

ESPECTROFOTÔMETRO PARA MEDIÇÃO DE FOSFORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO APLICADO À MONITORIZAÇÃO DE OXIGÊNIO

F. K. Schneider¹ e P. M. Gewehr²

RESUMO -- Desenvolveu-se um instrumento opto-eletrônico para medir tempos de vida de fosforescência. Ele é aplicado para monitorar concentrações de oxigênio em soluções aquosas utilizando como indicadores porfirinas metálicas que fosforescem à temperatura ambiente. Essa técnica de medição possui vantagens sobre outras técnicas ópticas usadas para monitorar oxigênio, como, por exemplo, intensidade de fluorescência. O instrumento desenvolvido é composto de uma fonte óptica para uso pulsado, lentes e filtros para a seleção dos comprimentos de onda dos caminhos ópticos de excitação e emissão, uma válvula fotomultiplicadora acoplada a um amplificador, uma placa conversora A/D conectada a um micro-computador padrão IBM-PC e um programa desenvolvido em linguagem C. O instrumento desenvolvido é capaz de medir tempos de vida tão pequenos quanto 5 μ s (menor do que em outros instrumentos já descritos) e, além da aplicação deste trabalho, está sendo utilizado como base para o desenvolvimento de sensores de pressão parcial de oxigênio gasoso.

Palavras-chave: Opto-eletrônica. Fosforescência. Tempos de Vida, Sensores de Oxigênio.

INTRODUÇÃO

Há anos tem-se desenvolvido instrumentos e sensores capazes de auxiliar na monitorização de O₂, CO₂ e outros gases em função da importância dos mesmos para a vida humana. Instrumentos e sensores baseados em técnicas ópticas têm encontrado crescente interesse por apresentar vantagens em boa parte das aplicações. A técnica de medição de tempos de vida de luminescência (fosforescência e fluorescência) aplicada à monitorização de oxigênio tem tido particular interesse, pois possui sensibilidade adequada e relativa imunidade a interferências. Enquanto o fenômeno de fluorescência apresenta tempos de decaimento da ordem de nanosegundos, os relacionados à fosforescência são da ordem de microsegundos a milissegundos e até segundos (Lewis e Kasha, 1944). A fluorescência (em termos de intensidade) tem sido, em geral, mais utilizada do que a fosforescência, para a análise de parâmetros biológicos (Lübbers e Opitz, 1983; Longmuir e Knopp, 1976; Peterson e Vurek, 1984; Gehrich *et alii*, 1986). Isso se deve, pelo menos em parte, a dois fatores. Primeiro, apesar da fosforescência já ter sido observada por Boudin (eosin em glicerol) em 1930 (Vanderkooi e Berger, 1989) e por Kautsky (1939) em soluções sem oxigênio, a sua intensidade era muito reduzida à temperatura ambiente, obrigando ao resfriamento das substâncias

¹ Prof. M. Sc. do Departamento de Eletrônica do CEFET-PR

² Prof. Dr. do Departamento de Eletrônica/CPGEI do CEFET-PR

Av. 7 de setembro 3165, 80230-901, Curitiba-PR, Email: gewehr@cpgei.cefetpr.br

em estudo a temperaturas da ordem de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. O segundo diz respeito à falta de instrumentos com tecnologia adequada que possibilitassem a utilização da técnica de excitação pulsada para a medição do decaimento de fosforescência. Recentemente, face ao desenvolvimento de instrumentos mais apropriados e síntese de compostos que fosforescem à temperatura ambiente, tem-se estudado extensivamente a luminescência dessas substâncias e suas aplicações (Vanderkooi *et alii*, 1987; Kalyanasundaram e Neumann-Spallart, 1982; Papkovsky, 1995).

Nos estudos de emissão de fosforescência, observou-se uma relação entre a quantidade de moléculas de oxigênio presentes no meio e o nível de luminescência emitida, o que possibilitou a quantificação de oxigênio em função da extinção da fosforescência (Vanderkooi e Berger, 1989). As vantagens da utilização da fosforescência como método analítico para a determinação de oxigênio, i. e., maior sensibilidade do que a fluorescência devido principalmente ao maior tempo de interação entre moléculas, aliado à necessidade de um instrumento com características de portabilidade, baixa complexidade e especialmente baixo custo, motivaram o desenvolvimento do presente trabalho. Assim, desenvolveu-se um sistema opto-eletrônico capaz de excitar substâncias indicadoras e medir seus tempos de vida de fosforescência para quantificar o O_2 presente no meio de medição (soluções aquosas). Neste artigo, além das medições de oxigênio, apresenta-se o desenvolvimento do sistema óptico formado por: uma fonte de luz para excitação pulsada de substâncias fosforescentes à temperatura ambiente; uma câmara de amostras com filtros, cubeta e lente ópticos; um sistema de transdução opto-eletrônico baseado em válvula fotomultiplicadora; amplificador; conversor A/D para a digitalização do sinal e; *software* de controle do sistema e tratamento matemático do sinal de fosforescência. O sistema é controlado por um micro-computador cujos programas de controle e tratamento de sinal foram desenvolvidos em linguagem C.

INSTRUMENTO DESENVOLVIDO

Considerando as necessidades de um instrumento para luminescência (Fleming, 1982) e as particularidades para a determinação dos tempos de vida de fosforescência, optou-se pelo instrumento apresentado sob a forma de diagrama em blocos da Figura 1. O instrumento é composto por: (1) fonte de energia radiante de excitação, (2) filtros de seleção para o comprimento de onda de absorção máxima da(s) substância(s) fosforescente(s), (3) câmara para verificação de fosforescência, (4) lente convergente e filtros de seleção para o comprimento de onda de emissão máxima de fosforescência, (5) transdutor opto-eletrônico, (6) *hardware* para adequação do sinal elétrico, (7) conversor analógico digital (A/D), (8) micro-computador (padrão IBM PC AT-486) e *hardware* para geração de sinal de disparo da lâmpada.

Fonte óptica

Utilizou-se como fonte uma lâmpada xenon de arco curto tipo FX-249 (EG&G, USA) para excitação pulsada. Esta lâmpada emite uma energia por pulso até 7 J, operando com tensões de até 1500 V e taxas de repetição de até 500 Hz. A faixa espectral estende-se de 310 a 1100 nm, o que a torna útil não só para a excitação das substâncias desta aplicação como também para outras, obtendo-se maior versatilidade no projeto. A distribuição espectral de energia radiante apresenta alta concentração próxima a 400 nm (EG&G, 1992), i. e., na faixa de comprimentos de onda mais sensível para excitação das substâncias utilizadas neste trabalho. A lâmpada possui um encapsulamento metálico com uma janela em vidro que direciona a saída da energia radiante, o que

facilita o seu acoplamento a fibras ópticas. Faz ainda parte da fonte óptica, uma fonte de alimentação tipo PS-302 (EG&G, USA), a qual apresenta tensão de saída regulável entre 400 e 1500 V e um transformador tipo FY-712 (EG&G, USA) para disparo da lâmpada. O esquema de disparo e controle de energia fornecida por pulso é mostrado na Figura 2.

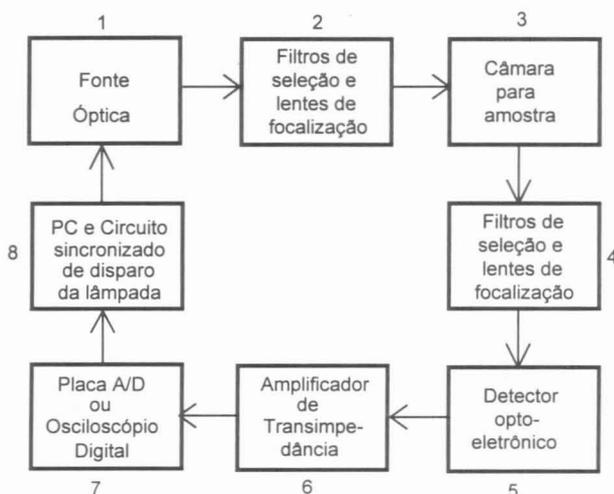


Figura 1 - Diagrama em blocos do instrumento desenvolvido para medição de tempos de vida de fosforescência.

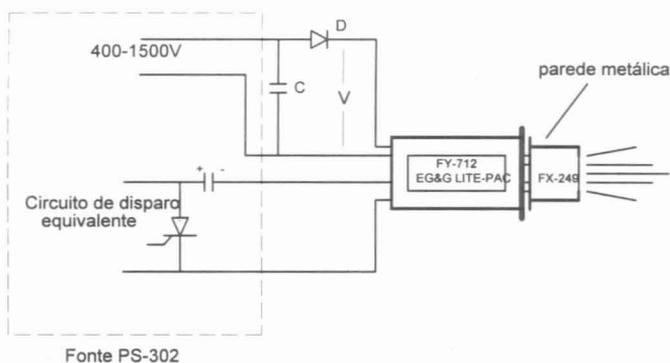


Figura 2 - Circuito da fonte de energia radiante com fonte de alimentação PS-302, transformador FY-712 e lâmpada xenon tipo FX-249 para excitação pulsada (todos da EG&G, USA).

A energia luminosa e a duração do pulso fornecidos pela fonte óptica são controlados pela tensão de alimentação e/ou pela capacitância utilizada ($E = \frac{1}{2} CV^2$). A duração do pulso também é influenciada pela indutância intrínseca do sistema. O diodo D (Figura 2) é recomendado pelo fabricante da lâmpada para o disparo otimizado quando tensões menores de 500 V são utilizadas. Todos os componentes da fonte óptica foram montados em uma caixa metálica reduzindo-se interferências, conforme a Figura 3. Usinaram-se diversas peças metálicas para o suporte e dissipação de calor da lâmpada, além de uma câmara para suporte dos filtros ópticos de excitação. Desenvolveu-se também uma placa de fiação impressa para fixação de capacitores, viabilizando a seleção de várias combinações deles, proporcionando assim capacitâncias diferentes de acordo com a energia desejada por pulso e tensão aplicada.

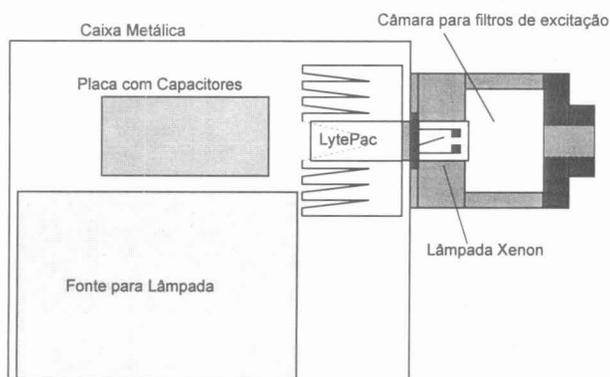


Figura 3 - Vista de topo da fonte óptica desenvolvida, acoplada à câmara para filtros.

Componentes Ópticos/Câmara de Testes

No caminho óptico de excitação utilizou-se um filtro tipo BG-25 (alta transmissão abaixo de 450 nm) e um filtro de interferência com transmitância máxima próxima de 400 nm (Rolyn Optics, USA). No caminho óptico de emissão utilizou-se um filtro tipo OG-590 (transmitância alta a partir de 590 nm) e um filtro de interferência com transmitância máxima próxima de 680 nm (Rolyn Optics, USA). Os filtros de emissão, juntos com uma lente para otimizar a coleta de luminescência da cubeta, estão situados na câmara de testes (Figura 4).

O arranjo implementado para fixar a cubeta, a lente e os filtros de emissão está também detalhado na Figura 4. Na saída da câmara apresenta-se a válvula fotomultiplicadora. Para ela, usinou-se uma peça em alumínio, a qual serve como invólucro e proporciona isolamento óptico e elétrico. O posicionamento da lente foi feito de forma a tornar a radiação incidente no filtro de interferência perpendicular à superfície do mesmo. Todas as arestas internas do invólucro da Figura 4 foram vedadas com borracha de silicone e as paredes internas pintadas em preto fosco.

Cubeta -- Para os testes com as substâncias utilizou-se uma cubeta do tipo 111-OS (Hellma, Brasil) com transmissão acima de 80 % na faixa de 360 a 2500 nm, com rolha de vedação (*stopper*)

de teflon (Figura 5). A rolha de teflon foi utilizada com a intenção de evitar uma interação rápida entre o gás dissolvido na solução da cubeta e o meio externo. Para realizar medições de concentrações de oxigênio em meio aquoso, controlou-se quantitativamente o gás no interior da cubeta. Para isso, borbulhou-se na solução uma mistura gasosa (usualmente N_2 e O_2) com concentrações conhecidas, através de agulhas de aço inoxidável (Figura 5, à direita) fixadas na tampa de teflon, uma para a entrada e outra para a saída do gás. As agulhas foram dispostas de modo que não houvesse obstrução do caminho óptico e nem servissem como meio de reflexão. Durante um intervalo de medição e outro, o nível de líquido era verificado e, se necessário, completado para manter a mesma concentração da substância fosforescente.

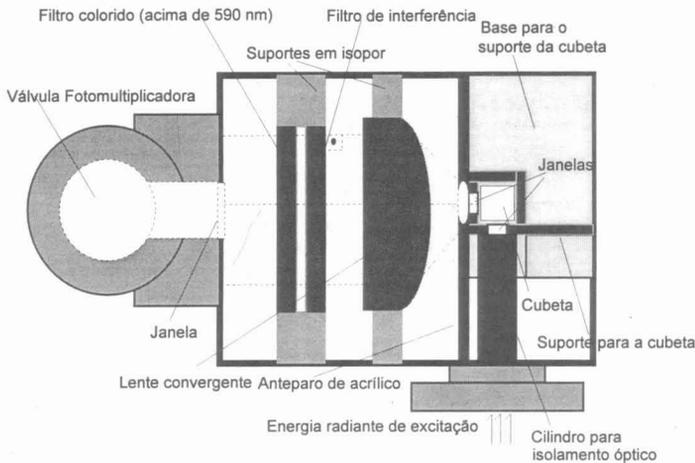


Figura 4 - Vista de topo da câmara de testes.

Válvula fotomultiplicadora

A válvula fotomultiplicadora utilizada é do tipo janela lateral R928 (Hamamatsu, USA), com tempo de subida de 2,2 ns e resposta espectral de 190 a 900 nm. Para a polarização da válvula utilizou-se o conversor DC-DC tipo C1309-04 (Hamamatsu, USA) com tensão de entrada de 13 a 24 V e corrente de 160 mA. A tensão de saída é regulada entre 190 e 1100 V (Hamamatsu, 1994).

Amplificador de Transimpedância

O amplificador de transimpedância converte a corrente de entrada (I_e) proveniente da válvula fotomultiplicadora para uma tensão de saída (V_s), conforme a equação (Stout e Kaufman, 1976):

$$V_s = -R \cdot I_e \quad (1)$$

onde: R é o resistor de realimentação.

O circuito do amplificador foi projetado em fiação impressa conforme a Figura 6, e montado numa caixa metálica com o objetivo de proporcionar blindagem. O circuito possui capacitores para estabilizar a tensão de alimentação, diodos de proteção na entrada (1N 4148) e diodo zener para limitação da tensão de saída. O amplificador operacional utilizado (OP 627, Burr Brown) possui baixa corrente de *offset* (10 pA), alta impedância de entrada com baixo valor capacitivo ($10^{13} \Omega$, 8 pF), alto ganho de malha aberta (106 dB), ampla largura de banda de 16 MHz assim como alta taxa de variação da tensão de saída ($40 \text{ V}/\mu\text{s}$) para ganho em configuração inversor unitário. O circuito foi projetado com um resistor de realimentação variável até $1 \text{ M}\Omega$ (R_1), pela necessidade prática de se alterar o ganho do amplificador para variar a tensão de saída até excursão máxima. A introdução do capacitor ($C=4,7 \text{ pF}$) na malha de realimentação proporciona maior imunidade a ruídos, mas altera o ganho e o tempo de resposta do circuito. Este foi ajustado usualmente para $1 \mu\text{s}$.

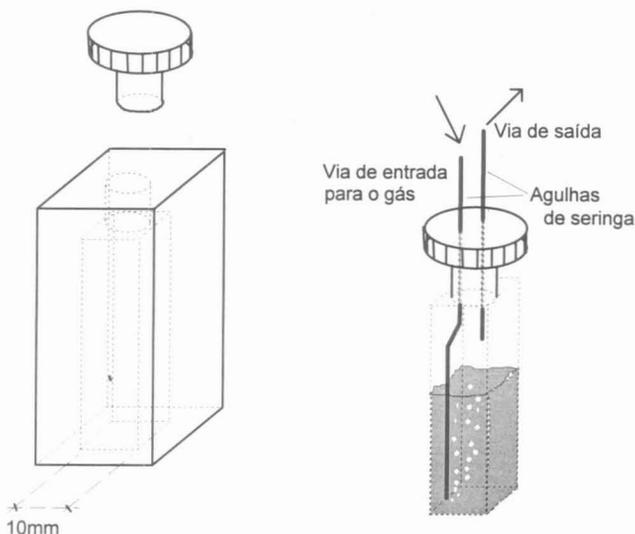


Figura 5 - Cubeta utilizada para análise de luminescência. À direita, as modificações efetuadas para as determinações de O_2 dissolvido em soluções aquosas.

Digitalização e tratamento do sinal

A digitalização do sinal de tensão de saída do amplificador de transimpedância foi efetuada via um conversor A/D. Inicialmente, utilizou-se como conversor um osciloscópio digital (TDS-420, Tektronix) conectado ao microcomputador via interface IEEE-488 (GPIB). Posteriormente, a placa conversora A/D (Flash-12(1), Strawberry Tree, USA) foi utilizada acoplada diretamente à placa mãe do microcomputador realizando a comunicação de dados via barramento da placa. Esta opção é mais veloz no que diz respeito à comunicação de dados.

Tratamento do sinal -- Na digitalização com a placa conversora A/D (resolução de 12 bits), utilizou-se 1 canal analógico com taxa de amostragem de 1 MHz. A placa possui várias características que a tornam versátil, tais como: contador interno de 16 bits, linha de habilitação de conversão (*gate*), memória para 65536 amostras possibilitando o armazenamento de grande quantidade de informação. Com isso é possível a transferência de grandes blocos de dados digitalizados, a partir da memória da placa para a memória do computador. O programa de controle da placa e tratamento matemático dos dados digitalizados foi desenvolvido em linguagem C (Noronha *et alii*, 1996), utilizando as fontes fornecidas pelo fabricante da placa. Os objetivos do programa são, basicamente: gerar um pulso de disparo para a lâmpada e sincronizar a aquisição de dados com o mesmo, descartar pontos onde há sobreposição no tempo dos sinais de excitação e de fosforescência (vide Figura 8) e, calcular uma curva exponencial que melhor se ajuste aos pontos, obtendo-se a constante de decaimento dela, a qual proporciona a quantificação de oxigênio através da relação de Stern-Volmer (vide Equação (3)).

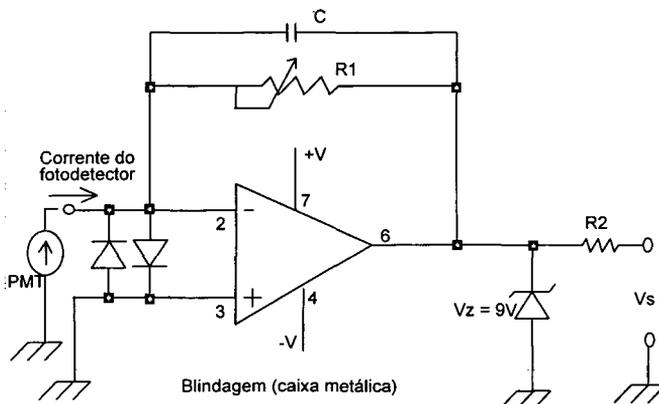


Figura 6 - Circuito do amplificador de transimpedância implementado.

Circuitos para sincronismo de aquisição de dados – O contador interno da placa A/D pode ser usado para gerar pulsos de disparo para a lâmpada com períodos entre disparos controlados pelo programa. Com o contador é possível dividir a frequência do sinal de *clock* de entrada (interno ou externo) por um fator que varia de 2 a 65536. A frequência do sinal interno de *clock* é de 2 MHz, gerando pulsos com uma frequência de aproximadamente 30 Hz a 1 MHz. O uso desse sinal de 2 MHz, entretanto, implica em limitações. Uma é que o pulso gerado na saída digital do contador possui um intervalo de tempo para o qual está em nível "1" igual ao intervalo de tempo para o qual um pulso de sinal de *clock* está em nível "1". O pulso para o disparo da lâmpada teria então uma duração de 0,5 μ s, o que não cumpre a necessidade de disparo dela (de 1 a 100 μ s). Outra, refere-se ao fato de se poder trabalhar com uma quantidade menor de pulsos por segundo. Por esse motivo implementou-se um circuito astável (CI 555) capaz de gerar um sinal de *clock* externo para o contador com frequência variável entre 15 kHz e 200 kHz. A frequência desse circuito astável foi ajustada para 150 kHz o que proporciona uma frequência de pulsos entre, aproximadamente 2,2 Hz a 75 kHz. Assim, obtém-se um tempo ajustável para nível de tensão alto e outro para nível de tensão

baixo dados pelos componentes (resistores e capacitor) do circuito astável. Como para o astável implementado, o tempo em nível alto é sempre maior ou igual ao tempo em nível baixo, e deseja-se um intervalo de tempo em nível alto da ordem de microsegundos para o disparo da lâmpada, inverteu-se o sinal de saída do circuito astável.

Implementou-se ainda um circuito (esquema na Figura 7) que permite o sincronismo da digitalização de dados com o pulso de disparo e a exclusão da região onde há sobreposição dos sinais de excitação e de fosforescência (vide Figura 8(a)). Obteve-se um sinal em que, decorrido um certo tempo após o disparo da lâmpada, um nível "1" é gerado (conforme as necessidades da fonte óptica) e a conversão analógico-digital é habilitada. Este sinal é acoplado ao sinal (*gate*) de controle de conversão da placa. O circuito desenvolvido, para sincronismo e controle da digitalização, é composto por dois monoestáveis. A duração do pulso gerado para cada sinal no pino de disparo é dado por componentes passivos (resistores e capacitores) e não mostrados na Figura 7. Observa-se que o tempo para o qual a substância está fosforescendo (alguns ms, no máximo) é muito menor que o tempo entre dois pulsos de lâmpada (e. g., 20 pulsos por segundo proporciona um intervalo de 50 ms entre pulsos).

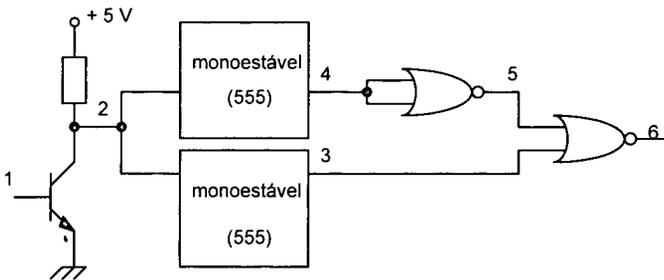


Figura 7 - Circuito para sincronismo e controle da digitalização. Os números de 1 a 6 indicam os sinais da Figura 8 (vide explicações no texto).

O sinal 1 das Figuras 7 e 8(b) é o pulso gerado para o disparo da lâmpada pelo contador da placa conversora A/D cujo *clock* é o sinal de saída do circuito astável ou o próprio sinal de *clock* interno da placa. Esse sinal é invertido, gerando o sinal 2, para adequá-lo como sinal de disparo para os circuitos monoestáveis. O monoestável inferior cria o sinal 3 que determina o tempo de atraso entre o disparo da lâmpada e o início da digitalização do sinal de fosforescência. O outro monoestável gera o sinal 4 que com o sinal 3 é utilizado para gerar uma janela de habilitação para a digitalização (sinal 6). Esse sinal (6) tem duas funções: (a) inicializar a digitalização algum tempo depois de ter ocorrido o pulso da lâmpada. Isto serve para eliminar os pontos iniciais do sinal adquirido pela válvula fotomultiplicadora. Esta característica é útil pois elimina a parte do sinal de fosforescência mascarada com a radiação de excitação proveniente da lâmpada que pode chegar à válvula. O tempo de atraso é assim controlado e deve ser no mínimo igual ao tempo de duração do pulso da lâmpada; (b) controlar o tempo em que a placa faz a digitalização, fazendo-o coincidir com a região de interesse da fosforescência do sinal proveniente da válvula fotomultiplicadora. Como a taxa de amostragem da placa é 1 MHz (período de 1 μ s) e a memória para armazenar dados na placa

é de somente 65536 bytes, isto significa que, se a placa permanecesse constantemente digitalizando e armazenando, a cada 65,5 ms os dados adquiridos estariam sendo substituídos por outros dados. Isto traz duas consequências indesejáveis. A primeira é que se deveria fazer a leitura de todos os dados digitalizados antes que os mesmos se perdessem, implicando em muitos acessos de leitura na placa. A segunda é que se teria de selecionar a informação de interesse, a qual seria aproximadamente 4 % do total dos dados lidos da placa (caso a frequência de disparo fosse 20 Hz e o decaimento do sinal de fosforescência de aproximadamente 2 ms). Assim, o sinal de controle minimiza o trabalho de processamento de informação por parte do computador, funcionando como um filtro que seleciona apenas as informações de interesse para a digitalização.

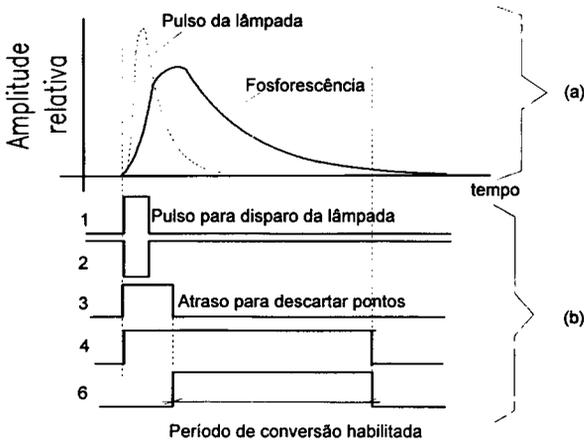


Figura 8 - Sinais de controle para o sincronismo do pulso de excitação da lâmpada e a digitalização do sinal de fosforescência conforme indicação da Figura 7 (vide explicações no texto).

Cálculo dos tempos de vida de fosforescência -- Para a determinação do tempo de vida de fosforescência, utilizou-se o ajuste da curva média obtida através de uma única exponencial que melhor caracteriza os dados digitalizados (Dyke e Muentner, 1975). O cálculo do tempo de vida através do ajuste de uma exponencial diretamente aos dados é exato, mas em função das diversas iterações necessárias na execução do programa, acaba sendo um método que exige esforços computacionais e tempo de execução longo (em função do número de pontos dos dados). Alternativa e preferencialmente efetua-se o ajuste pela exponencial linearizada, caso em que a curva obtida de fosforescência deve ser uma exponencial simples do tipo $f(t) = A \cdot e^{-t/\tau}$. Dessa forma, o tempo de vida (τ), é determinado pela construção de $g(t) = \ln(f(t))$:

$$g(t) = \ln(A \cdot e^{-t/\tau}) = \ln A - (1/\tau) \cdot t \quad (2)$$

onde: A é uma constante e $(-1/\tau)$ é o coeficiente angular da reta decrescente $g(t)$. Calculando-se τ , é possível a determinação de oxigênio através da relação de Stern-Volmer (vide Equação (3)).

RESULTADOS

Arranjos Ópticos Implementados

Para o estudo de substâncias fosforescentes e para verificação dos filtros ópticos, utilizou-se um monocromador SpectraPro[®] 275 (Acton Research, USA). Esse monocromador possui uma unidade microprocessada que permite o controle local ou remoto (via interface RS-232) dos comprimentos de onda inicial e final, velocidade de varredura, etc., para as grades difratoras acopladas. Neste trabalho, utilizou-se a grade A com faixa de trabalho otimizada entre 200 e 450 nm e a grade B entre 330 e 750 nm. Os arranjos ópticos para a obtenção dos espectros de absorção e emissão de fosforescência são apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. O esquema da Figura 9 também foi utilizado para a obtenção da transmitância dos filtros do sistema. Como fonte de radiação, utilizou-se uma lâmpada de tungstênio com alimentação de 2,6 V. O monocromador é necessário nos esquemas, pois possibilita a varredura do espectro através da seleção de cada comprimento de onda de interesse. Na Figura 10 há um desalinhamento de 90° entre a fonte óptica e o fotodetector para a redução de radiação da fonte junto ao fotodetector.

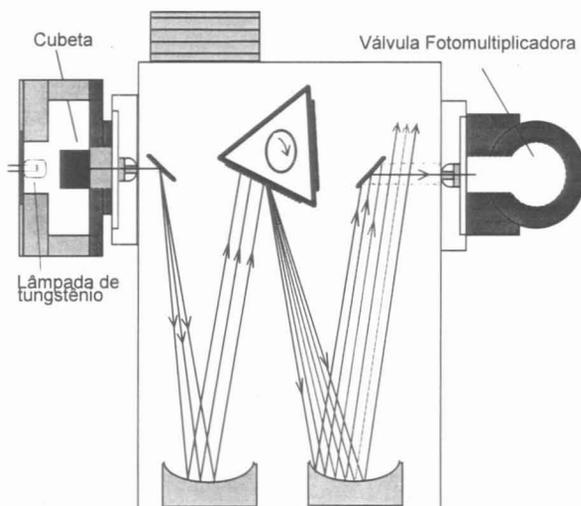


Figura 9 - Vista de topo do sistema óptico para análise espectral da absorbância das substâncias. Para os filtros, substituiu-se a cubeta por cada um deles.

A Figura 11 apresenta o esquema da parte óptica para as determinações de tempo de vida de fosforescência. Neste caso apenas filtros ópticos foram utilizados, tanto para a excitação quanto para a emissão, o que proporciona uma eficiência óptica maior, apesar de perda de seletividade. Outra vantagem é que os ganhos da válvula fotomultiplicadora e do amplificador de transimpedância podem estar em um nível mais baixo quando comparados às Figuras 9 e 10 (que utilizam o monocromador), proporcionando respectivamente menor ruído e menor distorção.

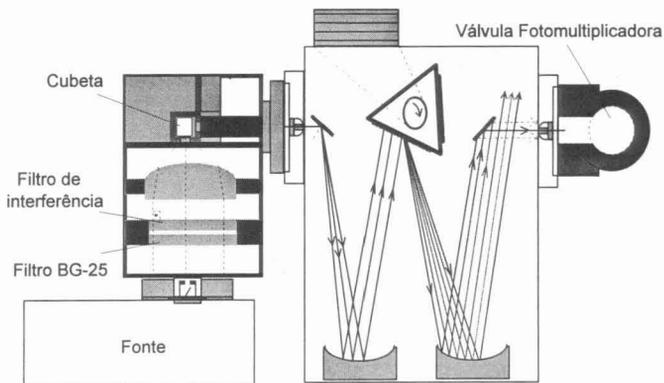


Figura 10 - Vista de topo do sistema óptico para análise espectral de emissão de fosforescência.

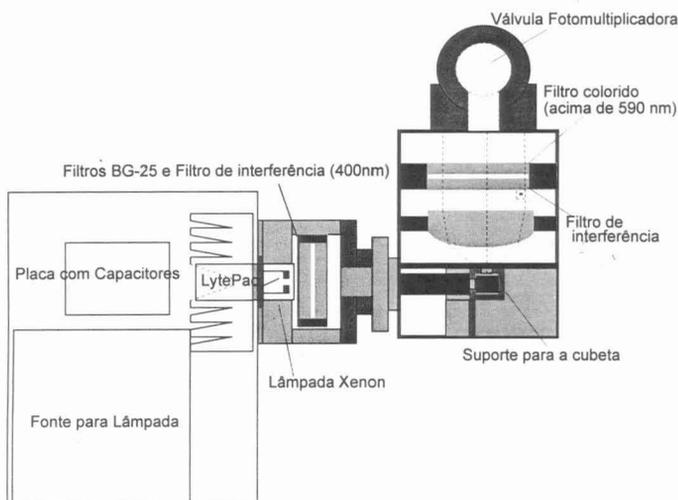


Figura 11 - Vista de topo do esquema óptico para medição de tempos de vida de fosforescência.

Desempenho do Instrumento

A fonte óptica desenvolvida apresentou um pulso com duração típica de $1 \mu\text{s}$ (*Full Width at Half Maximum*), conforme a Figura 12. Esse pulso foi considerado satisfatório pois a energia radiante obtida de $0,28 \text{ J}$ ($C=330,8 \text{ nF}$, $V=1300 \text{ V}$) é suficiente para a excitação das substâncias. Com essa duração, medições de tempos de vida de fosforescência da ordem de até $5 \mu\text{s}$ podem ser efetuadas, apesar de um pequeno sinal de sobreposição proveniente da fonte. Para valores acima de $15 \mu\text{s}$, a análise se torna praticamente imune ao sinal da fonte, aumentando a exatidão. Com a

duração de pulso acima, calculou-se uma indutância intrínseca dos dispositivos utilizados na fonte de $0,4 \mu\text{H}$, valor próximo do estimado pelo fabricante de $0,5 \mu\text{H}$ (EG&G, 1992).

Para as determinações de transmitância de cada filtro óptico (Figura 9), ajustou-se o ganho do amplificador de transimpedância na saída da válvula para um sinal máximo sem distorção na ausência de filtros no caminho óptico. Obteve-se uma curva espectral na faixa de 350 a 850 nm com passos de $0,2 \text{ nm}$ (fendas do monocromador com $0,3 \text{ mm}$). Essa curva é a resposta do sistema óptico empregado (lâmpada de tungstênio + grade difratora + válvula). Na sequência, para cada filtro óptico colocado na câmara na entrada do monocromador, efetuou-se uma varredura para a mesma região espectral acima especificada. Dividiu-se, então, as curvas obtidas com cada um dos filtros pela curva do sistema a vazio, obtendo-se a transmitância espectral relativa de cada filtro.

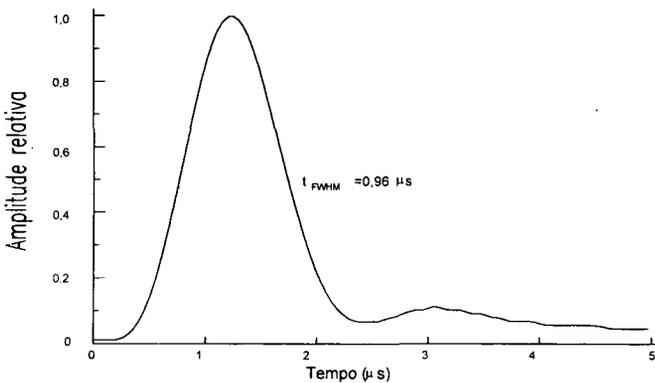


Figura 12 - Pulso típico da fonte óptica, obtido com o arranjo da Figura 11.

As Figuras 13 e 14 apresentam as curvas de transmitância dos filtros ópticos situados na excitação e emissão. As curvas são apresentadas em escala logarítmica (esquerda) e linear (direita). Aquela é útil para mostrar com detalhes as regiões em que as transmitâncias são reduzidas, porém suficientes para introduzir radiação indesejável no registro da fosforescência. As transmitâncias dos caminhos ópticos de excitação (Figura 13) e de emissão (Figura 14) mostraram-se adequadas para a aplicação desejada do instrumento pois a excitação deve ser feita na região próxima a 400 nm e a emissão de fosforescência deve ser registrada na região próxima a 670 nm (Pd coproporfirina) e 700 nm (Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina). Observa-se que pela substituição dos filtros, o instrumento pode ser utilizado para outras substâncias.

Monitorização de Oxigênio

Com o intuito de avaliar o instrumento como um todo e validar a técnica de medição, discute-se a seguir a aplicação do protótipo desenvolvido na medição de tempos de vida de fosforescência para a monitorização de concentrações de oxigênio. Para a determinação de O_2 utilizou-se a relação de Stern-Volmer modificada (Gewehr e Delpy, 1993):

$$\tau_0/\tau = 1 + \tau_0 \cdot kq \cdot [O_2] \quad (3)$$

onde: τ_0 e τ são os tempos de vida de fosforescência na ausência e na presença de uma concentração de oxigênio $[O_2]$ e, kq é constante para certas condições experimentais e conhecida como taxa de extinção (Vanderkooi *et alii*, 1987).

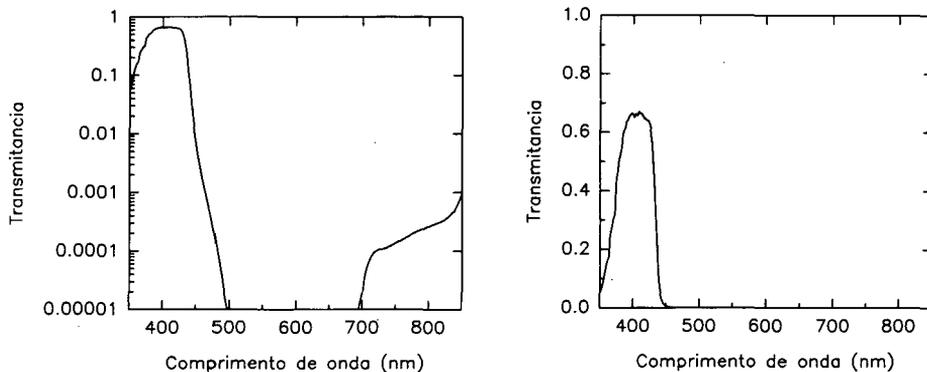


Figura 13 - Resposta total de transmitância para o caminho óptico de excitação com os dois filtros utilizados. Escala logarítmica (esquerda) e escala linear (direita).

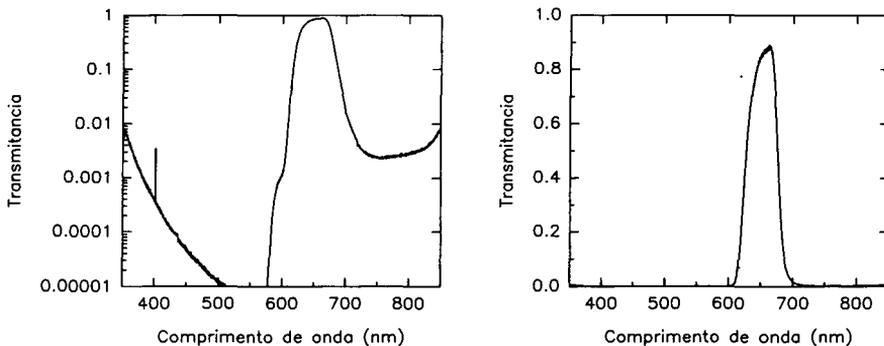


Figura 14 - Resposta total de transmitância para o caminho óptico de emissão com os dois filtros utilizados. Escala logarítmica (esquerda) e escala linear (direita).

Para a verificação da relação de Stern-Volmer, medem-se os tempos de vida para várias concentrações de oxigênio, incluindo 0 %. Para isso, um conjunto de 6 cilindros com diferentes concentrações de oxigênio e nitrogênio foram empregados. Nitrogênio a 100 % é usado para satisfazer a situação “sem oxigênio”, uma vez que ele não causa extinção de fosforescência e faz

parte da composição do ar respirado. Gases em cilindros foram adquiridos (White Martins) com as composições apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos gases utilizados.

Gás	Padrão	Oxigênio (%)	Nitrogênio (%)	Oxigênio (%) mínimo	Nitrogênio (%) mínimo
Oxigênio	comercial	--	--	99,5	--
Mistura 1	calibração	1,0	99,0	--	--
Mistura 2	calibração	4,8	95,2	--	--
Mistura 3	calibração	10,1	89,9	--	--
Nitrogênio	comercial	--	--	--	99,5
Nitrogênio	analítico 5.0	<0,0001	99,999	--	--

Absorção e Emissão das Substâncias -- Utilizaram-se as substâncias fosforescentes: Pd coproporfirina e Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina, ambas adquiridas da Porphyrin Products (USA). Os solventes para a preparação das soluções aquosas com as substâncias foram água destilada, dimetilformamida (DMF) e glicerol. Para padronização do pH ($7,2 \pm 0,03$ a 25°C), utilizou-se uma solução *buffer* padrão. Utilizou-se ainda BSA (bovine serum albumin - albumina bovina) da Pearce (USA), a qual inibe a extinção da fosforescência pelo O_2 (Vanderkooi *et alii*, 1987).

Para obtenção das curvas de absorção e emissão de Pd coproporfirina, preparou-se uma solução com 67,74 % de DMF, 29,03 % de H_2O e aproximadamente 3,22 % de solução *buffer* para ajuste de pH. A densidade óptica (*Optical Density*) medida foi 2,36 (389,8 nm). A Figura 15 apresenta a curva de absorção na faixa do espectro entre 350 e 850 nm, obtida com a grade B do monocromador. A localização (390,0, 510,8 e 544,6 nm) e forma dos picos são semelhantes às obtidas anteriormente por Gewehr (1991). A Figura 16 apresenta a curva de emissão de fosforescência obtida com pico próximo de 667 nm. Para a sua obtenção, em função do baixo rendimento óptico do arranjo utilizado (Figura 10), aumentou-se a largura das fendas de entrada e saída do monocromador para 2,5 mm e borbulhou-se gás com concentração baixa de oxigênio por alguns minutos na solução para aumentar a intensidade do sinal de fosforescência.

Para obtenção das curvas de absorção e emissão (não mostradas) de Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina, preparou-se uma solução com composição percentual dos solventes idêntica àquela com Pd coproporfirina. A densidade óptica medida foi 2,49 (422,4 nm). A curva de absorção foi obtida com a grade B do monocromador, entre 350 e 850 nm. A localização (422,2 e 523,2 nm) e forma dos picos são semelhantes às obtidas por Kalyanasundaram e Neumann-Spallart (1982) para

a substância dissolvida em DMF (90 %) e H₂O destilada (10 %). A curva de emissão obtida com a solução de Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina apresentou pico principal em 701,0 nm.

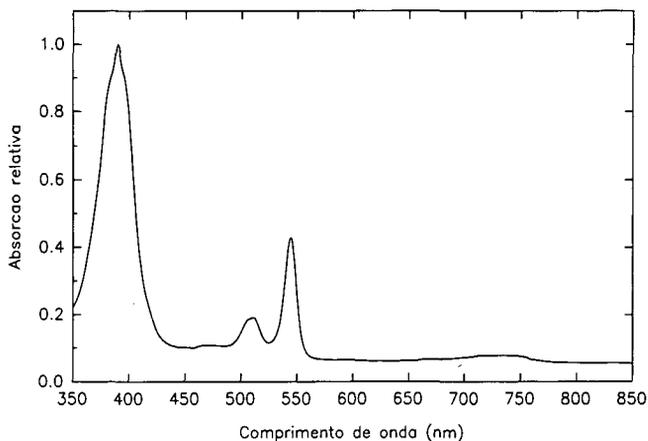


Figura 15 - Espectro corrigido de absorção de solução com Pd coproporfirina (67,74% de DMF, 29,03 % de H₂O) obtido com o arranjo da Figura 9. Picos de absorção em 390,0, 510,8 e 544,6 nm.

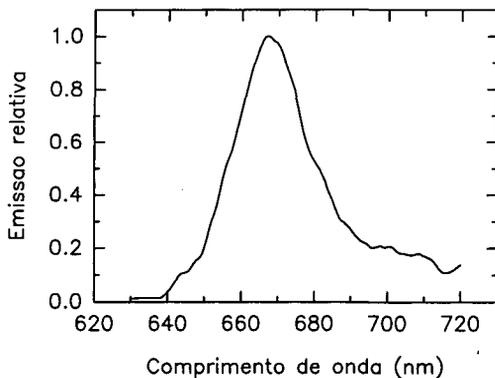


Figura 16 - Espectro de emissão de solução com Pd coproporfirina obtido com o arranjo da Figura 10. Pico de emissão obtido em 667,8 nm.

Oxigênio como Extintor de Fosforescência -- Para a monitorização de oxigênio em soluções aquosas utilizou-se o arranjo óptico da Figura 11, com a digitalização do sinal feita pela placa conversora A/D. Após as curvas de fosforescência terem sido adquiridas (média de 20),

determinavam-se os parâmetros da exponencial linearizada (amplitude e constante de decaimento) por ajuste e calculava-se o coeficiente de regressão. Com as composições gasosas da Tabela 1, realizaram-se as medições de tempos de vida de fosforescência após se borbulhar o gás por pelo menos 5 minutos nas soluções com água e DMF e, por mais de 30 minutos para as soluções com glicerol. As composições das soluções para esses experimentos são apresentadas junto às figuras assim como outros detalhes.

A Figura 17 mostra a relação de Stern-Volmer obtida para uma solução de Pd coproporfirina. Foi possível, nesse caso, a medição de tempos de vida para até 10,1 % de $[O_2]$. Além desse valor, há o limite do limiar do instrumento de aproximadamente 5 μs .

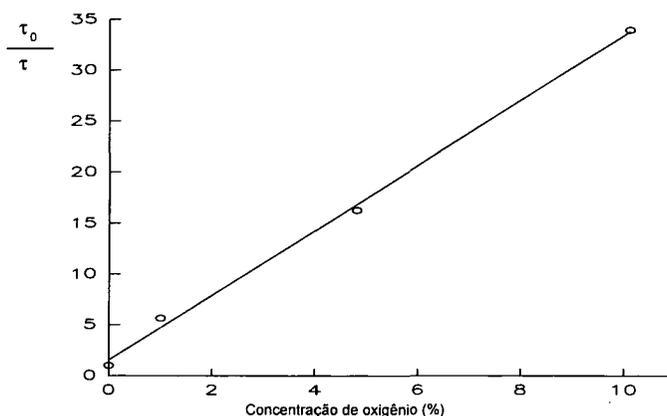


Figura 17 - Relação de Stern-Volmer para Pd coproporfirina (87,21 % H_2O , 12,78 % DMF) com pH 7,2. O.D. = 0,213 (389,8 nm). $T = 20^\circ C$. $\tau_0 = 153,38 \mu s$. $\tau_0/\tau = 1 + 3,259 \cdot [O_2]$.

O coeficiente de Stern-Volmer (3,259) foi obtido a partir do cálculo da reta de ajuste (mínimos quadrados) para os pontos obtidos da Figura 17. Para a mistura gasosa “nitrogênio padrão comercial” cuja concentração de O_2 é desconhecida, o tempo de vida de fosforescência medido foi de $\tau_x = 108,12 \mu s$. Com o coeficiente da reta, obtém-se a concentração de oxigênio de 0,128 % para essa mistura. A Tabela 2 resume os tempos de vida de fosforescência obtidos para os dados da Figura 17 e os valores calculados dos coeficientes de correlação. Devido a limitação do programa desenvolvido em linguagem C, utilizou-se um bloco de 64 kbytes para os dados manipulados pelo programa. Isso restringe a manipulação de dados provenientes da placa A/D em aproximadamente 44 kbytes, possibilitando o uso de até uns 11.000 dados convertidos (11.000 x 4 bytes por valor digitalizado). Portanto, houve uma solução de compromisso entre o número de curvas para gerar a exponencial média e o número de pontos considerados em cada exponencial. A correlação tende a ser melhor quanto maior for o número de curvas utilizadas para gerar a média, pois isto reduz a influência do ruído presente no sinal. Para tempos de vida pequenos, o número de pontos para o cálculo foi reduzido pois há a influência da fonte e a relação sinal/ruído é muito baixa.

Tabela 2 - Tempos de vida de fosforescência para a solução de Pd coproporfirina da Figura 17.

[O ₂] (%)	τ (μ s)	Correlação	Curvas x pontos
0	153,38	0,999	30 x 200
x	108,12	0,999	30 x 200
1	27,14	0,999	60 x 40
4,8	9,42	0,998	100 x 15
10,1	4,52	0,983	100 x 8

Com o objetivo de verificar a relação de Stern-Volmer para diferentes soluções e também utilizar a outra substância fosforescente, mais experimentos foram efetuados. O primeiro experimento, cujos resultados são apresentados na Figura 18 e Tabela 3, mostra o efeito de um solvente com maior viscosidade (glicerol) em conjunto com o indicador Pd coproporfirina. O tempo de vida de fosforescência é diretamente proporcional ao coeficiente de viscosidade (Vanderkooi e Berger, 1989). Na Tabela 3 apresentam-se tempos de decaimento medidos para a solução da Figura 18, composta de 13,5 % H₂O, 0,7 % DMF e 85,7 % glicerol. O aumento do tempo de vida proporcionou uma maior faixa de utilização do sistema para a medição de [O₂]. Para o caso anterior, a maior concentração para a qual se mediu tempo de vida foi 10,1 % de oxigênio, no limiar do instrumento. Neste caso, pode-se medir concentrações de até 100 %. Em contrapartida, aumentou o tempo necessário de borbulhamento das misturas gasosas para o equilíbrio pela menor capacidade de difusão do oxigênio nesse meio.

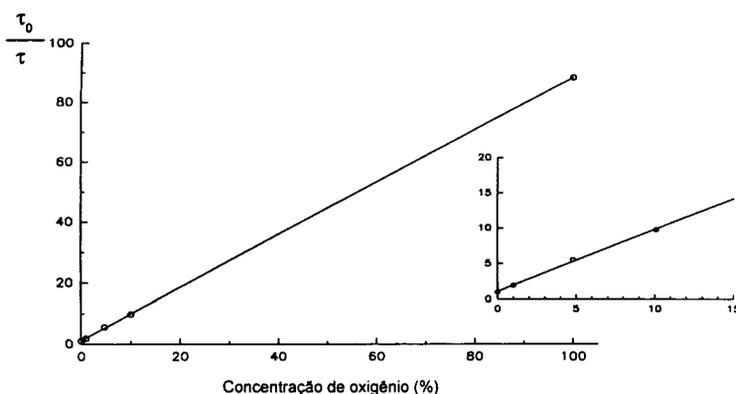


Figura 18 - Relação de Stern-Volmer para Pd coproporfirina (13,5 % H₂O, 0,7 % DMF, 85,7 % Glicerol) com pH 7,2. O.D. \approx 0,2 (389,8 nm). T = 20 °C. $\tau_0 = 912,79 \mu$ s. $\tau_0/\tau = 1 + 0,875 \cdot [O_2]$.

Na Figura 18, ampliou-se à direita, a região com maior número de pontos. A inclinação da reta (coeficiente angular) é menor para este caso do que para o anterior, o que significa uma menor sensibilidade de medição de oxigênio. Isto se deve a uma menor mobilidade das moléculas no meio aquoso contendo glicerol, o que implica em menor extinção de fosforescência (menor probabilidade de colisões intermoleculares).

Tabela 3 - Tempos de vida de fosforescência para a solução de Pd coproporfirina em glicerol da Figura 18.

[O ₂] (%)	τ (μ s)	Correlação	Curvas x pontos
0	912,79	0,999	10 x 740
1	469,208	0,999	8 x 720
4,8	163,89	0,999	20 x 300
10,1	93,162	0,999	20 x 180
100	10,32	0,999	80 x 20

Outro experimento foi efetuado com Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina. A solução foi preparada com as mesmas proporções de água e dimetilformamida que a solução de Pd coproporfirina da Figura 17. Embora os tempos de vida tenham sido equivalentes aos de Pd coproporfirina, a intensidade de fosforescência observada foi bem menor. Para medir a fosforescência, aumentou-se o ganho do amplificador de transimpedância em aproximadamente 65.000 vezes em relação a Pd coproporfirina.

Os resultados para Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina (Figura 19) mostram que a sensibilidade do método é diminuída na presença de proteínas como é o caso da albumina bovina (BSA). Vanderkooi *et alii* (1987) verificaram que os tempos de vida de fosforescência tornam-se independentes da densidade óptica da solução com o uso de BSA, enquanto que sem a mesma, o tempo de vida observado diminui à medida que aumenta a densidade óptica da solução analisada.

Os coeficientes angulares das retas de regressão obtidas para os dados da solução de Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina sem BSA e com BSA, são, respectivamente 2,978 e 1,776. Utilizando-se o tempo de vida medido para o gás "nitrogênio padrão comercial" e usando a equação da reta ajustada para a relação de Stern-Volmer da solução de Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina, obtém-se uma concentração de oxigênio de 0,124 %. Este valor é muito próximo daquele obtido (0,128 %) com os dados da Figura 17 para Pd coproporfirina, o que reforça a validade do método de medição.

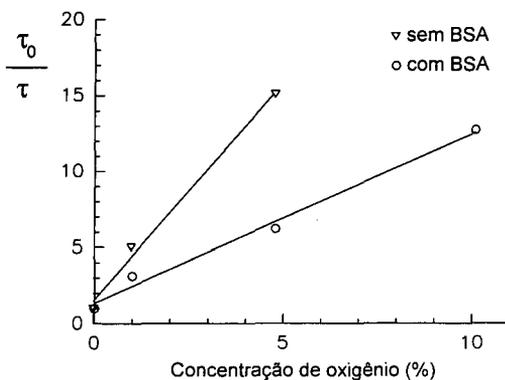


Figura 19 - Relação de Stern-Volmer para Pd-meso tetra (4-carboxifenil) porfina (87,21 % H₂O, 12,78 % DMF) com pH 7,2. O.D. \approx 0,2 (422,2 nm). ∇ - solução sem BSA apresentando $\tau_0 = 192,25 \mu\text{s}$, $\tau_x = 140,26 \mu\text{s}$, $\tau_1 = 38,42 \mu\text{s}$, $\tau_{4,8} = 12,75 \mu\text{s}$. \circ - solução com BSA apresentando $\tau_0 = 295,90 \mu\text{s}$, $\tau_1 = 94,70 \mu\text{s}$, $\tau_{4,8} = 47,72 \mu\text{s}$ e $\tau_{10,1} = 23,26 \mu\text{s}$. T = 22 °C.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um instrumento capaz de medir tempos de vida de fosforescência e aplicá-lo na monitorização de oxigênio em meios aquosos. Em termos de desempenho, o sistema é capaz de medir tempos de vida tão pequenos quanto 5 μs (contra 30 μs em outros sistemas, vide p. ex., Gewehr e Delpy (1993)), cobrindo dessa forma uma ampla faixa de concentração de oxigênio. Entretanto, essa característica nem sempre foi suficiente para monitorar concentrações elevadas (> 10 %) de O₂. Isso se deve à grande atividade das moléculas das substâncias fosforescentes em soluções aquosas, o que provoca alta taxa de auto-extinção. Utilizando-se o instrumento para medições de pressão parcial de O₂ com as substâncias fosforescentes imobilizadas em polímeros, os tempos de vida de fosforescência envolvidos são maiores (Gewehr, 1991), conseqüentemente ampliando a faixa de medição do instrumento. De fato, o instrumento desenvolvido com algumas adaptações tem sido utilizado para o desenvolvimento de membranas sensoras para a medição de oxigênio gasoso, as quais apresentam sensibilidade adequada, confiabilidade e pequeno tempo de resposta (Jakubiak *et alii*, 1996).

Tomando-se os tempos de vida da Figura 17, eles são menores do que os obtidos por Gewehr (1991) em condições semelhantes. Esses resultados provavelmente se devem ao fato de não se ter um gás de referência com rigorosamente 0 % de oxigênio neste trabalho (Tabela 1), contra 100 % sem O₂ no caso citado. De fato, o método óptico de medição descrito é sensível para concentrações de oxigênio em meio aquoso da ordem de nM (Vanderkooi *et alii*, 1987). Outro motivo, menos importante, é o fato de se ter uma densidade óptica menor naquele caso que aqui, uma vez que os tempos de vida são inversamente proporcionais à densidade óptica da solução (Vanderkooi e Berger, 1989). De qualquer maneira, verifica-se a grande sensibilidade do método, pois a pequena quantidade de moléculas de oxigênio (< 0,0001 %) presente no gás (99,999 % N₂) foi suficiente

para provocar uma diminuição do tempo de vida. Os valores máximos e mínimos de concentração de oxigênio que podem ser medidos variam de um experimento para outro em função das características da solução fosforescente preparada e do meio. Pelos dados da Figura 17, por exemplo, conclui-se que para a reta ajustada e, considerando-se o menor tempo de vida mensurável pelo instrumento igual a $5 \mu\text{s}$ ($\tau_0 = 153,38 \mu\text{s}$), obtém-se um valor máximo de concentração de oxigênio determinado pelo instrumento para a solução em questão, igual a $9,11 \% \text{O}_2$. No entanto, um valor maior de oxigênio foi medido para o caso comprometendo a confiabilidade do resultado pela menor correlação apresentada (vide Tabela 2).

O instrumento desenvolvido pode sofrer alterações eletrônicas e ópticas que configurem melhoria para o mesmo. Observa-se, p. ex., que a utilização da energia da lâmpada xenon é muito pequena na excitação da solução fosforescente. Com os dados de transmitância do caminho óptico de excitação (Figura 13), a faixa de passagem pode ser aproximada à forma de um retângulo com transmitância de 0,65 de 370 a 430 nm. Dos dados do fabricante (EG&G, 1992), verifica-se que a lâmpada emite $\approx 11,7 \%$ de sua energia radiante para a faixa. Se apenas 65 % (transmitância máxima) dessa energia atravessa os filtros de excitação, tem-se um valor parcial de 7,6 % da energia total. Há ainda perdas em função do arranjo mecânico no caminho de excitação. A lâmpada possui uma janela de emissão com diâmetro de 14,3 mm (área de emissão = $160,61 \text{ mm}^2$) e o duto de conexão para a cubeta um diâmetro interno de 9 mm (área = $63,62 \text{ mm}^2$), igual à incidência de luz na cubeta. Assim, em função do arranjo (área útil de excitação por área de emissão), supõe-se uma perda da ordem de 60 %. Este valor associado a 7,6 % (acima), evidencia que apenas 3 % ou menos da energia emitida pela lâmpada chega à solução. Isso sugere a possibilidade de utilização de dispositivos de excitação com menor emissão de energia. Lembra-se que a lâmpada xenon foi escolhida, entre outros motivos, por ser uma fonte óptica versátil. Assim, outro trabalho vem sendo desenvolvido em continuidade a este, referindo-se à possibilidade de se utilizar componentes ópticos mais compactos e de menor custo. LEDs (Diodos Emissores de Luz) vêm sendo testados como fonte de excitação e, como detector uma válvula fotomultiplicadora mais compacta de tecnologia mais avançada. Os resultados até o momento, entretanto, apresentam baixa relação sinal/ruído para o sinal de fosforescência (Branco *et alii*, 1996).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro parcial para o desenvolvimento do instrumento e pela bolsa de mestrado de F. K. Schneider.

REFERÊNCIAS

- BRANCO, G., JAKUBIAK, D. R. e GEWEHR, P. M. (1996). "Instrumentação de Estado Sólido para Excitação de Indicador Fosforescente de Oxigênio. *Anais do III Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde*. Campos do Jordão. p. 273-274, 13-17 Out.
- DYKE, T. R. and MUENTER, J. S. (1975). "An Undergraduate Experiment for the Measurement of Phosphorescence Lifetimes". *Journal of Chemical Education*, v. 52, n. 4, p. 251-258.

- EG&G. (1992). *Data Sheet F1022B-1 (Short-Arc Xenon Flashlamps and Power Supplies)*. Salem: EG&G Electro-Optics Ltd.
- FLEMING, G. (1982). "Luminescence Instrumentation". In: *Light, Chemical Change and Life: A Source Book in Photochemistry*. Eds.: J. D. Coyle, R. R. Hill and D. R. Roberts, Milton Keynes: Open University Press. p. 84-97.
- GEHRICH, J. L., LÜBBERS, D. W., OPITZ, N., HANSMANN, D. R., MILLER, W. W., TUSA, J. K. and YAFUSO, M. (1986). "Optical Fluorescence and Its Application to an Intravascular Blood Gas Monitoring System". *IEEE Trans. Biomed. Eng.* v. BME-33, n. 2, p. 117-132.
- GEWEHR, P. M. (1991). *Development of an Optical Oxygen Sensor for Medical Use Based upon Phosphorescence Lifetime Quenching and Employing a Polymer Immobilized Metalloporphyrin Probe*. Ph. D. Thesis. London: University of London, 282 p., jan.
- GEWEHR, P. M. and DELPY, D. T. (1993). "Optical Oxygen Sensor Based on Phosphorescence Lifetime Quenching and Employing a Polymer Immobilized Metalloporphyrin Probe. Part 1 - Theory and Instrumentation". *Med. & Biol. Eng. & Comput.* v. 31, p. 2-10.
- HAMAMATSU. (1994). *Test Data Sheet (Photomultiplier Tube Type R-928)*. Middlesex: Hamamatsu Corporation.
- JAKUBIAK, D. R., BRANCO, G. e GEWEHR, P. M. (1996). "Desenvolvimento de Membranas Sensoras para Detecção de Oxigênio Gasoso". *Anais do III Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde*. Campos do Jordão. p. 289-290, 13-17 Out.
- KALYANASUNDARAM, K. and NEUMANN-SPALLART, M. (1982). "Photophysical and Redox Properties of Water-Soluble Porphyrins in Aqueous Media". *J. Phys. Chem.* v. 86, p. 5163-5169.
- KAUTSKY, H. (1939). "Quenching of Luminescence by Oxygen". *Transactions Faraday Society*. v. 35, p. 216-219.
- LEWIS, G. N. and KASHA, M. (1944). "Phosphorescence and the Triplet State". *J. Amer. Chem. Soc.* v. 66, p. 2100-2116.
- LONGMUIR, I. S. and KNOPP, J. A. (1976). "Measurement of Tissue Oxygen with a Fluorescent Probe". *Journal of Applied Physiology*. v. 41, n. 4, p. 598-602.
- LÜBBERS, D. W. and OPITZ, N. (1983). "Quantitative Fluorescence Photometry with Biological Fluids and Gases". In: *Proc. 2nd. Int. Symp. Oxygen Transport to Tissue*. Eds.: J. Grote, D. Reneau and G. Thews. New York: Plenum. p. 65-68.
- NORONHA, G., SCHNEIDER, F. K., e GEWEHR, P. M. (1996). "Programa para Aquisição e Processamento de Sinais de Fosforescência". *Anais do III Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde*. Campos do Jordão. p. 565-566, 13-17 Out.

- PAPKOVSKY, D. M. (1995). "New Oxygen Sensors and their Application to Biosensing". *Sensors and Actuators B*. v. 29, p. 213-218.
- PETERSON, J. D. and VUREK, G. G. (1984). "Fiber-Optic Sensors for Biomedical Applications". *Science*. v. 224, p. 123-127.
- STOUT, D. F. and KAUFMAN, M. (1976). *Handbook of Operational Amplifier Circuit Design*. New York: McGraw-Hill.
- VANDERKOOI, J. M. and BERGER, J. W. (1989). "Excited Triplet States Used to Study Biological Macromolecules at Room Temperature". *Biochim. Biophys. Acta*. v. 976, p. 1-27.
- VANDERKOOI, J. M., MANIARA, G., GREEN, T. J. and WILSON, D. F. (1987). "An Optical Method for Measurement of Dioxygen Concentration Based upon Quenching of Phosphorescence". *The Journal of Biological Chemistry*. v. 262(12), p. 5476-5482.

SPECTROPHOTOMETER FOR THE MEASUREMENT OF TIME RESOLVED PHOSPHORESCENCE APPLIED TO OXYGEN MONITORING

F. K. Schneider¹ and P. M. Gewehr²

ABSTRACT -- This work describes the development of an opto-electronic instrument for the measurement of phosphorescence lifetimes. It is applied for monitoring oxygen concentrations in aqueous solutions using metalloporphyrin probes which present room temperature phosphorescence. This technique presents advantages over other optical techniques which are used for oxygen measurements as, for example, fluorescence intensity. The implemented instrument consists of a pulsed optical source, lenses and optical filters for wavelength selection in the excitation and emission pathways, a photomultiplier tube coupled to an amplifier, an analog to digital converter board connected to a microcomputer IBM-PC and a software implemented in C language. The instrument is capable of measuring lifetimes as short as 5 μ s and besides the application here reported, it has been used as a base for the development of gaseous oxygen partial pressure sensors.

Keywords: Opto-electronic, Phosphorescence, Lifetimes, Oxygen.

¹ Prof. M. Sc., Departamento de Eletrônica, CEFET-PR

² Prof. Dr., Departamento de Eletrônica/CPGEI, CEFET-PR

Av. 7 de setembro 3165, 80230-901, Curitiba-PR, Brazil, Email: gewehr@cpgei.cefetpr.br