UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

**ANALISADOR DE BILIRRUBINA NO SORO DE
NEONATOS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA
DIRETA**

LEANDRO AUGUSTO LOPES AZEKA

**Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título
de Mestre em Engenharia Elétrica.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Stela Veludo de Paiva

São Carlos

2009

Agradecimentos

Este trabalho só se tornou possível graças à ajuda direta ou indireta destas pessoas e instituições que agradeço, reconheço e dedico todo o apoio e conhecimento.

Primeiramente gostaria de agradecer à minha mãe Neide Lopes Azeka, ao meu pai Seigo Azeka, à minha irmã Luciana Lopes Azeka e à namorada Armanda Carla Arnault, que estiveram sempre presentes durante esta caminhada, e foram os maiores incentivadores desta jornada de estudos.

À orientadora Prof^a Dr^a Maria Stela Veludo de Paiva do Departamento de Engenharia Elétrica, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, pelo apoio e tutoria durante todo o período de graduação e principalmente do mestrado, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual. Ao Prof^o Dr^o Evandro Luís Linhares Rodrigues pelo auxílio técnico.

Agradeço efusivamente a colaboração do Prof^o Dr^o Arthur Lopes Gonçalves do Departamento de Puericultura e Pediatria, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pelo material disponibilizado, conselhos e concessão de seu corpo clínico para a realização dos testes.

Também agradeço à Olidef cz Indústria e Comércio de Aparelhos Hospitalares, que acreditou no meu trabalho, incentivou, financiou e muito colaborou para o desenvolvimento do produto. Gostaria de agradecer a todos os funcionários e principalmente aos amigos de trabalho, por todo o suporte provido, pela confiança e sincera amizade: Eng^o Lucio Kimura; parceiros de pesquisa e desenvolvimento Alexandre Donizet Dadalt, Luis Fernando Faim, Eng^o Daniel Rodrigues de Camargo, Eng^o Daniel Fantinado; amigos Eng^o Jose Francisco Ferreira Moitinho, Diego Rodrigues da Silva e Eng^o Thiago Samarino Lages.

Aos amigos MSc Fernando Ranieri e MSc Marcel Suetake, por todo companheirismo.

Agradeço às instituições que colaboraram com o fornecimento de material, e na realização de inúmeros testes: Proteon Indústria e Comércio, Komlux Fibras ópticas e Departamento de Ótica Não Linear, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), e em especial ao Departamento de Engenharia Elétrica, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

E principalmente a Deus.

“Se você começa a trabalhar em suas metas, suas metas começam a trabalhar em você. Se você começa a trabalhar em seu projeto, seu projeto começa a trabalhar em você. Qualquer que seja a coisa boa que construímos, ela acaba por nos construir.”

Jim Rohn

Resumo

Azeke, L. A. L. (2009) *Analizador de bilirrubina no soro de neonatos utilizando espectrofotometria direta*.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009

A icterícia é uma manifestação caracterizada pelo amarelamento da pele e mucosas devido ao excesso de bilirrubina no sangue do paciente. Cerca de 60% dos recém nascidos (RN) manifestam a icterícia nas primeiras semanas de vida, sendo este índice muito maior em neonatos prematuros. Se não corretamente diagnosticada, a alta concentração de bilirrubina pode intoxicar a massa encefálica, provocando uma encefalopatia conhecida como kernicterus. Existem vários métodos para medir a concentração de bilirrubina, e entre eles pode-se citar: métodos bioquímicos laboratoriais que utilizam amostras de sangue coletadas e reagentes específicos, medidores de bilirrubina transcutâneos e espectrofotometria em amostras de soro. O princípio básico desses métodos é a análise colorimétrica, que se baseia na alta absorbância da molécula de bilirrubina no comprimento de onda de 455 nm. O presente trabalho descreve um bilirrubiômetro, que foi desenvolvido para medir a concentração da bilirrubina utilizando a espectrofotometria direta no soro de amostras sanguíneas de neonatos. No projeto do bilirrubiômetro levou-se em consideração o baixo custo de produção, uma boa precisão comparada com outros equipamentos, e a utilização de componentes de alta tecnologia tais como LED com alta intensidade luminosa e fotorreceptores especiais para medir concentrações nas faixas de luz específica. Para a validação do equipamento foram obtidas amostras de sangue de recém nascidos, junto ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e os resultados das medidas realizadas com o bilirrubiômetro construído foram comparados com os obtidos com um bilirrubiômetro comercial e com métodos bioquímicos clássicos. Os resultados da comparação mostraram que o bilirrubiômetro construído apresenta um erro relativo de $\pm 1,05$ mg/dl, que se encontra dentro da média dos bilirrubiômetros diretos e custo de produção relativamente baixo.

Palavras-chave: Bilirrubiômetro, Espectrofotometria, Icterícia, Medição de Bilirrubina, Bilirrubina.

Abstract

Azeka, L. A. L. (2009) Neonate serum bilirubin meter using direct spectrophotometry.

Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Jaundice is a manifestation described as the yellowish staining of the skin and mucous membranes caused by the excessive levels of bilirubin in the patient blood. About 60% of the newborns present this feature in the first weeks of life, and this percentage is much higher in premature neonates. If not correctly detected and treated, the bilirubin can intoxicate the encephalic mass, causing an encephalopathy known as kernicterus. There are many methods to measure the bilirubin concentration such as: blood laboratory methods using specific reagents, transcutaneous bilirubin and serum spectrophotometric equipments. The basic principle of these devices is the colorimetric analysis based on the high absorption of the bilirubin molecule in the 455 nm wavelength. This work describes a bilirubin meter that was developed for measure the bilirubin concentration using direct spectrophotometry in the serum of neonates' blood samples. In the bilirubin meter project it was considered the low production cost, a good precision compared with others similar equipments, and the use of high technology components as high intensity LED and special photoreceptors to measure specific wavelengths. For validation of the equipment it was used newborn's blood samples from the Clinics Hospital at the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, and the results obtained with the equipment were compared with the values of a commercial bilirubin meter and with biochemical tests. The results showed that the developed bilirubin meter has a relative error around 1,05 mg/dl, similar to commercial bilirubin meters and a low relative cost.

Keywords: Bilirubinometer, Spectrophotometry, Direct Spectrophotometry, Bilirubin meter, Bilirubin.

Lista de Figuras

Figura 1 - Molécula de bilirrubina ($C_{33}H_{36}N_4O$). Fonte: (ODELL, 1980).....	5
Figura 2 - Metabolismo da bilirrubina.....	6
Figura 3 - Tecido do fígado enfatizando os canalículos biliares, hepatócitos e vasos sanguíneos. Fonte: (HANSEN; KOEPPEN, 2002)	7
Figura 4 - Órgãos do corpo envolvido na produção e excreção da bilirrubina. Fonte: (HANSEN; KOEPPEN, 2002).	9
Figura 5 - Gráfico dos níveis de bilirrubina que apresentam riscos de hiperbilirrubinemia para RN. Fonte: (BHUTANI; JOHNSON; SIVIERI, 1999).	11
Figura 6 - Equipamentos para fototerapia utilizados para tratamento da icterícia neonatal. Fonte: (OLIDEF CZ, 2007)	15
Figura 7 - Irradiação x Comprimento de onda para luz de fototerapia para o tratamento eficaz da Icterícia. Fonte: (OLIDEF CZ, 2007)	16
Figura 8 - Diagrama da absorção de um feixe de luz atravessando uma cubeta de tamanho l .	21
Figura 9 - Esquema óptico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos.	22
Figura 10 - Curva de absorção da bilirrubina e da oxihemoglobina pelo comprimento de onda. Fonte: (ZIJLSTRA; BUURSMA; ROEST, 1991; DU et al., 1998)	23
Figura 11 - Esquema básico de um bilirrubiômetro. Fonte: (REICHERT ANALYTICAL INSTRUMENTS, 2003).....	24
Figura 12 - Esquemático utilizado nos primeiros bilirrubiômetros. Fonte: (JACKSON; HERNANDEZ, 1970)	25
Figura 13 - Precisão do equipamento Bilimeter 3, em mg/dl. Fonte: (PFAFF MEDICAL, 2004a)	25
Figura 14 - Linearidade do equipamento Bilimeter 3, em mg/dl. Fonte: (PFAFF MEDICAL, 2004a)	26
Figura 15 - Icterômetro para avaliar a icterícia neonatal. Fonte: (MAISELS, 2006).....	27
Figura 16 - Absorção de luz da bilirrubina e hemoglobina somada com o efeito da absorção de melanina, Fonte: (BHUTANI et al., 2000).....	28
Figura 17 - Bilirrubiômetro transcutâneo de Yamanouchi, mostrando o sistema óptico com duplo caminho. Fonte: (MAISELS, 2006)	29
Figura 18 - Utilização de bilirrubiômetro transcutâneo em recém-nascidos.....	29
Figura 19 - Diagrama esquemático do equipamento BiliCheck. Fonte: (MAISELS, 2006)....	30

Figura 20 - Caminhos ópticos percorridos pelos feixes do JM-103. Fonte: (MAISELS, 2006)	31
Figura 21 - Diagrama de funcionamento do bilirrubinômetro Bilimed.....	34
Figura 22 - Circuito de polarização de um diodo.	35
Figura 23 - Estrutura interna dos LED convencionais e os LED de alto brilho. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006a).....	36
Figura 24 - Tensão direta pela corrente direta para LED Lumileds Luxeon K2. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c).....	37
Figura 25 - Espectro de luz para o LED Luxeon K2 branco, branco neutro e branco quente, fabricante Lumileds. Temperatura de junção à 25°C. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c).....	40
Figura 26 - Fluxo luminoso relativo ou potência radiométrica pela corrente direta para LED Lumiled K2 para $T_j=25^\circ\text{C}$ e corrente de teste de 1000 mA. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c)	41
Figura 27 - Padrão de radiação polar para LED Lumiled Luxeon K2 Branco <i>Lambertian</i> . Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c).....	41
Figura 28 - Padrão de radiação para LED Lumiled Luxeon III Branco <i>Side Emitting</i> . Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006b).....	42
Figura 29 - Lentes colimadoras diversas para LED Lumiled Luxeon K2. Fonte: (FRAEN CORPORATION, 2006; KHATOD OPTOELECTRONIC SRL, 2007)	42
Figura 30 - Montagem e tipos de lentes colimadoras para LED Lumiled Luxeon K2. Fonte: (FRAEN CORPORATION, 2006)	43
Figura 31 - Reposta da emissão de luz de um LED conforme a variação da temperatura de junção. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c).....	44
Figura 32 - Gráfico da variação de temperatura do LED Osram Dragon Azul pela variação da temperatura ambiente.	45
Figura 33 - Gráfico da variação da intensidade de luz relativa do LED Osram Dragon Azul pela variação de temperatura do LED.	45
Figura 34 - Gráfico da variação de temperatura do LED Lumiled Luxeon K2 Branco pela variação ambiente.	46
Figura 35 - Gráfico da variação da intensidade de luz relativa do LED Lumiled Luxeon K2 Branco pela variação de temperatura do LED.....	46
Figura 36 - Esquema interno do CI LM 723. (NATIONAL SEMICONDUCTOR, 1999).....	47

Figura 37 - Fonte de corrente utilizando o CI LM 723.	48
Figura 38 - Circuito simplificado do LM 723 como fonte de corrente.	48
Figura 39 - Corrente de Saída da composição do LM 723.	49
Figura 40 - Fonte Reguladora de corrente utilizando o CI LM 723.	50
Figura 41 - Acionamento da fonte de corrente utilizando o CI LM 723.	50
Figura 42 - Filtros para diversos comprimentos de onda. Fonte: (OMEGA OPTICAL, 2006)	51
Figura 43 - Composição de um filtro dicróico. Detalhe do substrato e da camada do <i>coating</i>	52
Figura 44 - Lentes e filtros utilizados no projeto.	53
Figura 45 - Diagrama do conjunto óptico.	53
Figura 46 - Emissão das luzes após passagem no conjunto óptico lente dicróica, filtro azuis 455 nm e filtro amarelo 575 nm.	54
Figura 47 - Gráfico da transmitância x comprimento de onda (nm) da lente dicróica 45°.....	55
Figura 48 - Gráfico da transmitância x comprimento de onda (nm) do filtro azul 455 nm.	55
Figura 49 - Gráfico da transmitância x comprimento de onda (nm) do filtro amarelo 575 nm.	55
Figura 50 - Corte seccional de um fotodiodo. Fonte: (HAMAMATSU PHOTONICS, 2007) .	56
Figura 51 - Circuito equivalente do fotodiodo. Fonte: (HAMAMATSU PHOTONICS, 2007)	57
Figura 52 - Características da corrente x tensão do fotodiodo. Fonte: (HAMAMATSU PHOTONICS, 2007)	59
Figura 53 - Aplicação de fotosensor conversor de frequência para medição de glicose em análise de sangue. Fonte: (KING, 2006)	60
Figura 54 - Pinagem e esquema de funcionamento do componente TCS 230. Fonte: (TAOS, 2007).....	61
Figura 55 - Resposta espectral do componente TCS 230. Fonte: (TAOS, 2007).....	62
Figura 56 – Técnica da medição pelo período. Fonte: (KIRIANAKI et al., 2002).....	63
Figura 57 - Técnica da medição pela frequência. Fonte: (KIRIANAKI et al., 2002)	64
Figura 58 - Região e procedimento para a punção de calcanhar. (VACCUETE DO BRASIL, 2003).....	66
Figura 59 - Tecidos perfurados por lanceta para o procedimento de punção. Fonte: (VACCUETE DO BRASIL, 2003)	66

Figura 60 - Tubo capilar, fabricante Perfecta. Fonte: (PERFECTA LAB, 2006)	67
Figura 61 - Tubo capilar contendo amostra e a separação dos componentes do sangue após a centrifugação.	69
Figura 62 - Tubo capilar em centrífuga com amostra de sangue, e tubo capilar já centrifugado com os componentes do soro separados. Fonte: (FANKHAUSER, 2004)	69
Figura 63 - Montagem do protótipo parcial contendo os elementos básicos do projeto.	72
Figura 64 - Circuito de acionamento do LED baseado no CI LM 723.	72
Figura 65 - LED Lumiled Luxeon K2 montado em um dissipador com lente e suporte para os filtros e lente dicróica.	73
Figura 66 - Esquema do caminho percorrido pela luz passando pela amostra e pelo suporte para tubo capilar.	74
Figura 67 - Corte lateral do conjunto óptico do bilirrubinômetro desenvolvido.....	75
Figura 68 - Montagem e peças integrantes do conjunto óptico do bilirrubinômetro.	75
Figura 69 – Diagrama de blocos interno do microcontrolador AT 89S8253. Fonte: (ATMEL CORPORATION, 2006).	77
Figura 70 - Configuração lógica do temporizador/contador da família AT 80C51 de microcontroladores. Fonte: (ATMEL CORPORATION, 2005).	78
Figura 71 - Esquema eletrônico da placa de controle, com o microcontrolador AT 89S8253 e os periféricos envolvidos no projeto.....	80
Figura 72 - Placa de controle com AT 89S8253 e os periféricos.	81
Figura 73 - Esquema eletrônico da placa da fonte.....	82
Figura 74 - Fluxograma do programa principal do software embarcado do Bilimed.	84
Figura 75 - Fluxograma para a inicialização das variáveis e o zero de leitura do software embarcado do Bilimed.....	85
Figura 76 - Fluxograma das sub-rotinas Leitura dos FOTOSensores e Medir Sinal do software embarcado do Bilimed.....	86
Figura 77 - Fluxograma das sub-rotinas Gravar Variáveis e Apagar Variáveis na EEPROM do microcontrolador, partes do software embarcado do Bilimed.....	87
Figura 78 - Fluxograma das sub-rotinas Leitura Dados e Enviar Serial do software embarcado do Bilimed.	88
Figura 79 - Esquema de ligação para a comunicação do Bilimed com um microcomputador através de comunicação serial.	88
Figura 80 - Montagem final da fonte de alimentação do bilirrubinômetro.	90

Figura 81 - As duas partes do protótipo do bilirrubinômetro. A primeira foto ilustra o bilirrubinômetro enquanto a segunda mostra a fonte de alimentação.	91
Figura 82 - Material utilizado para coleta de sangue.....	93
Figura 83 - Relação entre os sinais dos fotosensores para diferentes intensidades de entrada para uma amostra contendo água destilada.	94
Figura 84 - Gráfico da média (KHz) e da variância das amostras medidas na saída dos fotosensores.	95
Figura 85 - Gráfico da concentração de bilirrubina do aparelho comercial (mg/dl) pelo sinal de saída do Bilimed (KHz). Os pontos são os dados amostrais e a reta azul é a interpolação polinomial.	99
Figura 86 - Gráfico da concentração de bilirrubina pela concentração de saída do Bilimed, reta de tendência (linha contínua) e os dados coletados (pontos).....	101
Figura 87 - Erro na medição da concentração de bilirrubina do Bilimed (pontos).	102
Figura 88 - Linearidade do equipamento Bilimed (pontos) pela referência (linha contínua).	102

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tipos e características de sensores conversores de frequência TAOS. Fonte: (YURISH, 2005).....	59
Tabela 2 - Seleção do tipo de fotodiodo utilizado no TCS 230, A = sinal lógico Alto e B = sinal lógico Baixo. (TAOS, 2007).....	62
Tabela 3 - Escalas de frequências de saída do TCS 230, A = sinal lógico Alto e B = sinal lógico Baixo. (TAOS, 2007)	62
Tabela 4 - Dimensões do tubo capilar. Fonte: (PERFECTA LAB, 2006)	68
Tabela 5 - Parâmetros de configuração para a comunicação serial do Bilimed.....	89
Tabela 6 - Exemplo do formato dos dados enviados por comunicação pelo Bilimed.....	89
Tabela 7 - Concentração de bilirrubina (aparelho comercial) e sinal de saída do Bilimed para bilirrubina padrão.	98
Tabela 8 - Concentração de bilirrubina (aparelho comercial) e sinal de saída do Bilimed para soro humano.	98
Tabela 9 - Valores de referência de bilirrubina para adultos e neonatos. Fonte: (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2004)	100
Tabela 10 - Desvio Padrão, variância e erro máximo encontrado nas leituras do Bilimed....	101
Tabela 11 - Causas de hiperbilirrubinemia patológica durante a vida neonatal. Fonte: (ALVES FILHO, 1991).....	113
Tabela 12 - Possíveis causas e avaliação para a icterícia não conjugada. Fonte: (ALVES FILHO, 1991).....	114
Tabela 13 - Possíveis causas e avaliação para a icterícia conjugada. Fonte: (ALVES FILHO, 1991).....	115
Tabela 14 - Procedimento para o os padrões do método DPD.....	118
Tabela 15 - Reprodutibilidade do método DPD	119
Tabela 16 - Análise da variância para diferentes medições em amostras de soro humano....	121
Tabela 17 - Resultado de medições realizadas pelo Bilimed e por um bilirrubinômetro comercial para diferentes concentrações de bilirrubina (mg/dl).	125

Lista de Siglas e Abreviaturas

AC	<i>Alternating Current</i> (Corrente Alternada)
AD	Conversor Analógico Digital
ANSI	<i>American National Standard Institute</i>
AUDP	Ácido Uridino-Difosfato
AUDPG	Ácido Uridino-Difosfato Glucurônico
BT	Bilirrubina Total
BD	Bilirrubina Direta
BI	Bilirrubina Indireta
BTc	Bilirrubina Transcutânea
CI	Circuito Integrado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DC	<i>Direct Current</i> (Corrente Contínua)
DPD	Sal de Diclorofenildiazonio
Hb	Hemoglobina saturada
IESNA	<i>Illuminating Engineering Society of North America</i>
LCD	<i>Liquid Crystal Display</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standard</i>
RN	Recém Nascido
TAOS	<i>Texas Advanced Optoelectronic Solutions</i>
UART	<i>Universal Asynchronous Receiver Transmitter</i>
UDP	Uridino-Difosfato
UV	Ultra Violeta
RGB	<i>Red, Green, Blue</i>

Sumário

1. Introdução	1
1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1.2. JUSTIFICATIVAS	1
1.3. OBJETIVOS	2
1.4. ESTRUTURA DO TRABALHO	2
2. Bilirrubina e Icterícia	5
2.1. BILIRRUBINA E FISILOGIA	5
2.2. ICTERÍCIA	10
2.2.1. Icterícia Fisiológica	12
2.2.2. Icterícia Não-Fisiológica	12
2.2.3. Tratamento	14
3. Métodos para Medição de Bilirrubina	17
3.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
3.2. MÉTODOS BIOQUÍMICOS CONVENCIONAIS	17
3.3. ESPECTROFOMETRIA DIRETA	19
3.3.1. Conceitos de espectrofotometria	19
3.3.2. Espectrofotometria aplicada à bilirrubinômetros	22
3.4. MEDIÇÃO TRANSCUTÂNEA	26
3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
4. Materiais e Métodos	33
4.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	33
4.1.1. Módulos desenvolvidos	33
4.2. LED DE ALTA INTENSIDADE	35
4.2.1. LED Branco	39
4.2.2. Emissão de luz	41
4.2.3. Efeitos da temperatura	43
4.2.4. Projeto Elétrico	46
4.2.5. Fonte de corrente	47
4.3. FILTRO ÓPTICO	51
4.3.1. Filtro dicróico	51
4.3.2. Filtros dicróicos 455 nm, 575 nm e lente dicróica refletora do azul	52
4.4. FOTOSENSOR	56
4.4.1. Fotosensor conversor luz-frequência	59
4.4.2. Fotosensor TCS 230	61
4.4.3. Medindo a frequência	63
4.5. COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	65
4.5.1. Microcoleta de sangue	65
4.5.2. Punção de veia superficial do dorso das mãos	67
4.5.3. Tubo Capilar	67
5. Protótipo do Bilirrubinômetro	71
5.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	71
5.2. PROTÓTIPO PARCIAL	71
5.3. CONJUNTO ÓPTICO	73
5.4. PROJETO ELETRÔNICO	76
5.4.1. Circuito de controle	76
5.4.2. Fonte de alimentação	81
5.4.3. Software	83
5.5. PROJETO MECÂNICO	90

6. Resultados e Discussões.....	93
6.1. ANÁLISE PRELIMINAR.....	93
6.2. CURVA DA CONCENTRAÇÃO DE BILIRRUBINA.....	95
6.3. DISCUSSÕES	103
7. Conclusões e Sugestões.....	105
7.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
7.2. TRABALHOS PUBLICADOS.....	106
8. Referências Bibliográficas	107
APÊNDICE A – Causas e Avaliações da Icterícia.....	113
APÊNDICE B – Métodos Bioquímicos para Medição da Bilirrubina.....	117
1.1. MÉTODO DPD.....	117
1.2. MÉTODO SIMS HORN	119
APÊNDICE C - Tabela de Análise da Variância	121
APÊNDICE D – Programa em Matlab	123
APÊNDICE E – Tabela de Concentrações de Bilirrubina	125

1. Introdução

1.1. Considerações Iniciais

Durante os primeiros dias de vida do recém-nascido é comum o aparecimento da icterícia, decorrente da hiperbilirrubinemia neonatal. Esta manifestação, definida como a coloração amarelada da pele e das mucosas e causada pelo acúmulo de um pigmento amarelo chamado bilirrubina, ocorre em cerca de 60% dos recém nascidos, sendo este índice muito maior em neonatos prematuros (KNUDSEN, 1989; TAKSANDE et al., 2005). O aumento da concentração de bilirrubina indireta no sangue é geralmente causado pela imaturidade do fígado em processá-la. Existem fatores externos que também podem provocar a icterícia como o aleitamento materno, as disfunções hepáticas e a incompatibilidade sanguínea materno-fetal. Esse quadro é mais comum em recém-nascidos (RN) prematuros. Um de seus tratamentos é a fototerapia com luz azul. Altas concentrações de bilirrubina indireta são tóxicas para o cérebro e podem causar uma encefalopatia típica, chamada “kernicterus”, podendo ser letal ou deixar seqüelas irreversíveis para a criança.

1.2. Justificativas

Inicialmente a icterícia é diagnosticada no próprio berçário ou UTI neonatal pelas enfermeiras ou médicos envolvidos, que percebem a coloração amarelada no RN. A determinação dos níveis de bilirrubina é geralmente feita por três tipos de equipamentos conhecidos como bilirrubinômetros: os medidores portáteis que medem a bilirrubina transcutânea (BTc); os espectrofotômetros e analisadores de gás no sangue, que utilizam de análise fotométrica no soro de sangue para medir a bilirrubina total (BT) ; e analisadores bioquímicos laboratoriais fotométricos que medem as concentrações de bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD) e bilirrubina indireta (BI) em amostras de sangue reagidas quimicamente.

Os equipamentos transcutâneos são o “estado da arte” da medição de bilirrubina e possuem a vantagem de não necessitar de coletas sanguíneas para a realização dos testes, situação crítica e dolorosa principalmente para prematuros. Apesar de vários autores terem mostrado boa correlação entre a bilirrubina transcutânea e a total (BHUTANI et al., 2000), nem todos os resultados mostram que as medidas são totalmente independentes de fatores como raça, tempo de gestação e peso (MAISELS et al., 2004).

Apesar de necessitarem de amostras sanguíneas, os espectrômetros diretos geram resultados confiáveis, quando comparados com os transcutâneos, e podem ser facilmente medidas por pessoas do próprio corpo clínico. Sua tecnologia é também consideravelmente mais simples do que a dos transcutâneos, possui custo reduzido, boa precisão, reprodutibilidade e confiabilidade.

Todos os fabricantes dos três tipos de equipamentos mencionados anteriormente são estrangeiros, sendo que no Brasil, o alto custo de importação dos medidores, assim como o custo dos reagentes para a análise laboratorial, são fatores que encarecem este tipo de análise.

Esses fatores levaram à proposta deste projeto, de implementar um bilirrubinômetro espectrofotômetro direto, levando-se em consideração o baixo custo de produção, uma boa precisão das medidas quando comparadas com as de outros equipamentos similares, e a utilização de componentes de alta tecnologia.

1.3. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver e avaliar um equipamento capaz de medir a concentração da bilirrubina total usando a técnica conhecida como espectrofotometria direta em amostras de soro de neonatos, utilizando LED com alta intensidade luminosa e fotorreceptores especiais para medir concentrações nas faixas de ondas específicas.

1.4. Estrutura do Trabalho

Este trabalho está dividido em sete capítulos e cinco apêndices.

Neste capítulo foi apresentado o contexto no qual se insere o trabalho, o objetivo e as justificativas.

O segundo capítulo é dedicado à definição da bilirrubina e icterícia, mostrando o metabolismo da bilirrubina no organismo, exemplificando as causas e tipos de icterícia neonatal, além de ressaltar como tratar a doença.

No terceiro capítulo são abordados os diversos métodos para a medição da bilirrubina, e entre eles os principais métodos bioquímicos laboratoriais, a utilização de equipamentos baseados na espectrofotometria direta e a medição transcutânea da bilirrubina.

O quarto capítulo refere-se a materiais e métodos utilizados no projeto: LED de alta intensidade, filtro óptico, fotosensor e coleta de amostras de sangue.

O quinto capítulo descreve o protótipo do bilirrubinômetro apresentado neste trabalho.

O sexto capítulo apresenta os resultados obtidos junto ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, além de discussões dos resultados obtidos com o equipamento.

No capítulo sete são apresentadas as conclusões e sugestões para implementações futuras.

Os apêndices estão divididos em cinco partes. O apêndice A lista as principais causas e avaliações da icterícia. No apêndice B são exemplificados alguns métodos bioquímicos laboratoriais para a medição de bilirrubina. A tabela da variância dos resultados obtidos é mostrada no apêndice C. O apêndice D apresenta o programa em Matlab utilizado para o cálculo da curva da concentração de bilirrubina do bilirrubinômetro proposto. A tabela das medições realizadas pelo bilirrubinômetro desenvolvido e o equipamento comercial são mostrados no apêndice E.

2. Bilirrubina e Icterícia

2.1. Bilirrubina e Fisiologia

As células vermelhas do sangue (hemácias) são compostas basicamente por hemoglobinas e globulinas e sua função principal é de transportar oxigênio para os tecidos e retirar gás carbônico dos mesmos.

As hemoglobinas são constituídas basicamente por um núcleo tetrapirrólico chamado heme e pela globina que fazem parte das hemácias cuja vida média é de 120 dias. Após este período as hemácias são destruídas e processadas nos macrófagos do sistema retículo-endotelial, existentes principalmente na medula óssea, baço, fígado e nódulos linfáticos. A bilirrubina é um pigmento derivado do processamento do heme e 80% da bilirrubina deriva da destruição de hemácias e 20% de outras hemoproteínas, principalmente os citocromos. A molécula da bilirrubina é mostrada na figura 1.

Figura 1 - Molécula de bilirrubina (C₃₃H₃₆N₄O). Fonte: (ODELL, 1980)

Figura 2 - Metabolismo da bilirrubina.

O metabolismo da bilirrubina (ODELL, 1980) é ilustrado pela figura 2, onde os números indicam os principais processos:

- processo 1: destruição do heme e formação da bilirrubina;
- processo 2: transporte da bilirrubina pelo plasma, ligada à albumina;
- processo 3: captação da bilirrubina do plasma pelo hepatócito;
- processo 4: conversão no hepatócito da bilirrubina não conjugada em conjugada;
- processo 5: transporte da bilirrubina conjugada pela membrana biliar.

No sistema retículo-endotelial o heme é convertido em um pigmento verde conhecido por biliverdina (equação 1 e 2). Por sua vez a biliverdina é reduzida à bilirrubina indireta pela ação da enzima biliverdina redutase (equação 3). Neste processo o carbono-metano é liberado em forma de monóxido de carbono (processo 1). A bilirrubina recém formada no sistema retículo-endotelial é conhecida como bilirrubina não conjugada ou indireta; é lipofílica, tóxica em altas concentrações, insolúvel em água e circula no sangue ligada à albumina.

Figura 3 - Tecido do fígado enfatizando os canálculos biliares, hepatócitos e vasos sanguíneos. Fonte: (HANSEN; KOEPPEN, 2002)

As principais células constituintes do tecido hepático (figura 3) são chamadas de hepatócitos e os espaços entre eles são conhecidos como sinusóides hepáticos. Nos sinusóides hepáticos a bilirrubina se desliga da albumina (processo 2) e através de difusão penetram nos hepatócitos. Esta difusão celular é facilitada por um composto de proteínas citoplasmáticas (ligandinas): Y e Z (processo 3).

A bilirrubina é transportada para o retículo endoplasmático liso, onde é conjugada com ácido uridino-difosfato glucurônico (AUDPG, equação 4) com ação da enzima glicuronil transferase (equação 5), dando origem a um monoglucuronídeo e di-glucuronídeo conjugado (processo 4).

A bilirrubina cojugada, também conhecida como bilirrubina direta, é transportada até a membrana celular. Como esta é atóxica e solúvel em água pode atravessar por difusão a membrana lipídica do hepatócito. Na face oposta aos sinusóides e próxima aos canálculos

biliares (processo 5) ela é excretada diretamente pelos sais da bile, alcançando o trato intestinal.

No trato intestinal ela é metabolizada pelas bactérias da flora intestinal, formando os urobilinogênios. A maior parte dos urobilinogênios é absorvida e novamente excretada pelo fígado, e uma pequena fração é excretada pelos rins.

Este processo do metabolismo da bilirrubina pode ser resumido através da figura 4, mostrando a hemoglobina, bilirrubina direta e indireta e os urobilinogênios sendo metabolizados nos principais órgãos envolvidos.

Figura 4 - Órgãos do corpo envolvido na produção e excreção da bilirrubina. Fonte: (HANSEN; KOEPPEN, 2002).

Existem, basicamente, dois tipos de bilirrubina circulantes no sangue - a conjugada (bilirrubina direta) e a não-conjugada (bilirrubina indireta). No entanto, existe um terceiro tipo de bilirrubina, chamada de bilirrubina delta, do tipo conjugada de reação rápida e ligada à albumina permanentemente por uma reação covalente. Pelas técnicas tradicionais de medição, a bilirrubina delta era incluída nos resultados da bilirrubina direta (conjugada) e da bilirrubina total. Por estar fortemente ligada à albumina, a bilirrubina delta não é excretada pelos rins e permanece por períodos correspondentes à meia-vida da albumina (cerca de 19 dias).

Quando alguma parte de todo esse complexo sistema está afetada, pode ocorrer uma disfunção nos níveis séricos de bilirrubina conjugada e não conjugada. Esta situação é comum em recém-nascidos prematuros devido à sua imaturidade hepática para processar a bilirrubina ou excretá-la, levando à icterícia. Outros fatores podem incrementar os níveis de bilirrubina como incompatibilidade no tipo sanguíneo ou no fator RH ou traumas de nascimento. Acompanhando os mecanismos envolvidos no metabolismo da bilirrubina, é possível correlacionar o aumento de seus níveis séricos com alterações de um dos processos do metabolismo.

As concentrações de bilirrubina são expressas geralmente nas unidades mg/dl ou $\mu\text{mol/l}$, onde 1 mg/dl equivale a 17,1 $\mu\text{mol/l}$ aproximadamente.

2.2. Icterícia

A icterícia é a situação mais comum em crianças durante a primeira semana de vida. Ela é caracterizada pela coloração amarela da pele e mucosas (ex: boca, olhos). Aproximadamente 60% dos recém-nascidos desenvolvem valores séricos de bilirrubina maior do que 7,0 mg/dl, associados à icterícia visível.

Segundo Brown (2003) e estudos realizados por Diamond (1970 apud BROWN, 2003, p. e33), apesar da icterícia-doença ser conhecida de Galeno (com o nome de colelitíase) e Hipócrates (chamada de hidropsia fetal), a primeira referência escrita à icterícia não-patológica se deve a Bartolomeu Metlinger (1473 apud BROWN, 2003, p. e33) em seu livro “*Ein Regiment der Jungen Kinder*”. Seu tratamento foi registrado por Michel Ettmüller (1708 apud BROWN, 2003, p. e34), que em seu livro “*De Infantum Morbis*” recomenda oferecer leite humano desde o primeiro dia de vida.

A idéia de quantificar o valor de bilirrubina avaliando a cor da pele não é nova. Esta relação foi documentada por Ylppö (1913 apud BROWN, 2003, p. e33), e também foi quem primeiro introduziu o conceito de icterícia neonatal como manifestação de imaturidade hepática. No entanto ele mediu a concentração de bilirrubina no sangue total e não somente

DIAMOND, L. K. *A history of jaundice*. Baltimore, 1970. Série Bilirubin Metabolism in the Newborn. Birth Defects Original Article Series VI.

METLINGER, B. e AMELUNG, K. V. P. *Ein Regiment der Jungen Kinder*. Augsburg, 1473.

YLPPÖ, A. Icterus neonatorum (incl. I. n. gravis) und Gallenfarbstoffsekretion beim Foetus and Neugeborenen. *Z Kinderheilkd*, 1913, vol. 9, p. 208.

ETTMÜLLER, M. *De Infantum Morbis*. 1708.

no soro. O próximo grande avanço foi o reconhecimento de que a bilirrubina pode ser tóxica, ou seja, que a sua toxicidade está relacionada com a sua concentração e que é possível tratar a hiperbilirrubinemia (e prevenir danos neurológicos) com “transfusão de troca” ou exsanguíneo transfusão, segundo HSIA et al. (1952 apud BROWN, 2003, p e33).

Os níveis de bilirrubina que apresentam risco de hiperbilirrubinemia significativa para neonatos são mostrados no gráfico da figura 5. Os “níveis de risco” dependem do tempo de vida do recém-nascido, e podem ser classificados como alto (acima de 95%), intermediário (entre 40 a 75%) e baixo (abaixo de 40%). Desta forma, a concentração de bilirrubina que deve ser medida pelo equipamento estará entre valores entre 5 a 17 mg/dl, podendo chegar a valores acima de 20 mg/dl.

Figura 5 - Gráfico dos níveis de bilirrubina que apresentam riscos de hiperbilirrubinemia para RN.
Fonte: (BHUTANI; JOHNSON; SIVIERI, 1999).

A alta concentração de bilirrubina não conjugada pode vencer a barreira hematoencefálica e provocar uma encefalopatia conhecida como “kernicterus”. Isto pode ocorrer quando a concentração de bilirrubina não-conjugada aumenta para valores que superam a capacidade de associação com a albumina sérica, ou quando a bilirrubina se desprende da albumina devido à ação de drogas ou ácidos, ou ainda devido a fatores externos como a sepse.

Ela é caracterizada pela coloração amarela de determinadas partes do encéfalo como os gânglios da base e do hipocampo. O quadro inicial da doença é caracterizado por hipotonia, apatia e deficiência na sucção do RN. O segundo estágio da doença é caracterizado por convulsões e distermia (hipotermia ou hipertermia acentuadas). Esta encefalopatia pode acarretar seqüelas irreversíveis para o RN como espasmos, surdez e atraso mental, podendo também levar à morte (ALVES FILHO, 1991). Os tipos de icterícias podem ser comumente caracterizados como fisiológica e não fisiológica.

2.2.1. Icterícia Fisiológica

Quando deixa o útero materno, o RN ajusta-se à nova vida, com a expansão pulmonar e mudanças cardio-circulatórias exigidas para as trocas gasosas teciduais. O suprimento calórico do RN depende, dentre outros fatores, da competência da função hepática, assim como da metabolização da bilirrubina não conjugada, que transitoriamente não é detoxificada pelo sistema hepático, levando ao acúmulo desta no sangue.

Esse tipo de icterícia ocorre em aproximadamente 60 % dos recém nascidos, sendo mais freqüente em crianças prematuras. RN de termo podem apresentar concentrações crescentes de bilirrubina indireta de até 15 mg/dl (255 µmol/l) no quarto ou quinto dia de vida, que geralmente decresce nos dias seguintes e esse torna imperceptível (menor do que 7 mg/dl) do oitavo ao décimo dia de vida. Para RN prematuros, o pico de bilirrubinemia se dá entre o quinto e sétimo dia de vida, desaparecendo mais lentamente, não mais sendo perceptível após o décimo - quarto dia de vida.

2.2.2. Icterícia Não-Fisiológica

Quase todos os casos de icterícia não-fisiológica devem-se a distúrbios na produção da bilirrubina, da captação hepática, na excreção e absorção intestinal. Podem ser identificadas quando ocorre:

- icterícia precoce (nas primeiras 24 horas de vida);
- níveis de bilirrubina acima de 15 mg/dl;
- persistência da icterícia após sete dias de vida em RN de termo ou quinze dias em RN prematuros;

- incremento maior do que 5 mg/dl na bilirrubina em menos de 24 horas;

As principais causas da icterícia não-fisiológica são mostradas no apêndice A.

2.2.2.1. Bilirrubina não conjugada

Os níveis séricos da bilirrubina não-conjugada (bilirrubina indireta) são determinados pela velocidade de produção e pela velocidade de remoção dessa bilirrubina da circulação. Os distúrbios que alteram a capacidade de depuração do fígado estão ligados à captação e/ou conjugação hepática. Os aumentos de bilirrubina indireta não levam ao aumento da bilirrubina na urina.

As causas que podem originar o excesso de concentração de bilirrubina não conjugada são mostradas no apêndice A.

2.2.2.2. Bilirrubina conjugada

Os níveis séricos da bilirrubina conjugada (bilirrubina direta) são determinados pela capacidade de excreção da bilirrubina pelo fígado, ou seja, pela integridade fisiológica do hepatócito e da permeabilidade das vias biliares intra e extra-hepáticas. Patologias que alterem essas funções cursam com aumento da bilirrubina direta, e muitas vezes da bilirrubina indireta, e com a presença de bilirrubina na urina. Existem outros quadros clínicos originários do acúmulo da bilirrubina conjugada, que são mostrados no apêndice A.

2.2.2.3. Aleitamento

Existem duas formas da icterícia relacionada ao aleitamento (MARTIN; FANAROFF; WALSH, 2006). Uma inicia-se precocemente e deve-se à baixa ingestão de calorias e líquido, devido mais à falta de uma oferta de leite adequada. A outra forma tem início mais tardio, observada em menos de 1% dos RN amamentados ao seio e de causa ainda não esclarecida. Acredita-se que haja algum distúrbio (inibição) do metabolismo da bilirrubina. Durante a hospitalização estes RN não apresentam icterícia acentuada, mas tornam-se acentuadamente ictéricos na segunda semana de vida. Em geral, a icterícia persiste durante a segunda e terceira

semanas de vida. Se o aleitamento materno for mantido, os níveis elevados de bilirrubina persistem por quatro a dez dias e então começam a diminuir lentamente, chegando aos níveis normais em três a doze semanas. Se o recém-nascido estiver bem e a concentração de bilirrubina não estiver acima dos níveis de risco, o aleitamento não deve ser interrompido. Porém, se as concentrações apresentarem comportamento ascendente e atingir níveis de risco, deve-se pesquisar outras causas e iniciar o tratamento. Se as outras causas forem excluídas, pode-se tentar interromper o aleitamento até a regularização dos níveis de bilirrubina, sendo sempre reintroduzido após este período.

2.2.3. Tratamento

O principal objetivo do tratamento é evitar o acúmulo de bilirrubina no cérebro, o que pode causar kernicterus, enfermidade que traz grandes problemas ao desenvolvimento da criança. Quando é identificada uma causa tratável de icterícia, esse tratamento específico é de extrema importância. O tratamento da icterícia inclui basicamente duas opções.

A fototerapia ou banho de luz é a primeira opção, na maioria dos casos. Deve ser preferencialmente realizada no hospital. Consiste na exposição da criança a uma fonte de luz azul. A luz converte a bilirrubina impregnada na pele e nas mucosas, em outra substância (lumirrubina), que é incolor, atóxica, hidrossolúvel e não se acumula no cérebro. Comercialmente existem muitos equipamentos para este fim, podendo-se citar os com lâmpadas fluorescentes especiais brancas “luz do dia” ou azuis, os de luz halógena, os que utilizam fibra óptica (figura 6) e LED azuis de alta intensidade. O comprimento de onda para o tratamento efetivo está entre 400 e 550 nm, com um pico em 450 nm (figura 7). Devem-se evitar também níveis excessivos de radiação ultravioleta e infravermelha.

Figura 6 - Equipamentos para fototerapia utilizados para tratamento da icterícia neonatal. Fonte: (OLIDEX CZ, 2007)

Figura 7 - Irradiação x Comprimento de onda para luz de fototerapia para o tratamento eficaz da Icterícia. Fonte: (OLIDEF CZ, 2007)

O outro método é a exsanguíneo-transfusão, que consiste na retirada de todo o sangue da criança e a sua substituição por outro sangue, com baixa concentração de bilirrubina. É indicada para reduzir rapidamente a concentração de bilirrubina, quando há risco de acometimento do cérebro, especialmente se houver hemólise (destruição das hemácias). O risco de aparecimento de kernicterus é indicação absoluta para a realização desse tratamento.

3. Métodos para Medição de Bilirrubina

3.1. Considerações Iniciais

Neste capítulo serão descritos os principais métodos utilizados para medir a concentração de bilirrubina: método laboratorial, a espectrofotometria direta e a medição transcutânea.

3.2. Métodos Bioquímicos Convencionais

Os métodos bioquímicos laboratoriais são muito importantes para a medição precisa da concentração de bilirrubina, servindo de referência para a avaliação de bilirrubiômetros. Estes medem a concentração de bilirrubina direta, indireta e total no sangue através da introdução de reagentes e catalisadores em amostras de sangue. Existem vários métodos e formas para este tipo de análise. A maioria dos métodos laboratoriais faz uso de um reagente junto ao soro do sangue, tornando a bilirrubina própria para o método. Dependendo do método é possível encontrar a concentração de bilirrubina total, direta ou indireta através do uso de aceleradores próprios. Através de colorimetria utilizando um espectrofotômetro ou fotocolorímetro, mede-se a absorção da luz em um comprimento de onda determinado pelo método. Alguns métodos também fazem a compensação da oxihemoglobina (sangue sem hemólise) presente e utilizam de reagentes como padrão do cálculo da concentração. Para análise em adultos pode-se utilizar outros métodos como a determinação de bilirrubina na urina. O apêndice B detalha alguns dos métodos mais utilizados comercialmente.

A amostra de sangue a ser analisada deve ser preferencialmente coletada recentemente. Caso o ensaio não seja efetuado logo após a coleta, o soro deve ser conservado por até 48 horas, sob refrigeração (2-10°C) ou 12 horas à temperatura ambiente (menor que 25°C). As amostras de sangue ou soro devem ser protegidas da ação da luz, pois esta pode destruir, em uma hora, até 50% da bilirrubina presente na amostra.

No método DPD a bilirrubina total reage com o sal de diclorofenildiazonio (DPD) produzindo um azocomposto de cor vermelho em solução ácida. A análise fotométrica é realizada em 546 nm. Através de diversos reagentes e de amostras de calibração e padrão a concentração de bilirrubina total é calculada (WIENER LAB, 2000).

No método Jendrassik-Grof (1938) a bilirrubina reage especificamente com ácido sulfanílico diazotado, produzindo um pigmento vermelho (azobilirrubina) que se mede a 530 nm. A bilirrubina conjugada (direta) reage diretamente com o diazoreativo. Para se obter a reação da bilirrubina total emprega-se um revelador aquoso de benzoato de cafeína. Valores de hemoglobina abaixo de 100 mg/dl não produzem interferência significativa. Valores de hemoglobina iguais ou maiores que 100 mg/dl produzem resultados falsamente elevados na determinação de bilirrubina total e falsamente diminuídos na determinação da bilirrubina direta.

Segundo o fabricante Núcleo (NÚCLEO DIAGNÓSTICOS PRODUTOS ESPECIALIZADOS, 2006), no método Sims Horn a bilirrubina, na forma direta, está esterificada com glicuronídeos (mono e di) e, na forma indireta é não esterificada. A fração direta, na presença do para-benzenodiazono-sulfonato, reage por copulação, formando a azobilirrubina. A fração total reage com o ácido sulfanílico diazotado após adição de benzoato de sódio e cafeína. A fração indireta é obtida por diferença entre a total e a direta. A intensidade da cor vermelha produzida pelas duas frações é proporcional à concentração de bilirrubina presente na amostra e apresenta absorção máxima em 530 nm.

Outra técnica muito utilizada para a obtenção da concentração da bilirrubina é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). É uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, contida em uma coluna. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, esses dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e fluxo da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária. Alguns autores (RUBALTELLI; GOURLEY; LOSKAMP, 2001) utilizam desta técnica como referência para a comparação da concentração lida por bilirrubinômetros transcutâneos.

3.3. Espectrofotometria direta

3.3.1. Conceitos de espectrofotometria

A espectrofotometria pode ser conceituada como um procedimento analítico através do qual se determina a concentração de espécies químicas mediante a absorção de energia radiante (luz) (GORE, 2000). A luz pode ser entendida como uma forma de energia, de natureza ondulatória, caracterizada pelos diversos comprimentos de onda λ (expressos em μm ou nm) e que apresenta a propriedade de interagir com a matéria, sendo que parte de sua energia é absorvida por elétrons da eletrosfera dos átomos constituintes das moléculas.

Uma solução quando iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa dos vários comprimentos de onda que a compõem. Esta absorção, em cada comprimento de onda, depende da natureza da substância, de sua concentração e da espessura da mesma que é atravessada pela luz.

Segundo Laidler (1995), entre as primeiras investigações sobre a relação existente entre as intensidades de radiação incidente e transmitida, destacam-se as experiências de Pierre Bouguer (1729 apud LAIDLER, 1995, p. 181) e de Johann Heindrich Lambert (2001 apud LAIDLER, 1995, p. 181). Estes dois cientistas efetuaram observações independentes e verificaram que as propriedades associadas ao processo de absorção de luz podem ser enunciadas em termos de duas leis fundamentais:

- a intensidade de luz (monocromática) transmitida por um corpo homogêneo é proporcional à intensidade de luz incidente;
- a intensidade de luz (monocromática) transmitida decresce exponencialmente com o aumento da espessura da camada do corpo homogêneo.

Posteriormente, August Beer (1853 apud LAIDLER, 1995, p. 181) efetuou experiências semelhantes com soluções de concentrações diferentes e publicou seus resultados. As duas leis separadas que regem a absorção são conhecidas usualmente como Lei de Lambert e Lei de Beer. Na forma combinada são conhecidas como a Lei de Beer-Lambert.

BEER, A. *Einleitung in die höhere Optik*. Braunschweig: Vieweg und Sohn, 1853.

BOUGUER, P. *Essai d'Optique sur la Gradation de la Lumiere*. 1729.

LAMBERT, J. H. *Photometry, or, On the measure and gradations of light, colors, and shade translation from the Latin of Photometria, sive, De mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*. Traduzido por DILAURA, D. L. New York: Illuminating Engineering Society of North America, 2001.

Essa lei pode ser expressa matematicamente pelas equações seguintes, sendo ilustrada pela figura 8.

$$A = \alpha \cdot l \cdot c \quad (6)$$

$$T = \frac{I_1}{I_0} = 10^{-A} = 10^{-\alpha \cdot l \cdot c} \quad (7)$$

Dado que:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) \quad (8)$$

$$\alpha = \frac{4 \cdot \pi \cdot k}{\lambda} \quad (9)$$

Onde:

A : absorvância (ou absorvência);

T : transmitância;

I_0 : intensidade da luz incidente;

I_1 : intensidade da luz após atravessar o meio;

l : distância que a luz atravessa pelo corpo;

C : concentração de substância absorvente no meio;

α : coeficiente de absorção ou a absorvância molar da substância;

λ : comprimento de onda do feixe de luz;

k : coeficiente de extinção;

Figura 8 - Diagrama da absorção de um feixe de luz atravessando uma cubeta de tamanho l .

As unidades de c e α dependem do modo em que se expresse a concentração da substância absorvente. Se a substância for líquida, deve-se expressar como uma fração molar. As unidades de α são o inverso do comprimento (por exemplo, cm^{-1}). No caso dos gases, c pode ser expressa como densidade (a longitude ao cubo, por exemplo, cm^{-3}), em cujo caso α é uma seção representativa da absorção e tem as unidades em comprimento ao quadrado (cm^2 , por exemplo). Se a concentração de c está expressa em moles por volume, α é a absorbância molar normalmente dada em mol cm^{-2} .

Este princípio é base dos equipamentos conhecidos como espectrofotômetros (GORE, 2000). O espectrofotômetro é um instrumento que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto, e uma quantidade conhecida de uma substância de referência. A figura 9 mostra o esquema básico de um espectrômetro. Nele, um feixe proveniente de uma fonte de luz (lâmpada de tungstênio e deutério) atravessa um conjunto de lente e obturador antes de passar pela amostra. Após incidir na amostra, o feixe passa por uma venda e uma grade permite que o feixe seja separado em seus diferentes comprimentos de onda. Este espectro incide em um arranjo de diodos que irão medir cada comprimento de onda, caracterizando opticamente assim a amostra.

Figura 9 - Esquema óptico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos.

3.3.2. Espectrofotometria aplicada à bilirrubinômetros

Os bilirrubinômetros que se utilizam do princípio da espectrofotometria para medir a BT no soro de amostras de sangue são conhecidos como espectrômetros diretos. Neste tipo de medição, a diluição das amostras de sangue em reagentes não é necessária.

A figura 10 mostra o espectro de absorção das moléculas de bilirrubina e oxihemoglobina. A molécula de bilirrubina possui um pico de absorção de luz em torno de 455 nm (figura 10, pico A). Neste mesmo comprimento há interferência da oxihemoglobina, sendo necessário medir sua absorção nos picos de 545 (figura 10, pico B) ou 575 nm (figura 10, pico C) para efetuar uma compensação. A diferença de absorção nos comprimentos de onda da bilirrubina e da oxihemoglobina é utilizada para medir o valor de absorção da BT. Como este tipo de equipamento faz uma compensação da oxihemoglobina, amostras hemolizadas não afetam os resultados medidos. Outros pigmentos como carotenóides encontrados em alguns alimentos, também absorvem em 455 nm, limitando o uso do equipamento para neonatos de 2 a 3 semanas. Apesar de alguns bilirrubinômetros antigos não corrigirem a oxihemoglobina em suas leituras, a sua compensação é muito importante para evitar erros de leitura do equipamento.

Figura 10 - Curva de absorção da bilirrubina e da oxihemoglobina pelo comprimento de onda. Fonte: (ZIJLSTRA; BUURSMA; ROEST, 1991; DU et al., 1998)

O princípio básico de operação deste instrumento (figura 11) é a utilização de uma fonte de luz de alta intensidade para gerar a luz necessária para o processo de espectrofotometria. A luz passa pela amostra contendo o soro do sangue a ser analisado, podendo este estar em uma cubeta adequada ou em um tubo capilar. Após a luz passar pela amostra, o feixe é repartido e passa por dois filtros passa banda. Dependendo da concepção do fabricante, os valores dos filtros podem variar entre 455 a 460 nm na faixa do azul e 540 a 580 nm na faixa do amarelo. Um ou dois fotosensores (os mais utilizados são os de silício que trabalham na faixa da luz visível) são posicionados logo após os filtros para a medição do sinal luminoso. Para a interação com o usuário, um circuito de processamento analógico ou digital é utilizado, juntamente com um display de cristal líquido (LCD) ou galvanômetro. Um *chopper* também pode ser utilizado para fazer a amostragem da luz em um período de tempo pré-determinado, servindo como referência para circuitos analógicos.

Figura 11 - Esquema básico de um bilirrubiômetro. Fonte: (REICHERT ANALYTICAL INSTRUMENTS, 2003)

Para efetuar o cálculo da absorbância da bilirrubina, um valor de referência é utilizado. Este pode ser uma tabela comparativa ou uma amostra com valor conhecido (geralmente água destilada ou um padrão de calibração). Desta forma calcula-se a quantidade de bilirrubina na amostra.

O primeiro registro de estudos utilizando o espectrômetro para medir a bilirrubina (JACKSON, 1961) gerou um equipamento comercial e patente para utilização deste princípio (JACKSON; HERNANDEZ, 1970). O esquema é mostrado na figura 12. Para uso na medição de bilirrubina utilizou-se de lâmpadas de alta intensidade como fonte luminosa. O equipamento utilizava de duas lâmpadas de alta intensidade e o valor de absorbância captado pelo foto-receptor era mostrado através de circuitos analógicos rudimentares.

Figura 12 - Esquemático utilizado nos primeiros bilirrubinômetros. Fonte: (JACKSON; HERNANDEZ, 1970)

Comercialmente, existem muitas empresas estrangeiras que produzem este equipamento, mostrando a eficácia do método. Com tamanho reduzido, o equipamento Bilimeter 3 (PFAFF MEDICAL, 2004b) faz um auto ajuste inicial utilizando apenas a ponta de prova inorgânica. Conforme figura 13, sua curva de referência é linear até 28,5 mg/dl e sua fonte de luz é um LED de alta potência. Como diferencial este equipamento possui uma saída serial RS232. A figura 14 mostra a linearidade do equipamento Bilimed 3.

Figura 13 - Precisão do equipamento Bilimeter 3, em mg/dl. Fonte: (PFAFF MEDICAL, 2004a)

Figura 14 - Linearidade do equipamento Bilimeter 3, em mg/dl. Fonte: (PFAFF MEDICAL, 2004a)

No Brasil, um estudo foi realizado por Aguiar (1988) utilizando um arranjo com fibras ópticas e instrumentação eletrônica para a medição do sinal, juntamente com estudos clínicos para validação do projeto.

Alguns autores (PEAKE et al., 2001; LATERZA et al., 2002; GROHMANN et al., 2006) utilizaram um software especialmente desenvolvido para o equipamento ABL 735 *blood gas analyzer* (Radiometer Medical) em 128 comprimentos de onda de 478 à 672nm para medir as concentrações de BT, Bilirrubina conjugada, Não-conjugada e delta em sangue de neonatos e também em adultos. Os resultados foram comparados com bilirrubinômetros comerciais e métodos bioquímicos convencionais e mostraram-se eficientes principalmente para sangue de neonatos, porém subestimando alguns valores para altos valores de bilirrubina em amostra de adultos.

3.4. Medição Transcutânea

Um método visual de estimar os valores de BT no sangue é comparar a coloração da pele do recém-nascido com uma escala de cor. Em 1960, Gosset (1960 apud MAISELS, 2006, p. 218) descreveu o uso de um icterômetro para avaliar a icterícia neonatal. Aparentemente Dr. Gosset pintou faixas transversais de cinco diferentes tons de amarelo em um pedaço de plástico transparente. O instrumento é pressionado contra o nariz do RN, a cor amarela da pele pressionada é então relacionada com a faixa amarela apropriada (numerada de 1 a 5), e

uma pontuação é associada (figura 15). Se a leitura tende a estar entre duas faixas, uma pontuação de 0,5 pode ser associada (ex 1,5; 2,5). Para cada pontuação, o icterômetro fornece uma BT e dois desvios padrões acima da média.

Figura 15 - Icterômetro para avaliar a icterícia neonatal. Fonte: (MAISELS, 2006)

Hannemann, De-Witt e Wiechel Gosset (1978 apud MAISELS, 2006, p c219) utilizaram outro princípio onde uma luz é transmitida para a pele e o amarelamento dessa luz refletida pode ser medido de forma a pré-ditar os níveis de bilirrubina transcutânea (BTc) pela reflexão na pele. Luz mono-cromático de uma fonte de tungstênio foi aplicada à pele de recém-nascidos através de uma ramificação de um conjunto bifurcado de fibra óptica, enquanto a segunda ramificação levava a luz refletida de volta para um detector ótico. O sinal elétrico foi enviado para um microcomputador onde foi processado e armazenado. Por não ser portátil, este sistema era muito complexo para a utilização rotineira em hospitais.

O espectro de absorção da luz na pele é mostrado na figura 16. A melanina, encontrada nas camadas epidérmicas da pele, absorve a luz especialmente na região ultravioleta do espectro e age como um filtro através do espectro visível. O metabólito da hemoglobina na camada da derme, que se encontra logo abaixo da camada epidérmica, é também um grande absorvedor na região de baixo comprimento de onda. Conforme a concentração de melanina

aumenta na camada epidérmica, grande parte da absorção de luz se dá na camada epidérmica (ROGGAN et al., 1999).

Figura 16 - Absorção de luz da bilirrubina e hemoglobina somada com o efeito da absorção de melanina, Fonte: (BHUTANI et al., 2000)

A primeira aplicação clínica e de bilirrubinômetro transcutâneo de fácil portabilidade foi introduzida por Yamanouchi et al. (1980). Trabalhando com a companhia de câmera Minolta, estes pesquisadores desenvolveram um instrumento portátil que mede a intensidade da cor amarela na pele (figura 17). Quando uma ponta de prova fotográfica é pressionada contra a pele da criança em uma pressão de aproximadamente 200g, um tubo xenon produz uma luz estrobe que é transportada através de filamentos de fibra óptica para a ponta de prova (figura 18). A luz incidente penetra na pele, atingindo o tecido transcutâneo. A luz dispersada retorna através de um segundo filamento de fibra ótica e é carregado para um módulo espectrofotométrico. Dentro do módulo, a luz é dividida por um espelho dicróico em dois espectros, um deles passa por um filtro azul (absorção máxima de 460 nm) e o outro em um filtro verde (absorção máxima de 550 nm). A absorção neste espectro, corrigida pela hemoglobina, e a intensidade de cor amarela são medidas pela diferença entre as densidades de azul e verde e processadas eletronicamente para gerar a leitura digital.

Figura 17 - Bilirrubinômetro transcutâneo de Yamanouchi, mostrando o sistema óptico com duplo caminho. Fonte: (MAISELS, 2006)

No entanto, este equipamento apresentou algumas desvantagens. Ele não gerava uma leitura pronta da concentração de bilirrubina, um índice era mostrado e o valor da concentração era derivado através de uma base de dados obtidos individualmente em laboratórios no hospital. Além do mais, as leituras eram significativamente afetadas pelo tempo de gestação e pigmentação da pele. Desta forma, este instrumento teve aceitação limitada nos hospitais dos Estados Unidos, apesar de ser amplamente utilizado no Japão.

Figura 18 - Utilização de bilirrubinômetro transcutâneo em recém-nascidos.

São mais utilizados comercialmente dois equipamentos portáteis que utilizam a reflexão da pele para medir a BTc: o BiliCheck, da empresa Respironics (Marietta, Ga.) e o equipamento Draeger JM-103, formalmente o Minolta/ Hill-Rom Air-Shields JM-103 do fabricante Draeger Medical (Hattboro, Pa.). Apesar destes equipamentos usarem diferentes algoritmos e técnicas de medição, o princípio de operação é similar. O BiliCheck, cujo

diagrama esquemático é mostrado na figura 19, mede a BTc utilizando todo o espectro de luz visível (380 à 760 nm) refletido pela pele. A luz branca é transmitida para a pele e a luz refletida é coletada para análise. Algoritmos foram desenvolvidos para levar em conta o efeito da hemoglobina, melanina, a espessura da derme. A absorção da luz azul devido à bilirrubina na camada capilar e no tecido subcutâneo é isolada por subtração espectral (RUBALTELLI; GOURLEY; LOSKAMP, 2001).

Figura 19 - Diagrama esquemático do equipamento BiliCheck. Fonte: (MAISELS, 2006)

O JM-103 foi feito para superar as desvantagens do modelo anterior utilizando dois comprimentos de onda e um sistema de dois caminhos óticos (YASUDA; ITOH; ISOBE, 2003). O princípio de operação inclui a formação de dois feixes, um que alcança apenas as áreas superficiais do tecido subcutâneo, enquanto a outra penetra nas camadas mais profundas, conforme a figura 20. A diferença entre as densidades óticas é detectada por fotocélulas azuis e verdes. A medição de bilirrubina acumulada primeiramente no tecido subcutâneo mais profundo deve diminuir a influência de outras pigmentações na pele, como a melanina e hemoglobina.

Figura 20 - Caminhos ópticos percorridos pelos feixes do JM-103. Fonte: (MAISELS, 2006)

Ambos os instrumentos realizam uma medição digital da concentração de BTc ao invés de um índice que necessita de conversão. O BiliCheck necessita de cinco medidas subsequentes para calcular a média e gerar uma única medida. O JM-103 fornece a opção de obter uma a cinco medições através das quais se calcula automaticamente a média.

Era esperado que estas inovações tecnológicas empregadas pelo BiliCheck e o JM-103 pudesse tornar a medição da BTc independente de raça, cor, tempo de gestação e peso, mas isto não ocorre. Apesar de vários estudos de ambos os equipamentos, BiliCheck e o JM-103, terem mostrado boa correlação entre a BTc e a bilirrubina total medidas (BHUTANI et al., 2000), há estudos que mostram que as medidas não estão totalmente independentes de fatores como raça e o tempo de gestação (MAISELS et al., 2004).

3.5. Considerações Finais

O método escolhido para o desenvolvimento do bilirrubinômetro apresentado neste trabalho é a espectrofotometria direta. Além de maior simplicidade, os bilirrubinômetros espectrofotômetros estão no mercado há muito tempo e muitos estudos já comprovaram sua eficácia. A sua manipulação também é mais simples, comparado com os métodos bioquímicos, podendo ser feito pelo próprio corpo clínico neonatal. Outro aspecto importante são o custo e o tempo de desenvolvimento, sendo preferencial um projeto mais simples, gerando também um produto final com um custo reduzido comparado com o bilirrubinômetro transcutâneo. Estudos também sugerem que medições feitas em bilirrubinômetros transcutâneos devem ser procedidas por análises laboratoriais, pois as medidas transcutâneas apresentam valores subestimados em concentrações altas de bilirrubina, quando comparadas

com os métodos bioquímicos e os bilirrubinômetros fotométricos, que se mostraram mais confiáveis (GROHMANN et al., 2006).

4. Materiais e Métodos

4.1. Considerações Iniciais

O objetivo deste projeto foi a construção de um bilirrubinômetro baseado em espectrofotometria cujo nome é Bilimed. Este capítulo descreve os materiais utilizados no projeto do Bilimed e a metodologia utilizada para a microcoleta de sangue para neonatos. Serão abordadas as principais tecnologias como LED de alta intensidade, filtros ópticos e fotosensores.

4.1.1. Módulos desenvolvidos

O projeto do Bilimed consiste basicamente em três partes:

- conjunto óptico formado pela fonte de luz (LED de alta intensidade), lentes, filtros ópticos e o tubo capilar contendo a amostra a ser analisada;
- fotosensores para os comprimentos de onda de 455 nm e 575 nm;
- microcontrolador, alimentado por uma fonte de alimentação, onde são processados os sinais enviados pelos fotosensores e o acionamento do LED, além da interface com o usuário através de botões e um display LCD;

O diagrama apresentado na figura 21 mostra o funcionamento básico do projeto. A amostra de soro de sangue em um tubo capilar é inserida no conjunto óptico através de um suporte. Um circuito independente faz o acionamento do LED através de sinais enviados pelo microcontrolador para efetuar a amostragem temporizada do sinal. Todo o sistema é alimentado por uma fonte regulada de tensão desenvolvida especificamente para esta aplicação.

O sinal luminoso é então transformado em sinal digital pelos fotosensores nos comprimentos de onda de 455 nm e 575 nm. Este sinal é enviado para o microcontrolador AT 89S8253 e uma rotina específica converte a frequência enviada pelo fotosensor em um valor

correspondente à intensidade luminosa. Processa-se o sinal e este é convertido em um valor de concentração de bilirrubina total (mg/l).

O usuário interage com o sistema basicamente utilizando dois botões: um responsável por uma rotina de zero do sinal e outro responsável pela medição. Toda informação é transmitida visualmente para o usuário através de um display LCD.

Figura 21 - Diagrama de funcionamento do bilirrubinômetro Bilimed.

Nas seções seguintes serão descritos os materiais e métodos utilizados para a implementação deste projeto.

4.2. LED de Alta Intensidade

LED é a sigla em inglês para *light emitting diode*, ou diodo emissor de luz. O LED é um diodo semicondutor (junção P-N) que quando energizado emite luz visível. A luz é monocromática e produzida pelas interações energéticas do elétron. O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica de energia é chamado eletroluminescência. Em qualquer junção P-N polarizada diretamente, dentro da estrutura próximo à junção, ocorrem recombinações de lacunas e elétrons. Essa recombinação exige que a energia possuída por esse elétron, que até então era livre, seja liberada, o que ocorre na forma de calor ou fótons de luz (ZHELUDEV, 2007).

Através da física do estado sólido e do estudo de fenômenos de transporte, pode-se encontrar a uma expressão que representa o comportamento do diodo sob polarização reversa e direta, assumindo-se a polaridade da tensão e a direção da corrente conforme o circuito ilustrado na figura 22.

Figura 22 - Circuito de polarização de um diodo.

$$I_D = I_S \left(e^{\frac{V_D}{\eta V_T}} - 1 \right) \quad (10)$$

$$V_T = \frac{kT}{q} \quad (11)$$

Onde:

I_D : Corrente direta no diodo;

V_D : Tensão direta no diodo;

I_S : Corrente de saturação direta;

V_T : tensão térmica (V);

K : constante de Boltzman ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K);

q : carga do elétron ($1,602 \times 10^{-19}$ C);

T : temperatura absoluta da junção p-n em Kelvin;

η : é o coeficiente de emissão, também conhecido como fator de idealidade. Este coeficiente varia de 1 a 2 dependendo do processo de fabricação e do material semiconductor;

Através da equação 10 tem-se que a corrente do diodo é diretamente proporcional à tensão direta e inversamente à temperatura na junção.

A figura 23 mostra a estrutura dos LED convencionais comparados com os LED de alto brilho ou de alta intensidade. Devido à diferença de aplicações e do próprio material semiconductor, os LED de alto brilho possuem dissipação térmica separadas das vias condutivas, a parte óptica aprimorada para uma irradiação uniformizada e os materiais utilizados para sua construção visam à durabilidade e confiabilidade do LED.

Figura 23 - Estrutura interna dos LED convencionais e os LED de alto brilho. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006a)

Os LED possuem polaridade de forma que sua corrente flui para uma única direção sendo simples de manipular, porém alguns cuidados devem ser tomados (COOPER, 2007). Geralmente os fabricantes fornecem correntes de referência nas informações técnicas do

componente que representam a corrente utilizada para obter as curvas experimentais. Usualmente considera-se a temperatura de junção (T_j) do LED em 25°C.

Uma curva típica de tensão pela corrente direta é mostrada na figura 24. Para uma determinada temperatura, uma pequena mudança na tensão direta produzirá uma grande mudança na corrente direta. Fatores como tamanho, material e variações de lote e de temperatura do LED podem alterar o valor da tensão direta para obter a luz necessária.

Figura 24 - Tensão direta pela corrente direta para LED Lumileds Luxeon K2. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c)

As principais vantagens do uso de LED são:

- produzem uma maior relação luz por Watt do que lâmpadas incandescentes, útil para instrumento que utilizam bateria;
- podem emitir luz de uma única cor sem a utilização de filtros adicionais;
- pode-se facilmente focar a luz proveniente de um LED utilizando lentes simples;
- as aplicações envolvendo LED podem ser feitas com um ciclo liga/desliga rápido e sem desgaste rápido do componente;
- maior durabilidade mecânica;
- maior vida útil. Dependendo do modelo e do fabricante, alguns LED podem durar de 100,000 a 1,000,000 horas. Lâmpadas fluorescentes duram em torno de 30000 horas enquanto incandescentes de 10000 a 20000 e não possuem mercúrio;

Entre as desvantagens do uso de LED pode-se citar:

- o preço inicial por lúmen do LED é mais caro comparado com a tecnologia de iluminação convencional. O custo adicional deve-se ao circuito de alimentação e as

fontes necessárias. Porém para a relação custo/benefício total (incluindo consumo e manutenção), LED são mais vantajosos do que lâmpadas incandescentes ou halógenas;

- o desempenho do LED depende amplamente da temperatura ambiente;
- é necessário um dissipador de calor adequado para garantir a durabilidade do LED, caso contrário o LED pode falhar e ter sua vida útil comprometida;
- deve-se alimentar o LED com uma fonte de corrente constante;
- a luz emitida pelos LED são direcionais e usualmente em um ângulo estreito comparado com outras fontes de luz;
- o espectro de um LED branco difere significativamente quando comparado com o espectro do sol ou lâmpada incandescente. Os picos em 460 nm e 500 nm podem resultar em diferenças de cores nos objetos iluminados por LED;
- existe uma crescente preocupação a respeito dos LED azuis e brancos capazes de exceder os limites de segurança dos chamados riscos da radiação azul (AMERICAN NATIONAL STANDARD INSTITUTE/ ILLUMINATING ENGINEERING SOCIETY OF NORTH AMERICA, 2007).

Produtos que utilizam LED de alta potência têm recentemente revolucionado o a área médica, com uma ampla gama de aplicações nesta área (JONES; BARNETT, 2006), entre elas iluminação de salas de cirurgias utilizando focos cirúrgicos. Existe uma importante utilização de LED como fonte de iluminação que oferece baixo nível de influência fotobiológica em pessoas em ambiente fechados, como disfunções em trabalhadores noturnos e o efeito *Jet-Lag*, que ocorre em viagens prolongadas devido à mudança dos fusos horários, por um dessincronismo entre nosso relógio biológico interno e os indicadores de tempo externo. Sistemas com múltiplos LED são atualmente utilizados na área dermatológica para tratamento de acne, psoríase e eczemas. Na área neonatológica existem equipamentos de fototerapia que utilizam LED para o tratamento de icterícia. Existem outros tipos de aplicação como terapia fotodinâmica, desinfecção fotodinâmica e a utilização de LED ultravioleta (UV) para desinfecção.

4.2.1. LED Branco

Os LED azuis podem ser adicionados a LED verdes e vermelhos para gerar a impressão de LED brancos, porém hoje esta técnica não é a mais eficaz. A maioria dos LED brancos são baseados em uma estrutura InGaN – Gan, que emite luz azul com comprimento de onda de 455 nm a 470 nm (CHOI; PARK, 2007). Este LED é envolvido por uma camada fosfórica amarelada feita usualmente de cristais ($\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$) que são polvilhadas e confinadas em um tipo de adesivo viscoso. O LED emite luz azul, mas parte dela é eficientemente convertido em um largo espectro centrado em aproximadamente 580 nm (amarelo). Como o amarelo estimula os receptores vermelhos e verdes do olho, o resultado da mistura azul e amarelo dá a aparência de uma luz branca. Comercialmente o primeiro registro de LED brancos que utilizam este princípio é do fabricante Nichia em 1996 e atualmente cinco grandes fabricantes utilizam estas tecnologias (PHILLIPS, 2005).

O LED utilizado no projeto é o Luxeon K2 Branco do fabricante Lumileds. A figura 25 mostra o espectro de luz para este LED. Este LED possui uma característica óptica de interesse do projeto, com máximos de irradiação nas duas faixas de absorção do bilirrubinômetro: em torno de 455 nm e 575 nm. Este modelo de LED também apresenta uma das maiores intensidades luminosa no mercado.

Figura 25 - Espectro de luz para o LED Luxeon K2 branco, branco neutro e branco quente, fabricante Lumileds. Temperatura de junção à 25°C. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c)

Nas próximas subseções serão mostrados as principais características do LED Luxeon K2 e os cuidados para a utilização deste LED.

4.2.2. Emissão de luz

A Luz emitida por um LED aumenta com o incremento da corrente estabelecida, porém a eficiência expressa em lumens por Watt é afetada. Esta relação pode ser observada na figura 26.

Figura 26 - Fluxo luminoso relativo ou potência radiométrica pela corrente direta para LED Lumiled K2 para $T_j=25^\circ\text{C}$ e corrente de teste de 1000 mA. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c)

Outra característica importante para a utilização de LED é a distribuição radial da luz emitida pelo LED, mostrado na figura 27. Basicamente existem comercialmente dois tipos de LED: o *Lambertian* que concentra a emissão de luz frontalmente e os LED *Side Emitting* que emitem luz lateralmente (figura 28) para aplicações que visam não ofuscar o usuário ou uma distribuição lateral difundida.

Figura 27 - Padrão de radiação polar para LED Lumiled Luxeon K2 Branco *Lambertian*. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c)

Figura 28 - Padrão de radiação para LED Lumiled Luxeon III Branco *Side Emitting*. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006b)

Devido ao seu tamanho reduzido e por concentrar uma grande quantidade de luz em uma fonte pontual, a construção de dispositivos ópticos específicos para colimar a luz emitida por um LED de alta potência torna-se necessária. Existem muitas empresas especializadas na construção de lentes colimadoras para LED construída especificamente para o modelo e fabricante do LED. Para os LED Lumiled Luxeon K2 encontram-se disponíveis lentes com ângulo de abertura de 10°, 25°, 30° e 45°, além de lentes elípticas e específicas para diferentes aplicações, como conjunto para 3 e 4 LED, iluminação para paredes e faróis de carro. Estas lentes são mostradas na figura 29.

Figura 29 - Lentes colimadoras diversas para LED Lumiled Luxeon K2. Fonte: (FRAEN CORPORATION, 2006; KHATOD OPTOELECTRONIC SRL, 2007)

A figura 30 mostra um corte da lente, as dimensões, a montagem no LED e as diferentes superfícies colimadoras.

Figura 30 - Montagem e tipos de lentes colimadoras para LED Lumiled Luxeon K2. Fonte: (FRAEN CORPORATION, 2006)

4.2.3. Efeitos da temperatura

Em um semicondutor de junção P-N, conforme o aumento de temperatura da junção, a corrente que passa através do LED tende a aumentar. Este aumento de corrente gera mais calor na junção e, se não há limitação na corrente, a junção irá falhar devido ao aquecimento. Este fenômeno é conhecido como fuga térmica. Recomenda-se alimentar o LED com uma fonte constante de corrente, evitando assim a variação de luz, de tempo e de vida útil, resultantes da variação de tensão.

A luz emitida por um LED decai com o aumento da temperatura de junção (figura 31). Temperaturas elevadas na junção, resultantes de um aumento na potência dissipada ou mudanças na temperatura ambiente podem ter efeito significativo na luz emitida. LED vermelhos ou alaranjados (AlGaInP) possuem uma sensibilidade maior comparado com os LED azuis e verdes (InGaN).

Desta forma é importante considerar os efeitos da temperatura quando desenvolver projetos com irradiância específica ou com eficácia maior, minimizando os efeitos térmicos do sistema. Com o aumento da potência existe um aumento na carga térmica e uma quantidade maior de calor a ser dissipado. Temperaturas maiores nos LED podem resultar na diminuição da irradiância e também em um tempo de vida reduzido. Quando projetados, um dissipador térmico deve ser selecionado com capacidade de resfriamento suficiente para manter a temperatura de junção abaixo de 125 °C.

Figura 31 - Reposta da emissão de luz de um LED conforme a variação da temperatura de junção. Fonte: (LUMILEDS FUTURE ELECTRONICS, 2006c)

Além do mais a variação de temperatura também pode provocar uma mudança no comprimento de onda dominante. As características de comprimento de onda de um LED são feitas geralmente com temperaturas de junção a 25°C. O aumento da temperatura de junção resulta em correntes maiores, provocando uma mudança no comprimento de onda na ordem de 0,03 a 0,13 nm/°C, o que evidencia a importância de dissipadores térmicos apropriados e o uso de uma fonte de corrente.

Um ensaio foi feito para testar a variação da temperatura na intensidade emitida de dois LED de diferentes fabricantes e para mostrar e qualificar as diferenças entre LED de mesmas características, mas de fabricantes distintos. Os dois LED testados foram LED OSRAM Dragon Azul e o LED Lumiled Luxeon K2 Branco utilizado no projeto. A condição para o teste foi uma corrente constante de 700 mA.

Em um ambiente termicamente controlado de uma incubadora para recém-nascido (fabricante Olidef cz modelo SCTI LINE 3), aumentou-se gradativamente a temperatura desejada entre 27 a 38 °C. Com a leitura de um termômetro digital (fabricante GE - Druck Modelo DPI 820) e com dois termopares tipo K foram realizadas medidas de temperatura nas proximidades do LED e também nos terminais do LED. O gráfico da figura 32 mostra a variação de temperatura para o LED Dragon e o da figura 34 ilustra a variação para o LED Luxeon. Nestes gráficos é possível analisar uma maior linearidade térmica para o LED Luxeon, mas ambas as curvas mostram um crescimento exponencial na temperatura do LED em relação à temperatura ambiente.

A luz emitida pelo LED foi direcionada para um sensor ótico TCS 230 que converte o sinal lido em frequência. O resultado foi indicado em um display gráfico. As correntes e tensões no LED foram constantes durante todo o procedimento. Os resultados são mostrados na figura 33 e figura 35. É possível observar como a intensidade do LED decai com o aumento de temperatura, sendo o LED Luxeon mais estável comparado com o Dragon.

Figura 32 - Gráfico da variação de temperatura do LED Osram Dragon Azul pela variação da temperatura ambiente.

Figura 33 - Gráfico da variação da intensidade de luz relativa do LED Osram Dragon Azul pela variação de temperatura do LED.

Figura 34 - Gráfico da variação de temperatura do LED Lumiled Luxeon K2 Branco pela variação ambiente.

Figura 35 - Gráfico da variação da intensidade de luz relativa do LED Lumiled Luxeon K2 Branco pela variação de temperatura do LED.

Os resultados dos ensaios mostram uma melhor resposta do LED branco Luxeon K2 sendo este um dos fatores da escolha deste modelo de LED para o projeto.

4.2.4. Projeto Elétrico

Projetar fontes de luz com um único LED em aplicações é relativamente simples. Uma fonte constante de corrente deve ser utilizada, com tensão direta suficiente para o LED, sendo que LED não são projetados para trabalharem com tensão reversa. Para fontes que utilizam

vários LED e apenas uma fonte, estes são geralmente colocados em série para evitar níveis de luz desiguais resultantes de variações de tensão. A tensão de saída da fonte deve ser suficiente para acomodar a soma de todas as tensões máximas de entradas dos LED (COOPER, 2007).

Para o LED Lumiled K2 foi projetado uma fonte de corrente com o circuito integrado LM 273. Esta fonte de corrente será detalhada na seção 4.2.5.

4.2.5. Fonte de corrente

O LM 723 é um circuito integrado estabilizador de tensão que possui uma grande estabilidade em relação à temperatura. A figura 36 mostra o esquema interno simplificado do circuito integrado (CI) LM 723.

Figura 36 - Esquema interno do CI LM 723. (NATIONAL SEMICONDUCTOR, 1999)

Internamente este circuito integrado compreende um diodo Zener compensador de temperatura, um amplificador diferencial e um transistor de saída. Um transistor externo a este CI é utilizado na maioria dos casos como limitador de corrente. A tensão de saída do LM 723 é estabilizada e independente da tensão de entrada, com valor entre 6,95 e 7,35 V (tensão nominal de 7,15 V).

O esquema apresentado na figura 37 utiliza este CI como uma fonte de corrente (BRAGA, 2005).

Figura 37 - Fonte de corrente utilizando o CI LM 723.

De uma maneira simplificada, tem-se nesta configuração um amplificador operacional funcionando como seguidor de tensão, conforme a figura 38:

Figura 38 - Circuito simplificado do LM 723 como fonte de corrente.

No ponto divisor de tensão dos resistores R15/R13 (figura 38) obtém-se uma tensão de referência de aproximadamente 2,2 V. Nesta condição uma corrente I_1 flui por R12, que permanece constante e regulada. Esta mesma corrente atravessa igualmente a resistência de carga no conector J7 (figura 39). O transistor NPN (TIP41C) ajuda a conduzir uma corrente

maior na saída do operacional para o LED (conector J7). Desta forma a corrente de saída torna-se:

$$I1 = \frac{2,2}{R12} \quad (12)$$

Figura 39 - Corrente de Saída da composição do LM 723.

A adjunção à montagem de duas resistências R10 e R11 (figura 40) permite proteger o circuito contra sobrecargas térmicas. É o transistor de limitação de corrente interna do circuito integrado que faz a função de chavear de acordo com a temperatura. Conforme as especificações do LM 723, este transistor abre quando a temperatura atinge 30 °C e quando for aplicada uma pré-tensão de base de 0,6 V. Quando a temperatura atinge 120 °C, esta pré-tensão cai a 0,5 V. Executa-se a proteção de sobrecarga térmica, fornecendo ao transistor limitador de corrente uma pré-tensão de base (0,55 V). Ele será bloqueado para as condições normais de temperatura, mas passará a conduzir se a temperatura se tornar anormalmente elevada, estando os transistores de saída bloqueados ao seu redor.

Figura 40 - Fonte Reguladora de corrente utilizando o CI LM 723.

Para acioná-lo através de uma porta digital um transistor NPN (Q1) é adicionado na entrada COMP (figura 41), que se encontra diretamente ligado ao transistor de saída do CI LM 723. Quando a entrada de Q1 estiver em nível lógico alto, a base do transistor interno do LM 723 estará em nível baixo, portanto o CI não conduzirá. Caso o transistor Q1 não esteja conduzindo, a base do transistor de saída do LM 723 estará livre para conduzir a tensão de saída.

Figura 41 - Acionamento da fonte de corrente utilizando o CI LM 723.

As qualidades evidentes de uma montagem desse tipo são: simplicidade, grande estabilidade, uma região de regulação de tensão de alimentação bastante grande e um custo reduzido.

4.3. Filtro Óptico

Um filtro óptico serve para transmitir seletivamente luz que possui certa propriedade (como por exemplo, um comprimento de onda específico, ou seja, cores de luz específica). São muito utilizados em fotografia, instrumentos óticos e estágios de cor em iluminação. A figura 42 mostra alguns filtros de diversas cores e diferentes comprimentos de onda.

Figura 42 - Filtros para diversos comprimentos de onda. Fonte: (OMEGA OPTICAL, 2006)

4.3.1. Filtro dicróico

Filtros dicróicos são filtros óticos, também conhecidos como refletivos ou filtros de película delgada (filmes finos), podem ser feitos depositando-se filmes finos de materiais dielétricos (“*coating*”) sobre um substrato de vidro ou quartzo opticamente plano (figura 43). Eles usualmente transmitem um comprimento de onda específico enquanto refletem os outros componentes não desejados (FISCHER; TADIC-GALEB; YODER, 2008). O filme de um filtro dicróico forma uma seqüência de cavidades refletivas que ressoa com os comprimentos de onda desejados. Outros comprimentos de onda cancelam ou refletem conforme os picos e vales das ondas que se sobrepõem

Figura 43 - Composição de um filtro dicróico. Detalhe do substrato e da camada do *coating*.

Filtros dicróicos são muito utilizados em trabalhos científicos, dado que sua faixa exata de cor pode ser controlada pela sua espessura e seqüência de *coatings*. Eles são usualmente mais delicados e caros com relação a outros tipos de filtros. Estes filtros também podem ser utilizados como um prisma dicróico de uma câmera para separar um feixe de luz em dois feixes de cores diferentes (STENZEL, 2005).

Alguns cuidados devem ser tomados ao se manipular os filtros (STENZEL, 2005). Uma diferença no ângulo de incidência pode levar a uma mudança no comprimento de onda de corte. Outros fatores, como variação de temperatura, partículas e gorduras na face do filtro podem alterar as suas características. A espessura e a seletividade do filtro podem aumentar a absorção da intensidade da luz de saída, sendo que estes devem ser muito bem dimensionados para aplicações que requerem uma intensidade baixa de luz.

4.3.2. Filtros dicróicos 455 nm, 575 nm e lente dicróica refletora do azul

No projeto do Bilimed, para a medição da absorção da molécula de bilirrubina, os valores de filtros dicróicos foram de 455 nm e 575 nm. A lente dicróica utilizada possui a característica específica de refletir o azul em 480 nm quando este estiver a 45° do feixe luminoso e refratar o restante do espectro. Estes filtros e a lente são mostrados na figura 44. Repare na lente dicróica refletindo o azul quando esta se encontra à 45°.

Figura 44 - Lentes e filtros utilizados no projeto.

Para o levantamento das características técnicas dos filtros empregados foi montado um conjunto óptico contendo: um LED de alta intensidade, uma lente colimadora para a luz proveniente do LED, um suporte de cor preta para alinhar a lente dicroica com ângulo de 45° , o filtro azul 455 nm e o amarelo 575 nm nas extremidades. O diagrama deste conjunto óptico e seus elementos são mostrados na figura 45.

Figura 45 - Diagrama do conjunto óptico.

A figura 46 mostra a montagem feita para este conjunto óptico. É possível observar a emissão da luz branca através do conjunto óptico, da luz amarela após passar pelo filtro 575 nm e da luz azul refletida pela lente dicroica e filtrada pelo filtro 455 nm.

Figura 46 - Emissão das luzes após passagem no conjunto óptico lente dicróica, filtro azuis 455 nm e filtro amarelo 575 nm.

Os gráficos da figura 47, figura 48 e figura 49 mostram as curvas características dos filtros 455, 575 e da lente dicróica. Estas curvas foram levantadas no Instituto de Física de São Carlos - Departamento de Ótica Não Linear, utilizando o espectrofotômetro Ocean Optics USB 2000. Pode-se observar que os filtros possuem uma faixa de passagem estreita em torno do comprimento de onda nominal, não deixando residual nos outros comprimentos de onda. A lente reflexiva também possui uma característica muito linear, refletindo todos os feixes a partir de 480nm.

Figura 47 - Gráfico da transmitância x comprimento de onda (nm) da lente dicróica 45°.

Figura 48 - Gráfico da transmitância x comprimento de onda (nm) do filtro azul 455 nm.

Figura 49 - Gráfico da transmitância x comprimento de onda (nm) do filtro amarelo 575 nm.

4.4. Fotosensor

Fotodiodo são sensores semicondutores que detectam luz e geram uma corrente ou tensão quando a junção P-N do semicondutor é iluminada pela luz. Podem ser classificados como PN, PIN, schottky, e avalanche. A figura 50 mostra a estrutura interna e alguns detalhes da junção P-N de um fotodiodo. A aplicação de luz na junção resultará em uma transferência de energia das ondas luminosas incidentes (na forma de fótons) para a estrutura atômica, resultando em um aumento do número de portadores minoritários e um aumento do nível da corrente reversa (SEDRA; SMITH, 2000).

Foto-transistores são transistores cuja junção coletor-base fica exposta à luz e atua como um fotodiodo. O transistor amplifica a corrente em alguns miliampères. Sua velocidade é menor que a do fotodiodo.

Figura 50 - Corte seccional de um fotodiodo. Fonte: (HAMAMATSU PHOTONICS, 2007)

A corrente reversa e o fluxo luminoso variam quase que linearmente, ou seja, um aumento na intensidade luminosa resultará em um aumento semelhante na corrente reversa. Pode-se admitir que a corrente reversa seja essencialmente nula na ausência de luz incidente. A corrente negra (*black current*) é a corrente que existirá sem nenhuma iluminação aplicada. O nível de corrente gerada pela luz incidente sobre um fotodiodo não é suficiente para que ele possa ser usado em um controle direto, sendo necessário para isto que haja um estágio de amplificação (HAMAMATSU PHOTONICS, 2007).

Como os tempos de subida e de descida (parâmetros de mudança de estado) são da ordem de nanossegundos, o dispositivo pode ser usado na aplicação de contagem ou comutação de alta velocidade. O germânio é mais adequado para luz incidente na região infravermelha, já que abrange um espectro mais amplo de comprimentos de onda do que o

silício, apesar de sua corrente negra ser maior.

O circuito equivalente de um fotodiodo é mostrado na figura 51, onde:

I_L : Corrente gerada pela luz incidente (proporcional à quantidade de luz);

I_D : Corrente do diodo;

C_j : Capacitância da junção;

R_{SH} : Resistência Shunt;

R_S : Resistência em série;

I' : Corrente da resistência;

V_D : Tensão através do diodo;

I_0 : Corrente de saída;

V_0 : Tensão de saída;

Figura 51 - Circuito equivalente do fotodiodo. Fonte: (HAMAMATSU PHOTONICS, 2007)

A corrente de saída é dada por:

$$I_0 = I_L - I_D - I' = I_L - I_S \left(e^{\frac{eV_D}{kT}} - 1 \right) - I' \quad (13)$$

Onde:

I_S : Corrente de saturação reversa do fotodiodo;

e : Carga do elétron;

k : Constante de Boltzmann;

T : Temperatura absoluta do fotodiodo;

A tensão de circuito aberto V_{oc} é a tensão de saída quando I_o tende a zero. Desta forma tem-se:

$$V_{oc} = \frac{k.T}{e} \ln \left(\frac{I_L - I'}{I_s} + 1 \right) \quad (14)$$

Se I' é omitido, desde que I_s aumente exponencialmente com a temperatura ambiente, V_{oc} é inversamente proporcional à temperatura ambiente e proporcional ao logaritmo de I_L . No entanto esta relação pode ser desconsiderada para níveis baixos de luz.

A corrente de curto circuito I_{SC} é a corrente de saída quando a resistência de carga R_L é igual a zero e V_o é igual a zero, e pode ser escrita como:

$$I_{SC} = I_L - I_s \left(e^{\frac{e.(I_{SC}.R_s)}{k.T}} - 1 \right) - \frac{I_{SC}.R_s}{R_{SH}} \quad (15)$$

Na equação 15, o segundo e o terceiro termos limitam a linearidade de I_{SC} . No entanto R_s é pequeno comparado com o valor de R_{SH} (10^7 a 10^{11} Ohms), podendo-se assim omitir estas parcelas para simplificação.

Quando uma tensão é aplicada em um fotodiodo no estado escuro, a característica tensão por corrente observada é similar à curva convencional de um diodo retificador, conforme a curva 1 da figura 52. Conforme a luz incide na junção, a curva característica 1 passará para as curvas 2 e 3. Portanto, uma corrente I_{SC} proporcional à luz fluirá no sentido do anodo para o catodo, caso os terminais do fotodiodo estiverem curto-circuitados, ou uma tensão de circuito aberto V_{oc} com polaridade positiva no anodo for originada. Essa corrente I_{SC} é extremamente linear em relação à luz incidente.

Figura 52 - Características da corrente x tensão do fotodiodo. Fonte: (HAMAMATSU PHOTONICS, 2007)

4.4.1. Fotosensor conversor luz-freqüência

Atualmente existem fotosensores programáveis que convertem a luz em freqüência, em um único CI(YURISH, 2005). Eles operam com uma matriz de fotodiodos em série com um circuito conversor para freqüência, tendo como saída uma onda quadrada. A freqüência de saída é proporcional à luz incidente (irradiância), podendo ser diretamente conectado a um microprocessador ou outro circuito lógico, com precisão de 10 a 12 bits, sem a necessidade de eletrônica ou conversores analógico/digital (AD) adicionais. A tabela 1 apresenta as características de alguns sensores programáveis do fabricante TAOS (Texas Advanced Optoelectronic Solutions).

Fotosensores	TCS 230	TSL230RD	TSL230R	TSL235R	TSL237	TSL237T

Máxima Freqüência de saída (MHz)	1,0	1,0	1,0	0,5	0,6	0,6
Resposta Espectral (nm)	RGB	350-1000	350-1000	350-1000	350-1000	350-1000
Erro de não-linearidade, (% FS)	0.2	0.2	0.2	0.2	1	1
Programável	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO

Tabela 1 - Tipos e características de sensores conversores de freqüência TAOS. Fonte: (YURISH, 2005)

Existem muitas aplicações laboratoriais e médicas utilizando estes CIs, como por exemplo, espectrofotômetro de baixo custo baseado em LED com diferentes cores e um CI conversor (YEH; TSENG, 2006) e medidores de glicose em amostras de sangue (KING, 2006).

Figura 53 - Aplicação de fotosensor conversor de frequência para medição de glicose em análise de sangue. Fonte: (KING, 2006)

A figura 53a mostra a utilização de fotodiodos com filtros RGB individuais (KING, 2006). Os sinais dos fotodiodos, depois de amplificados, são ligados em um multiplexador para seleção da cor e então convertidos em sinal digital por um conversor AD, para envio do dado a um microcontrolador. A figura 53b usa o componente TCS 230, que converte diretamente luz em um trem de pulsos com frequência proporcional aos componentes RGB da luz. A saída do CI pode ser conectada diretamente no microcontrolador, eliminando a necessidade de amplificadores, multiplexadores e conversores AD.

Para equipamentos como oxímetros de pulso a aplicação deste CI torna-se conveniente, pois elimina a necessidade de filtros e circuitos adicionais (BACHIOCHI, 2004). Oxímetros de pulso medem a porcentagem de hemoglobina saturada (Hb) medindo a absorção das luzes vermelha e infravermelha que passam através do tecido do paciente. Conhecer a porcentagem de saturação de oxigênio no sangue é importante na administração de anestésias ou na determinação da eficiência do sistema respiratório, assim como auxílio ao diagnóstico de várias doenças.

4.4.2. Fotosensor TCS 230

O componente TCS 230 é um conversor luz-frequência que opera no espectro da luz visível e a frequência de saída pode ser escalonada em três valores diferentes (YURISH, 2005). Sua pinagem e o esquema de funcionamento são mostrados na figura 54. A luz incide sobre uma matriz de 8x8 fotodiodos azuis, vermelhos e verdes. Através dos pinos S2 e S3 escolhem-se quais dos fotodiodos serão habilitados. O sinal proveniente dos fotodiodos passa por um circuito conversor de corrente para frequência. O sinal de saída é uma onda quadrada com ciclo de onda de 50% e com sua frequência variando diretamente com a quantidade de luz incidente nos fotodiodos. O pino OE habilita ou inibe o sinal de saída e os pinos S0 e S1 são responsáveis pelo ajuste da escala da frequência de saída.

Figura 54 - Pinagem e esquema de funcionamento do componente TCS 230. Fonte: (TAOS, 2007)

Cada fotodiodo da matriz possui dimensão de 120 x 120 μm . A matriz possui dezesseis fotodiodos com filtro azul, dezesseis com filtro verde, dezesseis com filtragem no vermelho e dezesseis sem nenhum tipo de filtro. Os fotodiodos da mesma cor são ligados em paralelo e podem ser selecionados pelo usuário. A figura 55 mostra a resposta espectral do componente para os filtros azul, verde, vermelho e sem filtro.

Figura 55 - Resposta espectral do componente TCS 230. Fonte: (TAOS, 2007)

A tabela 1 e a tabela 2 mostram como configurar o CI TCS 230 conforme a aplicação. É possível escolher entre os três tipos de filtros coloridos existente, além do filtro para a luz visível e também a frequência de saída na qual se deseja trabalhar.

S2	S3	Tipo do Fotodiodo
B	B	Vermelho
B	A	Azul
A	B	Claro (s/ filtro)
A	A	Verde

Tabela 2 - Seleção do tipo de fotodiodo utilizado no TCS 230, A = sinal lógico Alto e B = sinal lógico Baixo. (TAOS, 2007)

S1	S2	Escala da frequência de saída
B	B	Desligado
B	A	2% (12 KHz)
A	B	20% (120 KHz)
A	A	100% (600 kHz)

Tabela 3 - Escalas de frequências de saída do TCS 230, A = sinal lógico Alto e B = sinal lógico Baixo. (TAOS, 2007)

4.4.3. Medindo a frequência

Os dois métodos mais comuns para a medição da frequência são medição por período e medição pela frequência (KIRIANAKI et al., 2002). A escolha da interface e a técnica de medição dependem da resolução e da taxa de aquisição de dados.

A técnica da medição por período (figura 56), utilizada em baixas frequências, mede o período dos pulsos, usando um sinal de referência (T_0). Durante um ciclo do sinal a ser medido (T_x), conta-se o número de pulsos (N_x) da frequência de referência T_0 . O período é o resultado multiplicação do número de pulsos (N_x), pelo período de referência. O erro estará ligado à relação entre T_0 e T_x , além dos tempos iniciais e finais Δt_1 e Δt_2 .

Figura 56 – Técnica da medição pelo período. Fonte: (KIRIANAKI et al., 2002)

A segunda técnica, conhecida como medição da frequência, acúmulo de pulsos ou técnica de integração (figura 57), é a que foi utilizada no projeto. Nesta técnica conta-se (N_x), o número de pulsos (T_x) do sinal de interesse, em um período fixo de tempo (T_0). A medição de frequência encaixa-se bem em aplicações com variações lentas, níveis de luz constante e para a leitura da média dos níveis de luz durante curtos períodos de tempo. A resolução é limitada principalmente pelos contadores disponíveis e o tempo de medição disponível. Medir a frequência fornece o benefício adicional de que valores randômicos ou variações rápidas de frequências (*jitter*) resultantes de ruído na fonte de luz serão transpostos no cálculo da média.

Figura 57 - Técnica da medição pela frequência. Fonte: (KIRIANAKI et al., 2002)

Para o projeto do bilirrubinômetro, foram utilizados dois sensores TCS 230, um para o comprimento de onda de 455 nm e outro para 575 nm. A configuração utilizada para o sensor foi a sem filtro com espectro da luz visível ($S2 = 1$ e $S3 = 0$) e com a escala de frequência em 100 % ($S1=1$ e $S2 = 1$), pois os feixes incidentes nos fotosensores já estarão filtrados para o seu comprimento de onda respectivo.

O sinal de frequência foi conectado diretamente às portas de interrupção dos dois contadores do microcontrolador, para a contagem dos pulsos enviados pelos CIs (*Contagem_contador*), enquanto outro temporizador (*timer*) estipula o tempo (*t_timer*) da contagem. A frequência lida pelo microcontrolador é dada pela equação 16.

$$Freq = \frac{Contagem_contador}{t_timer} \quad (16)$$

Para o projeto o tempo t_timer foi igual a 100 ms (10 Hz), pois o sinal medido encontra-se na faixa de KHz. Medir com uma base de tempo longa, maior do que 1s, pode acarretar em erros de leitura devido ao efeito térmico do LED, pois este também deverá ser acionado por um período maior ou igual a 1 s.

4.5. Coleta de Amostras de Sangue

A coleta de amostras de sangue para a realização dos testes nos bilirrubinômetros é feita conforme as regras estabelecidas em cada hospital. Para a medição da concentração de bilirrubina pelo Bilimed, a quantidade de sangue necessária para preencher um tubo capilar é mínima (entre 70-80 µl, equivalente a duas gotas de sangue). A microcoleta de sangue, mostrada na seção 4.5.1, é umas das técnicas utilizadas para se obter a amostra de forma mínima. Pode-se também efetuar a coleta através de uma punção em uma das veias do dorso da mão (4.5.2), com a vantagem de se evitar eventuais impurezas provenientes da punção do processo da microcoleta.

4.5.1. Microcoleta de sangue

A microcoleta é um processo de escolha para obtenção de sangue venoso ou periférico, especialmente em pacientes pediátricos, quando o volume a ser coletado for menor que o obtido através de tubos a vácuo convencionais. O sangue obtido de punção capilar é composto por uma mistura de sangue de arteríola e vênulas, além de fluidos intercelulares e intersticiais.

Em adultos o sangue capilar pode ser obtido por punção digital. Para neonatos utiliza-se a punção de calcanhar, através de perfuração com lanceta na face lateral plantar do calcanhar (figura 58). O método consiste em posicionar o calcanhar entre o polegar e o indicador e introduzir a lanceta de forma perpendicular na face lateral interna ou externa do calcanhar, evitando a região central.

Figura 58 - Região e procedimento para a punção de calcanhar. (VACCUETE DO BRASIL, 2003)

A punção deve ser feita perpendicularmente à superfície da pele e não de outra forma, pois poderá causar inflamações. Deve-se desprezar a primeira gota, por conter maior quantidade de fluidos celulares do que sangue, e colher a amostra a partir da segunda gota. Nem sempre os neonatos sangram imediatamente; se a gota de sangue não fluir livremente, efetua-se uma massagem leve para se obter uma gota bem redonda (esta massagem no local da punção não deve ser firme e nem causar pressão, pois pode ocorrer contaminação).

Há uma relação linear entre o volume de sangue coletado e a profundidade da perfuração no local da punção (figura 59). Portanto a lanceta deverá ser selecionada de acordo com o local a ser puncionado e a quantidade de sangue necessária. Em neonatos e bebês, a profundidade da incisão é crítica, não devendo ultrapassar 2,4 mm, caso contrário, haverá a possibilidade de causar sérias lesões no osso calcâneo e falange. Isto pode ser evitado usando lancetas de aproximadamente 2 a 2,25 mm. de profundidade, com disparo semi-automático com dispositivo de segurança.

Figura 59 - Tecidos perfurados por lanceta para o procedimento de punção. Fonte: (VACCUETE DO BRASIL, 2003)

4.5.2. Punção de veia superficial do dorso das mãos

Esta é a técnica mais utilizada nos procedimentos do Setor de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e foi o método utilizado para a obtenção das amostras de soros coletados para os diversos testes realizados com o bilirrubinômetro desenvolvido. Visualiza-se uma veia no dorso de uma das mãos do RN, procede-se a assepsia com álcool a 70%, deixa-se secar e se introduz uma agulha 20x6 ou 25x6. Uma vez puncionado a veia, o sangue flui facilmente e se coleta o sangue nos capilares. Bastam duas a três gotas para preencher dois capilares. Este método é preferencial à punção capilar porque as amostras só contêm sangue, sem outros fluídos intersticiais.

4.5.3. Tubo Capilar

O soro se refere ao plasma sanguíneo nos quais os fatores de coagulação (como a fibrina) foram removidos naturalmente. Significa que o soro sanguíneo não possui os fatores de coagulação do sangue total, que foram consumidos pela coagulação das hemácias. O soro sanguíneo para análise no bilirrubinômetro desenvolvido é coletado em tubos capilares, ilustrados na figura 60. Estes tubos devem conter em suas extremidades o antiocoagulante chamado heparina, para evitar a coagulação do sangue coletado e permitir a perfeita separação do soro das hemácias, por centrifugação.

Figura 60 - Tubo capilar, fabricante Perfecta. Fonte: (PERFECTA LAB, 2006)

Quando um tubo capilar entra em contato com um líquido, este sobe pelas paredes do tubo até certa altura. Quem sustenta o peso da coluna de água no capilar é a tensão superficial. No caso, essa tensão se deve à interação entre as moléculas de água e a parede interna do capilar.

A força de adesão tem a ver com a afinidade do líquido com a superfície sólida, e atua no sentido do líquido molhar o sólido. A força de coesão tem a ver com a coesão do próprio líquido, e atua no sentido oposto. Se a força de adesão for superior à de coesão, o líquido vai interagir favoravelmente com o sólido, molhando-o, e formando um menisco. Se a superfície sólida for um tubo de raio pequeno, como um capilar de vidro, a afinidade com o sólido é tão grande que líquido sobe pelo capilar.

A resultante vertical dessa força é dada pelo produto da tensão superficial (em dinas/cm) pelo comprimento da circunferência interna do tubo (cm). O resultado é uma força que deve ser igual ao peso da coluna de água que subiu pelo tubo. A altura da coluna de líquido é inversamente proporcional ao diâmetro interno do tubo, sendo a fórmula dada por:

$$h = \frac{2\gamma \cos \theta}{\rho g r} \quad (17)$$

Onde:

γ : tensão superficial do líquido (J/m² ou N/m);

θ : ângulo de contato;

ρ : densidade do líquido (kg/m³);

g : aceleração da gravidade (m/s²);

r : raio do tubo (m);

Desta forma, o comprimento do tubo capilar é inversamente proporcional ao raio do tubo e o sangue deve ser coletado com um certo ângulo. A tabela 4 mostra as dimensões comerciais de um tubo capilar.

Tipo	Comprimento	Diâmetro Interno	Diâmetro Externo
Sem Heparina	0,75 mm	1,1 mm	1,5 mm
Com Heparina	0,75 mm	1,1 mm	1,5 mm

Tabela 4 - Dimensões do tubo capilar. Fonte: (PERFECTA LAB, 2006)

O procedimento para a coleta de amostras de sangue para tubo capilar, mostrado na figura 61, é a seguinte:

- Preenche-se um tubo capilar com sangue até $\frac{3}{4}$ da sua altura;

- Fecha-se uma das extremidades na chama de uma lamparina (massa de modelar ou outros materiais podem ser utilizados para a oclusão do capilar);
- Coloca-se o capilar em uma centrífuga apropriada (figura 62) ou 5 minutos em 10000 a 12000 rpm;

Figura 61 - Tubo capilar contendo amostra e a separação dos componentes do sangue após a centrifugação.

Este método também é utilizado para medir a proporção de plasma em relação às hemácias, conhecido como método do micro-hematócrito.

Figura 62 - Tubo capilar em centrífuga com amostra de sangue, e tubo capilar já centrifugado com os componentes do soro separados. Fonte: (FANKHAUSER, 2004)

5. Protótipo do Bilirrubinômetro

5.1. Considerações Iniciais

Este capítulo descreve a montagem de um protótipo do Bilimed, dividido em três partes: o conjunto óptico, o projeto eletrônico (circuito da fonte, fonte de alimentação e software) e o projeto mecânico. Para avaliar a viabilidade dos componentes escolhidos, um protótipo parcial foi construído e também será descrito.

5.2. Protótipo Parcial

Uma avaliação inicial dos componentes envolvidos foi realizada através de uma montagem de um protótipo parcial ilustrado na figura 63. Este protótipo consistiu basicamente de um protoboard com o circuito eletrônico básico do microcontrolador, uma placa de CI responsável pelo acionamento do LED de alto brilho baseado no CI LM 723 (figura 64) e um conjunto óptico simples.

Os principais testes feitos com este protótipo foram:

- Avaliação de estabilidade do circuito de acionamento do LED e estudo comportamental do LED quanto a variações de temperatura, corrente e tensão, resultados vistos na seção 4.2.3;
- Medição dos comprimentos de onda das lentes e dos filtros ópticos, resultados presentes na seção 4.3.2;
- Montagem do circuito do microcontrolador e o software de temporização responsável pela leitura dos sinais enviados pelo TCS 230, conforme descrito na seção 4.4.3.

Figura 63 - Montagem do protótipo parcial contendo os elementos básicos do projeto.

Figura 64 - Circuito de acionamento do LED baseado no CI LM 723.

As seções seguintes irão descrever as partes do protótipo final do Bilimed.

5.3. Conjunto Óptico

O conjunto óptico básico é formado pelo LED Lumiled Luxeon K2 Branco montado em cima de um dissipador térmico, conforme a figura 65. A luz é colimada por uma lente específica para o LED, e em cima da lente existe um suporte para os filtros e a lente dicróica. A lente é disposta à 45° de forma que o feixe azul é refletido e filtrado pelo filtro 455 nm, enquanto que o feixe amarelo é refratado para o filtro 575 nm.

Figura 65 - LED Lumiled Luxeon K2 montado em um dissipador com lente e suporte para os filtros e lente dicróica.

A partir dos testes iniciais realizados com este conjunto básico, construiu-se um conjunto óptico para o bilirrubinômetro. A luz, ao ser emitido pelo LED Lumiled Luxeon K2 Branco é colimada por um conjunto de lentes que possuem uma distribuição angular de no máximo 10°, com o objetivo de focar toda a luz emitida pelo LED para dentro do conjunto óptico.

Um anteparo, que também é o suporte para o tubo capilar, é o próximo caminho óptico da luz (figura 66). Este possui uma pequena fresta com o objetivo de permitir a passagem de luz que passa pela amostra de soro dentro do tubo capilar. A fresta está localizada no meio do suporte para que um tubo capilar com amostra do plasma a ser analisado se encaixe perfeitamente em seu interior, evitando vibrações ou inclinações que prejudiquem a leitura do sinal.

Figura 66 - Esquema do caminho percorrido pela luz passando pela amostra e pelo suporte para tubo capilar.

Depois da refração da amostra pelo tubo capilar, a fresta luminosa incide em um suporte para os filtros ópticos e para a lente dicrótica. Esta peça é feita de material opaco e de cor negra para evitar reflexões e refrações desnecessárias.

O próximo elemento óptico é a superfície da lente dicrótica 45° que refletirá os comprimentos de onda inferior à 480nm e refratará o restante da luz. A parte refletida é filtrada pelo filtro 455 nm e o outro feixe de luz refratado é filtrado para o comprimento de 575 nm. Na extremidade do suporte e logo após os filtros existe uma placa de CI contendo o fotosensor TCS 230, responsável pela captura do sinal. A figura 67 mostra um corte do conjunto óptico e seus elementos constituintes. A figura 68 ilustra a montagem final do conjunto óptico.

Figura 67 - Corte lateral do conjunto óptico do bilirrubinômetro desenvolvido.

Figura 68 - Montagem e peças integrantes do conjunto óptico do bilirrubinômetro.

5.4. Projeto Eletrônico

5.4.1. Circuito de controle

O projeto eletrônico da placa de controle foi desenvolvido baseado no microcontrolador AT 89S8253 de 8 bits da ATMEL (família 80C51) cujo diagrama de blocos internos é mostrado na figura 69, onde podem ser vistos os seguintes dispositivos de interesse para o projeto:

- Portos de entrada e saída, utilizadas para a comunicação com o LCD e sinal dos botões;
- 12 Kbytes de memória FLASH, utilizados para o código fonte;
- 2 Kbytes de memória EEPROM, utilizadas para gravação das últimas 100 concentrações de bilirrubina;
- Porta serial UART, utilizada na comunicação RS232 com o microcomputador para envio dos dados coletados;
- 3 temporizadores/contadores de 16 bits, utilizados para a leitura do sinal enviado pelo TCS 230.

Outros fatores que contribuíram para a escolha deste microcontrolador foram os seguintes:

- Baixo custo (em torno de R\$ 15,00);
- Programação em linguagem C (BARR, 1999);
- Conhecimentos prévios da família de microcontroladores 8051, o que acarreta em um tempo menor de implementação;
- Utilização de ferramentas próprias de desenvolvimento de software (plataforma de desenvolvimento Keil C51) e de gravadores (programador de memória T51Prog da ELNEC);

Todos estes fatores contribuíram para a redução do tempo e custo de desenvolvimento do software e do hardware, conseqüentemente do projeto como um todo.

Figura 69 – Diagrama de blocos interno do microcontrolador AT 89S8253. Fonte: (ATMEL CORPORATION, 2006).

O projeto utilizou os três temporizadores/contadores do AT 89S8253. Eles foram configurados para um temporizador e dois contadores de 16 bits. A família 80C51 de microcontroladores da ATMEL possui características comuns nos seus temporizadores/contadores (MACKENZIE; PHAN, 2006). Podem ser configurados independentemente para operar em uma variedade de modos tanto como contadores ou temporizadores. Quando configurado como um temporizador, este executa por um período programado de tempo, e então habilita uma requisição de interrupção. Ao operar como um contador, o temporizador/contador conta pulsos negativos de tensão em um pino externo.

Após um número de contagens pré-determinadas, o contador ativa uma requisição de interrupção. As contagens de tempo ou interrupção são ativadas nos registradores THx (8 bits mais significativos) e TLx (8 bits menos significativos), onde x representa um dos 3 temporizadores/contadores do microcontrolador (0,1,2).

Os temporizadores e contadores foram programados no modo 1. Neste modo os temporizadores/contadores estão configurados para 16 bits com os registradores THx e TLx conectados em cascada. Estes podem ser acessados para obter a contagem recente ou carregar valores pré-determinados. A figura 70 mostra a configuração lógica deste modo. A entrada incrementa o registrador TLx. Quando ocorre *overflow*, a contagem atinge o limite do temporizador e todos os bits de contagem de THx e TLx passam de 1 para 0. Isto ativará o flag TFX, gerando uma requisição de interrupção..

Figura 70 - Configuração lógica do temporizador/contador da família AT 80C51 de microcontroladores.
Fonte: (ATMEL CORPORATION, 2005).

No modo de operação como temporizador (bit C/Tx=0), os registradores de contagem são incrementados a cada 12 períodos de *clock* ($1/F_{osc}$), ou seja, a frequência de contagem é:

$$F = \frac{F_{osc}}{12} \quad (18)$$

No modo contador (bit C/Tx=1), os registradores de contagem contam as transições negativas no pino externo Tx. Quando a leitura é nível lógico alto em um ciclo e nível lógico baixo no seguinte, o contador é incrementado. Desta forma a máxima taxa de contagem é dada por:

$$F_{max} = \frac{F}{2} = \frac{F_{osc}}{24} \quad (19)$$

Para o sinal de saída do TCS 230 de no máximo 600 KHz (tabela 3), o oscilador externo utilizado possui uma frequência de $F_{osc} = 24$ MHz, o valor da frequência de contagem é de $F = 2$ MHz e a máxima taxa de contagem é de $F_{max} = 1$ MHz.

A figura 71 mostra o esquema eletrônico da placa de controle desenvolvida com o microcontrolador AT 89S8253, contendo os seguintes componentes adicionais:

- um display LCD de doze caracteres e duas linhas para interface com o usuário;
- dois botões *push-bottom* para o acionamento das funções pelo usuário;
- dois conectores para a conexão com os fotosensores TCS 230;
- um circuito para o *reset* do microcontrolador;
- dois capacitores 5 pF e cristal oscilador para o *clock* externo;
- um transistor NPN para acionamento do circuito de acionamento do LED;
- um regulador de tensão 5 V (LM 7805) para a alimentação do circuito de controle e um regulador de 12 V (LM 7812) para a alimentação do LED, com os seus respectivos dissipadores térmicos.
- um CI conversor MAX232 e capacitores para a conversão do sinal do microcontrolador para um sinal compatível com o protocolo RS232, utilizado na comunicação serial.

Todos estes periféricos estão ligados nas portas do AT 89S8253. A porta P2 está ligada aos pinos de dados do LCD. O pino de saída do TCS 230 que mede a faixa do amarelo está conectado ao pino P1.0, que corresponde contador 2 (T2), enquanto o TCS 230 responsável pela faixa do azul está ligado ao pino P3.4 que corresponde ao contador 0 (T0). Os pinos 11 (RX) e 12 (TX) são ligados nas portas R1OUT e T1IN do conversor MAX232 para a comunicação serial. A figura 71 mostra o esquemático de ligação do AT 89S8253 e todos os periféricos envolvidos no projeto. O esquema eletrônico foi desenvolvido utilizando o software OrCAD Capture v 15.7 (MITZNER, 2007).

Figura 71 - Esquema eletrônico da placa de controle, com o microcontrolador AT 89S8253 e os periféricos envolvidos no projeto.

A placa de CI dupla face foi projetada utilizando o software OrCAD Layout v15.7 (Cadence Design Systems). Os resultados finais da placa e da montagem podem ser vistos na figura 72.

Figura 72 - Placa de controle com AT 89S8253 e os periféricos.

5.4.2. Fonte de alimentação

Uma fonte de alimentação é usada para transformar a energia elétrica sob a forma de corrente alternada da rede em uma energia elétrica de corrente contínua. Existem basicamente duas topologias para as fontes de alimentação: lineares e chaveadas (SEDRA; SMITH, 2000).

Numa fonte de alimentação do tipo linear, a tensão alternada da rede elétrica é aumentada ou reduzida por um transformador, retificada por diodos ou ponte de diodos retificadores para que somente os ciclos positivos ou os negativos possam ser usados. A seguir, estes são filtrados para reduzir a ondulação e finalmente regulados pelo circuito regulador de tensão.

Um outro tipo de fonte de alimentação é a chamada fonte chaveada, onde se alimenta com tensão alternada uma etapa retificadora (de alta ou baixa tensão), filtra-se através de capacitores e a tensão resultante é "chaveada" ou comutada em alta frequência utilizando-se transistores de potência. Essa energia "chaveada" é passada por um transformador, para elevar ou reduzir a tensão, e finalmente retificada e filtrada. A regulação ocorre devido a um circuito de controle com realimentação que, de acordo com a tensão de saída, altera o ciclo de condução do sinal de chaveamento, ajustando a tensão de saída para um valor desejado e pré-definido.

A vantagem da fonte chaveada é que o rendimento da potência é maior e a perda por geração de calor bem menor do que nas fontes lineares. Além disso, necessita de transformadores menores e mais leves o que a torna muito menor do que as lineares. A desvantagem é a emissão de ruídos e radiação devido à alta frequência de chaveamento, além de uma maior complexidade e de um número maior de componentes eletrônicos (PRESSMAN, 1998).

Uma fonte linear foi montada para a alimentação de toda a eletrônica envolvida no protótipo. A escolha deste tipo de fonte deve-se à sua simplicidade e tempo de desenvolvimento reduzido. A figura 73 mostra o esquema da fonte, também desenvolvida utilizando os software OrCAD Capture v15.7 e OrCAD Layout v15.7. A topologia para a fonte foi a de um circuito retificador de onda completa mais um resistor de 47 k Ω e capacitor de 2200 μ F em paralelo, para a retificação do sinal. A corrente durante um pico de acionamento do LED é de aproximadamente 1 A logo, o transformador dimensionado possui uma potência de 8 VA, com tensão de saída de 15 VAC. Regulam-se a tensão de saída da fonte com os CIs reguladores de tensão presentes na placa de controle. A saída da placa possui um conector com 3 pinos e também um conector para a chave de seleção de tensão do transformador, correspondente às tensões 127V e 220V.

Figura 73 - Esquema eletrônico da placa da fonte.

5.4.3. Software

O software embarcado no microcontrolador AT 89S8253 é responsável pelo sincronismo e acionamento do LED, leitura dos fotosensores TCS 230, além de fazer a interface do usuário através das teclas e do display LCD. Foi implementado em linguagem C (SCHILDT, 1996), utilizando o ambiente de desenvolvimento μ Vision 3, do fabricante Keil Software Inc. O software é constituído por nove partes básicas (figura 74):

- inicialização das variáveis, que consiste em carregar no programa a biblioteca de interface com o LCD responsável pela comunicação com o microcontrolador, configuração do microcontrolador (portas, temporizadores, contadores), declaração das variáveis globais e locais utilizadas no programa;
- efetuar o zero de leitura do equipamento;
- rotina principal, que contém as rotinas principais do programa e a interação com o usuário a partir das duas teclas;
- sub-rotina de leitura dos fotosensores, encarregada pela contagem do tempo pelo temporizador e contagem dos pulsos enviados pelos fotosensores TCS 230;
- sub-rotina de medição do sinal, responsável por transformar o sinal lido pelos fotosensores em concentração de bilirrubina;
- sub-rotina gravar variáveis, que grava a última medição feita;
- sub-rotina para leitura dos dados guardados na EEPROM;
- sub-rotina apagar variáveis, responsável por apagar todas as variáveis salvas no equipamento;
- sub-rotina enviar serial, que envia os dados salvos para um microcomputador via comunicação serial.

Figura 74 - Fluxograma do programa principal do software embarcado do Bilimed.

Na rotina principal (figura 74, área pontilhada vermelha), mede-se o sinal enviado pelo fotosensor pela sub-rotina Leitura dos Fotosensores. O usuário pode interagir com o sistema apertando dois botões. Ao colocar uma amostra contendo água destilada o usuário efetua o zero de leitura pressionando o botão 1 (figura 74, área pontilhada laranja). Ao inserir um tubo capilar com amostra de sangue, o usuário pode efetuar a medição apertando o botão 2 (figura 74, área pontilhada verde). Ao pressionar o botão, a sub-rotina Medir Sinal será executada e aparecerá uma mensagem no LCD, perguntando se o usuário pretende salvar a medição,

pressionando o botão 1, ou cancelar pelo botão 2. Se o usuário optar por salvar a medição, a sub-rotina Gravar variáveis irá gravar a medição na EEPROM interna.

O usuário também pode interagir com um menu principal se pressionar o botão 2 por mais de dois segundos (figura 74, área pontilhada azul). Uma tela de navegação irá aparecer, contendo as opções: leitura dos dados, apagar dados, enviar serial ou sair do menu. Para confirmar a opção o usuário deve pressionar o botão 1, e para prosseguir para o próximo item o usuário deve pressionar o botão 2.

Na inicialização das variáveis (figura 75), configuram-se as portas do microcontrolador, as variáveis e os valores padrões utilizados globalmente. Neste processo a biblioteca de comunicação com o display LCD também é inicializada e a tela de abertura do programa é mostrada. Configuram-se o temporizador, responsável pelo tempo de acionamento do LED e pelo período de medição, e os dois contadores que medem os pulsos enviados pelos fotosensores. As configurações temporizador/contador do microcontrolador AT 89S8253 foram discutidas anteriormente na seção 5.4. A sub-rotina zero de leitura, também ilustrada na figura 75, é ativada se o botão de zero for acionado. O usuário insere uma amostra com água destilada em um tubo capilar. Faz-se uma medição e este valor é armazenado como valor de referência (Zero Azul e Zero Amarelo).

Figura 75 - Fluxograma para a inicialização das variáveis e o zero de leitura do software embarcado do Bilimed.

O fluxograma da sub-rotina de leitura dos fotosensores é mostrado na figura 76. O temporizador é acionado por um período de 100ms. Durante este período o LED é ativado, seguido de um atraso para a estabilização de seu sinal, e os contadores iniciam as contagens dos pulsos enviados pelos fotosensores TCS 230, medindo assim a quantidade de luz azul e

amarela (seção 4.4.3). No final do período do temporizador, o LED é apagado e as frequências dos fotossensores são obtidas dividindo-se a contagem pelo período do timer, neste caso por 100. O resultado obtido é uma integração em um período de 100ms do sinal enviado pelo fotossensor TCS 230. Um período de atraso é colocado ao final da sub-rotina para que a temperatura do LED estabilize, evitando assim o estresse térmico e variações no sinal de leitura.

Na sub-rotina medir sinal (figura 76), quando o botão de medição é apertado, as frequências azul e amarela são calculadas subtraindo o sinal do fotossensor do zero de referência (Azul – Zero Azul, Amarelo – Zero Amarelo). A partir destes valores a concentração de bilirrubina é calculada através de uma função, que será apresentada na seção 6.2. O resultado é mostrado para o usuário através do display LCD.

Figura 76 - Fluxograma das sub-rotinas Leitura dos Fotossensores e Medir Sinal do software embarcado do Bilimed.

Até 100 medições podem ser gravadas sequencialmente na EEPROM do microcontrolador. Após o preenchimento das 100 posições, o programa reinicia na posição zero e os dados são sobrepostos. Para a manipulação dos dados pelo usuário, foram criadas sub-rotinas de gravar, apagar e de leitura das variáveis. Os dados são correlacionados através de um índice (Posição atual) guardado na própria EEPROM, que mostra qual a posição do último dado armazenado. Para gravar uma variável (figura 77), uma leitura inicial da posição atual é feita. Verifica-se se as 100 posições foram ocupadas e então se grava a concentração de bilirrubina na EEPROM. Para apagar as variáveis, o índice Posição atual recebe o valor zero e também a concentração de bilirrubina nesta posição, e dessa forma as próximas medições serão gravadas a partir da posição zero.

Figura 77 - Fluxograma das sub-rotinas Gravar Variáveis e Apagar Variáveis na EEPROM do microcontrolador, partes do software embarcado do Bilimed.

O usuário poderá ler os dados gravados executando a sub-rotina Leitura Dados, mostrados no fluxograma da figura 78. A leitura acontece de forma cíclica, sempre do primeiro registro até o registro atual. Após a leitura do último dado, o primeiro dado é mostrado. O usuário pode avançar para o próximo dado apertando o botão 1 ou voltar para o menu principal pressionando o botão 2.

A sub-rotina de envio dos dados armazenados pela comunicação serial é mostrada na figura 78. Após iniciar os parâmetros do microcontrolador para a comunicação serial, o

programa inicia a transferência dos dados sequencialmente, começando sempre da posição 0 e termina na última posição armazenada na EEPROM.

Figura 78 - Fluxograma das sub-rotinas Leitura Dados e Enviar Serial do software embarcado do Bilimed.

Figura 79 - Esquema de ligação para a comunicação do Bilimed com um microcomputador através de comunicação serial.

O usuário pode descarregar os dados salvos através de comunicação serial RS232. Para isto, basta conectar um cabo serial com o conector DB9 do Bilimed na entrada COM de um microcomputador (figura 79). O Bilimed envia os dados armazenados até o registro atual na forma de uma lista em formato ASCII. O usuário pode acessar estes dados no microcomputador através de um programa de comunicação como o Microsoft Hyper Terminal. As configurações para a comunicação serial são mostradas na tabela 5. Os dados podem então ser manipulados em planilhas eletrônicas e processadores de texto para a geração de relatórios. Um exemplo do formato dos dados enviados pelo Bilimed é mostrado na Tabela 6.

Bits por segundo	9600
Bits de dados	8
Paridade	Nenhum
Bits de parada	1

Tabela 5 - Parâmetros de configuração para a comunicação serial do Bilimed.

Olidef cz
Bilimed v0,4
Numero
Bilirrubina(mg/dl)
0 0,00
1 7,55
3 7,35
4 7,46

Tabela 6 - Exemplo do formato dos dados enviados por comunicação pelo Bilimed.

5.5. Projeto Mecânico

O projeto mecânico consiste em construir um protótipo que consiga agregar em um invólucro plástico as outras partes do projeto. Dividiu-se a parte mecânica em duas partes. Uma é exclusivamente dedicada à fonte de alimentação. Devido à potência de consumo do LED o transformador utilizado ocupa um espaço volumoso, sendo necessária sua montagem à parte. Nesta caixa da fonte (figura 80) encontram-se o transformador, a placa da fonte, dois porta-fusíveis, chave geral, seletor de tensão 127 V e 220 V, entrada para rede AC (corrente alternada) e cabo de saída com conector necessário para a alimentação do projeto.

Figura 80 - Montagem final da fonte de alimentação do bilirrubinômetro.

A outra parte é o bilirrubinômetro em si, constituído de uma caixa plástica, o conjunto óptico, a placa de controle eletrônica, o LCD, os dois botões, a entrada para o suporte do tubo e a conexão para a fonte de alimentação. Para o conjunto óptico tomou-se o cuidado de dispô-lo de forma a evitar o aumento de temperatura e conseqüentemente flutuações na medição, sendo necessária a dissipação térmica adequada. Outra preocupação é o alinhamento do conjunto óptico, já que este também influencia diretamente na precisão do equipamento. Ambos os protótipos podem ser vistos nas fotos da figura 81.

Figura 81 - As duas partes do protótipo do bilirrubinômetro. A primeira foto ilustra o bilirrubinômetro enquanto a segunda mostra a fonte de alimentação.

6. Resultados e Discussões

6.1. Análise Preliminar

Uma análise preliminar foi realizada para avaliar as condições nas quais o aparelho irá funcionar. Nesta análise foram efetuados testes com basicamente três amostras: água destilada, soro humano adulto e apenas o tubo capilar. Os parâmetros de interesse deste teste são os valores das frequências lidas pelos dois sensores, para mensurar o comportamento destas variáveis quanto às variações na intensidade luminosa, e avaliar a viabilidade do projeto quanto à absorção da bilirrubina. A coleta de soro humano adulto foi realizada segundo o método descrito na seção 4.5. O material utilizado para a coleta, como o lancetador (B-D Lancet Device, fabricante Becton Dickinson), as lancetas (B-D Ultra Fine II Lancet, fabricante Becton Dickinson), o tubo capilar (fabricante Perfecta) e a massa para selagem do tubo são mostrados na figura 82.

Figura 82 - Material utilizado para coleta de sangue.

O gráfico da figura 83 mostra a relação das frequências de saída dos fotosensores (455 nm e 575 nm) para diferentes quantidades de luz incidindo em um tubo capilar contendo água destilada. Este gráfico foi obtido diminuindo o tamanho do feixe do suporte do tubo capilar, reduzindo assim a quantidade de luz que a amostra absorve. Esta curva mostra claramente a relação linear entre os sinais.

Figura 83 - Relação entre os sinais dos fotosensores para diferentes intensidades de entrada para uma amostra contendo água destilada.

As amostras de soro foram utilizadas para medir a variação do sinal de saída (frequência amarelo – frequência azul) para várias medições subseqüentes. O objetivo desta avaliação foi estudar a confiabilidade do conjunto óptico para várias medições com a mesma amostra. Um total de 14 amostras de soro de diferentes pessoas foi utilizado para medir a confiabilidade do sistema. A média e a variância dos resultados são mostradas na figura 84. A tabela contendo os valores utilizados para a construção da curva encontra-se no apêndice C.

Figura 84 - Gráfico da média (KHz) e da variância das amostras medidas na saída dos fotosensores.

Outro teste realizado foi a medição do sinal de saída após um período de 12 horas após a coleta, expondo a amostra à luz e temperatura ambiente. Observou-se uma variação de até 18% no sinal de saída, comprovando assim a cautela quanto à exposição da amostra à luz e também sua conservação apropriada.

Concluiu-se com essas análises que o sistema estava adequado para se levantar a curva de calibração do instrumento.

6.2. Curva da Concentração de Bilirrubina

O sinal proveniente dos sensores é convertido em um sinal correspondente à absorção de bilirrubina através da equação 20, baseada na lei de Lambert-Beer (seção 3.3.1), onde o sinal relativo à absorção da molécula de bilirrubina (455 nm) é compensado pela absorção da oxihemoglobina (575 nm):

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \log_{10} \left(\frac{Freq_{575}}{Freq_{455}} \right) \quad (20)$$

Onde:

I_1 : intensidade da luz incidente;

I_0 : intensidade da luz após atravessar o meio;

A : absorbância relativa à bilirrubina mensurada (KHz);

$Freq_{575}$: frequência lida pelo sensor de 575 nm (KHz);

$Freq_{455}$: frequência lida pelo sensor de 455 nm (KHz);

Para o cálculo da concentração de bilirrubina é necessário conhecer um ponto inicial de medida, que servirá como zero inicial e corresponderá à luz incidente para referência quanto à absorção de luz nos comprimentos de onda especificados. Alguns equipamentos utilizam água destilada, padrões de bilirrubina ou até mesmo o ar dentro de cubeta ou tubo capilar para a medição do ponto zero.

Para este projeto o ponto de referência (zero) é medido com um tubo capilar limpo contendo água destilada de procedência. Insere-se o tubo no suporte e realiza-se a medição, acionando-se o botão 'zero'. É importante efetuar este procedimento antes de cada medição, evitando assim erros de leitura referentes às variações de temperatura do LED e temperatura ambiente.

Subtraindo o zero inicial dos valores obtidos através da medição da amostra equivale à leitura de absorbância da concentração de bilirrubina expresso por:

$$A_{bili} = \log_{10} \left(\frac{A_{zero}}{A_{amostra}} \right) \quad (21)$$

Onde:

$$A_{zero} = \log_{10} \left(\frac{Freq_{575_zero}}{Freq_{455_zero}} \right) \quad (22)$$

$$A_{amostra} = \log_{10} \left(\frac{Freq_{575}}{Freq_{455}} \right) \quad (23)$$

A_{bili} : absorbância da bilirrubina (KHz);

A_{zero} : absorbância da amostra contendo água destilada (KHz);

$A_{amostra}$: absorbância da amostra contendo bilirrubina a ser mensurada (KHz);

$Freq_{575_zero}$: frequência da água destilada lida pelo sensor 575 nm (KHz);

$Freq_{455_zero}$: frequência da água destilada lida pelo sensor 455 nm (KHz);

Para a simplificação matemática e para os cálculos microprocessados, os valores de zero nos dois comprimentos de onda são armazenados em memória durante o procedimento de tara, e a absorbância da bilirrubina é calculada pela equação 25.

$$A_{bili} = \log_{10} \left(\frac{\frac{Freq_{575_zero}}{Freq_{455_zero}}}{\frac{Freq_{575}}{Freq_{455}}} \right) \quad (24)$$

$$A_{bili} = \log_{10} \left(\frac{Freq_{575_zero} \cdot Freq_{455}}{Freq_{455_zero} \cdot Freq_{575}} \right) \quad (25)$$

A concentração de bilirrubina será uma função proporcional à variável A_{bili} como mostrado na equação 26.

$$ConcBili = f(A_{bili}) \quad (26)$$

Para calcular esta função é necessário fazer uma interpolação matemática que será detalhada a seguir.

A curva da concentração da bilirrubina foi deduzida utilizando dois diferentes métodos. O primeiro teste foi realizado utilizando um padrão de bilirrubina comercial (Padrão Stantard, CELM- Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos) diluído em diferentes concentrações para a análise do sinal do Bilimed. O outro método consiste na análise de soros de neonatos em um bilirrubinômetro comercial (Photo Ictometer OHC Model IV- O'Hara & Co LTD, Tokyo).

O padrão de bilirrubina é vendido comercialmente e faz parte integrante de um kit para a análise laboratorial de bilirrubina. Nesta primeira etapa utilizou-se um volume de 500 µg de

bilirrubina pura, segundo normas da *American Association for Clinical Chemistry*, com um coeficiente de absorção molar de $60,7 \pm 1,6$ a 453 nm e 25°C, utilizado como padrão em testes laboratoriais baseados no método Jendrassik-Grof. (seção 3.2). A preparação do padrão foi feita utilizando diluentes em diferentes concentrações. Após a diluição, a solução foi mantida ao abrigo da luz e conservada sobre temperatura adequada, e os testes realizados dentro de um prazo de no máximo de 6 horas. Os padrões de bilirrubina sofrem grande variabilidade de resultados, podendo sofrer variações de mais de 20%, sendo recomendado o armazenamento a -70°C (LEITE et al., 2003). Foram montados vários padrões diluindo um padrão inicial de 20 mg/dl. Os padrões da tabela 7 foram gerados e mensurados com o Bilimed (sinal de saída) e o bilirrubiômetro comercial (conc. bilirrubina).

Conc. Bilirrubina (mg/dl)	Sinal de Saída (KHz)
0	0
2,5	0,31
7,8	0,66
12,5	1,24
14,5	1,43
15,3	1,38
17	1,54

Tabela 7 - Concentração de bilirrubina (aparelho comercial) e sinal de saída do Bilimed para bilirrubina padrão.

Algumas amostras de soro de recém-nascidos fornecidas pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto foram analisadas e coletadas segundo o procedimento apresentado na seção 4.5. Os resultados foram baseados no bilirrubiômetro comercial citado anteriormente, tomando o cuidado para manter as amostras em local escuro e no período máximo de 12 horas. A tabela 8 mostra os valores de concentração de bilirrubina e o sinal de saída do Bilimed.

Conc. Bilirrubina (mg/dl)	Sinal de Saída (KHz)
0	0
2,2	0,29
4,5	0,48
5,2	0,55
7	0,59
12,5	1,24

Tabela 8 - Concentração de bilirrubina (aparelho comercial) e sinal de saída do Bilimed para soro humano.

Os dados da tabela 7 e da tabela 8 mostram que o sinal de saída do Bilimed possui uma relação linear com a concentração de bilirrubina do equipamento comercial. Ao plotar o gráfico dos dados coletados é possível observar a linearidade do sinal. Baseado nestes pontos encontra-se uma reta que melhor se aproxima dos pontos. O gráfico da figura 85 mostra a reta interpolada e os pontos amostrados. A função escolhida para a curva interpolada foi a polinomial de primeiro grau. O software MATLAB v 5.3 (The MathWorks Inc, 1999) foi utilizado para encontrar a curva de calibração. O código fonte do programa implementado no Matlab (HAHN; VALENTINE, 2007) encontra-se no apêndice D.

Figura 85 - Gráfico da concentração de bilirrubina do aparelho comercial (mg/dl) pelo sinal de saída do Bilimed (KHz). Os pontos são os dados amostrais e a reta azul é a interpolação polinomial.

Desta forma a equação de interpolação será uma equação polinomial do primeiro grau da seguinte forma:

$$\mathbf{ConcBili} = f(A_{bili}) = \mathbf{a.A_{bili} + b} \quad (27)$$

A equação final é da forma:

$$\mathbf{ConcBili} = f(A_{bili}) = \mathbf{10.A_{bili}} \quad (28)$$

$$\text{ConcBili} = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{\text{Freq}_{575_zero} \cdot \text{Freq}_{455}}{\text{Freq}_{455_zero} \cdot \text{Freq}_{575}} \right) \quad (29)$$

Esta equação é colocada no software embarcado do microcontrolador para o cálculo da bilirrubina em tempo real.

Na prática os valores de concentração de bilirrubina que podem ser considerados são mostrados na figura 5 na seção 2.2. A tabela mostra alguns valores de referência de bilirrubina para recém-nascidos e adultos.

Adultos	Abaixo de 1 mg/dl	
RN	à termo	pré-termo
Acima de 24 hrs	5,0 mg/dl	8,0 mg/dl
Acima de 48 hrs	8,0 mg/dl	13,0 mg/dl
Do terceiro ao quinto dia	12,0 mg/dl	18,0 mg/dl

Tabela 9 - Valores de referência de bilirrubina para adultos e neonatos. Fonte: (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2004)

Foram realizadas 130 medições baseadas em 26 amostras de diferentes concentrações de bilirrubina, além das suas respectivas medições de zero, que formaram uma base de dados para análise do bilirrubinômetro. As amostras, obtidas durante o período de março, abril e maio de 2008, foram coletadas em diferentes recém-nascidos internados no setor de pediatria do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Os valores obtidos foram comparados simultaneamente com o valor mensurado por um bilirrubinômetro comercial (Photo Ictometer OHC Model IV, fabricante O'Hara & Co LTD) e por análises bioquímicas efetuadas no Laboratório de Pediatria do mesmo hospital. Dos dados coletados, 41 medições (30% dos resultados) possuem concentração maior do que 10 mg/dl (171 µmol/l). A tabela no apêndice E mostra os resultados obtidos. Os dados experimentais na figura 86 mostram a relação do sinal de saída da concentração medida no equipamento de referência pela concentração medida pelo Bilimed. A linha contínua representa a reta de tendência (método dos mínimos quadrados) dos dados.

Figura 86 - Gráfico da concentração de bilirrubina pela concentração de saída do Bilimed, reta de tendência (linha contínua) e os dados coletados (pontos).

O gráfico de erro de leitura do equipamento, que é mostrado na figura 87, é gerado pela diferença entre as concentrações medidas e as de referência (pontos). A média é igual a 0 mg/dl (linha pontilhada), o dobro do desvio padrão é de 2,093 mg/dl (linha tracejada), e a curva de tendência é mostrada pela linha contínua. A tabela 10 mostra o desvio padrão, a variância e o erro máximo encontrados nas leituras das amostras.

Desvio Padrão	1,0477 mg/dl
Variância	1,0976 mg/dl
Erro Máximo	2,4739 mg/dl

Tabela 10 - Desvio Padrão, variância e erro máximo encontrado nas leituras do Bilimed.

Figura 87 - Erro na medição da concentração de bilirrubina do Bilimed (pontos).

A figura 88 mostra a linearidade em relação à concentração de referência pela do Bilimed. Os pontos representam a linearidade obtida a partir da reta de tendência da figura 86. A linha contínua é a diagonal central do gráfico e representa a linearidade ideal.

Figura 88 - Linearidade do equipamento Bilimed (pontos) pela referência (linha contínua).

6.3. Discussões

Os dados iniciais gerados mostram que o equipamento possuirá uma grande linearidade para valores entre 0 e 30 mg/dl de bilirrubina. Através da análise da curva de tendência do gráfico da figura 86 e dos sinais enviados pelos fotosensores, as medições são seguras até 25 mg/dl, pois para este valor a absorção do feixe em 455 nm ainda está dentro do limite de erro do fotosensor. Acima deste valor, a intensidade luminosa e o sinal se tornam muito baixos, aumentando significativamente o erro da leitura. Comparativamente, o equipamento Bilimeter 3 (PFAFF MEDICAL, 2004b), bilirrubinômetro com características similares ao Bilimed conforme a seção 3.3.2, apresenta uma linearidade de $\pm 3\%$ para uma faixa de 0 a 28,5 mg/dl.

O erro máximo de leitura obtido foi de 2,47 mg/dl para uma concentração de 23,5 mg/dl. O equipamento apresenta um erro relativo de $\pm 1,05$ mg/dl, resultado que se encontra dentro da média de alguns modelos de bilirrubinômetros diretos (± 2 mg/dl) segundo estudo comparativo feito entre alguns equipamentos (GROHMANN et al., 2006). Neste estudo foram comparados os três métodos de medição de bilirrubina (transcutâneo, espectrofotométrico e laboratorial), sendo que o método da espectrofotometria direta mostrou resultados melhores e mais confiáveis. Estes equipamentos possuem uma simplicidade maior de operação com o usuário e podem ser manipulados pelo próprio corpo clínico, o que não ocorre com o método bioquímico (seção 3.2). A grande desvantagem dos espectrofotômetros diretos é a necessidade da amostra de sangue, pois mesmo sendo um volume baixo pode ser complicada para recém-nascidos de baixo peso, e a limitação para a análise apenas em RN.

O bilirrubinômetro transcutâneo, apresentado na seção 3.4, é o estado da arte na medição de bilirrubina. Apresenta muitas vantagens como o resultado imediato e a não necessidade de coleta. Porém sua tecnologia não se mostrou totalmente independente de fatores como raça, peso e tempo de gestação (MAISELS et al., 2004). O Bilimed possui todas as características de um bilirrubinômetro espectrofotômetro comercial. O diferencial do equipamento está justamente no emprego de tecnologias como o LED de alto brilho e fotosensores digitais. Utilizando estes componentes, o equipamento Bilimed pode chegar a 20% do preço de um bilirrubinômetro transcutâneo e 50% de um bilirrubinômetro convencional.

O método bioquímico é considerado como a principal referência para a medição da concentração de bilirrubina tanto em adultos como em neonatos. O método pode mensurar

não só a bilirrubina total, como os bilirrubinômetros transcutâneos e espectrômetros, mas também a bilirrubina direta e indireta. Possui a desvantagem de necessitar de amostra de sangue, qualificação profissional para sua realização e um tempo maior para a obtenção do resultado.

O equipamento desenvolvido possui muitos desafios para sua construção, que envolvem:

- estabilidade do sinal enviado pelo LED (seções 4.2.3, 4.2.4 e 4.2.5). Deve-se tomar um cuidado especial com as variações de temperatura que podem alterar o resultado final;
- alinhamento, posicionamento e a precisão das peças utilizadas no conjunto óptico, principalmente com o formato e a fresta do suporte para o tubo capilar (seção 5.3);
- qualidade dos filtros, lentes e espelhos utilizados (seção 4.3);

Existem algumas restrições para a realização dos testes clínicos e a avaliação do equipamento (seção 6.2). Uma delas é a disponibilidade de amostras de soro, que depende da demanda e do número de pacientes com alta concentração de bilirrubina presentes no hospital, sendo um trabalho que deverá ser realizado em médio prazo. Os testes com o padrão de bilirrubina mostram-se importantes, porém se este não for corretamente armazenado, o seu valor pode gerar erros de leitura durante o processo de calibração. Existe também uma dificuldade maior de adquirir um padrão de alta concentração de bilirrubina (30 mg/dl), devido ao seu alto preço e por ser fornecido apenas por fabricantes estrangeiros. Outro fator que dificulta a análise do padrão calibrador é a baixa reprodutibilidade, já que uma vez diluído o padrão este não poderá ser reutilizado nos dias seguintes.

Outro cuidado que deve ser tomado é na manipulação da amostra de sangue, evitando o posicionamento inadequado do tubo capilar no suporte, a separação incorreta do soro no processo de centrifugação e as imperfeições e sujeira no tubo capilar ou no próprio conjunto óptico. Para assegurar a qualidade nos resultados devem-se seguir corretamente as instruções, efetuar a medição do zero a cada amostragem, evitar o contato direto com o tubo capilar e centrifugar a amostra para obter um soro homogêneo. Também deve-se proteger a amostra da exposição à luz e seu correto armazenamento.

7.

Conclusões e Sugestões

Este trabalho apresentou um protótipo de um bilirrubinômetro (Bilimed) utilizando o método da espectrofotometria direta. Para uma avaliação preliminar deste protótipo, foi feita a comparação de seus resultados com um bilirrubinômetro comercial.

Os resultados obtidos mostraram que o equipamento possui uma boa linearidade para um fundo de escala de até 25 mg/dl e um erro relativo dentro da faixa de equipamentos comerciais. Com a utilização de um sistema contendo filtros, lentes, LED de alta intensidade e fotossensores conversores de luz em frequência, o equipamento Bilimed apresentou um custo de projeto reduzido. Comercialmente existe um grande mercado para o Bilimed, pois os bilirrubinômetros são fabricados por empresas estrangeiras, não existindo modelos nacionais.

O método da espectrofotometria direta está há muito tempo mostrando ser uma boa técnica para a medição da concentração de bilirrubina. Muitos equipamentos comerciais que utilizam essa técnica foram industrializados e vários estudos comprovaram a eficácia do método. O Bilimed por ser um espectrofotômetro direto possui vantagens tais como o rápido diagnóstico, simplicidade de operação e precisão comparada à de bilirrubinômetros comerciais. Porém este equipamento possui desvantagens como a necessidade da coleta de sangue, o que não ocorre com bilirrubinômetros transcutâneos. Alguns fatores externos podem prejudicar os resultados obtidos, como a variação da temperatura e o manuseio e preparo inadequado da amostra de soro.

7.1. Sugestões para Trabalhos Futuros

As seguintes sugestões são apresentadas para trabalhos futuros:

- para aumentar o fundo de escala do equipamento deve-se aumentar a luz incidente na amostra ou diminuir as perdas durante o caminho óptico, porém esta alternativa deve ser avaliada com cuidado, já que uma mudança na parte óptica acarretaria em mudanças significativas na curva de calibração do equipamento. Para aumentar a

precisão deve-se ajustar a curva para diversas amostras, objetivando alcançar as especificações dos equipamentos comerciais;

- uma nova topologia onde a amostra de sangue e o tubo com água destilada são inseridos ao mesmo tempo no equipamento, evitando assim possíveis erros de leitura relacionados ao zero do equipamento;
- para diminuir o espaço ocupado pela fonte pode-se utilizar uma fonte chaveada. Com a redução, a fonte poderá ser inserida em uma mecânica única junto com o conjunto óptico e a eletrônica;
- deve-se estudar formas simplificadas de calibração do instrumento através da leitura de padrões de bilirrubina comerciais, do ajuste da função de interpolação e do alinhamento do conjunto óptico, visando uma produção industrial do equipamento.

7.2. Trabalhos Publicados

Através deste trabalho foram publicados os seguintes artigos em anais de congressos:

AZEKA, L. A. L. e PAIVA, M. S. V. Espectrofotômetro analisador de bilirrubina em soro de neonatos utilizando LED de alta potência. In XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008. Salvador: CBEB. (AZEKA; PAIVA, 2008)

AZEKA, L. A. L. e PAIVA, M. S. V. A low cost LED based bilirubin meter - Description and evaluation of a low cost spectrophotometer bilirubin analyzer. In BIODEVICES 2009 – Second International Conference on Biomedical Electronics and Devices, 2009. Porto: INSTICC. (AZEKA; PAIVA, 2009)

8.

Referências Bibliográficas

ALVES_FILHO, N. *Manual de Perinatologia*: Sociedade Brasileira de Pediatria, Comitê de Perinatologia, 1991. Hiperbilirrubinemia do Recém-Nascido - Conduta Prática, p. 139-151.

AMERICAN_ACADEMY_OF_PEDIATRICS. Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation. *Pediatrics*, 2004, vol. 114, p. 297-316.

ANSI/IESNA. *Recommended Practice for Photobiological Safety for Lamp and Lamp Systems*: American National Standard Institute/Illuminating Engineering Society of North America, 2007. ANSI/IESNA RP-27.1-05.

ASKIN, F. D., DIEHL-JONES, et al. The neonatal liver, III: pathophysiology of liver dysfunction. *Neonatal Network*, 2003, vol. 22, p. 5 - 15.

ATMEL 8051 Microcontrollers hardware manual. [on line]. ATMEL corporation, 2005. [05/05/07]. Disponível em: <http://www.atmel.com/dyn/resources/prod_documents/DOC4316.PDF>.

AT89S8253. [on line]. ATMEL corporation, 2006. [17/02/2008]. Disponível em: <http://www.atmel.com/dyn/resources/prod_documents/doc3286.pdf>.

AZEKA, L. A. L. e PAIVA, M. S. V. Espectrofotômetro analisador de bilirrubina em soro de neonatos utilizando LED de alta potência. In *XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, 2008. Salvador: SBEB, 2008. p 4.

AZEKA, L. A. L. e PAIVA, M. S. V. A low cost LED based bilirubin meter - Description and evaluation of a low cost spectrophotometer bilirubin analyzer. In *BIODEVICES 2009 – Second International Conference on Biomedical Electronics and Devices*, 2009. Porto: INSTICC, 2009. p 4.

BACHIOCHI, J. Light-to-Frequency Conversion (Part 1) TSL230R-Based Pulse Oximeter Circuit Cellar. *The Magazine for Computer Application*, 2004, p. 26-31.

BARR, M. *Programming embedded System in C and C++*. 1^a ed. Sebastopol: O'reilly Media, 1999. 171 p.

BHUTANI, V. K., GOURLEY, G. R., ADLER, S., et al. Noninvasive Measurement of Total Serum Bilirubin in a Multiracial Predischage Newborn Population to Assess the Risk of Severe Hyperbilirubinemia. *Pediatrics*, 2000, vol. 106, p. 1-9.

BHUTANI, V. K., JOHNSON, L. e SIVIERI, E. M. Predictive Ability of a Predischage Hour-specific Serum Bilirubin for Subsequent Significant Hyperbilirubinemia in Healthy Term and Near-term Newborns. *Pediatrics*, 1999, vol. 103, p. 6-14.

BRAGA, N. C. *Fontes de Alimentação*. 1^a ed. Rio de Janeiro: Antenna Edições Técnicas, 2005. 240 p.

BROWN, A. K. Kernicterus: Past, Present, and Future 2003, vol. NeoReviews, p. e33–e40.

CHOI, K. J. e PARK, J. K. Phospor-Conversion White Light Emitting Diode Using InGaN Near-Ultraviolet Chip. *Solid State Phenomena*, 2007, vol. 124-126, p. 499-502.

COOPER, J. Driving LED lamps – some simple design guidelines. *LEDs magazine*, 2007, p. 15.

DE_AGUIAR, L. L. *Analizador Fotométrico de Bilirrubina no sangue para neonatologia*. Rio de Janeiro: COPPE; Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988, 111 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica.

DU, H., FUH, R. A., LI, J., et al. PhotochemCAD: a computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochemistry and Photobiology*, 1998, vol. 68, p. 141–142.

FANKHAUSER, D. B. *Hematocrit protocol*. Batavia: University of Cincinnati Clermont College, 2004. 3 p. manual de instrução.

FEVERY, J., BLANCKAERT, N., BIRCHER, J. E., et al. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 2^a ed. New York: Oxford University Press, 1999. 1630 p.

FISCHER, R. E., TADIC-GALEB, B. e YODER, P. R. *Optical System Design*. 2^a ed. New York: Mc Graw Hill, 2008. Optical Thin Films, p. 569-585.

FRAEN FHS series lenses for K2 LED. [on line]. FRAEN Corporation, 2006. [20/06/2007]. Disponível em: <http://www.fraensrl.com/prodinfo.html#FHS_K2>.

GORE, M. G. *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. 368 p. I.S.B.N. 0199638128, 9780199638123.

GROHMANN, K., ROSER, M., ROLINSKI, B., et al. Bilirubin Measurement for Neonates: Comparison of 9 Frequently Used Methods. *Pediatrics*, 2006, vol. 117, p. 1174-1183

HAHN, B. D. e VALENTINE, D. T. *Essential Matlab for Engineers and Scientists*. 3^a ed. Oxford: Elsevier, 2007. 428 p.

HAMAMATSU Photodiode Technical Information [on line]. Hamamatsu Photonics, 2007. [01/10/2007]. Disponível em: <http://sales.hamamatsu.com/assets/applications/SSD/photodiode_technical_information.pdf>.

HANSEN, J. T. e KOEPPEN, B. M. *Netter's Atlas of Human Physiology*. 2^a ed. Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 2002. 224 p. Série Netter Basic Science.

JACKSON, S. H. A simple stable instrument for determination of bilirubin by direct spectrophotometry. *Clinical Chemistry*, 1961, vol. 7, p. 512-520.

JACKSON, S. H. e HERNANDEZ, A. H. A New "Bilirubinometer" and its use in estimating total and conjugated bilirubin in serum. *Clinical Chemistry*, 1970, vol. 16, p. 462 - 465.

JENDRASSIK, L. e GRÓF, P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. *Biochemische Zeitschrift*, 1938, vol. 297, p. 81-89.

JOHNSON, R. L. *Precision optical filters for OEM instrumentation and research technical handbook*. 3^a ed. Brattleboro: Omega Optical, 2006.

JONES, G. e BARNETT, G. High-power LEDs provide illumination and treatment in medical applications. *LEDs Magazine*, 2006, vol. 8, p. 33-35.

KHATOD Lenses for Luxeon LEDs I/II/V/K2 KEPL97 Series. [on line]. KHATOD Optoelectronic Srl, 2007. [20/06/2007]. Disponível em: <http://www.khatod.com/pdf/kepl197_luxeon.pdf>.

KING, R. Optoelectronic Sensors in medical Applications. *SENSORS*, 2006.

KIRIANAKI, N., YURISH, S., SHPAK, N., et al. *Data Acquisition and Signal Processing for Smart Sensors*. 1^a ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

KNUDSEN, A. Prediction of the development of neonatal jaundice by increased umbilical cord blood bilirubin. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 1989, vol. 78, p. 217-221.

LAIDLER, K. J. *The World of Physical Chemistry*. Oxford: Oxford University Press, 1995. 488 p. I.S.B.N. 0198559194, 9780198559191.

LATERZA, O. F., SMITH, C. H., WILHITE, T. R., et al. Accurate direct spectrophotometric bilirubin measurement combined with blood gas analysis. *Clinica Chimica Acta*, 2002, vol. 323, p. 115-120.

LEITE, M. D. G. D. C., FACCHINI, F. P., FARIA, E. C. D., et al. Avaliação laboratorial da estabilidade do padrão calibrador de bilirrubina. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina laboratorial*, 2003, vol. 39, p. 21-24.

LUMILEDS - All in one plug & play guide. [on line]. Lumileds Future Electronics, 2006a. [18/07/2006]. Disponível em: <<http://www.lumileds.com/pdfs/LuxeonPNPguide.pdf>>.

LUMILEDS Technical Datasheet DS45 Power light source LUXEON III Emitter. [on line]. Lumileds Future Electronics, 2006b. [20/06/07]. Disponível em: <<http://www.lumileds.com/pdfs/DS45.PDF>>.

LUMILEDS Technical Datasheet DS51 Power light source LUXEON K2. [on line]. Lumileds Future Electronics, 2006c. [30/09/2007]. Disponível em: <<http://www.lumileds.com/pdfs/DS51.pdf>>.

MACKENZIE, I. S. e PHAN, R. C.-W. *The 8051 microcontroller*. 4^a ed. New Jersey: Prentice Hall, 2006. 560 p.

MAISELS, M. J. Historical Perspectives: Transcutaneous Bilirubinometry. *NeoReviews*, 2006, vol. 7, p. c217-c225.

MAISELS, M. J., OSTREA, E. J., TOUCH, S., et al. Evaluation of a new transcutaneous bilirubinometer. *Pediatrics*, 2004, vol. 113, p. 1628-1635.

MARTIN, R. J., FANAROFF, A. A. e WALSH, M. C. *Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine-Diseases of the Fetus and Infant*. 8^a ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006.

MITZNER, K. *Complete PCB design using OrCad Capture and Layout*. 1^a ed. Burlington: Newnes, 2007. 529 p.

LM723/LM723C Voltage Regulator. [on line]. National Semiconductor, 1999. [10/10/2007]. Disponível em: <<http://www.national.com/ds/LM/LM723.pdf>>.

NÚCLEO. *Bilirrubina*. Itaboraí: NÚCLEO Diagnóstico Produtos Especializados LTDA, 2006. 2 p. Catálogo de produto.

ODELL, G. B. *Neonatal Hyperbilirubinemia*. Grune & Stratton, 1980. 152 p. Série Monographs in Neonatology.

OLIDEF CZ FOTOTERAPIAS. [on line]. Olidef cz, 2007. [20/02/2008]. Disponível em: <<http://www.olidefcz.com.br/>>.

PEAKE, M., MAZZACHI, B., FUDGE, A., et al. Bilirubin measured on a blood gas analyser: a suitable alternative for near patient assessment of neonatal jaundice? *Annals of Clinical Biochemistry*, 2001, vol. 38, p. 355-540.

PERFECTA Tubo Capilar Para Micro-Hematócrito. [on line]. Perfecta Lab, 2006. [29/02/2008]. Disponível em: <<http://www.perfectalab.com.br/site/default.asp?pg=pro&spg=tub>>.

PFAFF. *Bilimeter 3 Operating Instruction*. Neuburg: Pfaff Medical, 2004a. 2 p. Manual de Operação.

PFAFF. *Bilimeter 3 Specification Brochure*. Neuburg: Pfaff Medical, 2004b. Catálogo de produto.

PHILLIPS, A. Small companies fight for a foothold in white LED sector. *LEDs Magazine*, 2005, vol. 31, p. 15-17.

PRESSMAN, A. I. *Switching power supply design*. 2^a ed. New York: McGraw-Hill, 1998. 669 p.

REICHERT. *Reichert Unistat Bilirubinometer Instruction Manual* Depew: Reichert, 2003. 24 p. Manual de operação.

ROGGAN, A., FRIEBEL, M., DÖRSCHER, K., et al. Optical Properties of Circulating Human Blood in the Wavelength Range 400–2500 nm. *Journal of Biomedical Optics*, 1999, vol. 4, p. 36-46.

RUBALTELLI, F. F., GOURLEY, G. R. e LOSKAMP, N. Transcutaneous bilirubin measurement: a multicenter evaluation of a new device. *Pediatrics*, 2001, vol. 107, p. 1264-1271.

SCHILDT, H. C. *Completo e Total - 3ª Edição revista e atualizada*. Traduzido por MAYER, R. C. 3ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

SEDRA, A. S. e SMITH, K. C. *Microeletrônica*. Traduzido por SEABRA, A. C., LOBO_NETO, M., SANTOS_FILHO, S. G. D. e NOIJE, W. A. M. V. 4ª ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2000. 1269 p.

STENZEL, O. *The Physics of Thin Film Optical Spectra An Introduction*. 1ª ed. Berlin: Springer, 2005. 275 p. Série Springer series in surface sciences.

TAKSANDE, A., VILHEKAR, K., JAIN, M., et al. Prediction of the development of neonatal hyperbilirubinemia by increased umbilical cord blood bilirubin. *Current Pediatric Research*, 2005, vol. 9, p. 5-9.

TCS230 Programmable color light-to-frequency converter [on line]. TAOS, 2007. [01/10/2007]. Disponível em: <http://sales.hamamatsu.com/assets/applications/SSD/photodiode_technical_information.pdf>.

VACCUETE. *Guia prático para coleta de sangue*. Campinas: Vaccuete do Brasil, 2003. 26 p. Manual de instrução.

WIENER. *Bilirrubina Total AA*. Rosario: Wiener Laboratorios SAIC, 2000. 2 p. Catálogo de produto.

YAMANOUCHI, I., YAMAUCHI, Y. e IGARASHI, I. Transcutaneous bilirubinometry: preliminary studies of noninvasive transcutaneous bilirubinmeter in the Okayama National Hospital. *Pediatrics*, 1980, vol. 65, p. 195-202.

YASUDA, S., ITOH, S. e ISOBE, K. New Transcutaneous jaundice device with two optical paths. *J Perinat Med*, 2003, vol. 31, p. 81-88.

YEH, S. e TSENG, S. S. A Low Cost LED Based Spectrometer. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2006, vol. 53, p. 1067-1072.

YURISH, S. Y. Intelligent Opto Sensors' Interfacing Based on Universal Frequency-to-Digital Converter. *Sensors & Transducers Magazine*, 2005, vol. 56, p. 326-334.

ZHELUDEV, N. The life and times of the LED - a 100-year history. *Nature Photonics*, 2007, vol. 1, p. 189-192.

ZIJLSTRA, W. G., BUURSMA, A. e ROEST, W. P. M.-V. D. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Clinical Chemistry*, 1991, vol. 37, p. 1633-1638.

APÊNDICE A – Causas e Avaliações da Icterícia

Produção aumentada	Excreção diminuída	Forma Mista
<p>A. Incompatibilidade sanguínea materno-fetal (Rh, ABO, outras)</p> <p>B. Esferocitose hereditária</p> <p>C. Anemias hemolíticas não esferocíticas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Deficiência G-6-P-D 2. Def. piruvatoquinase 3. Outras def. enzimáticas eritrocitárias 4. Alfa-talassemia 5. Gama-talassemia 6. Hemólise induzida pela vit. K₃ <p>D. Coleções extravasculares de sangue (patéquias, hematomas cerebrais/ pulmonares/ ocultos)</p> <p>E. Policetemia</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Transfusão materno-fetal ou feto-fetal 2. Ligadura tardia do cordão umbilical <p>F. Aumento da circulação êntero-hepática</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estenose pilórica 2. Atresia ou estenose intestinal (incluindo pâncreas anular) 3. Doenças de Hirschsprung 4. Íleo meconial/ síndrome de rolha meconial 5. Jejum prolongado/ outras síndromes de hipoperistaltismo 6. Íleo paralítico induzido por drogas (paregórico, hexametônio) 7. Sangue deglutido 	<p>G. Endócrino/metabólicos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Icterícia não-hemolítica familiar (tipos 1 e 2) 2. Síndromes de Gilbert, Rotor, Dubin-Johnson 3. Galactosemia 4. Hipotireoidismo 5. Tirosinose 6. Hipermetionemia 7. Drogas e Hormônios <ol style="list-style-type: none"> a. Novobiocina b. Drogas colestáticas c. Pregnanediol d. Síndrome Lucey-Driscoll e. Ocitocina (mãe) f. Outras drogas obstétricas 8. Filho de mãe diabética 9. Prematuridade 10. Hipopituitarismo 11. Insuficiência cardíaca congestiva 12. Aberrações cromossômicas 13. Outros erros inatos do metabolismo <p>H. Obstrutivas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Atresia /estenose biliar 2. Cisto cédoco 3. Fibrose cística 4. Obstrução biliar extrínseca (bondas, tumores) 5. Síndromes colestáticas <ol style="list-style-type: none"> a. Progressiva (ácidos biliares séricos elevados) b. Não progressiva (ácidos biliares séricos normais) c. Intermitente 	<p>I. Seps Neonatal</p> <p>J. Infecções intra-uterinas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Toxoplasmose 2. Rubéola 3. Citomegalo vírus 4. Herpes simples 5. Sífilis 6. Doença de Chagas 7. Hepatite Vítrica (B, não-A/ não-B) 8. Outras <p>K. Hepatite vítrica A</p>

Tabela 11 - Causas de hiperbilirrubinemia patológica durante a vida neonatal. Fonte: (ALVES FILHO, 1991)

Incremento das taxas de hemoglobinas devido a:
• Isoimunização (incompatibilidade de grupo sanguíneo, como fator RH, ABO ou grupos menores de sangue);
• Defeitos enzimáticos nas hemácias;
• Anomalias estruturais das hemácias (spherocytosis hereditária, elliptocytosis);
• Infecções (sepsias, infecções no trato urinário);
• Sequestro do sangue;
• Policitemia;
• Tempo de vida menor das hemácias em RN (80 dias ao invés de 120 dias);
Decremento das funções hepáticas e conjugação da bilirrubina:
• Atividade imatura da enzima glucuronil transferase em RN: RN possuem 1% da capacidade adulta, enquanto que prematuros possuem 0,1% ;
• Síndrome de Gilbert;
• Síndrome de Crigler Najjar;
• Estenose Pilórica;
• Hipotireoidismo;
• Crianças com mães diabéticas;
• Amamentamento materno;
Incremento na reabsorção enteropática:
• Icterícia por amamentamento (devido à desidratação por suprimento inadequado de leite);
• Obstrução do intestino;
• Sem alimentação entérica;
Avaliação da icterícia não conjugada:
Avaliação inicial:
• Avaliar a bilirrubina total e direta;
• Tipo sanguíneo e fator Rh (do RN e da mãe);
• Hematócritos, teste da antiglobina direta;
Avaliação tardia:
• Contagem de células vermelhas, contagem reticulocite (se evidente ou suspeita de doença hemolítica);
• Cultura de sangue, urinalise, cultura de urina;
• Testes de funcionamento da tireóide, exame G6PD, eletroforese das hemácias.

Tabela 12 - Possíveis causas e avaliação para a icterícia não conjugada. Fonte: (ALVES FILHO, 1991)

Doenças Hepatocelulares:
Hepatites: Hepatite Idiopática Neonatal; viral (Hepatite B, C); Bacterial (E. coli, infecções no trato urinário);
Nutrição parenteral total;
Esquemia Hepática (danos pós-esquemicos);
Eritroblastose fetal ;
Desordens metabólicas: Deficiência Alpha-1 antitripsina; Galactosemia, tirosinemia, fructosemia; Desordem no armazenamento de glicose; Doenças Cerebrohepatorenal (Zellweger); Fibroses císticas; Hipopituitarismo;
Anomalias na árvore biliar:
Atresia biliar Extrahepática: nas primeiras duas semanas, a bilirrubina não conjugada predomina; após há predominância da bilirrubina conjugada;
Bloqueio dos dutos da bile (Alagille vs. não-sindromica);
Cisto Coledocal;
Síndrome do plug de bile;
Avaliação inicial:
Bilirrubina total e direta;
Substâncias de redução de urina, AST, ALT, GGT;
Ultra-som hepático;
Avaliação tardia
Serologia Hepatite B e C;
Estudo da deficiência alfa1-antitripsina;
HIDA scan Colangiograma;

Tabela 13 - Possíveis causas e avaliação para a icterícia conjugada. Fonte: (ALVES FILHO, 1991)

APÊNDICE B – Métodos Bioquímicos para Medição da Bilirrubina

1.1. Método DPD

O método de medição da bilirrubina total segundo o fabricante Wiener (WIENER LAB, 2000) é descrito a seguir. A bilirrubina total reage com o sal de diclorofenildiazônio (DPD) produzindo um azocomposto de cor vermelho em solução ácida.

Reagentes fornecidos:

- reagente 1: solução aquosa contendo ácido clorídrico 90 $\mu\text{mol/l}$ e tensoativo;
- reagente 2: frascos contendo sal de diclorofenildiazônio;
- reagente para Branco de Amostra: solução aquosa contendo ácido clorídrico 90 $\mu\text{mol/l}$ e tensoativo.

Instruções de uso:

- reagente de Trabalho: reconstituir cada frasco de Reagente 2 com 10ml de Reagente 1. Tampar e agitar até dissolução completa. Homogeneizar e datar;
- coleta: Obter soro ou plasma da maneira habitual. Manter protegido da luz natural ou artificial, cobrindo o tubo com papel escuro;
- aditivos: caso a amostra seja plasma, deve-se utilizar heparina;
- estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve ser preferencialmente fresca. No caso de não se realizar o ensaio na hora, o soro deve ser conservado até 48 horas sob refrigeração (2 a 10 °C), não mais de 24 horas sob refrigeração ou 12 horas à temperatura ambiente (menor que 25 °C). A ação da luz pode destruir em uma hora até 50% da bilirrubina presente na amostra.

Material necessário:

- espectrofotômetro ou fotocolorímetro;
- micropipetas ou pipetas para medir os volumes indicados;
- tubos de fotocolorímetro;
- cronômetro;
- analisador automático.

Condições de reação:

- longitude de onda 546nm ou 20-550 em fotocolorímetro com filtro verde;
- temperatura ambiente;
- 10 minutos de reação;
- volume de amostras 10 µl;
- volume final de reação: 0,54 ml.

Procedimento:

Em quatro tubos de fotocolorímetro marcados Bc (branco de calibrador ou padrão), C (calibrador ou padrão), Bd (Branco de desconhecido) e D (desconhecido), colocar conforme tabela 14:

	BC	C	Bd	D
Reagente para Branco de Amostra	0,5 ml	-	0,5 ml	-
Reagente 1	-	0,4 ml	-	0,4 ml
Calibrador ou Padrão	40 µl	40 µl	-	-
Amostra	-	-	40 µl	40 µl
Reagente de trabalho	-	0,1 ml	-	0,1 ml

Tabela 14 - Procedimento para o os padrões do método DPD.

Misturar e incubar 10 minutos à temperatura ambiente. Ler em espectrômetro a 546nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (520-550 nm) levando o aparelho a zero com o Branco de Reagente (Br).

Podem-se aumentar proporcionalmente os volumes. Processar o Branco de Reagente (Br) por cada série de determinações misturando 0,4 ml de Reagente1 + 40 µl de água destilada + 0,1 ml de Reagente de trabalho. A cor de reação é estável durante 30 minutos pelo que a absorbância deve ser lida nesse intervalo.

Cálculo dos resultados:

$$\text{Bilirrubina Total (mg/l)} = (D - Bd)F \quad (30)$$

$$F = X(\text{mg/l}) / (C - Bc) \quad (31)$$

Onde:

X: concentração de bilirrubina total do Calibrador A plus (100mg/l).

A reprodutibilidade do método é mostrada na tabela 15.

Nível	D.P.	C.V.
6,8 mg/l	+ - 0,13 mg/l	1,9%
60 mg/l	+ - 0,31 mg/l	0,5 %

Tabela 15 - Reprodutibilidade do método DPD

Linearidade: a reação é linear até 200 mg/l. Para valores superiores repetir o procedimento com amostra diluída 1:2 ou 1:4 com solução fisiológica e multiplicar o resultado obtido por 2 ou 4, respectivamente.

1.2. Método Sims Horn

O método a seguir é distribuído pelo Núcleo laboratórios (NÚCLEO DIAGNÓSTICOS PRODUTOS ESPECIALIZADOS, 2006). A bilirrubina, na forma direta, está esterificada com glicuronídeos (mono e di) e, na forma indireta é não esterificada. A fração direta, na presença do para-benzenodiazono-sulfonato, reage por copulação, formando a azobilirrubina. A fração total reage com o ácido sulfanílico diazotado após adição de benzoato de sódio e cafeína. A fração indireta é obtida por diferença entre a total e a direta. A intensidade da cor vermelha produzida pelas duas frações é proporcional à concentração de bilirrubina presente na amostra e apresenta absorção máxima em 530 nm.

O teste de Bilirrubina foi comparado com outro método de Bilirrubina disponível comercialmente. Soros controle e amostras foram usados para comparação. Os resultados foram avaliados por um componente principal de análise e também pelo modelo de regressão não paramétrica de acordo com Bablok & Passing. A regressão linear obtida pode ser descrita como:

Bilirrubina Total:

$$r = 0,953Y = 1,060X + 0,270$$

$$X_{média} = 4,10 \text{ mg/dl}$$

$$Y_{média} = 4,25 \text{ mg/dl} \quad (32)$$

Bilirrubina Direta:

$$r= 0,998$$

$$Y = 0,997 * X + 0,090$$

$$X \text{ média} = 3,82 \text{ mg/dl}$$

$$Y \text{ média} = 3,83 \text{ mg/dl} \quad (33)$$

Ambos os métodos mostraram boa concordância e um desvio não significativo foi observado em algumas amostras específicas.

APÊNDICE C - Tabela de Análise da Variância

	Freq Azul (KHz)	Freq Amarelo (KHz)	Sinal de Saída (KHz)	Média (KHz)	Variância
Amostra 1	143,3	204,34	61,04	60,50	2,31
	141,7	203,39	61,69		
	148,1	206,89	58,79		
Amostra 2	114,1	187,98	73,88	74,48	2,82
	112,9	186,52	73,62		
	113,9	187,33	73,43		
	103,9	180,88	76,98		
Amostra 3	136,1	203,60	67,50	68,53	2,11
	128	197,55	69,55		
Amostra 4	142,6	223,37	80,77	80,12	0,32
	152,3	231,50	79,20		
	146,5	226,75	80,25		
	141,8	221,94	80,14		
	145,4	225,64	80,24		
Amostra 5	144,3	220,87	76,57	77,50	1,35
	143,2	220,30	77,10		
	144,6	221,72	77,12		
	138,4	217,93	79,53		
	143	220,19	77,19		
Amostra 6	189,2	227,91	38,71	38,96	0,05
	188,2	227,20	39,00		
	187,9	227,07	39,17		
Amostra 7	193,7	230,49	36,79	36,52	0,10
	195,2	231,80	36,60		
	195,4	231,58	36,18		
Amostra 8	133	195,27	62,27	62,83	1,15
	138,3	202,36	64,06		
	142,3	204,44	62,14		
Amostra 9	145,6	203,23	57,63	57,85	0,25
	138,4	196,83	58,43		
	146,3	203,81	57,51		
Amostra 10	155	207,19	52,19	52,68	1,45
	165,2	216,47	51,27		
	157,9	212,39	54,49		
	155,9	209,01	53,11		
	159,7	212,06	52,36		
Amostra 11	154,7	213,10	58,40	57,48	2,97
	148,6	207,98	59,38		
	159,8	215,37	55,57		
	158,4	214,99	56,59		
Amostra 12	129	195,84	66,84	66,58	0,14
	128,9	195,21	66,31		
Amostra 13	145,3	210,50	65,20	65,22	0,00
	141,5	206,74	65,24		
Amostra 14	209,8	248,82	39,02	38,89	0,01
	210,1	248,94	38,84		
	210	248,82	38,82		

Tabela 16 - Análise da variância para diferentes medições em amostras de soro humano.

APÊNDICE D – Programa em Matlab

```
% Projeto Bilirrubinometro
% Curva de calilbracao BiliMed

%Leandro Augusto Lopes Azeka

clc;
clear all;
close all;

%Carrega os testes realizados: Concentração de bilirrubina, Freq_450,
Freq_575
%Conc_Bili (mg/dl)|455 nm Zero|575 nm Zero|455 nm media|575 nm corr media|

teste_total=load('teste_excluidos.txt');
%teste_total=load('media_teste1.txt');
%teste_total=[teste_total;load('media_teste2.txt')];
%Reune as informações de todos os testes em uma unica varivavel e ordena
%os resultados segundo a concentração de bilirrubina

Teste_Total = sortrows(teste_total,1);
Conc_Bili_Total      = Teste_Total(:,1);
Freq_450_zero_Total = Teste_Total(:,2);
Freq_575_zero_Total = Teste_Total(:,3);
Freq_450_Total      = Teste_Total(:,4);
Freq_575_Total      = Teste_Total(:,5);

%Calcula a Absorbancia da Bilirrubina atraves do Zero e das medidas de
%frequencia 455 e 575 nm
Abs_Zero_Total = log10(Freq_575_zero_Total./Freq_450_zero_Total); %Calcula
a Absorbancia para o Zero
Abs_Testes_Total = log10(Freq_575_Total./Freq_450_Total); %Calcula
a Absorbancia para os testes
Abs_Bili_Total = Abs_Testes_Total - Abs_Zero_Total; %Bilirrubina estimada =
Freq_575 (corrigida) - Freq_474

%Ordena os valores da concentracao de bilirrubina e da absorbancia medida
%em ordem crescente

%Interpola um polinomio de primeiro grau para a Bilirrubina e calcula o
%erro
xx_Abs_Bili=0:0.1:3; %Eixo x do grafico

[P_Bili_Total,S_Bili_Total]=polyfit(Abs_Bili_Total,Conc_Bili_Total,1);
%Interpola um polinomio de primeiro grau para a Bilirrubina
P_Bili_Total=[10 0]
yy_Conc_Bili_Total=polyval(P_Bili_Total,xx_Abs_Bili); %Eixo y do grafico

%Calcula os valores de Bilirrubina estimado pela equação de interpolação

[Estim_Bili_Total,D_Bili_Total] =
polyval(P_Bili_Total,Abs_Bili_Total,S_Bili_Total);
Erro_Bili_Total=(Conc_Bili_Total-Estim_Bili_Total);

Estim_Bili_Total=polyval(P_Bili_Total,Abs_Bili_Total); %Eixo y do grafico
P_Estim=[10 0]
[P_Estim,S_Estim]=polyfit(Conc_Bili_Total,Estim_Bili_Total,1); %Interpola
um polinomio de primeiro grau para a Bilirrubina
```

```

xx_Estim_Bili=0:2:30; %Eixo x do grafico
yy_Estim_Bili=polyval(P_Estim,xx_Estim_Bili); %Eixo y do grafico

%Plota Grafico para análise da estimativa da curva de calibracao
figure(1);
%subplot(2,1,1);
plot (Abs_Bili_Total,Conc_Bili_Total,'ro',
xx_Abs_Bili,yy_Conc_Bili_Total,'b');
%Abs_Bili,Conc_Bili,'bo',xx_Abs_Bili,yy_Conc_Bili,'b',...
ylim([0 30]);
xlim([0 3]);
title ('Concentração de Bilirrubina');
ylabel('Concentração Bilirrubina (mg/dl)');
xlabel('Sinal Saída (KHz)');
grid on;

%Plota Grafico comparativo entre os dois valores de concentracao
figure(3)
plot ([0 30],[0 30],'b',Estim_Bili_Total,Conc_Bili_Total,...
'rs','LineWidth',2,'MarkerEdgeColor','r',...
'MarkerFaceColor','r','MarkerSize',5);
ylim([0 30]);
xlim([0 30]);
title ('Concentração Bilirrubina');
ylabel('Concentração Bilirrubina Referência(mg/dl)');
xlabel('Concentração Bilirrubina Bilimed(mg/dl)');
grid on;

```

APÊNDICE E – Tabela de Concentrações de Bilirrubina

Concentração Bilirrubina (mg/dl)							
Referência	Bilimed	Referência	Bilimed	Referência	Bilimed	Referência	Bilimed
0,5	1,120604	4,5	4,729482	7,5	7,365001	13,5	13,08733
0,5	1,133335	4,5	4,761385	7,5	7,420421	14,5	14,1539
0,5	1,103457	4,5	4,730802	7,5	7,317666	14,5	14,09966
0,5	1,133335	4,5	4,730802	7,5	7,314864	14,5	14,1539
0,5	1,170098	4,5	4,800589	7,5	7,297716	14,5	14,09966
2,2	2,703331	4,5	4,839179	7,8	5,56433	14,5	14,0461
2,2	2,742838	4,5	4,889319	7,8	5,56433	14,5	13,69468
2,2	2,80695	4,5	5,158374	7,8	5,704505	14,5	13,69648
2,2	2,810162	4,5	5,158374	7,8	5,687419	14,5	13,68536
2,2	2,759455	5	5,823074	7,8	5,55356	14,5	13,67339
2,5	3,029691	5	5,858256	8,5	8,392329	14,5	13,64075
2,5	2,94975	5	5,842047	8,5	8,339168	15,3	13,59388
2,5	2,960144	5	5,858101	8,5	8,396042	15,3	13,7446
2,5	2,973216	5	5,841113	8,5	8,463971	15,3	13,54676
2,5	2,950979	5,2	5,378248	8,5	8,421105	15,3	13,59758
2,5	2,960071	5,2	5,391069	8,5	8,411922	15,3	13,52521
2,5	2,719381	5,2	5,392704	9	9,64976	17	15,25208
2,5	2,719325	5,2	5,3653	9	10,04483	17	15,25208
2,5	2,746614	5,2	5,311618	9	9,551273	17	15,25208
2,5	2,680986	6	7,977322	9	9,551273	17	15,18309
2,5	2,672882	6	7,812155	9	9,664105	17	14,91768
3	3,049205	6	7,654514	10	9,812391	17	14,79223
3	3,078733	6	8,159768	10	10,58777	17	14,84101
3	3,075395	6	6,52533	10	9,784525	17	14,81376
3	3,025433	6	6,517505	10	9,848675	17	14,75324
3	3,071536	6	6,506348	10	9,737903	17	14,52606
3,5	4,050727	6	6,455818	10	9,87539	18,5	18,19214
3,5	3,978712	6	6,493728	10	10,24604	18,5	18,36116
3,5	4,143848	6,5	6,931451	10	10,24291	18,5	18,36116
3,5	3,996035	6,5	7,22974	12,5	12,24496	18,5	17,6147
3,5	3,918947	6,5	6,71177	12,5	12,12974	18,5	18,28532
3,5	4,013935	6,5	6,209437	12,5	12,10546	23,5	25,96574
4,5	4,698548	6,5	6,712771	12,5	12,18318	23,5	26,06646
4,5	4,639989	7	6,404412	12,5	12,12909	23,5	26,07698
4,5	4,630341	7	6,410971	13,5	13,32625	23,5	26,07173
4,5	4,667358	7	6,453991	13,5	13,08869	23,5	26,06116
4,5	4,630341	7	6,389191	13,5	13,18551	23,5	25,95978
4,5	4,74464	7	6,387196	13,5	13,10542	23,5	25,98802

Tabela 17 - Resultado de medições realizadas pelo Bilimed e por um bilirrubinômetro comercial para diferentes concentrações de bilirrubina (mg/dl).