

Finalizando, voltemos a pensar no que ocorre durante a revelação do filme fotográfico: o revelador (reductor) difunde para dentro da gelatina e, dentro de cada elemento de volume de gelatina, parte do revelador é consumido numa reação com o halogeneto de prata sensibilizado lá presente. Tal tipo de problema implica numa equação mais complexa:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - kc^n$$

onde kc^n corresponde à velocidade da reação em que é consumido o revelador. O expoente n é a ordem da reação em relação ao revelador. Deixamos ao interessado pensar de como tal situação poderia ser simulada hidraulicamente. Sugerimos pensar em tubos verticais com furos laterais (ladrões) ao lado das ligações com os capilares.

BIBLIOGRAFIA

- ¹A.D. Moore: "The Hydrocal", *Ind. Eng. Chem.* 28, 740-709 (1936)
- ²C.S. Leopold: "Hydraulic analogue for the solution of problems...", *Trans. Am. Soc. Heating and Ventilating Eng. (ASHVE)* 54, 389-407 (1978).
- ³R.F. Scott: "Hydraulic Analogue Computer for Studying Diffusion Problems", *Geotechnique*, 7, 55-72 (1975).
- ⁴W.J. Karplus: "Analog Simulation: Field Problems", McGraw-Hill, New York, 1958. Especialmente: Cap. 4. Finite-difference Approximations; § 4.7 ... in cartesian coordinates; § 4.8 ... in cylindrical coordinates; § 4.9 ... in spherical coordinates; Cap. 10, Nomenclature-analog Simulation Systems; § 10.4 Hydraulic analog for the diffusion equation; Cap. 12, The Diffusion Equation and other Parabolic Equations.
- ⁵G.C. Barker: "Theory of the Current in Alternating Current Polarograph". *Pure Appl. Chem.* 15, 239-261 (1967).
- ⁶P. Delahay: "The Study of Fast Electrode Processes by Relaxation Methods. V.2.C. Absolutely Equivalent Circuit not Transmission Lines". Em "Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering. Vol. 1. Delahay, ed., New York, Interscience, págs. 269-271, 1961.
- ⁷R. Parsons: "Faradaic and Nonfaradaic Processes. V. Equivalent Circuit Approach. Em "Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering. Vol. 7. P. Delahay, ed., New York, Interscience, págs. 197-203, 1970.

NOTAS TÉCNICAS

CONSTRUÇÃO DE UM ESPECTRÔMETRO PARA MEDIDA DE EMISSÕES ULTRA FRACAS.

Y. Shimizu, R. Casadei de Baptista e K. Zinner

*Instituto de Química, Depto. de Bioquímica, Universidade de São Paulo – Caixa Postal 20780,
São Paulo - S.P. – Brasil.*

(Recebido em 7/02/1979)

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras reações catalisadas por hemoproteínas dando origem a produtos esperados na clivagem térmica de certos compostos intermediários de alto teor de energia têm sido propostas nos últimos anos¹. Quando estes intermediários possuem estrutura do tipo dioxetanico obtém-se, frequentemente compostos carbonílicos eletronicamente excitados.

Uma das possíveis maneiras de analisar tais sistemas consiste na observação direta de seus espectros de emissão, quando esta última chega a níveis substanciais. Outro processo, indireto, procura observar a emissão de luz resultante da transferência de energia para aceptores emissivos adequados.

A seleção destes aceptores possibilita a medida de estados eletronicamente excitados singlete ou ainda estados triplete se o aceptor possui em sua estrutura átomos "pesados" (Br, I, p.ex.) e a regra de conservação do spin é parcialmente sobrepujada.

Os espectros de emissão constituem-se, frequentemente, em importante argumento a favor de um determinado mecanismo proposto. As emissões enzimáticas "in vitro", ou ainda reações modelo, são usualmente bastante fracas tornando necessária instrumentação altamente sensível para poder medir distribuições espectrais ou até para detectá-las pura e simplesmente.

Um dos esforços pioneiros neste campo da instrumentação veio do grupo do Prof. H. Inaba no Japão². Optaram estes autores, por um arranjo instrumental relativamente sofisticado, um analisador espectral de filtros empregando a técnica "synchronous single photon counting", SSPC.

Nossa opção tem várias modificações técnicas com relação ao processo de Inaba levando em conta a facilidade da construção mecânica e, mais importante, a maneira pela qual os resultados são obtidos e avaliados. Nossa construção visa baratear na medida do possível o custo de construção e ao mesmo tempo obter o máximo de versatilidade.

2. Desenho e construção

Uma das características principais do espectrômetro está na utilização de um conjunto de filtros de vidro com comprimentos de onda de "cut-off" bastante nítidos. A escolha deste elemento de seleção espectral ao invés da combinação de "grating" ou prisma e fendas convencionais resulta em melhores características de eficiência global de transmissão.

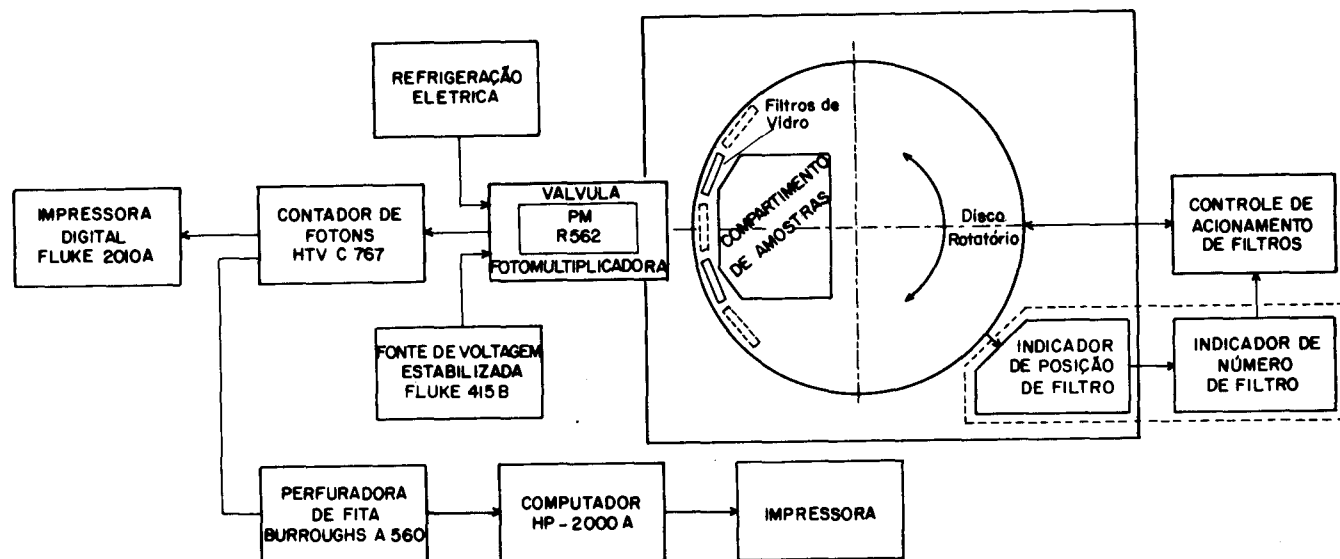


Fig. 1 — Diagrama de bloco do instrumento.

2.1. Partes mecânicas principais

O instrumento teve seu desenho simplificado ao máximo para evitar problemas mecânicos durante a operação e também dificuldades no processo de fabricação. Um diagrama de bloco simplificado aparece na Figura 1. As partes mecânicas principais são o disco giratório, o receptáculo de medida, o mecanismo de fechamento do caminho da luz e o indicador de posição de filtro. O disco giratório (diâmetro 87cm) divide-se em 50 setores, 25 dos quais são ocupados por filtros de vidro coloridos de 5 x 5cm (Toshiba e Corning) dispostos alternadamente e cobrindo a faixa de comprimentos de onda de 400 a 680 nm. O receptáculo de medida (23x20x13cm) permite acomodar vários tipos de recipientes de vidro além de acessórios como controlador de temperatura, agitador magnético, etc. O mecanismo de bloqueio à passagem da luz protege a válvula fotomultiplicadora de exposição a luz intensa indesejada, por meio de um sistema de fechamento automático, sempre que o receptáculo de medidas é aberto. O indicador de posição de filtro consiste de duas partes, um detetor de posição e um indicador do número do filtro. O detetor de posição de filtro utiliza uma combinação de três engrenagens especialmente projetadas e dez microchaves separadas em dois grupos de cinco para identificar cada filtro.

A Figura 2 mostra o esquema do indicador de posição de filtro. O disco giratório V que tem cinquenta reentrâncias e três pinos são acionados em etapas, seja no sentido horário seja no anti-horário, pela engrenagem I (que possui dois pinos) que está por sua vez unida a um motor DC.

Quando o disco V avança uma etapa, o motor DC é parado pelo detetor de posição D₂ e acionado novamente por um novo sinal de comando. A engrenagem III com cinco reentrâncias e um pino move-se uma etapa quando a engrenagem II percorre duas etapas. A engrenagem IV (com cinco reentrâncias) percorre uma etapa quando III termina uma rotação completa. Cada etapa de III e IV é identificada por microchaves individuais, cujas partes detetoras estão diretamente ligadas aos eixos. Cada uma das cinco microchaves

ligadas à engrenagem III identifica os números 1, 2, 3, 4 e 5 e, em IV, os números 0, 5, 10, 15 e 20, respectivamente. Com isto os vinte e cinco filtros são identificados pela ação conjunta das duas microchaves.

Os dados fornecidos pelas microchaves são somados em forma binária. Da ação conjunta destes elementos com o gerador de pulsos e outros conjuntos contadores (vide Figura 2) resulta uma apresentação visual de dois dígitos. Estas partes estão acondicionadas em uma caixa metálica a prova de luz (191 x 91 x 57 cm).

2.2. Análise espectral

O disco giratório é acionado pela combinação da engrenagem I e do motor DC. Uma amostra que emite luz é então colocada no compartimento de amostras, localizado à frente e o mais próximo possível do cátodo da válvula fotomultiplicadora HTV R 562 para obter o máximo de eficiência na coleta de luz. A fotomultiplicadora é resfriada eletricamente a -18°C para garantir longa vida de operação e obter melhores relações sinal/ruído cortando o ruído de origem térmica.

Os pulsos da fotomultiplicadora são processados no contador de fótons Hamamatsu HTV C767 através um pré-amplificador e registrador por uma impressora digital FLUKE 2010A e uma perfuradora de fita Burroughs A560 simultaneamente. Os resultados da fita perfurada são levados a um computador Hewlett-Packard HP 2000A para processamento de dados.

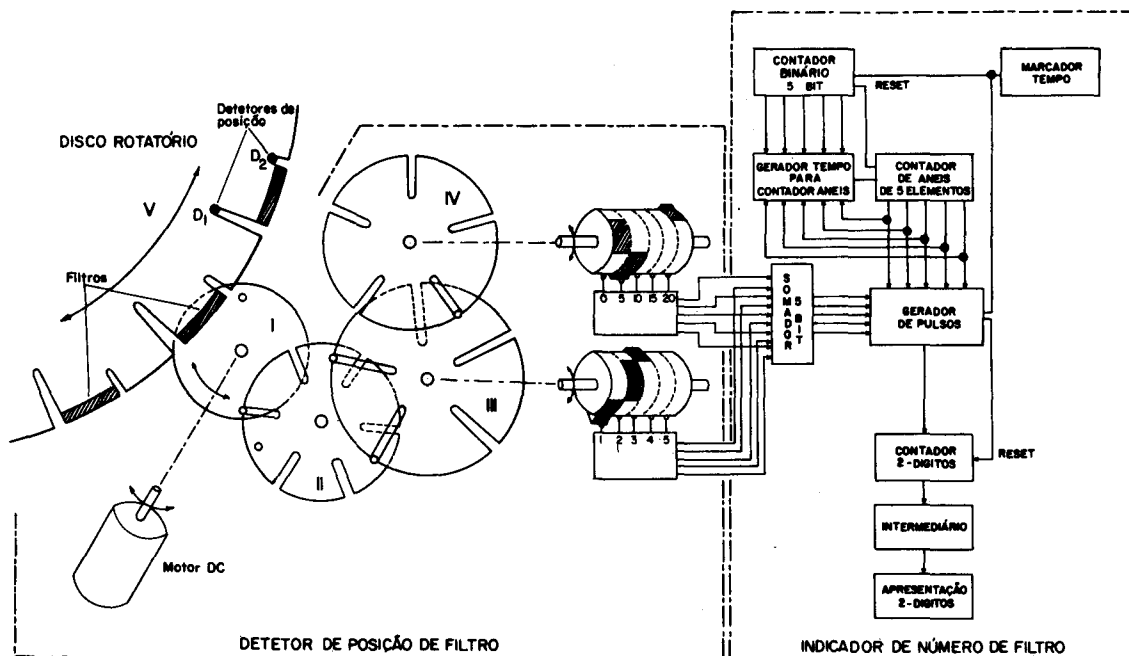


Fig. 2 – Indicador de posição de filtro.

A análise espectral é feita pela divisão do número de contagens pela janela espectral que é, por sua vez, definida pela subtração das curvas de transmitância de filtros sucessivos corrigidas para a sensibilidade espectral da fotomultiplicadora.

A intensidade luminosa média P_{ij} entre dois filtros sucessivos i e j é dada por

$$P_{ij} = e^{-N_i - N_j} / \int S_K(\lambda) [F_i(\lambda) - F_j(\lambda)] d\lambda,$$

onde $N_i - N_j$ é a diferença do número de contagens por segundo, $F_i(\lambda) - F_j(\lambda)$ a subtração entre as respectivas curvas de transmitância, $S_K(\lambda)$ a sensibilidade espectral e e a carga elétrica.

A resolução espectral é dada pelas janelas espectrais individuais. O resultado da análise espectral é expressa na forma de um histograma, sendo também possível efetuar a convolução do resultado para filtros individuais quando necessário.

A fotografia do instrumento completo aparece na Figura 3.

3. Operação

Uma dificuldade técnica importante está no fato de que as fontes de emissão de luz tais como as de quimi e bioluminescência variam em intensidade durante o processo de medida. Passa, então, a ser muito importante saber como a intensidade da luz das diferentes fontes varia em função do tempo. Esta complicação suplementar requer um sistema de controle para possibilitar uma operação automática e sequencialmente controlada. Com esta finalidade construiu-se um sistema de controle elétrico capaz de preencher os requisitos:

a) Medida alternada da intensidade de luz sem e com filtro e marcação do tempo ao final de cada medida para acompanhar a variação de intensidade da fonte.

b) Seleção sucessiva de filtros com intervalos zero, um ou dois a partir do filtro inicial. Intervalos de um ou dois são, via de regra, usados para determinações espectrais mais grosseiras em experiências prévias.

c) Obtenção de três ou cinco medidas de intensidade com cada filtro.

d) Indicação da posição de filtro. A luz indicativa permanece acesa sempre que uma medida é feita com filtro.

e) Coleta dos resultados na impressora digital e na perfuradora de fita.

O diagrama de fluxo desta complexa sequência de operações aparece na Figura 4. Um monitor de tempo entra em operação após o sinal de partida e ocorre a impressão de um número de filtro previamente selecionado.

O contador de fótons, com tempo de contagem pré-definido, mede a intensidade de luz sem filtro para servir de monitor de intensidade. O tempo ao final de cada medida e o número de pulsos são marcados em preto na impressora. Segue-se uma medida idêntica com filtro após o movimento do disco rotatório de uma etapa no sentido horário. O tempo ao final da medida e o número de pulsos são agora registrados em vermelho na impressora. Finda esta etapa a fita da impressora volta à posição preta e o disco rotatório retorna em sentido anti-horário à posição anterior para nova medida sem filtro. Esta sequência alternada é repetida até ser preenchido o número de leituras (3 ou 5) pré-estabelecido. O disco rotatório é então acionado no sentido horário até chegar à posição correspondente ao próximo filtro selecionado, seguindo-se a sequência de operações acima descritas. O sinal automático de término é gerado entre os filtros 25 e 1. Se não houver um sinal manual de parada, a sequência de operações segue os intervalos zero, um ou dois pre-selecionados. Após a seleção de um filtro, seu número é registrado na impressora após o avanço de um espaço de impressão. A sequência total é realizada automaticamente. Um resultado típico exemplificado na Figura 5.

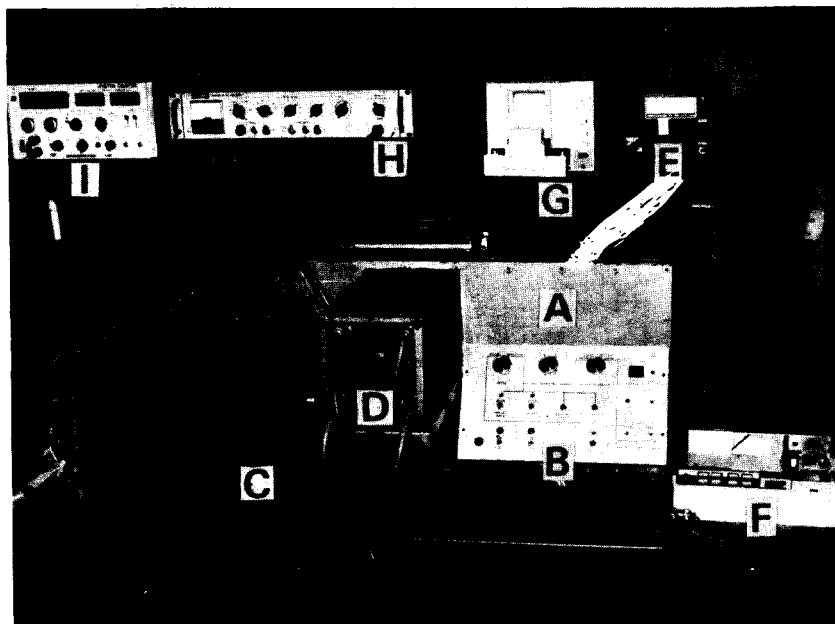


Fig. 3 — Fotografia do instrumento. A - Caixa metálica a prova de luz; B - painel de controle; C - controle de acionamento de filtros; D - válvula fotomultiplicadora e refrigeração elétrica; E - fonte para a refrigeração elétrica; F - perfuradora de fita; G - impressora; H - fonte de voltagem estabilizada; I - contador de fótons.

4. Desempenho

O aparelho cobre a faixa de comprimentos de onda do visível de 400 a 680 nm. A resolução espectral foi medida pelo critério de Rayleigh³ com base no fato de que cada janela espectral de filtro normalizada apresenta boa correspondência com uma função

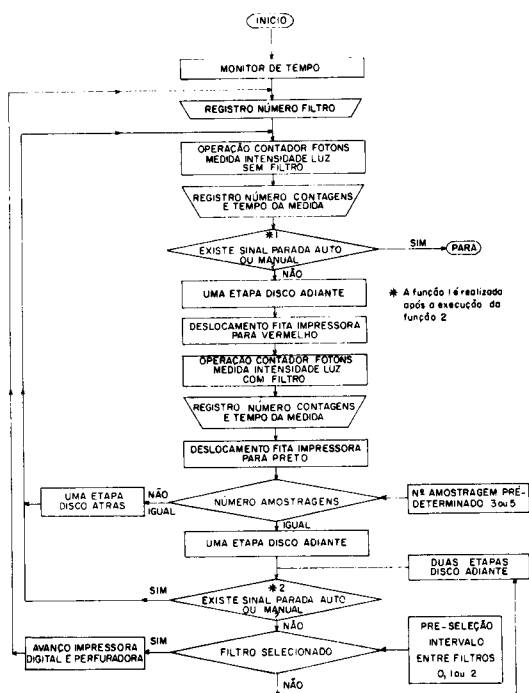


Fig. 4 — Diagrama de fluxo de operação.

$$\left[\frac{\text{sen} \left\{ \pi (\lambda - \lambda_0) / \Delta\lambda \right\}}{\pi (\lambda - \lambda_0) / \Delta\lambda} \right]^2$$

quando $|\lambda - \lambda_0| \leq \Delta\lambda$, onde λ é comprimento de onda, λ_0 o comprimento de onda central e $\Delta\lambda$ corresponde à resolução no critério de Rayleigh. A resolução espectral foi estimada entre 20 e 26 nm se bem que não seja constante ao longo de todo o espectro visível. A precisão da posição

de um comprimento de onda, outro fator importante a analisar, foi medida a partir do gráfico dos comprimentos de onda no pico (máximo) de histogramas submetidos à convolução por funções individuais ajustadas a cada janela de filtro em função do comprimento de onda de uma radiação incidente. Como padrão, foi usado um "Monocromador para alta intensidade" da Bausch e Lomb. A discrepância entre comprimentos de onda indica a precisão de indicação de um comprimento de onda e foi suficientemente baixa em toda a região espectral como se vê nas Figuras 6 e 7.

Foram também efetuados estudos experimentais empregando algumas fontes de luz fracas com distribuição espectral conhecida, para verificar mais a fundo o desempenho do espectrômetro. A figura 6 mostra a comparação entre a distribuição espectral normalizada de uma lâmpada de mercúrio pelo espectrômetro e por um monocromador convencional Bausch e Lomb, em situação tal que as resoluções

preto	{ 0103673 00105,7 0000012	
vermelho	{ 0093941 00096,1	
preto	{ 0104886 00087,9	
vermelho	{ 0093891 00080,2	
preto	{ 0105514 00072,0	
vermelho	{ 0094984 00064,2	intensidade com filtro
		tempo com filtro (segundo)
preto	{ 0106668 00055,5 0000011	intensidade sem filtro
		tempo sem filtro (segundo)
		número do filtro
vermelho	{ 0097858 00045,7	

Condições escolhidas: número de leituras 3
intervalo entre filtros 0

Fig. 5 — Exemplo de apresentação de resultados da impressora.

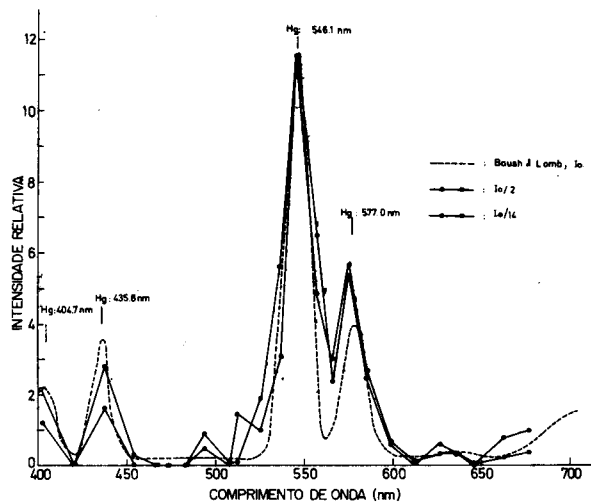


Fig. 6 — Distribuição espectral de uma lâmpada de mercúrio. (---) monocromador convencional, intensidade total I_0 ; (-o-o-) espectrômetro, intensidade $I_0/2$; (-o-o-) idem, intensidade $I_0/14$.

espectrais eram praticamente as mesmas. A Figura 7 mostra os resultados obtidos com uma fonte de luz bastante fraca e de distribuição espectral conhecida. Trata-se da medida da fluorescência de 2,5-difeniloxazol (PPO) e 2,2'-p-fenil-bis-5-fenil oxazol (POPOP) em solução de tolueno, radiação esta proveniente de hexadecano-1-c¹⁴, segundo Hastings e Weber⁴. Neste caso, a distribuição espectral é bastante ampla ao contrário do exemplo anterior. Os resultados experimentais da Figura 7 mostram boa correspondência dentro de um intervalo de erro de ± 10 nm. A intensidade de luz medida foi diminuída de 2 vezes em relação à emitida pelo padrão no máximo de emissão. O resultado de Hastings e Weber foi normalizado no máximo de emissão para efeito de comparação. Além disso, foi possível medir distribuições espectrais com intensidades 9 e 15 vezes menores que a original. Nossa fonte padrão calibrada apresenta $I_{416\text{nm}} = 6,2 \times 10^6$ $\text{hv.ml}^{-1} \text{seg}^{-1}$. Ao levar em conta a eficiência da fotomultiplicadora de 0,15 a eficiência global de medida de luz é de aproximadamente 0,5% que deve ser comparada aos 1,4% de um contador de cintilação líquida em condições similares.

Os resultados acima demonstram que o instrumento é suficientemente útil e poderoso para as aplicações a que se propõe, ou seja, a medida de distribuições espectrais das emissões de luz muito fracas como algumas de quimi- e bioluminescência.

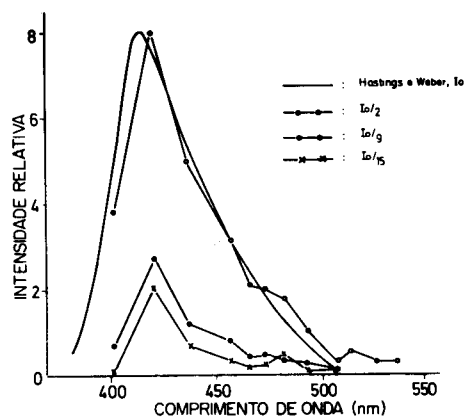


Fig. 7 — Fluorescência da fonte padrão de Hastings e Weber (—) dados de Hastings e Weber⁴, intensidade total I_0 . (-o-o-) espectrômetro, $I_0/2$; (-o-o-) idem, $I_0/9$; (-x-x-) idem, $I_0/15$.

O instrumento apresenta várias possibilidades no que concerne a ulterior desenvolvimento. Podem-se, por exemplo, empregar simultaneamente duas válvulas fotomultiplicadoras idênticas, passando uma delas a servir de monitor de intensidade ou de sua variação. Isto abre a possibilidade para se observar luminescência muito rápidas ("flash") e sua distribuição espectral em associação a equipamentos capazes de efetuar misturas rapidamente. Por retirada e deslocamento de alguns filtros e adição de outros tantos, pode-se também estender a capacidade do aparelho para cobrir a região espectral correspondente ao UV próximo. Esta modificação está sendo realizada presentemente. Finalmente, é óbvio que o instrumento pode ser empregado simplesmente como um fotômetro sensível ou ainda trabalhar a comprimento de onda constante.

Inúmeras reações enzimáticas acompanhadas de emissões fracas de luz têm sido estudadas com este espectrômetro como já reportado na literatura¹.

Agradecimentos: — Os autores agradecem a assistência da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Os autores agradecem ao Prof. G. Cilento (Instituto de Química, USP), o integral apoio em todas as etapas deste trabalho. Dr. Y. Shimizu (Tohoku University, Sendai, Japão) é professor visitante da FAPESP.

¹ G. Cilento, N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haum, A. Faljoni, O. Augusto, R. Casadei de Baptista e E.J. H. Bechara, Photochem. Photobiol. (no prelo) vide referências citadas neste trabalho.

² H. Inaba, Y. Shimizu e Y. Tsuji, 1974 Proc. ICO Conf. Opt. Methods in Sci. and Ind. Meas. Japan J. Appl. Phys. 14, 23 Suppl. 14-1 (1975).

³ M. Born e E. Wolf, "Principles of Optics", Oxford: Pergamon Press, 333 (1970).

⁴ J.W. Hastings e G. Weber, J. Opt. Soc. Amer. 53, 1410 (1963).