

Application Note AN-EC-039

Estudo de espectro-eletroquimiluminescência da emissão simultânea de dois luminóforos

Monitoramento por ECL do sistema de transferência de energia por ressonância (RET) formado por luminol e fluoresceína

A quimiluminescência eletrogerada, ou eletroquimiluminescência (ECL), é a emissão de luz proveniente de estados excitados gerados por reacões de transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

Essa técnica oferece vantagens como alta versatilidade, excelente sensibilidade e um dispositivo compacto e portátil. Além disso, a ECL permite controle temporal e espacial preciso da reacão [1,2].

Esta Nota de Aplicacão descreve a resposta de ECL quando mais de um luminóforo está presente em uma solucão.

INSTRUMENTACÃO E SOFTWARE

Os experimentos de ECL são realizados utilizando o instrumento SpectroECL, equipado com uma célula microespectrômetro (Figura 1) ou com uma célula fotodiodo (ECLPHOTODIODCELL) como detector.
Eletrodos serigrafados de carbono (SPEs, 110) são utilizados para realizar os experimentos de ECL.
O SpectroECL é controlado pelo software DropView SPELEC, que permite a coleta simultânea do sinal eletroquímico e do sinal de luz emitida. Além disso, o software inclui ferramentas para tratamento e análise de dados. A Tabela 1 lista todo o hardware e software utilizados neste estudo.



Figura 1. O instrumento SpectroECL e a célula microespectrômetro.

Tabela 1. Visão geral do hardware e software utilizados.

Equipamento	Número do artigo
Instrumento	SPECTROECL
Célula	ECLPHOTODIODCELL
SPE de ouro	110
Cabo de conexão para SPEs	CAST
Software	DropView SPELEC

ECL DO LUMINÓFORO LUMINOL

A excitacão eletroquímica de 0,002 mol/L de luminol na presenca de 0,05 mol/L de peróxido de hidrogênio em tampão PBS 0,1 mol/L (pH 8) é realizada por voltametria de varredura linear, de 0,00 V a +1,00 V, a 0,05 V/s.
O detector fotodiodo integrado ao ECLPHOTODIODCELL registra o sinal total de ECL, porém não fornece resolucão de comprimento de onda.
Esse detector é altamente sensível, permitindo a deteccão de concentracões muito baixas do luminóforo em estudo.

Como pode ser observado na Figura 2, o voltamograma de varredura linear (linha azul) mostra um pico de oxidacão em 0,30 V, correspondente à oxidacão eletroquímica do luminol na presenca de peróxido de hidrogênio. Isso também gera a emissão de luz em 425 nm, registrada pelo fotodiodo como emissão total de luz (linha verde). Os picos de ECL e eletroquímico coincidem exatamente em 0,30 V.
O sinal de ECL do luminol na presenca de peróxido de hidrogênio apresenta seu comportamento característico, com a intensidade de emissão aumentando durante a oxidacão do luminol [3,4].

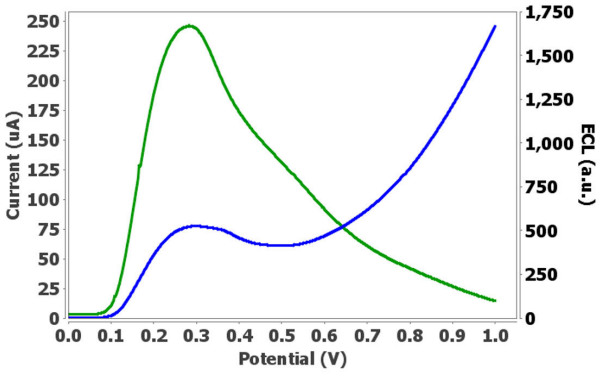


Figura 2. Voltamograma linear (linha azul) e sinal de ECL (linha verde) para 0,002 mol/L de luminol e 0,05 mol/L de peróxido de hidrogênio em solução PBS, utilizando o ECLPHOTODIODCELL.

Repetindo o experimento com o microespectrômetro como detector, observa-se a mesma resposta eletroquímica (linha azul, Figura 2), mas a resposta óptica é diferente, já que o microespectrômetro diferencia os comprimentos de onda. O espectro registrado apresenta uma única banda de emissão em 425 nm, como visto na Figura 3a.

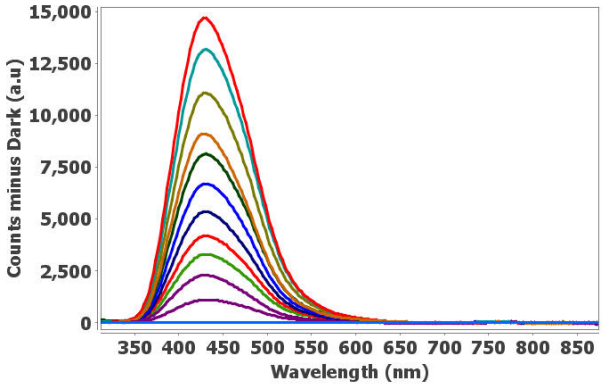


Figura 3a. Sinal de ECL para 0,002 mol/L de luminol e 0,05 mol/L de peróxido de hidrogênio em solução PBS, utilizando a célula microespectrômetro.

A evolucão da emissão em 425 nm em funcão do potencial pode ser obtida utilizando a ferramenta «Spectra vs EC» no DropView SPELEC. Como pode ser visto na Figura 3b, o comportamento da ECL coincide exatamente com a resposta de ECL obtida pelo detector fotodiodo (linha verde, Figura 2). A emissão de ECL atinge o máximo quando o pico de oxidacão do luminol em 0,30 V é observado eletroquimicamente.

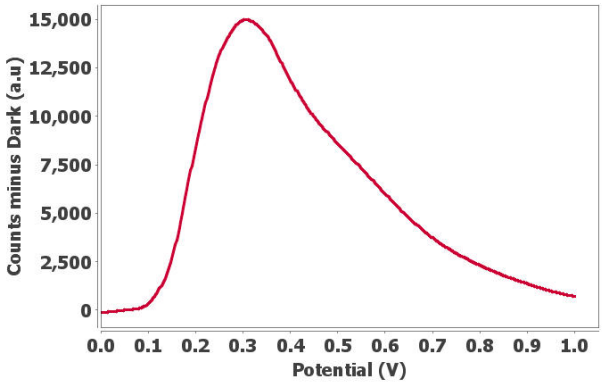


Figura 3b. Evolução da emissão do luminol em 425 nm em função do potencial.

ECL DOS LUMINÓFOROS LUMINOL E FLUORESCEÍNA

O sistema de transferência de energia por ressonância (RET) formado pelos luminóforos luminol (doador) e fluoresceína (aceptor) [5] é estudado. De acordo com o mecanismo de RET, o luminol gera luminescência ao sofrer oxidacão eletroquímica na presenca de peróxido de hidrogênio. Parte dessa luz emitida atua como fonte de excitacão para a fluoresceína, que reemite luz em um comprimento de onda diferente.

A análise desse sistema utilizando o ECLPHOTODIODCELL fornece as respostas eletroquímica (linha azul) e de ECL (linha verde) mostradas na Figura 4. Como apenas o luminol sofre oxidacão eletroquímica, o voltamograma é idêntico ao obtido sem fluoresceína (Figura 2). O detector fotodiodo registra um aumento na intensidade total de ECL durante a oxidacão do luminol em 0,30 V. Porém, como o fotodiodo não registra os espectros de emissão, ele não consegue distinguir as contribuicões do luminol e da fluoresceína.

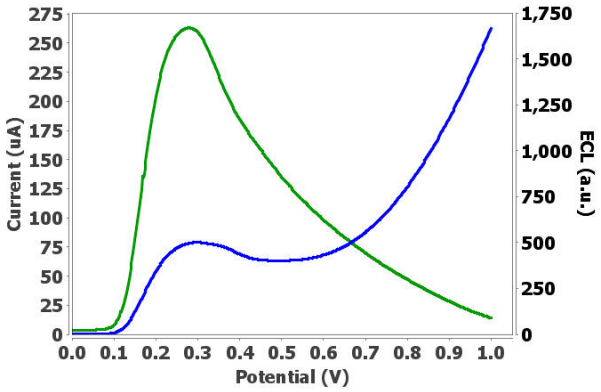


Figura 4. Voltamograma linear (linha azul) e sinal de ECL (linha verde) para 0,002 mol/L de luminol, 0,0001 mol/L de fluoresceína e 0,05 mol/L de peróxido de hidrogênio em solução PBS, utilizando o ECLPHOTODIODCELL.

Ao repetir o experimento utilizando a célula microespectrômetro, o comportamento eletroquímico permanece o mesmo (linha azul, Figura 4), mas a ECL apresenta duas bandas de emissão. A Figura 5a mostra os espectros registrados durante a voltametria de varredura linear. A banda em 425 nm corresponde à emissão do luminol, enquanto a banda em 530 nm está associada à emissão da fluoresceína. Isso confirma a RET do luminol para a fluoresceína e demonstra a capacidade do microespectrômetro de diferenciar as emissões de diferentes luminóforos.

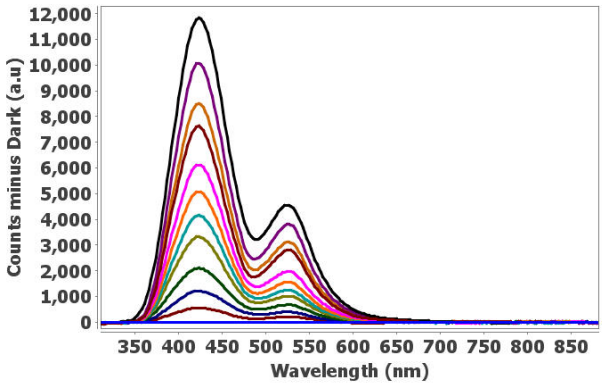


Figura 5a. Sinal de ECL para 0,002 mol/L de luminol, 0,0001 mol/L de fluoresceína e 0,05 mol/L de peróxido de hidrogênio em solução PBS, utilizando a célula microespectrômetro.

A evolucão das emissões em funcão do potencial é analisada utilizando a ferramenta «Spectra vs EC» no DropView SPELEC. Como pode ser observado na Figura 5b, as emissões do luminol e da fluoresceína aumentam durante a oxidacão do luminol e atingem seus máximos em 0,30 V. A resposta de espectro-eletroquimiluminescência também permite avaliar a contribuicão de cada luminóforo, mostrando que a emissão do luminol é maior que o sinal da fluoresceína.

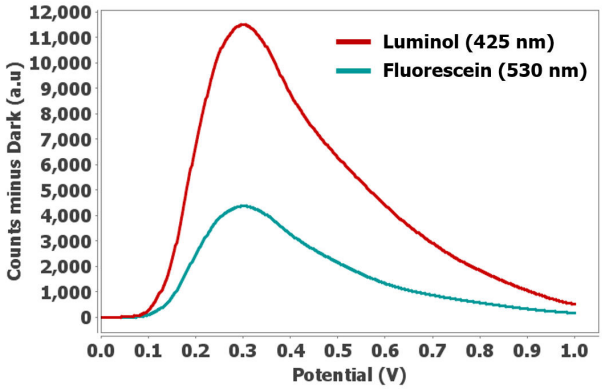


Figura 5b. Evolução da emissão do luminol em 425 nm em função do potencial.

CONCLUSÃO

O sistema de ECL formado pelo luminol como luminóforo e peróxido de hidrogênio como co-reagente, assim como o sistema de ECL por RET baseado em dois luminóforos, luminol e fluoresceína, com peróxido de hidrogênio como co-reagente, foram estudados utilizando o SpectroECL com dois detectores diferentes.

O detector fotodiodo não discrimina entre comprimentos de onda e registra a intensidade total de luminescência para cada ponto eletroquímico. A célula fotodiodo é muito útil para a detecção de concentracões muito baixas do luminóforo em estudo e para pesquisas com apenas uma espécie marcadora. Por outro lado, o detector microespectrômetro fornece resolucão de comprimento de onda e permite a realizacão de experimentos de espectro-eletroquimiluminescência, já que os espectros visíveis são registrados simultaneamente ao sinal eletroquímico. Essa célula é útil para sistemas multianalito, desenvolvimento de novos luminóforos e caracterizacão de propriedades de materiais.

REFERÊNCIAS

1. Richter, M. M. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem. Rev.* 2004, *104*, 3003–3036. https://doi.org/10.1021/cr020373d.
2. Hu, L.; Xu, G. Applications and Trends in Electrochemiluminescence. *Chem. Soc. Rev.* 2010, *39*, 3275–3304. https://doi.org/10.1039/b923679c.
3. Ballesta-Claver, J.; Valencia-Mirón, M. C.; Capitán-Vallvey, L. F. Disposable Electrochemiluminescent Biosensor for Lactate Determination in Saliva. *Analyst* 2009, *134*, 1423–1432. https://doi.org/10.1039/b821922b.
4. Yildiz, G.; Tasdoven, U.; Menek, N. Electrochemical Characterization of Luminol and Its Determination in Real Samples. *Analytical Methods* 2014, *6*, 7809–7813. https://doi.org/10.1039/C4AY01281J.
5. Neves, M. M. P. S.; Bobes-Limenes, P.; Pérez-Junquera, A. et al. Miniaturized Analytical Instrumentation for Electrochemiluminescence Assays: A Spectrometer and a Photodiode-Based Device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016, *408*, 7121–7127. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9669-7.

CONTACT

Metrohm Brasil
Rua Minerva, 161
05007-030 São Paulo
metrohm@metrohm.com.br



SpectroElectrochemiluminescence instrument for Screen-Printed Electrodes

SpectroECL combines in one equipment a biopotentiostat/galvanostat and a microspectrometer integrated in an innovative cell for Screen-Printed Electrodes. This miniaturized and portable alternative is perfect for performing Electrogenerated ChemiLuminescence (ECL) measurements



Photodiode cell for electrochemiluminescence measurements

Cell for screen-printed electrodes to perform electrochemiluminescence measurements. This ABS cell includes a Silicon photodiode with preamp with a spectral response range 340 - 1100 nm and peak sensitivity wavelength of 960nm.
This cell should be used in combination with µStat ECL or µStat SpectroECL electrochemiluminiscence instruments.



i-µStat Cable Connector for Screen-Printed Electrodes

Connector that act as an interface between our Screen-Printed Electrodes and Metrohm DropSens potentiostats.