

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO DE BAIXO CUSTO PARA MEDIDAS POR QUIMILUMINESCÊNCIA

Eduardo P. Borges, Elizabeth N. Fernandes e Fábio R. P. Rocha[#]

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos - SP

Boaventura F. Reis^{*}

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP 96, 13400-970 Piracicaba - SP

Recebido em 29/11/01; aceito em 27/5/02

DEVELOPMENT OF A LOW COST DEVICE FOR CHEMILUMINESCENCE MEASUREMENTS. A simple and low cost device (ca. US\$ 150) that comprises two photodiodes fixed in lab-made Perspex flow cell is proposed for chemiluminescence measurements. The characteristics of the device (large observation window and reduced thickness) allow maximizing the amount of the emitted radiation detected. A sensitivity improvement of ca. 50 % was observed by employing two photodiodes for signal measurements. The performance of the device was assessed by the oxidation of luminol by hydrogen peroxide, yielding a linear response within the range of 2.50 to 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 . The detection limit was estimated as 0.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ hydrogen peroxide which is comparable with those obtained by using equipments based on photomultipliers.

Keywords: flow analysis; chemiluminescence; hydrogen peroxide; photodiode.

INTRODUÇÃO

Procedimentos analíticos com detecção por quimiluminescência destacam-se pela alta sensibilidade e ampla faixa de resposta linear¹. Tais métodos podem ser implementados empregando instrumentação similar à utilizada em outros métodos ópticos, como espectrofotometria e fluorescência. Entretanto, os equipamentos são usualmente mais simples devido à ausência de fontes de radiação externas e de dispositivos para a discriminação de comprimentos de onda².

Quimiluminescência é, geralmente, monitorada empregando células em espiral posicionadas em frente à janela de uma fotomultiplicadora³. Apesar de procedimentos bastante sensíveis serem implementados com estes dispositivos, sua aplicação é limitada ao uso em laboratório devido à fragilidade. O emprego de quimiluminescência para medidas em campo, por exemplo, requer o desenvolvimento de dispositivos mais robustos e versáteis. Adicionalmente, apesar da emissão de radiação ocorrer em todas as direções, com as configurações dos equipamentos usuais, apenas uma fração da radiação é detectada devido ao posicionamento da cela de medida em relação ao detector.

Os fotodiodos, embora menos sensíveis que as fotomultiplicadoras, podem ser usados para a detecção da radiação emitida, apresentando vantagens como maior robustez e menores custo e tamanho. O emprego destes dispositivos é particularmente interessante no caso de sistemas miniaturizados ou destinados a medidas em campo⁴. Devido aos menores custos e tamanho, mais de um fotodiodo pode ser empregado para maximizar a quantidade de radiação detectada.

Neste trabalho, é proposto um dispositivo simples, robusto e de baixo custo para medidas por quimiluminescência em sistemas de análise em fluxo. Visando melhorar a sensibilidade, foi investigado o emprego de dois fotodiodos acoplados à cela de fluxo. O desempenho do dispositivo foi avaliado empregando como modelo a oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio em meio alcalino.

PARTE EXPERIMENTAL

Descrição do dispositivo

O dispositivo proposto é mostrado na Figura 1 e consiste de uma cela de fluxo similar a anteriormente proposta para medidas por espectrofotometria em fase sólida⁵, à qual foram acoplados dois fotodiodos de silício (a, b) com área sensível de 50 mm² (OSD50-E, RS 846-711). A cela de fluxo foi construída empregando peças de acrílico e uma tira de borracha com 1 mm de espessura (c), presas por parafusos (não mostrados na figura). Na parte central da tira de borracha, foi feito um corte circular com 10 mm de diâmetro (área transversal de 78 mm²), sendo o volume da cela (78 μL) definido pela a espessura da tira e pela área do corte. Essa área também correspondia à janela de observação, que permite que a radiação emitida pela reação alcance os fotodetectores. Nos dois blocos do lado direito da figura, foram feitos dois furos transversais (0,8 mm d.i.), distantes 30 mm, para a entrada e saída de fluidos. Na tira de borracha, foi feito um corte para interligar os pontos de entrada e saída de fluidos à área de observação. O conjunto foi acondicionado em uma caixa escura para evitar a incidência de luz ambiente sobre os fotodetectores.

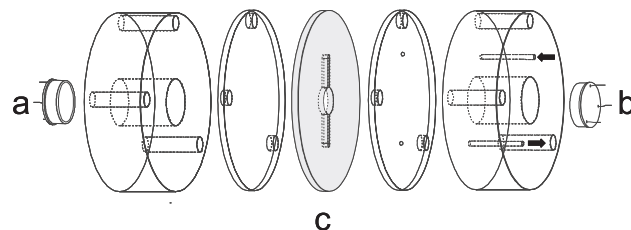


Figura 1. Dispositivo empregado para medidas por quimiluminescência. a, b – fotodiodos de silício com 50 mm² de área sensível; c – tira de borracha com 1 mm de espessura. As demais peças foram construídas em acrílico. As setas indicam os pontos de entrada e saída de soluções

*e-mail: reis@cena.usp.br

[#] endereço atual: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo - SP

O diagrama do circuito eletrônico empregado para o condicionamento dos sinais gerados pelos fotodiodos é mostrado na Figura 2. Os terminais de saída de cada fotodiodo foram conectados às entradas não inversoras de dois amplificadores operacionais (CA3140) para amplificação e compatibilização de impedância. Os terminais de saída destes dispositivos foram conectados a um amplificador configurado como somador de sinais, que também permitia o ajuste de zero ("offset"). O sinal de saída do amplificador foi monitorado empregando um registrador potenciométrico ou através de um microcomputador, equipado com uma interface eletrônica. Uma fonte de diferença de potencial constante bipolar (± 12 V) foi empregada para a alimentação dos dispositivos.

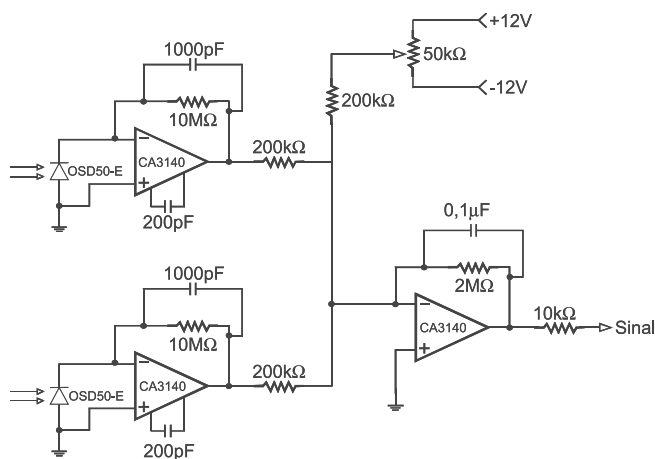


Figura 2. Circuito eletrônico empregado para o condicionamento dos sinais e ajuste de zero ("offset"). A saída de sinal foi conectada a um registrador potenciométrico ou a uma das entradas analógicas da interface PCL-711S

Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas empregando água deionizada e reagentes com grau analítico. Solução $4,50 \text{ mmol L}^{-1}$ luminol (R_1) foi preparada dissolvendo-se 79,6 mg de 5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona (Sigma) em 100 mL de solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ K_2CO_3 e ajustando o pH para 10,5 com HCl. Solução $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ hexacianoferrato(III) de potássio (R_2) foi preparada dissolvendo-se 1,65 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 100 mL de água.

Solução estoque de peróxido de hidrogênio (ca. 1 mmol L^{-1}) foi preparada a partir de uma solução 30% m/m e padronizada com permanganato de potássio. Soluções de referência foram preparadas por diluições da solução estoque.

Equipamentos

O módulo de análise foi construído empregando tubos de polietileno (0,8 mm d.i.) e confluências feitas de acrílico. A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Ismatec IPC-

4, equipada com tubos de propulsão de Tygon. Para a inserção das soluções foi empregado um injetor proporcional com barra deslizante. Um registrador potenciométrico (Cole-Parmer) ou um microcomputador equipado com uma interface eletrônica (Advantech, PCL-711S) foram empregados para o monitoramento dos sinais.

Diagrama de fluxos e procedimento

O instrumento foi avaliado empregando a reação de oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio, catalisada por hexacianoferrato(III) de potássio. O diagrama de fluxos do módulo de análise empregado é mostrado na Figura 3. As soluções de peróxido de hidrogênio ($100 \mu\text{L}$) foram inseridas no fluido transportador, recebendo por confluência as soluções de luminol (R_1) e do catalisador (R_2). A distância entre o ponto de confluência y e a entrada da cela de fluxo foi a menor possível (ca. 5 cm) visando minimizar perdas de radiação. A altura dos sinais transientes (S) foi empregada como base de medida.

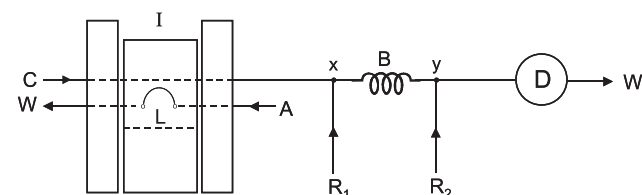


Figura 3. Diagrama de fluxos do módulo de análise empregado para avaliação do desempenho do dispositivo (D). I – injetor; L – alça de amostragem ($100 \mu\text{L}$); C – transportador (H_2O), $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; R_1 – $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ luminol, $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; R_2 – $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; B – reator helicoidal (20 cm). W – recipiente de descarte

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da quimiluminescência resultar na emissão de radiação eletromagnética em todas as direções, as configurações usualmente empregadas permitem a medida de apenas uma fração (geralmente $< 50\%$) da radiação emitida. Esta limitação resulta em um decréscimo inerente de sensibilidade. O dispositivo proposto consiste de uma cela de fluxos com reduzida espessura (1 mm) e janela de observação de 78 mm^2 (Figura 1). Esta configuração permite maximizar a quantidade de radiação detectada, visto que apenas a radiação emitida no sentido radial não incide sobre os fotodetectores. Adicionalmente, a espessura reduzida permite minimizar absorção de radiação pela solução.

O emprego de dois fotodetectores pode afetar tanto a sensibilidade quanto o nível de ruído. Desta forma, a razão sinal/ruído foi estimada para cada um dos fotodetectores e na configuração que empregava os dois fotodiodos. Para tanto, foram considerados os desvios padrão de 500 leituras da linha base (1,0 - 1,7 mV) e o sinal máximo referente a uma solução contendo $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 (medidas em triplicata). Um aumento significativo da razão sinal/ruído foi observado com o emprego dos dois fotodetectores (Tabela 1), indi-

Tabela 1. Características analíticas do dispositivo proposto empregando 1 ou 2 fotodiodos

Fotodiodo	sinal / ruído ¹	Equação da reta ²	LD ³ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
a	28,3	$S = 16,8 + 3,24 C$ ($r=0,998$)	1,1
b	20,0	$S = 26,4 + 3,27 C$ ($r=0,999$)	1,6
a+b	54,0	$S = 27,5 + 4,79 C$ ($r=0,999$)	0,80

1. Estimada considerando os sinais para uma solução $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 ($n=3$) e 500 medidas da linha base; 2. S - sinal máximo (mV); C - concentração de H_2O_2 ($\mu\text{mol L}^{-1}$); 3. Limite de detecção estimado a nível de confiança de 99,7%

Tabela 2. Comparação de procedimentos para determinação de H_2O_2 por quimiluminescência

Tipo de detector	Geometria da cela	Catalisador	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	Referência
fotodiodo	laminar	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,8	Presente trabalho
fotomultiplicadora	bulbo de vidro	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,1 ^b	6
fotomultiplicadora	bulbo de vidro	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,01 ^b	7
fotomultiplicadora	espiral de vidro	Co(II)	0,01	10
fotodiodo	laminar	peroxidase	0,003	11
fotomultiplicadora	—	peroxidase	8	12

a. Limite de detecção estimado a nível de confiança de 99,7% ($k=3$); b. Limite de detecção estimado a nível de confiança de 94,4% ($k=2$)

cando que o efeito do aumento da porcentagem de radiação detectada é mais significativo que o aumento no nível de ruído. Outras características analíticas estimadas são mostradas na Tabela 1.

Sinais transientes obtidos com o dispositivo proposto, mostrados na Figura 4, indicam um aumento de sensibilidade de ca. 50 %, com o emprego dos dois fotodetectores. Resposta linear foi obtida para concentrações de H_2O_2 entre 2,50 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 (Tabela 1). Considerando o desvio padrão de 500 leituras da linha base, o limite de detecção foi estimado em 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a nível de confiança de 99,7 %. Coeficiente de variação de 0,9% foi estimado a partir de 20 medidas empregando uma solução contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 .

O dispositivo proposto apresentou um desempenho analítico comparável ao observado em procedimentos para detecção de H_2O_2 em condições químicas similares, ou seja, utilizando hexacianoferrato(III) de potássio como catalisador e detecção com

fotomultiplicadora^{6,7}. Com a utilização do luminol, melhores resultados podem ser alcançados mediante emprego de outros catalisadores e/ou uso de substâncias que prolongam e intensificam a emissão de luz⁸. Uma comparação dos resultados obtidos com o luminômetro proposto com dados da literatura é apresentada na Tabela 2.

O dispositivo para medidas por quimiluminescência pode ser facilmente construído, com custo estimado em R\$ 450,00 (US\$ 150,00). Foram observadas algumas características favoráveis em comparação com equipamentos comercialmente disponíveis que empregam fotomultiplicadoras, como a maior robustez, menor tamanho e baixo consumo de energia. Estas características são compatíveis com o emprego do instrumento para medidas fora do laboratório como, por exemplo, medidas em campo. Adicionalmente, o dispositivo é bastante atraente para uso em sistemas miniaturizados ou em procedimentos que envolvam o uso de reagentes sólidos⁹, que podem ser diretamente imobilizados na área de observação da cela de fluxo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências FAPESP, CAPES e CNPq pelas bolsas e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Robards, K.; Worsfold, P. J.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 266, 147.
- Dodeigne, C.; Lejeune, T. R.; *Talanta* **1994**, 51, 415.
- Lewis, S. W.; Price, D.; Worsfold, P. J.; *J. Biolumin. Chemilumin.* **1993**, 8, 183.
- Simpson, M. L.; Sayler, G. S.; Patterson, G.; Nivens, D. E.; Bolton, E. K.; Rochelle, J. M.; Arnott, J. C.; Applegate, B. M.; Ripp, S.; Guillorn, M. A.; *Sens. Actuators B* **2001**, 72, 134.
- Reis, B. F.; Rocha, F. R. P.; Teixeira, L. S. G.; Costa, A. C. S.; Korn, M.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 116.
- Shaw, F.; *Analyst* **1980**, 105, 11.
- Bostick, D. T.; Hercules, D. M.; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 447.
- Collaudin, A. B.; Blum, L. J.; *Sens. Actuators, B* **1997**, 88-39, 189.
- Marshall, R. W.; Gibson, T. D.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 266, 309.
- Price, D.; Mantoura, R. F. C.; Worsfold, P. J.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 377, 145.
- Hayashi, K.; Sasaki, S.; Ikebukuro, K.; Karube, I.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 329, 127.
- Li, J.; Wang, K. M.; Yang, X. H.; Xiao, D.; *Anal. Commun.* **1999**, 36, 195.

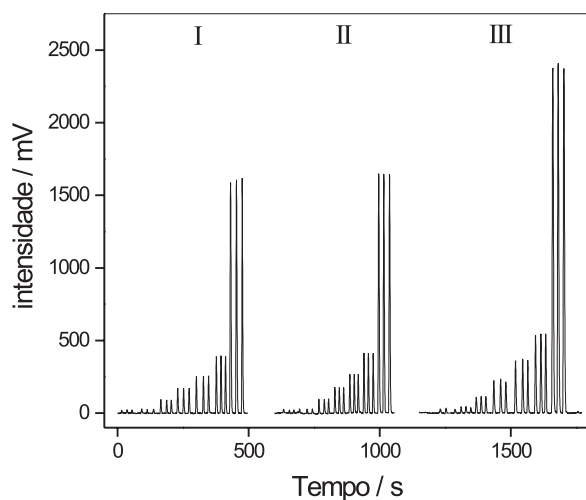


Figura 4. Sinais transientes obtidos com o sistema modelo empregando 1 (I e II) ou 2 fotodetectores (III). Da esquerda para direita, os sinais são referentes a três injeções de 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio