíodos. As dimensões das duas placas PCB (156 mm × 90 mm) assim como a disposição dos componentes eletrónicos nas mesmas estão de acordo com a disposição das regiões de reação na lâmina de teste. Os componentes eletrónicos, assim como a própria caixa são reutilizáveis. Na figura 5.14 são ainda evidenciados os componentes do sistema de leitura, fotodíodos (4) e blocos de conversão (5).

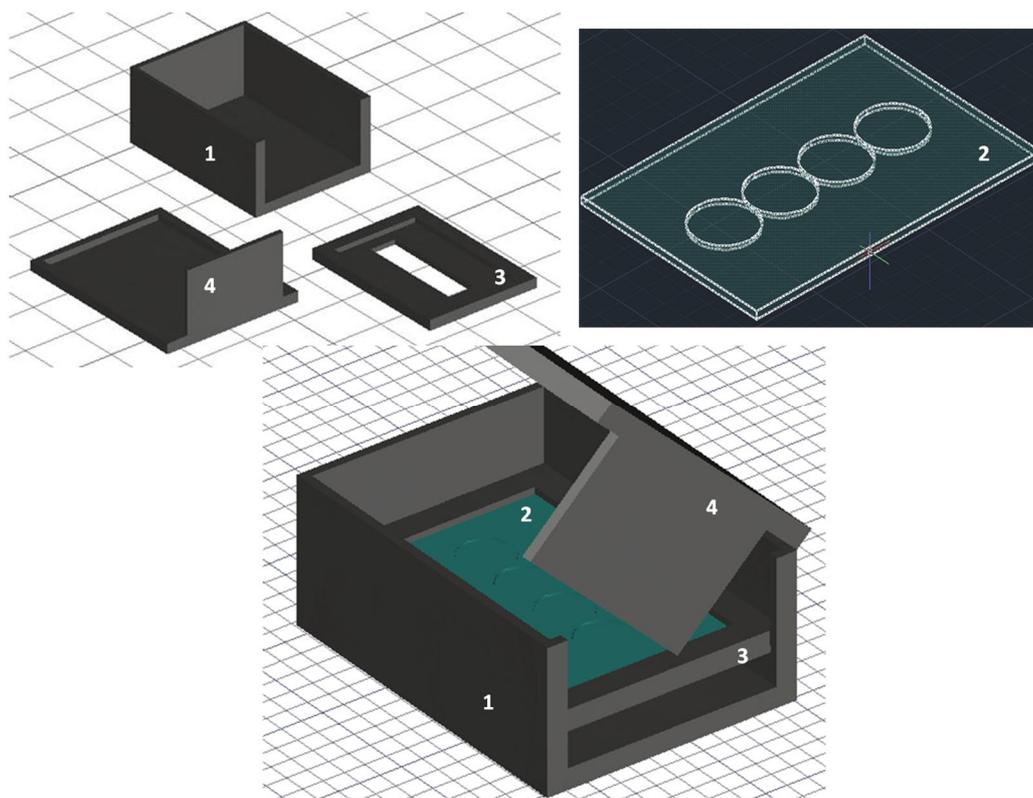


Figura 5.13 Configuração do sistema protótipo em *AutoCAD*.

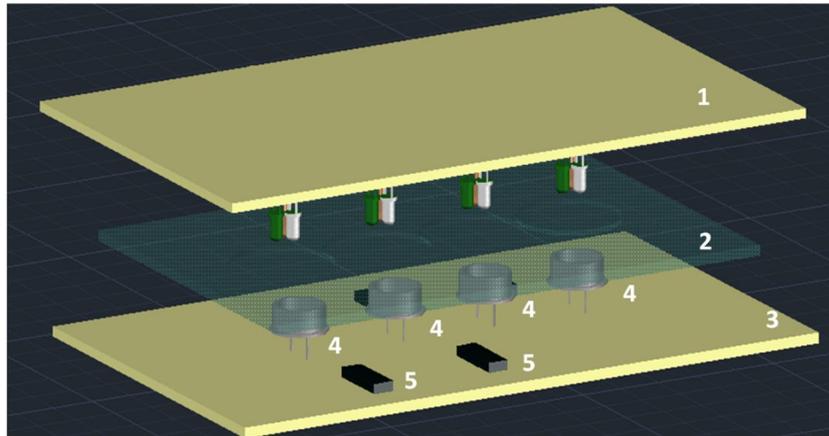


Figura 5.14 Configuração das placas PCB em relação à lâmina de teste.

Uma das limitações enunciadas anteriormente, relativamente à área de reação do protocolo em lâmina, é que esta deve ser sempre constante de forma a permitir uma comparação mais rigorosa dos resultados. Assim, cada uma das regiões de teste deve apresentar uma área de reação limitada e constante. As dimensões das áreas de reação (aproximadamente 24 mm de diâmetro), e como consequência da lâmina de teste, têm em conta as especificações do protocolo em lâmina aplicado nos testes experimentais (explicadas a secção 4.1).

O material da lâmina de teste deve ser transparente para possibilitar a passagem de luz, podendo ser vidro, poliestireno, entre outros. Assim, optou-se pela utilização de uma estrutura comercial existente (tampas das placas de poços normalmente utilizadas para cultura de células) com características favoráveis às pretendidas: placas transparentes de poliestireno com regiões de teste limitadas e diâmetro apropriado à aplicação pretendida – figura 5.15.



Figura 5.15 Tampa das placas de poliestireno normalmente utilizadas para cultura de células.

No entanto, foram ainda introduzidas algumas modificações na estrutura, nomeadamente, o corte das suas paredes laterais, de forma a assemelhar-se a uma lâmina de teste e ainda facilitar a sua inserção no dispositivo implementado – figura 5.16. As regiões de teste são as quatro áreas centrais da lâmina (evidenciadas na figura 5.16).



Figura 5.16 Lâmina de teste utilizada no protótipo implementado.

Para além disso, foi realizado um teste experimental, no espectrofotómetro laboratorial (figura 3.1), de forma a comparar a transmitância desta lâmina de teste com uma lâmina de vidro convencional (estrutura utilizada nos testes experimentais até agora apresentados) entre os comprimentos de onda de interesse (400 nm a 1000 nm). A figura 5.17 apresenta o resultado obtido.

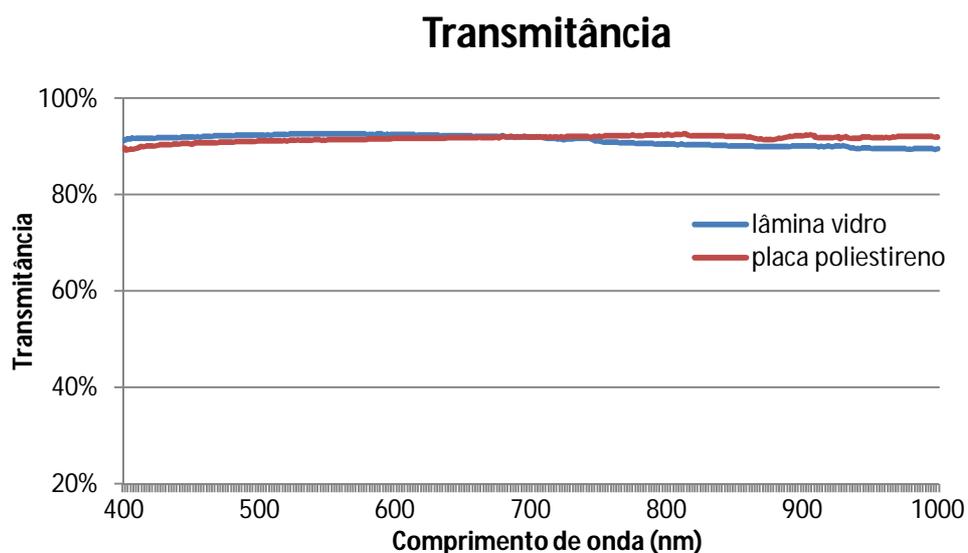


Figura 5.17 Valores de Transmitância para uma lâmina convencional em vidro (curva azul) e para uma lâmina de poliestireno (curva vermelha).

Por observação da figura 5.17 é possível verificar que ambas as estruturas apresentam elevados valores de transmitância, sendo o valor médio para a lâmina de vidro 91,32%, muito próximo do valor teoricamente esperado – 91,8% [55]; e para a placa de poliestireno 91,66%, estando assim validada a utilização da placa de poliestireno para a utilização pretendida.

É ainda de referir que foi produzida, especificamente para o sistema, uma placa em poliestireno com quatro regiões de teste, através de um processo de baixo custo, termoformação, nas oficinas do Instituto de Polímeros e Compósitos da Universidade do Minho.

A termoformação é um processo através do qual se dá forma, por aplicação de calor e pressão. Inicialmente, uma folha do material a moldar é aquecido de forma a ficar com menor rigidez e mais deformável. Posteriormente é aplicada uma forte pressão (através da criação de vácuo entre a folha do material e o próprio molde) de forma a obrigar o material a contactar com as paredes do molde, que devido à grande diferença de temperatura, arrefecem o material, dando-lhe a forma do molde desejado [56]. A placa produzida é apresentada na figura 5.18.

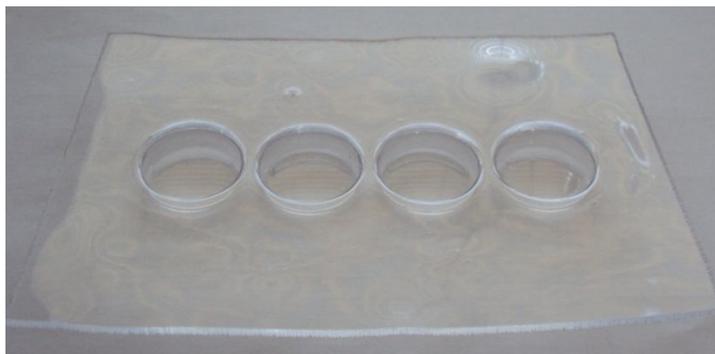
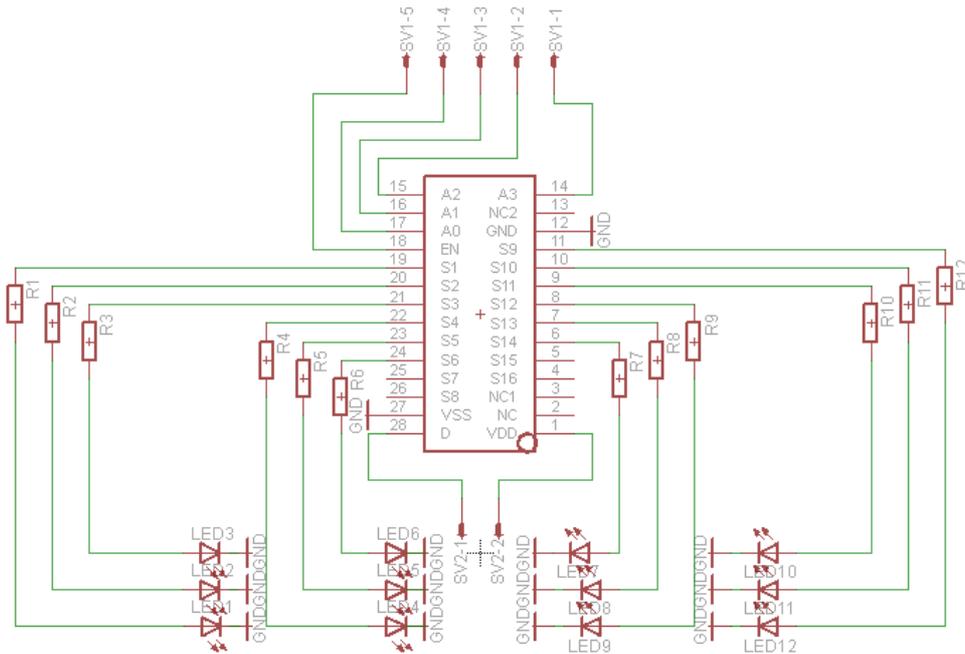


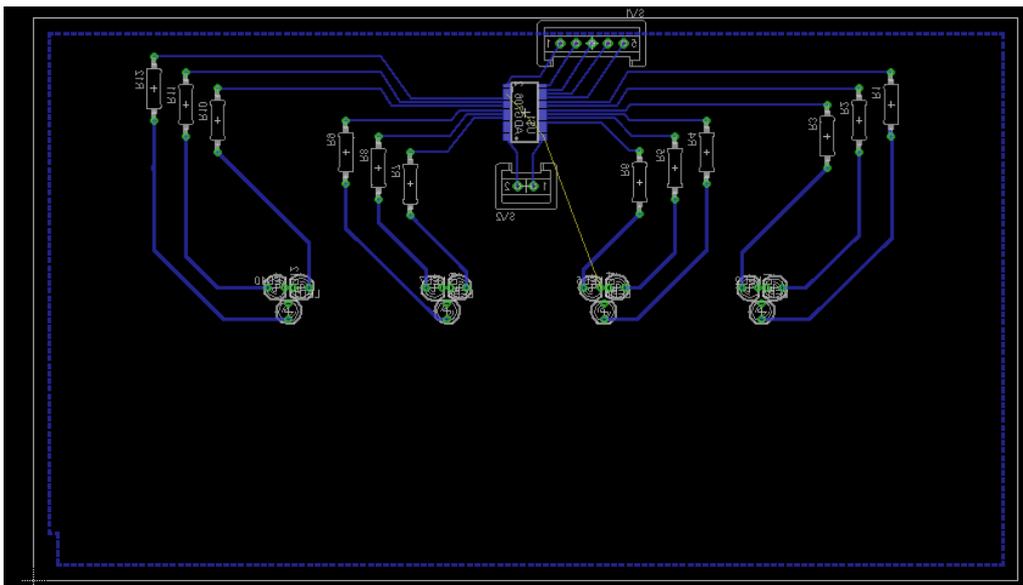
Figura 5. 18 Lâmina com quatro regiões de teste produzida através do processo de termoformação.

Como é visível pela figura 5.18, a placa apresenta alguns problemas de deformação devido à dificuldade de controlo dos parâmetros de temperatura e pressão ao longo do processo. Para além disso, devido às características do processo de fabrico, as áreas de teste não apresentavam uma superfície totalmente lisa o que é crítico para as medições óticas. Sabe-se ainda que outros processos de fabrico mais precisos poderiam ser utilizados, como a moldação por injeção, de forma a obter uma lâmina de teste com boas características. No entanto, estes processos envolvem elevados custos e apenas se tornam viáveis para produção em massa. O desenvolvimento de uma lâmina de teste específica para este protótipo não é objeto de estudo deste trabalho.

Para além do *design* do sistema e da lâmina de teste, procedeu-se ao desenho das placas PCB do sistema no *software* de *design* Eagle (*Easily Applicable Graphical Layout Editor*). Os resultados são apresentados nas figuras 5.19 e 5.20, onde se pode observar a disposição dos vários componentes eletrónicos. O PCB superior (figura 5.19) é constituído por 4 sistemas de LEDs, sistema de resistências e por um *multiplexer* SMD (*Surface Mounting Device*) 1:16; o PCB inferior (figura 5.20) pelos fotodíodos e conversores corrente-tensão.

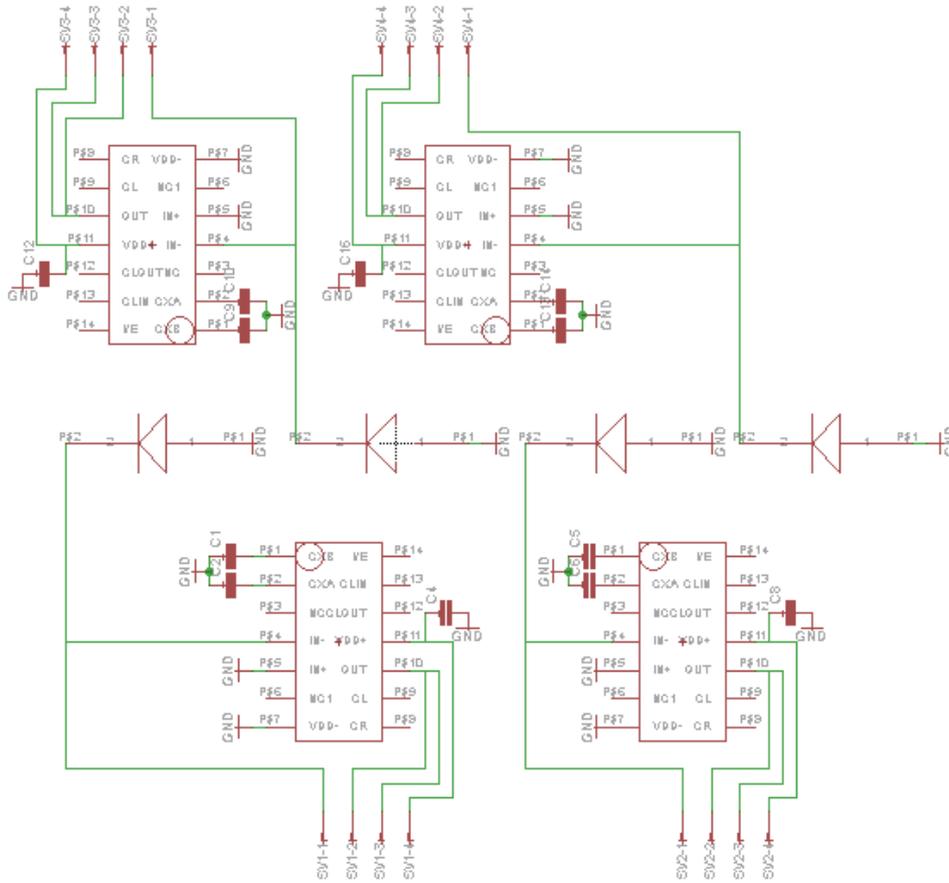


(a)

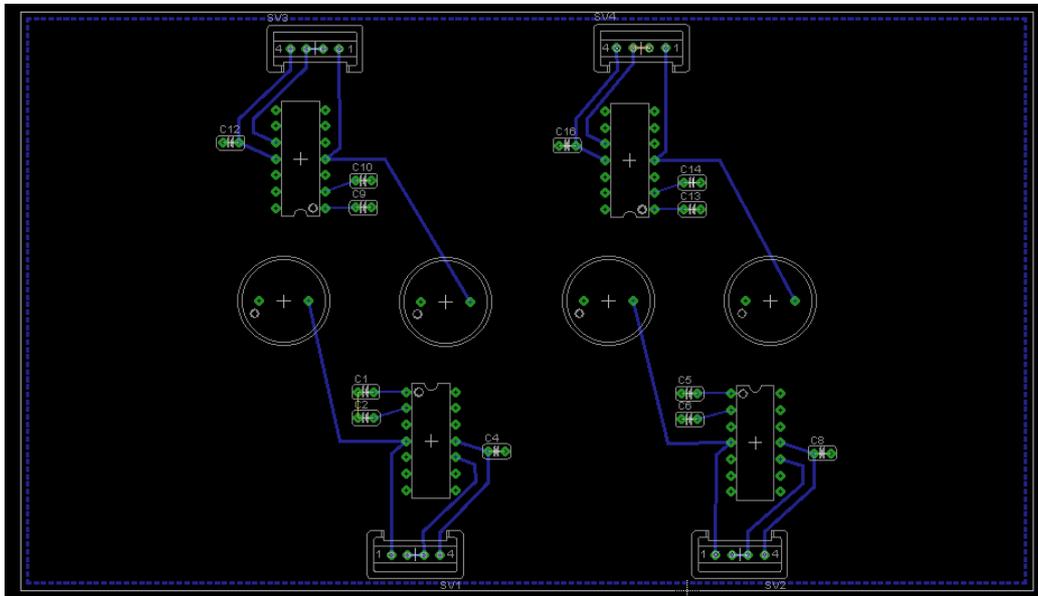


(b)

Figura 5.19 PCB com sistema de iluminação: esquemático (a) e respetiva *board* (b).



(a)



(b)

Figura 5.20 PCB com sistema de leitura: esquemático (a) e respetiva board (b).

5.8 Implementação do sistema

Uma vez especificada a arquitetura do sistema e respetivos componentes procedeu-se à implementação do dispositivo. As figuras 5.21 e 5.22 apresentam as placas PCB que constituem o dispositivo.



Figura 5.21 PCB com sistema de iluminação (LEDs, resistências e *multiplexer*).

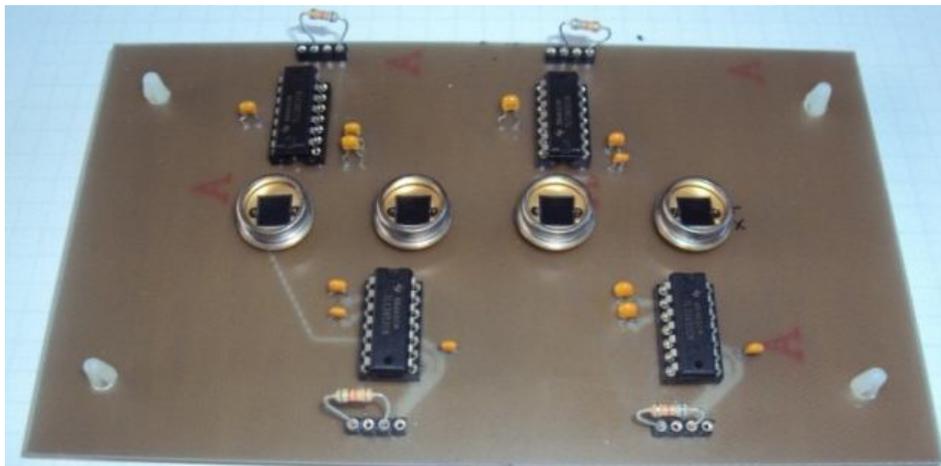


Figura 5.22 PCB com sistema de leitura (fotodíodos e conversor corrente-tensão).

Para terminar, a Figura 5.23 (a) apresenta o dispositivo protótipo com todos os componentes eletrónicos que o constituem. O invólucro do sistema (caixa preta) foi artesanalmente construído com base na utilização de caixas de PVC (*Polyvinyl Chloride*), utilizadas na prática comum para instalações elétricas. Tal escolha prendeu-se com as boas características da caixa para este tipo de aplicação, como o baixo peso, elevada resistência e forma adequada para o dispositivo a desenvolver. Para tal, foram introduzidas algumas modificações na caixa, como por exemplo as aberturas laterais, de forma a proceder-se à

inserção da lâmina de teste; e a cor da caixa, que deve ser preta de forma a não afetar as medições óticas. O suporte central, para a fixação da lâmina de teste, e a placa superior, para fixação do microcontrolador e do PCB com o sistema de LEDs, foram também construídos artesanalmente em contraplacado, propositadamente para o sistema.

A figura 5.23 (b) apresenta a configuração exterior do sistema; e por fim, a figura 5.23 (c) o mecanismo lateral de inserção da lâmina de teste.

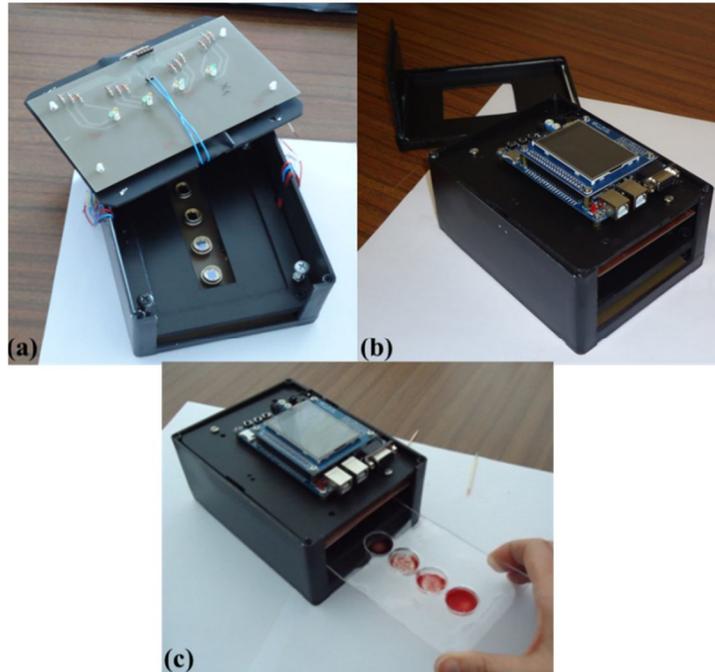


Figura 5.23 (a) Componentes do sistema protótipo; (b) Configuração do sistema (dimensões exteriores do dispositivo: 160 mm × 120 mm × 70 mm); (c) mecanismo de inserção da placa de teste.

5.9 Requisitos de Energia

De forma a tornar o protótipo desenvolvido num sistema totalmente independente e portátil, utilizou-se uma bateria recarregável de NiMH (*Nickel-Metal Hydride*) com uma tensão de 8,4 V e uma capacidade de 250 mAh [57], para a alimentação do *multiplexer* e conversores corrente-tensão. Tal escolha teve em conta a relação preço/qualidade da mesma e ainda a sua facilidade de recarga para o utilizador, sendo uma bateria convencional facilmente recarregável. Para além da bateria referida, e uma vez que o *multiplexer* e conversores são alimentados a 5V, foi necessária a utilização de um circuito regulador de tensão - figura 5.24. Para tal um regulador da *STMicroelectronics* foi selecionado (L7805 [58]), em que V_i é a tensão de entrada (8,4 V da

bateria) e V_o a tensão de saída (5V pretendidos para a alimentação dos componentes eletrônicos referidos).

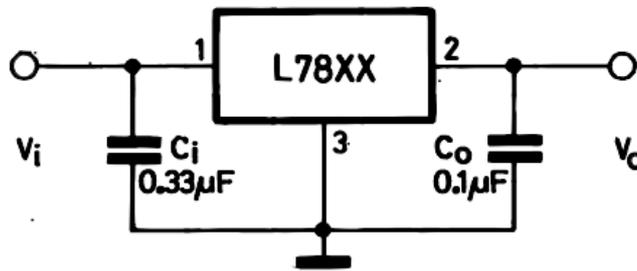
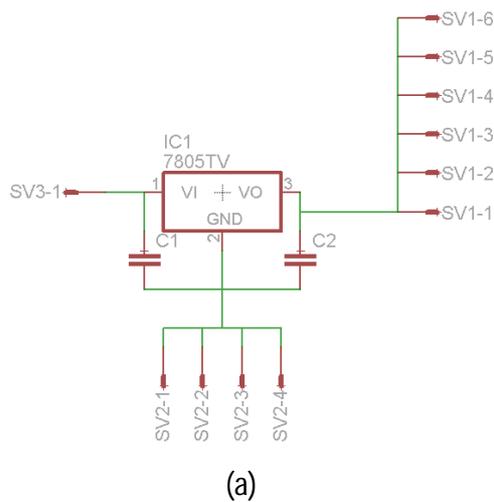
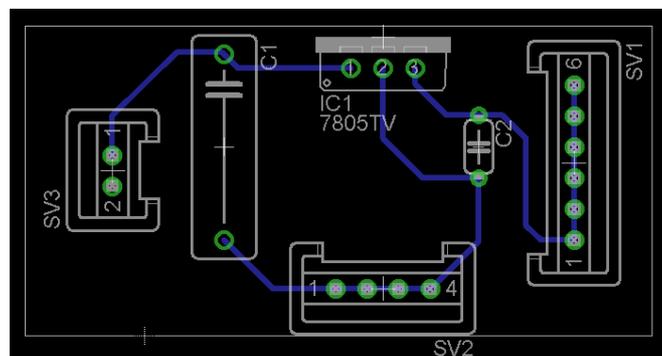


Figura 5.24 Circuito regulador de tensão (5V) implementado (adaptado de [58]).

Assim, foi necessário o desenho de mais uma placa PCB no *software* Eagle, tendo em conta o circuito elétrico apresentado na figura 5.24. O resultado é apresentado na figura 5.25 (50 mm × 25 mm). A figura 5.26 apresenta o sistema de energia utilizado para a alimentação dos *multiplexers* e conversores (PCB com sistema regulador + bateria de 8,4 V).



(a)



(b)

Figura 5.25 PCB com circuito regulador: esquemático (a) e respetiva *board* (b).

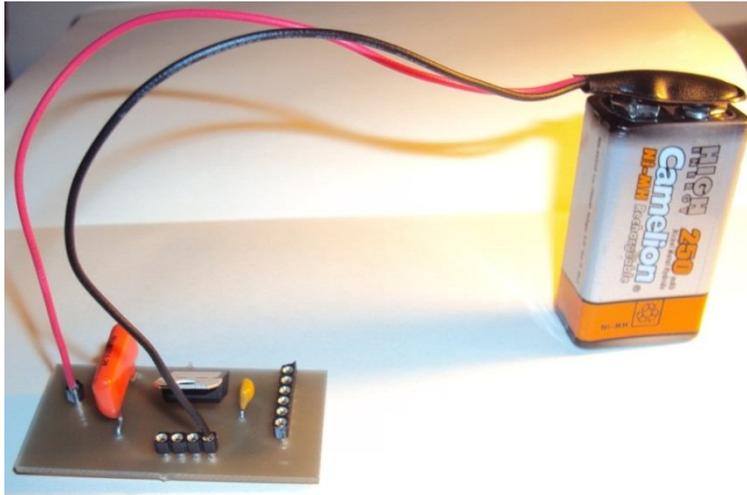


Figura 5.26 Sistema de energia utilizado para alimentação dos *multiplexers* e conversores corrente-tensão.

Para além disso, foi testado o tempo de duração da bateria quando esta se encontra a alimentar o multiplexer e os quatro conversores corrente-tensão. Verificou-se que esta tem uma duração de cerca de 25 minutos, antes de necessitar de ser novamente carregada. Tendo em conta que cada análise ao tipo sanguíneo demora cerca de 5 minutos a efetuar (considerando o tempo de preparação das amostras e a etapa de calibração), é possível realizar-se cerca de 5 análises antes de proceder-se à substituição da bateria ou à sua recarga.

Relativamente à alimentação do microcontrolador, de forma a evitar a utilização de um computador portátil juntamente com o dispositivo para o alimentar via *USB (Universal Serial Bus)*, foram estudadas várias alternativas. A primeira passou pela tentativa de utilização das baterias utilizadas na alimentação dos conversores e *multiplexer*. No entanto, verificou-se que estas não possuíam potência suficiente para ligar a interface gráfica do microcontrolador. Após o teste de várias baterias com capacidades mais elevadas, verificou-se que todas elas apresentavam uma potência demasiado baixa para o consumo efetuado pela interface gráfica do microcontrolador.

Os melhores resultados foram obtidos com o teste de uma bateria de uma câmara de filmar (*Sony NP-FH70 [59]*) com 8,3 V de tensão e com uma potência de 12,2 Wh. Esta foi capaz de alimentar o microcontrolador, nomeadamente a interface gráfica desenvolvida, durante cerca de 11,5 minutos, pelo que pode ser uma alternativa viável para o dispositivo. Para efetuar os testes realizados foi necessário a utilização de um circuito regulador de tensão (figura 5.26) de forma a alimentar um dos pinos do microcontrolador com 3,3 V (equivalente à alimentação

via *USB*), em que V_{IN} é a tensão de entrada (8,3 V da bateria) e V_o a tensão de saída (3,3V pretendidos para a alimentação do microcontrolador). Assim, foi selecionado um regulador de tensão de 3,3 V da *STMicroelectronics* (LD1086V33 [60]).

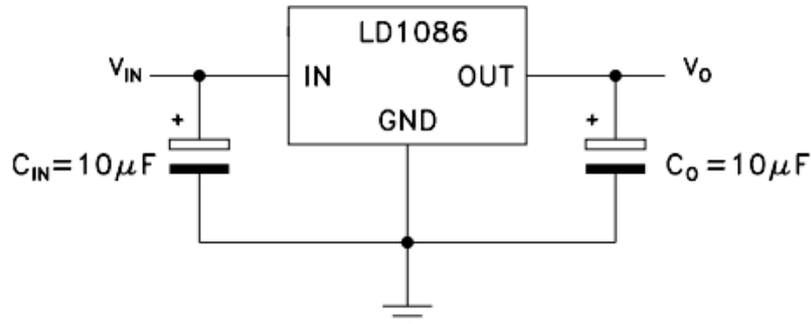


Figura 5.27 Circuito regulador de tensão (3,3 V) implementado [60].

A principal desvantagem da utilização deste tipo de uma bateria é o seu elevado custo. Para além disso, o reduzido tempo de operação antes de ser necessário recarregar novamente a bateria leva à necessidade de estudo de outras baterias com maior potência ou a substituição dos reguladores de tensão por conversores DC-DC, visto estes últimos terem uma eficiência superior (cerca de 50% para os reguladores e 85% para os conversores DC-DC [61]). Tal consideração deve ser tida em conta futuramente.

5.10 Custo do protótipo implementado

Uma vez que um dos objetivos desta dissertação é o desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo, procedeu-se à contabilização dos custos associados à implementação do protótipo. A tabela 5.5 apresenta uma estimativa dos custos de componentes associados à construção do sistema protótipo completo. É que salientar que os custos apresentados são variáveis, consoante a entidade onde se adquirem os componentes, sendo apenas apresentada uma aproximação dos mesmos (quando comprados à unidade). De referir que foram apenas contabilizados custos de componentes eletrónicos, não se tendo entrado em linha de conta com os custos de *design* nem desenvolvimento de *software*.

Tabela 5.2 Estimativa dos custos de implementação do protótipo.

Descrição do componente	Unidades	Preço (em Euros)
LED com pico nos 406 nm	4	7,46
LED com pico nos 566 nm	4	3,49
LED com pico nos 956 nm	4	0,45
Resistência de proteção dos LED	12	0,23
Multiplexer 1:16	1	2,55
Fotodíodo	4	98,80
Amplificador operacional	4	7,12
Condensador 100nF	13	1,61
Invólucro do sistema	1	3,00
Construção do dispositivo (alterações no invólucro, suporte da lâmina, parafusos, entre outros)	1	25,00
Bateria 8,4V	1	20,00
Regulador 5V	1	0,55
Condensador 330nF	1	0,35
Conector	23	8,23
Construção PCB	3	15,00
Microcontrolador	1	34,38
Interruptor	1	3,35
Total		231,57

Capítulo 6 – Testes Experimentais ao Protótipo Implementado

Neste capítulo são apresentados todos os resultados experimentais dos testes efetuados ao protótipo desenvolvido, bem como a discussão dos mesmos tendo por base as características inicialmente pretendidas para o sistema.

6.1 Testes experimentais para determinação das variáveis

Após especificação e implementação do sistema protótipo, procedeu-se à realização de testes globais de forma a verificar a funcionalidade do sistema e determinar os valores experimentais que permitem completar o algoritmo de classificação (variáveis *limite_maior*, *limite_menor* e *limite_total*). Assim, foram realizados testes com amostras de sangue fornecidas pelo IPS (doze amostras de sangue, $n = 12$), e previamente classificadas através da realização dos testes convencionais de tipagem sanguínea. É ainda de referir que, nesta fase, foi utilizado o microcontrolador para o controlo dos LEDs através da implementação do algoritmo de controlo e a interface gráfica implementada, sendo que apenas o algoritmo de classificação e consequentemente o de decisão não foram aplicados, uma vez que foi objetivo destes testes iniciais determinar as variáveis experimentais (*limite_maior*, *limite_menor* e *limite_total*) necessárias para completar os algoritmos referidos.

Assim, foram inicialmente medidos com um multímetro os valores de tensão (à saída dos conversores corrente-tensão do sistema) dos reagentes que constituem a linha de base (Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D), para cada comprimento de onda (406 nm, 566 nm e 956 nm). Posteriormente, para cada amostra de sangue, foram obtidos os valores de tensão para as quatro amostras de teste, cada uma com três valores de tensão correspondentes aos três comprimentos de onda discretos. Após a aquisição destes dados, foram calculados os valores discretos de DO para cada amostra de teste. As figuras 6.1 e 6.2 apresentam os resultados obtidos para duas amostras de sangue, A negativo e O positivo.

Para cada amostra de teste produzida nos 12 ensaios de teste sanguíneo (quarenta e oito amostras de teste no total, quatro amostras de teste por cada amostra de sangue) foram calculadas as diferenças entre os três valores discretos de DO (variáveis *diferença_1* e *diferença_2*). Posteriormente, os valores médios dessas diferenças e os respetivos desvios padrões, para os dois tipos de amostra (aglutinadas e não aglutinadas) foram calculados – tabelas 6.1 e 6.2.

Tipo sanguíneo A negativo

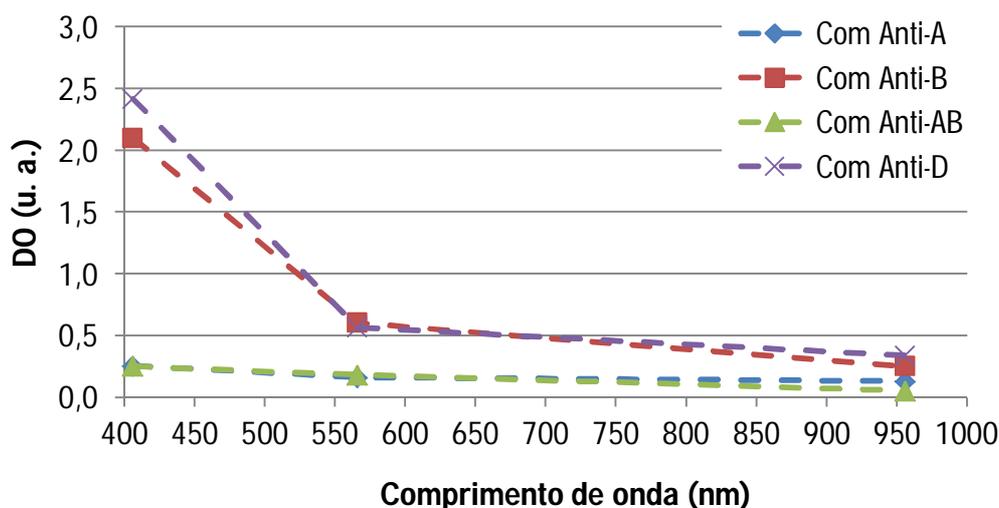


Figura 6.1 Valores discretos de DO para uma amostra de sangue tipo A negativa na presença: Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva violeta).

Tipo sanguíneo O positivo

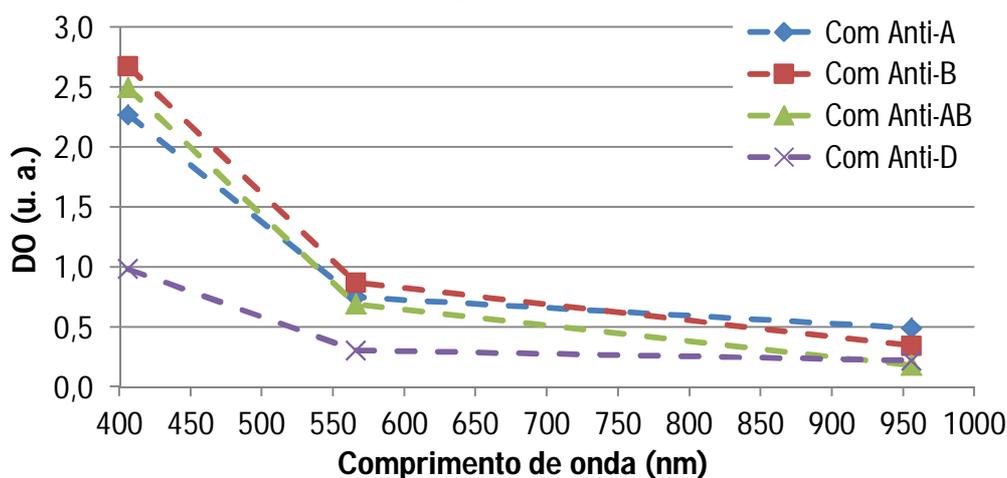


Figura 6.2 Valores discretos de DO para uma amostra de sangue tipo O positiva na presença: Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva violeta).

Tabela 6.1 Variação média das diferenças entre os valores discretos de DO para as amostras aglutinadas e não aglutinadas.

	Variação Média da DO (n=12)	
	Amostras aglutinadas	Amostras não aglutinadas
<i>diferença_1</i>	0,1808	1,6415
<i>diferença_2</i>	0,0542	0,3220

Tabela 6.2 Desvio padrão das diferenças entre os valores discretos de DO para as amostras aglutinadas e não aglutinadas.

	Desvio Padrão ($n=12$)	
	Amostras aglutinadas	Amostras não aglutinadas
<i>diferença_1</i>	0,1108	0,3597
<i>diferença_2</i>	0,0361	0,1923

Com os resultados obtidos pode aferir-se que é possível a distinção dos dois tipos de amostras de teste, aglutinada e não aglutinada, e como consequência dos tipos sanguíneos ABO-Rh, através da aplicação de dois valores limite – *limite_maior* e *limite_menor* – no algoritmo de classificação. Estas variáveis devem ser definidas de acordo com os resultados experimentais apresentados nas tabelas 6.1 e 6.2 Assim, considerando a definição de desvio padrão (desvio mais provável de uma amostra em relação à média de valores [54]) e os resultados obtidos para a média de variação das DOs pode ser considerado que:

$$limite_maior = 1,0000 \text{ e } limite_menor = 0,1000$$

Alternativamente, como já referido, pode ser estabelecido apenas um limite de distinção (*limite_total*), baseado também nos resultados experimentais obtidos e no pior caso de distinção (diferenças máximas para amostras aglutinadas e diferenças mínimas para não aglutinadas), por exemplo:

$$limite_total = 0,7000$$

Os valores destes limites não se alteram com o tempo de utilização do dispositivo, incluindo com a degradação da eletrónica (diminuição da intensidade dos feixes de luz dos LEDs ou ainda efeitos da temperatura no desempenho dos componentes do sistema), uma vez que o algoritmo de classificação tem em conta, no cálculo das DOs, os valores de tensão obtidos apenas com os reagentes (valores de referência). Portanto, a etapa de calibração do sistema, cada vez que este é reiniciado, garante a viabilidade dos valores limite.

6.2 Testes Finais ao Protótipo

Procedeu-se à realização de testes no sistema completo, com todos os elementos acoplados. A figura 6.3 apresenta o aspeto final do dispositivo.

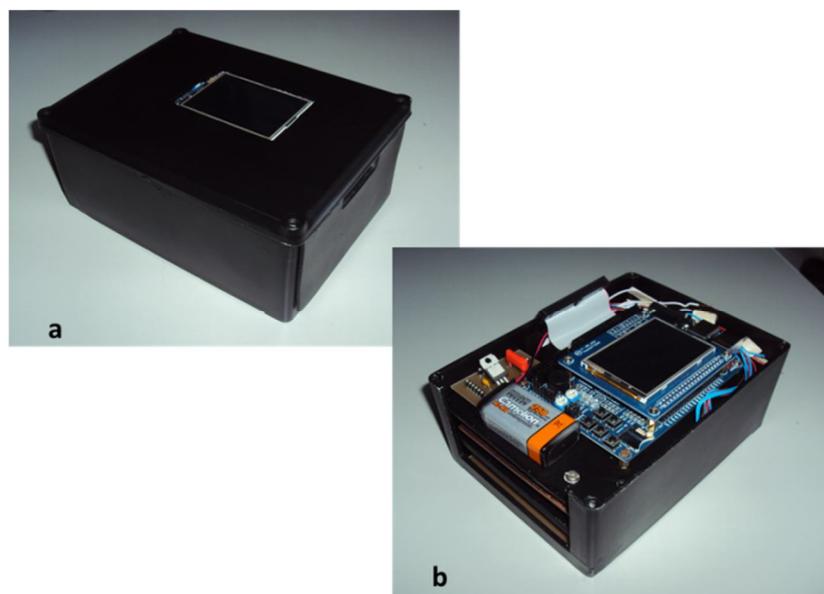


Figura 6.3 Sistema final: (a) vista exterior; (b) vista superior do dispositivo sem a tampa de proteção, evidenciando-se os componentes.

O teste e validação do sistema final foram realizados com um conjunto de 8 amostras de sangue ($n=8$) de todos os tipos ABO-Rh fornecidas pelo IPS. Cada uma dessas amostras foi testada de forma a obter a classificação do protótipo e compará-la com a classificação realizada pelos profissionais dessa instituição.

Ao longo da execução dos testes finais foram também realizados alguns ajustes aos algoritmos implementados devido ao facto de muitas vezes os valores de tensões produzidos pelas amostras não aglutinadas serem tão baixos que o ADC do microcontrolador os considerar nulos (no caso da utilização do LED com pico de emissão nos 566 nm). Esta situação é crítica pois leva a uma situação matematicamente impossível de resolver no cálculo das DOs, através da equação 2.5. Assim, considerou-se que, aquando da aquisição dos valores de tensão de amostras de teste, se os valores obtidos forem nulos então a amostra é automaticamente classificada como não aglutinada através da introdução de valores de DOs típicos para esse tipo de amostra e comprimento de onda.

As tabelas 6.3 à 6.6 apresentam quatro exemplos de teste, nomeadamente os valores das diferenças de DOs (*diferença_média_total*) calculados pelo microcontrolador, para cada

amostra de teste de amostras sanguíneas do tipo AB negativo, A positivo, B negativo e O positivo, respetivamente. A classificação de cada amostra de teste foi realizada com base na utilização da variável *limite_total*, previamente determinada com os testes experimentais apresentados na secção 6.1.

Tabela 6.3 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo AB negativo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).

Reação com:				
Tipo AB negativo	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
<i>diferença_média_total</i>	0,1799	0,1715	0,1634	1,3750
Classificação da amostra	Ag.	Ag.	Ag.	NAg.

Com base na classificação das amostra de teste, apresentada na tabela 6.3, o microcontrolador produziu como saída o representado na figura 6.4.

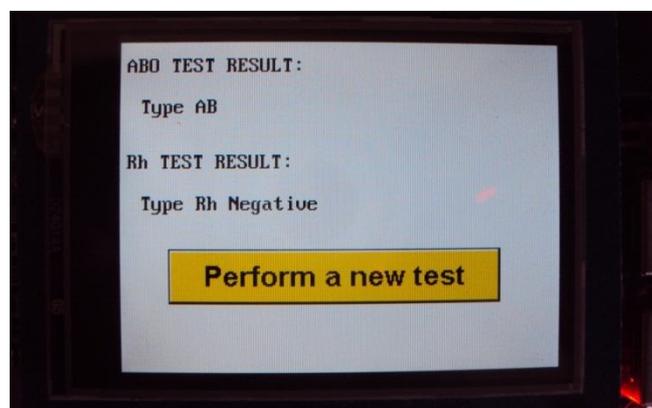


Figura 6.4 Saída do microcontrolador, como resultado de um teste de tipagem sanguínea a uma amostra de sangue tipo AB negativo.

Tabela 6.4 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo A positivo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).

	Reação com:			
Tipo A positivo	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
<i>diferença_média_total</i>	0,1763	1,4031	0,1652	0,2154
Classificação da amostra	Ag.	NAg.	Ag.	Ag.

Saída do Microcontrolador: Tipo sanguíneo A positivo

Tabela 6.5 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo B negativo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).

	Reação com:			
Tipo B negativo	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
<i>diferença_média_total</i>	1,3750	0,1695	0,1623	1,1857
Classificação da amostra	NAg.	Ag.	Ag.	NAg.

Saída do Microcontrolador: Tipo sanguíneo B negativo

Tabela 6.6 Valores das diferenças de DOs para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue tipo O positivo e respetiva classificação das amostras (Ag – amostra aglutinada; NAg – amostra não aglutinada).

	Reação com:			
Tipo O positivo	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
<i>diferença_média_total</i>	1,3750	1,3993	1,3589	0,1901
Classificação da amostra	NAg.	NAg.	NAg.	Ag.

Saída do Microcontrolador: Tipo sanguíneo O positivo

Os testes realizados com todas as amostras de sangue ($n=8$) foram consistentes com a classificação previamente realizada pelo IPS. Contudo é de referir algumas particularidades no que diz respeito à classificação ABO e Rh.

Na tipagem ABO verificou-se que os valores da variável *diferença_média_total* tinham uma variação média (dentro do mesmo tipo de amostra) pequena e uma distinção bastante acentuada entre os dois tipos de amostras (aglutinada e não aglutinada), o que tornou a utilização da variável *limite_total* bastante adequada para a distinção das mesmas e, como consequência, para a determinação do tipo sanguíneo ABO.

Relativamente à determinação do tipo sanguíneo Rh, verificou-se uma maior variação da variável *diferença_média_total* dentro do mesmo tipo de amostra. Para além disso, as diferenças entre amostras aglutinadas e não aglutinadas foram menores que no caso da tipagem ABO. Ainda assim, suficientes para a distinção clara e objetiva do tipo sanguíneo Rh, o que também tornou adequado a utilização da variável *limite_total* para a classificação das amostras em aglutinadas ou não aglutinadas e, como consequência, para a determinação do tipo sanguíneo Rh.

Capítulo 7 – Conclusões e Trabalho Futuro

A determinação do tipo sanguíneo é um teste clínico bastante relevante, uma vez que consiste na única forma de garantir a realização de transfusões sanguíneas mais seguras para o paciente.

Atualmente existe disponível um vasto conjunto de métodos/sistemas para a determinação dos tipos de sangue, entre eles, os testes manuais e os sistemas automáticos. Estes apresentam algumas limitações que devem ser obviadas, entre as quais, a subjetividade associada aos testes manuais e a impossibilidade de produção de resultados num curto período de tempo característica dos sistemas automáticos.

A utilização da espectrofotometria para determinação dos tipos de sangue foi inicialmente descrita por Narayanan *et al.*, sendo que após a publicação dos seus estudos foram efetuados vários trabalhos relacionados com a temática, todos eles baseados na mistura de sangue/células eritrocitárias com anticorpos e na deteção da reação de aglutinação através da comparação dos declives dos espectros de DO, numa região específica do espectro (região linear).

O objetivo principal desta dissertação foi o desenvolvimento de um dispositivo automático, portátil, rápido e de baixo custo para a determinação do tipo sanguíneo ABO-Rh em humanos. Pretendia-se a implementação de um sistema baseado numa abordagem espectrofotométrica, à semelhança de Narayanan *et al.*, mas com a minimização de algumas limitações associadas aos trabalhos anteriormente desenvolvidos nesta área, tendo sempre em vista as características pretendidas para o sistema.

As medições experimentais realizadas inicialmente tiveram como objetivo a prova do conceito, ou seja, provar a capacidade da espectrofotometria para a determinação dos tipos de sangue ABO-Rh (tendo como base o protocolo em cuvette anteriormente aplicado por Narayanan *et al.* e outros autores). Para além disso, pretendeu-se verificar se, com a simplificação dos protocolos anteriormente implementados, era possível a distinção das amostras com base nos espectros de DO. Com a realização destas análises, provou-se a viabilidade da utilização de métodos espectrofotométricos na determinação do grupo sanguíneo. No entanto, verificaram-se algumas limitações associadas à utilização do protocolo em cuvette, relacionadas com a dificuldade de automatizar o processo de decisão. Foram também realizados testes experimentais num espectrofotómetro comercial, de forma a validar os resultados obtidos pelo

sistema laboratorial utilizado. Adicionalmente introduziu-se a utilização do reagente Anti-AB nas medições espectrofotométricas, sendo que a sua utilização revelou-se importante, resultando numa distinção dos grupos sanguíneos ABO mais fiável, funcionando como uma confirmação do tipo de sangue.

Posteriormente foram realizados novos testes experimentais, recorrendo ao protocolo convencional do teste em lâmina, tendo-se verificado vantagens deste em relação ao protocolo anterior. Para além disso, os tipos de sangue foram determinados de forma correta e precisa. Por esta razão escolheu-se o protocolo em lâmina para a preparação das amostras de teste a inserir no sistema implementado. É de referir o carácter inovador da utilização do teste em lâmina para deteção ótica da reação de aglutinação, uma vez que a sua aplicação não foi até ao momento referida na literatura. Outras vantagens da utilização deste protocolo foram já anteriormente referidas, das quais se destacam a simplicidade e rapidez de preparação das amostras e a não dependência dos resultados experimentais em relação ao técnico que prepara as amostras de teste.

Relativamente à implementação do dispositivo, esta envolveu a especificação e teste da eletrónica, o *design* do sistema e a construção do mesmo, cumprindo-se os objetivos inicialmente propostos: sistema de reduzidas dimensões, de baixo custo, portátil, processo de decisão do tipo de sangue automático e tempo de resposta rápido (< 5 minutos). Para além disso, conseguiu-se projetar um sistema que permite a determinação dos tipos de sangue ABO-Rh sem a necessidade de equipamentos que dificultam a portabilidade, como incubadoras e centrífugas, e com uma distinção entre amostras, aglutinadas e não aglutinadas, baseada nas diferenças entre três valores de DO.

No que diz respeito aos resultados obtidos pelo protótipo na classificação dos tipos sanguíneos, estes foram consistentes com os resultados obtidos pelo IPS na classificação das respetivas amostras de sangue testadas, com uma maior facilidade de determinação no sistema ABO. Tal facto pode estar relacionado com a força de reação naturalmente fraca, associada ao antigénio D. Apesar deste facto, conseguiu-se claramente distinguir amostras reativas (com antigénio D) de não reativas (sem antigénio D), e assim, determinar o tipo sanguíneo Rh.

Relativamente às principais dificuldades e limitações ao longo da realização do presente trabalho, estas estiveram relacionadas com o correto funcionamento dos PCBs do sistema devido a fenómenos de oxidação e destruição das placas com o seu tempo de vida. Para além disso, este tipo de placas é muitas vezes afetado por fenómenos de eletricidade estática que põe

em causa o seu correto funcionamento. Esta dificuldade pode ser obviada através do fabrico de placas PCB com melhores características e menos suscetíveis aos problemas referidos.

Outras dificuldades estiveram relacionadas com a programação do microcontrolador, nomeadamente a aquisição de valores nulos por parte do ADC (no caso das amostras não aglutinadas analisadas com o LED com o pico de emissão nos 566 nm). Tal facto pode ser, no futuro, resolvido com a utilização de um LED de alta intensidade, de forma a garantir que mesmo os valores mínimos de tensão gerados pelos feixes de luz incidentes nos fotódodos sejam corretamente adquiridos pelo microcontrolador.

Do ponto de vista da aplicação prática deste sistema, as características do dispositivo protótipo e a sua fácil utilização torna-o bastante adequado para aplicação nas unidades de emergência móveis (ambulâncias) ou ainda nas unidades de saúde provisórias de países em desenvolvimento.

Relativamente às perspetivas de trabalho futuro, devem ser efetuados testes do protótipo com uma amostra mais significativa e em ambiente clínico para uma completa validação do dispositivo.

Para além disso, melhorias ao nível do protótipo devem ser consideradas, como por exemplo, verificar a quantidade mínima de amostra de teste (reagente + sangue) para a determinação dos tipos sanguíneos, de forma a reduzir o diâmetro de cada região de teste, a dimensão do sistema de LEDs e fotódodo e, como consequência, do próprio dispositivo. Adicionalmente, melhorias ao nível do *design* do sistema e da interface gráfica desenvolvida podem ser tidas em conta, de forma a facilitar a interação dispositivo-utilizador.

Ainda na perspetiva de trabalho futuro, a tipagem sanguínea Rh considerada nesta dissertação deteta apenas a presença ou ausência do antígeno tipo D na superfície eritrócitos. De facto, é comum designar-se Rh positivo um indivíduo que contém o antígeno D na superfície dos eritrócitos e Rh negativo se esse antígeno está ausente. Contudo, se for pretendida uma análise mais completa do sistema Rh, deve ser considerado um complexo de genes que origina várias combinações de 3 antígenos alternativos: C ou c, D ou d e E ou e. Com base nos antígenos referidos, existem várias combinações que definem o fenótipo Rh completo: CDe, cDE, CDE, entre outros. Com a determinação do fenótipo Rh, a transfusão de sangue torna-se ainda mais segura, uma vez que garante que o recetor não acolhe antígenos desconhecidos no seu sistema, evitando o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos. Assim, seria

bastante útil avaliar de que forma a espectrofotometria contribuiria para a determinação do fenótipo Rh e se esta poderia trazer vantagens em relação aos métodos existentes (redução do tempo de teste, por exemplo).

Outra questão relevante é a realização do teste reverso. Este, como já referenciado, consiste na detecção dos anticorpos no plasma sanguíneo, funcionando como confirmação do teste direto na prática clínica. Normalmente, para a realização deste teste são utilizados eritrócitos reagentes do tipo A e B a reagir com plasma sanguíneo do paciente, de forma a identificar os anticorpos plasmáticos. Seria interessante avaliar se com a utilização da espectrofotometria era possível a realização do teste reverso e ainda se o teste poderia utilizar sangue total, ou seja, não haver a necessidade de separação dos componentes do sangue (eritrócitos + plasma sanguíneo), poupando-se em recursos (centrífugas para separação dos componentes sanguíneos) e tempo de análise.

Bibliografia

- [1] S. Rod, P. Tate, and S. Trent, *Anatomia & Fisiologia*, 1º ed., Lisboa: Lusodidacta, 2001.
- [2] K. Rogers, *Blood: Physiology and Circulation*, 1º ed., New York: Britannica Educational Publishing, 2011.
- [3] S. P. Alexander, "An Integrated Microoptical Microfluidic Device for Agglutination Detection and Blood Typing," Mechanical Engineering, Faculty of North Carolina State University, 2007.
- [4] M. A. Lichtman, E. Beutler, T. J. Kipps *et al.*, *Manual de Hematologia de Williams*, 6º Edição ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.
- [5] R. Caquet, *Guia Prático de Análises Clínicas*, 1ª ed., Lisboa: Climepsi, 2004.
- [6] G. Daniels, *Human Blood Groups*, 2ª ed., Oxford: Blackwell Sciences, 2002.
- [7] A. V. Hoffbrand, *Fundamentos em Hematologia*, 4ª ed., São Paulo: Artmed, 2004.
- [8] S. M. Lewis, *Hematologia prática de Dacie e Lewis*, 9 ed., Porto Alegre: Artmed, 2006.
- [9] J. B. Lambert, "A Miniaturized Device for Blood Typing Using A Simplified Spectrophotometric Approach," Mechanical Engineering, Faculty of North Carolina State University, 2006.
- [10] W. Malomgré, and B. Neumeister, "Recent and future trends in blood group typing," *Anal Bioanal Chem*, vol. 393, pp. 1443-1451, 2009.
- [11] H. Diagnóstica, "DiaClon Anti-A, DiaClon Anti-B, DiaClon Anti-AB," Folheto informativo, Outubro de 2011.
- [12] BioRad. "Products: Monoclonal Antibodies," 19 de Outubro, 2011; <http://diamed.com/products.aspx?mode=prod_prod&id=39&navvis=yes>.
- [13] BioRad. "Products: ABO/Rh," 20 de Outubro, 2011; http://diamed.com/product_detail.aspx?id=98&navvis=yes.
- [14] "Blood Policy and Technology," in Congress Office of Technology Assessment, 1985, pp. 79-91.
- [15] P. Sturgeon, "Automation: its introduction to the field of blood group serology," *Journal of Blood Group Serology and Education*, vol. 17, 2001.

Bibliografia

- [16] B. P. L. Moore, "Automation in the Blood Transfusion Laboratory: I. Antibody Detection and Quantitation in the Technicon AutoAnalyzer.," *Canadian Med. Ass. Journal*, vol. 100, pp. 381-387, 1969.
- [17] T. F. Dictionary. "Threshold," 10 de Março, 2012; <http://www.thefreedictionary.com/threshold>.
- [18] M. Garretta, J. Gener, A. Muller *et al.*, "The Groupomatic System for Routine Immunohematology," *Transfusion*, vol. 15, pp. 422-431, 1975.
- [19] D. Zaccarelli, G. Monti, J. Malaguti *et al.*, "Esperienza di automazione nella determinazione dei gruppi sanguigni," *La Trasfusione del Sangue*, vol. 45, pp. pp. 28-31, 2000.
- [20] Olympus. "Manual OLYMPUS PK TP SYSTEM," 25 de Outubro, 2011; http://www.giveapint.org/files/documents/Olympus_TP.pdf.
- [21] Olympus. "Diagnostic Systems Milestones : 1991-2005.," 25 de Outubro, 2011; <http://www.olympusglobal.com/en/corc/history/story/analyzer/milestones/1991.html>.
- [22] G. Wittmann, J. Frank, W. Schramm *et al.*, "Automation and Data Processing with the Immucor Galileo System in a University Blood Bank," *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 34, pp. 347-352, 2001.
- [23] I. Gamma. "Our Products and Services," 25 de Outubro, 2011; http://www.immucor.com/site/ps_bb_automation_galileo.jsp.
- [24] A. Dada, D. Beck, and G. Schmitz, "Automation and Data Processing Banking using the Ortho AutoVue Innova System," *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 34, pp. 341-346, 2007.
- [25] O. C. Diagnostics. "Manual Ortho AutoVue Innova," 26 de Outubro, 2011; http://www.orthoclinical.com/hi-in/ProductInformation/TransfusionMedicine/Immunohematology/ORTHOAutoVueInnova/Documents/AutoVue_Innova_eBrochure.pdf.
- [26] BioRad. "Products - Blood Bank Automation: TANGO Optimo," 26 de Outubro, 2011; <http://www.biorad.com/prd/en/US/adirect/biorad?cmd=BRCatgProductDetail&vertical=CDG&catID=L0U2TNE8Z&country=US&lang=en&javascriptDisabled=true>.
- [27] BioRad. "Products: Techno TwinStation," 27 de Outubro, 2011; http://diamed.com/product_detail.aspx?id=848&navis=yes.

- [28] BioRad. "Products: Classic Plus ID-GelStation," 28 de Outubro, 2011; http://diamed.com/product_detail.aspx?id=840&nawis=yes.
- [29] Diagast. "Produtos: QWALYS," 28 de Outubro, 2011; http://www.diagast.com/index.php?option=com_content&view=article&id=78%3A3records&catid=40%3Aqwalys&Itemid=245&lang=pt.
- [30] K. J. Pretzel, M. Korb, O. Meyer *et al.*, "Evaluation of Immunohematology Routine Methods using the Erythrocytes Magnetized Technology on the Qwalys Diagast System.," *Institute of Transfusion Medicine, Charité. Berlin, Germany*, 2007.
- [31] K. Loster, S. Fleischhauer, and P. Schwind, "Lateral Flow Assay for Simultaneous typing of ABO, Rhesus subgroups and Kell " *Vox Sang*, vol. 87, 2004.
- [32] S. Narayanan, S. Orton, G. F. Leparc *et al.*, "Ultraviolet and Visible Light Spectrophotometric Approach to Blood Typing: Objective Analysis by Agglutination Index," *Transfusion*, vol. 39, pp. 1051-1059, 1999.
- [33] S. Narayanan, L. Galloway, A. Nonoyama *et al.*, "UV-Visible Spectrophotometric Approach to Blood Typing II: Phenotyping of Subtype A2 and Weak D and wholeBlood Analysis," *Transfusion*, vol. 42, pp. 619-626, 2002.
- [34] S. R. Anthony, "A Simplified Visible/Near-Infrared Spectrophotometric Approach to Blood Typing for Automated Transfusion Safety," Mechanical Engineering, North Carolina State University, 2005.
- [35] M. J. K. Thomas, *Ultraviolet and visible spectroscopy*, 2^a ed., Chichester: John Wiley & Sons, 1997.
- [36] R. C. Denney, and R. Sinclair, *Visible and Untraviolet Spectroscopy*, London: Analytical Chemistry by Open Learning, 1987.
- [37] E. M. Balbás, *Optical Techniques for the Study of Living Tissue* Netherlands: DUP Science, 2010.
- [38] B. Eggins, *Biosensors: an introduction*, John Wiley & Sons, 1996.
- [39] A. Nonoyama, "Using Multiwavelength UV-Visible Spectroscopy for the Characterization of Red Blood Cells: An Investigation of Hypochromism," Department of Chemistry University of South Florida, 2004.
- [40] A. Nonoyama, A. Gracia-Lopez, L. H. Garcia-Rubio *et al.*, "Hypochromicity in red blood cells: an experimental and theoretical investigation " *Biomedical Optics Express*, vol. 2, pp. 2126-2143, 2011.

Bibliografia

- [41] J. R. Meyer-Arendt, *Introduction to Classical & Modern Optics*, 3^a ed., New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 1989.
- [42] A. N. Shvalov, J. T. Soini, A. V. Chernyshev *et al.*, "Light-scattering properties of individual erythrocytes," *Applied Optics*, vol. 38, pp. 230-235, 1999.
- [43] H. Photonics, "Si Photodiodes - S2386 series," Datasheet, 2010.
- [44] "Catalog Spectrophotometer Jasco V-560," 26 de Julho, 2012; http://www.orgchm.bas.bg/~i2mp/V_550560570.pdf.
- [45] Bivar, "Tight Tolerance Ultraviolet LED Lamp - TZ Series (T1, 3mm Round / 15° & 30°)", Datasheet, 2008.
- [46] Osram, "3 mm (T1) LED, Diffused," Datasheet, 2005.
- [47] Optek, "GaAs Plastic Infrared Emitting Diodes," Datasheet, 1996.
- [48] A. Devices, "Low-Voltage, 8-/16-Channel Multiplexers," Datasheet, 2002.
- [49] P. Horowitz, and W. Hill, *The Art of Electronics*, 2 edition ed.: Cambridge University Press, 1989.
- [50] T. Instruments, "TLC2652, TLC2652A, TLC2652Y Advanced LinCMOS Precision Chopper-Stabilized Operational Amplifiers," Datasheet, 2005.
- [51] S. Microelectronics, "STM32F103xE - High-density performance line ARM-based 32-bit MCU with 512KB Flash, USB, CAN, 11 timers, 3 ADCs, 13 communication interfaces," Datasheet, 2009.
- [52] S. Microelectronics, "STM32F101xx, STM32F102xx, STM32F103xx, STM32F105xx and STM32F107xx advanced ARM-based 32-bit MCUs," Reference Manual, 2011.
- [53] Micrium, "uC/GUI Graphical User Interface with Graphic Library," User's & reference manual for μ C/GUI, 2002-2007.
- [54] C. H. Brase, and C. P. Brase, *Understandable Statistics*, 9th edition ed., USA: Brooks Cole, 2008.
- [55] E. M. Sciences. "Microscope Glass Slides - Physical Properties," 16 de Julho, 2012; <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/histology/slides.aspx>.
- [56] M. K. Warby, J. R. Whiteman, W.-G. Jiang *et al.*, "Finite element simulation of thermoforming processes for polymer sheets," *Mathematics and Computers in Simulation*, vol. 61, pp. 209–218, 2003.

- [57] "Datasheet Camelion Specialized Batteries: Ni-MH Batteries," 6 de Agosto, 2012; <http://www.mantech.co.za/Datasheets/Products/NH-9V250.pdf>.
- [58] STMicroelectronics, "L7800 Series - Positive Voltage Regulators," Datasheet, 2003.
- [59] Sony. "InfoLithium H Series Battery Pack," 4 de Setembro, 2012; <http://store.sony.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?catalogId=10551&storeId=10151&langId=-1&partNumber=NPFH70>.
- [60] STMicroelectronics, "LD1086xx - A adjustable and fixed low drop positive voltage regulator," Datasheet, 2012.
- [61] XP, "SWITCHING REGULATOR, 3.3V, 1A O/P," Datasheet, 2011.
- [62] "Sistemas de Telecomunicações Guiados - ISCTE," 9 de Agosto, 2012; <http://radio.lx.it.pt/STG/STG0405acetatos10.pdf>.

Anexos

Esta secção encontra-se dividida em três setores. O anexo I e II apresentam os gráficos intermédios obtidos nos testes experimentais com aplicação do protocolo em cuvete e em lâmina, respetivamente. O anexo III apresenta as caracterizações experimentais realizadas sobre os LEDs selecionados para o dispositivo.

Anexo I – Gráficos metodologia em cuvete

O anexo I apresenta os gráficos relativos aos valores de corrente no fotodiodo para algumas das amostras efetuadas para o sistema ABO-Rh, bem como a explicação da forma como se obtêm os espectros de DO apresentados no capítulo 3.

Considerando uma amostra de sangue tipo A, procedeu-se à medição da corrente no fotodiodo (A) em função do comprimento de onda (nm) para as amostras de teste (sangue com anticorpos), controlo (sangue com PBS) e amostra de referência (solução de PBS) – figura A1.1.

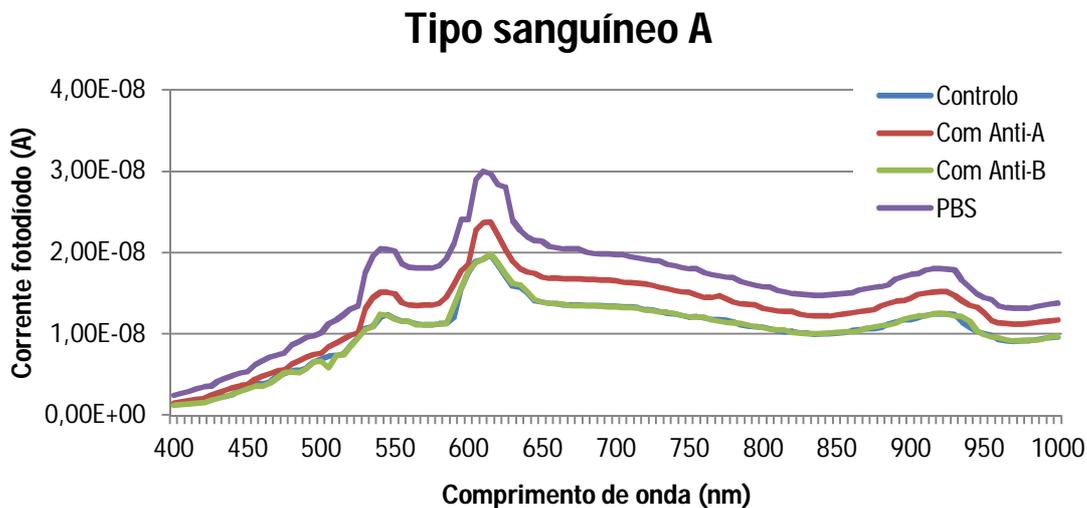


Figura A1.1 Valores de Corrente no fotodiodo em função do comprimento de onda para uma cuvete com 2,5 mL de PBS (solvente, curva roxa); e para uma amostra de sangue tipo A a reagir com PBS (curva azul), com reagente Anti-A (curva vermelha) e com reagente Anti-B (curva verde).

De forma a obter o espectro de DO para cada uma das amostras (controlo e amostras de teste (sangue a reagir com Anti-A e sangue a reagir com Anti-B)) apenas é necessário aplicar

a equação 2.5 considerando como solvente os valores de corrente obtidos com uma cuvete com 2,5 mL de PBS (curva roxa da figura A1.1).

A figura A1.2 apresenta a corrente no fotodíodo (A) em função do comprimento de onda (em nm) para uma amostra de sangue tipo Rh positivo, considerando as amostras de teste, controlo e referência. Os espectros de DO são obtidos fazendo as mesmas considerações anteriormente referidas para o caso da amostra de sangue tipo A.

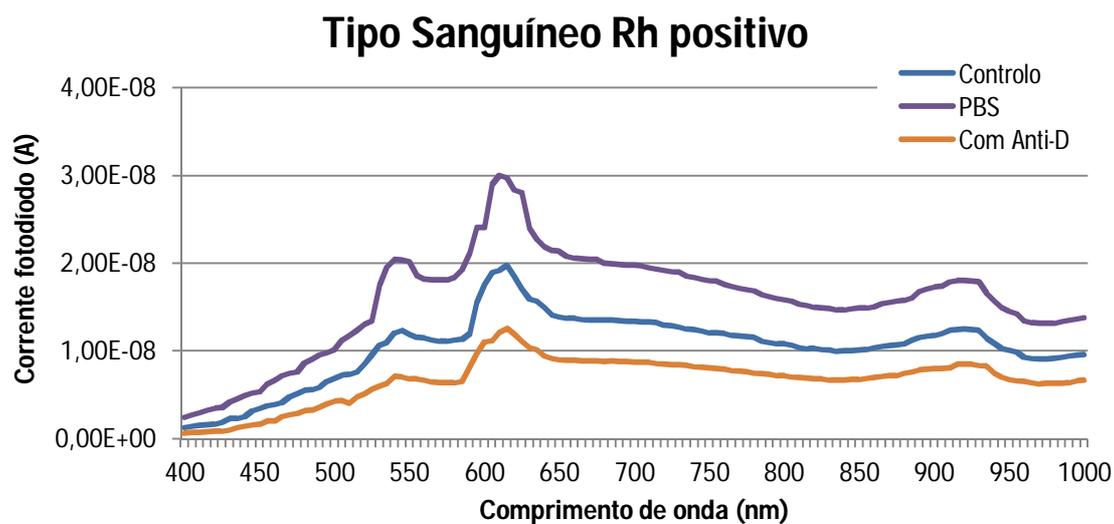


Figura A1.2 Valores de Corrente no fotodíodo em função do comprimento de onda para uma cuvete com 2,5 mL de PBS (background, curva roxa); e para uma amostra de sangue Rh positivo a reagir com PBS (curva azul) e com reagente Anti-D (curva laranja).