


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Este exemplar correspondendo à redação final da tese  
defendida por EDEN JANUÁRIO NETTO  
foi aprovada pela Comissão  
Julgadora em 10/08/94  
  
Orientador

## SISTEMA COM SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA A MEDIÇÃO DO pH GÁSTRICO

EDEN JANUÁRIO NETTO

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa  
Co-orientador: Prof. Dr. Wang Binseng

Tese submetida ao  
Departamento de Engenharia Biomédica  
como parte dos requisitos  
para a obtenção do grau de  
Doutor em Engenharia Elétrica na  
Universidade Estadual de Campinas

Agosto - 1994

10/08/94

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

SISTEMA COM SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA  
A MEDIÇÃO DO pH GÁSTRICO

EDEN JANUÁRIO NETTO

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa  
Co-orientador: Prof. Dr. Wang Binseng

Banca examinadora:

Dr. Eduardo Tavares Costa (UNICAMP)  
Dr. Sérgio Santos Mühlen (UNICAMP)  
Dr. Edson Moschim (UNICAMP)  
Dr. Pedro Miguel Gewehr (CEFET-PR)  
Dr. John Peterson (NIH - EE.UU.)

## RESUMO

A construção e o desempenho de um sistema com sensor de fibra óptica para medição do pH numa faixa ampla é apresentada. A construção do sensor é baseada no emprego de dois indicadores colorimétricos de pH, fornecendo uma sensibilidade na faixa de pH 1 a pH 7, com uma precisão de 0,1 unidades de pH. Essa faixa se estende até pH 9, mas com uma precisão menor. A aplicação principal deste protótipo é a monitoração do pH gástrico.

O sistema é baseado na imobilização conjunta dos indicadores colorimétricos e micropartículas de dispersão em microesferas de gel de "polyacrylamide". O sensor é construído com uma única fibra óptica de plástico de 0,25mm, um divisor de luz com fibra óptica, uma lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado, um fotodetector com grade holográfica e CCD, conectado a um computador, responsável pela análise espectral em duas faixas de comprimentos de onda. O computador apresenta graficamente o valor do pH por um período de até 24 horas. O sistema apresenta uma estabilidade 0,2 unidades de pH por 24 horas, tempo de resposta de alguns minutos e foi testado em amostras de suco gástrico e em um animal.

## ABSTRACT

The construction and performance of a fiber-optic broad-range pH sensor is described. The general construction of the sensor is based on two immobilized colorimetric indicators, providing a sensitivity over the pH range of 1 to 7 with a precision of 0.1 pH unit. The range extends to pH 9 with less precision. The primary objective of the design is for gastric measurements.

The system is based on absorbance dyes bound to polyacrylamide gel containing light-scattering particles. The sensor is constructed on a single 0.25mm diameter plastic optical fiber. The optical system consists of a sub-miniature tungsten lamp, fiber-optic splitter, and CCD - grating detector connected to a computer for spectral analysis, using two wavelength regions. The computer displays the pH graphically over 24 hours. The system shows stability within 0,2 pH unit over 24 hours, response time of a few minutes and has been tested with gastric juice samples and in an animal.

Obrigado Deus,  
pela proteção dedicada a  
Lélia, minha esposa, e  
pelo presente, Allana, minha filha.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão ao Prof. Dr. Wang Binseng, pelo apoio e orientação, e ao Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa, pelo acompanhamento e discussões no curso deste trabalho.

Agradeço ao Dr. John I. Peterson, do Biomedical Engineering and Instrumentation Program do National Institutes of Health, Maryland, EE.UU., pelo apoio irrestrito e orientação científica durante os dois anos e meio do desenvolvimento experimental deste protótipo.

Agradeço a todos os colegas do Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná pelo apoio e incentivo, em particular o Prof. Heitor Silvério Lopes, o Prof. Dr. Paulo José Abatti e o Prof. Dr. Pedro Miguel Gewehr.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida, e à Direção Geral do Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, pelo afastamento concedido.

Por fim, mas para a pessoa que esteve ao meu lado em todos os momentos, agradeço a minha esposa Lélia, pelo carinho, atenção, incentivo e compreensão, sem os quais este trabalho não seria realizado.

# Índice

Lista das figuras . . . . .	.I
Lista das tabelas . . . . .	.III
<b>1. Introdução . . . . .</b>	<b>.1</b>
1.1 Monitoração do pH gástrico . . . . .	.3
1.2 Eletrodos de vidro e antimônio . . . . .	.7
1.2.1 Limitações e vantagens dos eletrodos . . . . .	.8
1.3 Sensor de pH com fibra óptica. . . . .	.11
1.4 Objetivo do presente trabalho. . . . .	.13
<b>2. Sistema óptico para a medição do pH. . . . .</b>	<b>.17</b>
2.1 Sistema genérico com sensor de fibra óptica. . . . .	.18
2.1.1 Sensor com fibra óptica. . . . .	.20
2.1.1.1 Indicador de pH. . . . .	.20
2.1.1.2 Imobilização do indicador. . . . .	.33
2.1.1.3 As fibras ópticas. . . . .	.36
2.1.2 Instrumento opto-eletrônico. . . . .	.38
2.1.2.1 Fonte óptica . . . . .	.39
2.1.2.1.1 Lâmpada incandescente. . . . .	.39
2.1.2.1.2 Diodo emissor de luz . . . . .	.41
2.1.2.2 Condicionadores ópticos. . . . .	.41
2.1.2.2.1 Seleção. . . . .	.42
2.1.2.2.2 Separação. . . . .	.43
2.1.2.2.3 Discriminação. . . . .	.44
2.1.2.3 Fotodeteccção . . . . .	.45
2.1.2.3.1 Fotomultiplicadora . . . . .	.46
2.1.2.3.2 Fotodiodo. . . . .	.47
2.1.2.3.3 CCD. . . . .	.48
2.1.2.4 Processamento eletrônico . . . . .	.51
2.2 Conclusão. . . . .	.52

<b>3. Avaliação básica do sensor de pH com fibra óptica.</b>	53
3.1 Tipos e seleção dos indicadores de pH.	54
3.2 Espectro dos indicadores diluídos.	57
3.3 Definições e construção do sensor.	60
3.3.1 Imobilização do indicador.	61
3.3.2 Elemento refletor.	67
3.3.3 Membrana tubular	68
3.3.4 Fibra óptica	69
3.3.5 Construção do sensor	69
3.4 Instrumento opto-eletrônico.	71
3.5 Desempenho do sensor de fibra óptica básico.	75
3.5.1 Tamanho do poro da membrana.	77
3.5.2 Comprimento da fase sensora.	77
3.5.3 Capacidade de tamponamento	78
3.5.4 Concentração de "bis-acrylamide"	79
3.5.5 Concentração de "acrylamide"	79
3.5.6 Diâmetro da fase reagente	80
3.6 Conclusão.	82
<b>4. Sistema com sensor de fibra óptica desenvolvido.</b>	84
4.1 Especificação do sistema construído.	85
4.2 Sensor com fibra óptica.	91
4.3 Instrumento opto-eletrônico.	93
4.3.1 Sistema de excitação	93
4.3.2 "Splitter" com fibra óptica.	97
4.3.3 Sistema de fotodeteção	100
4.4 Sensor com sensibilidade na faixa de pH 1 a 7.	102
4.5 Método de determinação do pH	107
4.6 "Software"	107
4.7 Conclusão.	116
<b>5. Resultados</b>	118
5.1 Desempenho do sensor em solução tampão	118
5.1.1 Estabilidade temporal.	119
5.1.1.1 Instrumento opto-eletrônico.	119



5.1.1.2	Estabilidade do sensor . . . . .	.122
5.1.1.2.1	Vazamento de indicador . . . . .	.123
5.1.1.2.2	Acomodação das microesferas. . . . .	.124
5.1.1.2.3	Perda de indicador . . . . .	.126
5.1.1.2.4	Descoloração . . . . .	.126
5.1.1.3	Estabilidade final . . . . .	.127
5.1.2	Dependência da temperatura . . . . .	.128
5.1.3	Dependência da força iônica. . . . .	.130
5.1.4	Calibração . . . . .	.133
5.1.4.1	Procedimento . . . . .	.133
5.1.4.2	Eficácia do método . . . . .	.134
5.1.5	Reprodutibilidade da medida. . . . .	.136
5.1.6	Tempo de resposta. . . . .	.137
5.2	Desempenho do sensor "in vitro". . . . .	.139
5.2.1	Exatidão do sensor . . . . .	.140
5.2.2	Reprodutibilidade da medida. . . . .	.142
5.3	Desempenho do sensor "in vivo" . . . . .	.143
5.4	Conclusão. . . . .	.148
<b>6.</b>	<b>Discussão geral e conclusões . . . . .</b>	<b>.149</b>
6.1	Análise comparativa sensor - eletrodos . . . . .	.149
6.1.1	Desvantagem do sensor. . . . .	.151
6.1.2	Características similares. . . . .	.151
6.1.3	Vantagens do sensor. . . . .	.153
6.2	Toxicidade das substâncias do sensor . . . . .	.155
6.3	Particularidades, continuidade e aprimoramentos. . . . .	.156
<b>Apêndice.</b>	<b>. . . . .</b>	<b>.161</b>
A -	Soluções tamponadas . . . . .	.161
<b>Referências bibliográficas.</b>	<b>. . . . .</b>	<b>.167</b>

# LISTA DAS FIGURAS

Figura 1.1:	Perfil do registro do pH gástrico. . . . .	6
Figura 1.2:	Diagrama típico de um sistema óptico . . . . .	.11
Figura 2.1:	Sistema com sensor óptico genérico . . . . .	.18
Figura 2.2:	Estrutura química dos cromóforos . . . . .	.24
Figura 2.3:	Estrutura química dos tautômeros . . . . .	.25
Figura 2.4:	Absorbância de um único indicador. . . . .	.30
Figura 2.5:	Absorbância de três indicadores. . . . .	.30
Figura 2.6:	Absorbância de mistura de indicadores. . . . .	.31
Figura 2.7:	Transmitância de mistura de indicadores. . . . .	.32
Figura 2.8:	Configurações de sensores. . . . .	.34
Figura 2.9:	Fibra óptica . . . . .	.37
Figura 2.10:	Diagrama em blocos dos sistema de medida . . . . .	.39
Figura 2.11:	Separação das radiações. . . . .	.43
Figura 2.12:	Espelho dicróico . . . . .	.44
Figura 2.13:	Discriminação da radiação. . . . .	.45
Figura 2.14:	Elemento básico do CCD . . . . .	.49
Figura 2.15:	Detector CCD . . . . .	.50
Figura 3.1:	Sensibilidade óptica de um indicador de pH . . . . .	.58
Figura 3.2:	Sensibilidade óptica de três indicadores . . . . .	.59
Figura 3.3:	Diagrama genérico do sensor. . . . .	.61
Figura 3.4:	Estrutura química do "acrylamide". . . . .	.62
Figura 3.5:	Estrutura química do "bis-acrylamide". . . . .	.63
Figura 3.6:	Representação da imobilização. . . . .	.64
Figura 3.7:	Preparação das microesferas. . . . .	.66
Figura 3.8:	Microesferas de "polyacrylamide" . . . . .	.66
Figura 3.9:	Microesferas com indicador e micropartículas . . . . .	.68
Figura 3.10:	Sensor básico construído . . . . .	.69
Figura 3.11:	Diagrama do instrumento básico . . . . .	.72
Figura 3.12:	Respostas espectrais dos instrumentos. . . . .	.74
Figura 3.13:	Diagrama do instrumento utilizado. . . . .	.75

Figura 3.14:	Tempo de resposta em função do diâmetro. . . . .	.81
Figura 3.15:	Tempo de resposta em função da área. . . . .	.81
Figura 4.1:	Acoplamento da radiação na fibra . . . . .	.85
Figura 4.2:	Divisor de feixe com "half mirror" . . . . .	.88
Figura 4.3:	Divisor de feixe com "splitter". . . . .	.88
Figura 4.4:	Diagrama do sistema construído . . . . .	.91
Figura 4.5:	Representação do sensor construído. . . . .	.92
Figura 4.6:	Representação do conector SMA 905. . . . .	.92
Figura 4.7:	Desenho da lâmpada e do LED. . . . .	.94
Figura 4.8:	Acoplamento da radiação. . . . .	.96
Figura 4.9:	Sistema de excitação desenvolvido. . . . .	.97
Figura 4.10:	"Splitter" de fibra de vidro . . . . .	.98
Figura 4.11:	"Splitter" construído. . . . .	100
Figura 4.12:	Sistema de detecção empregado. . . . .	102
Figura 4.13:	Microesferas utilizadas. . . . .	106
Figura 4.14:	Espectro final . . . . .	106
Figura 4.15:	"Menu" principal do "software" . . . . .	108
Figura 4.16:	Apresentação gráfica da subrotina n.1. . . . .	110
Figura 4.17:	Curva de calibração pH 1 a pH 4. . . . .	112
Figura 4.18:	Curva de calibração pH 4 a pH 7. . . . .	113
Figura 5.1:	Arranjo de teste de estabilidade . . . . .	121
Figura 5.2a:	Presença de ar na fase reagente do sensor. . . . .	125
Figura 5.2b:	Desenho do sensor construído . . . . .	125
Figura 5.3:	Gráfico da dependência da temperatura. . . . .	131
Figura 5.4:	Resposta do sensor em solução tampão . . . . .	137
Figura 5.5:	Tempo de resposta do sensor. . . . .	138
Figura 5.6:	Exatidão do sensor "in vitro". . . . .	142
Figura 5.7:	Resposta do sensor "in vitro". . . . .	143
Figura 5.8:	Sensor para avaliações "in vivo" . . . . .	144
Figura 5.9:	Combinação eletrodo/sensor . . . . .	145
Figura 5.10:	Resposta do sensor "in vivo" . . . . .	147

## LISTA DAS TABELAS

Tabela 1.1:	Características dos eletrodos . . . . .	10
Tabela 3.1:	Indicadores da classe sulfoneftaleína . . . . .	56
Tabela 3.2:	Indicadores de outras classes . . . . .	56
Tabela 5.1:	Estabilidade temporal . . . . .	.129
Tabela 5.2:	Dependência da temperatura. . . . .	.130
Tabela 5.3:	Concentrações dos íons no suco gástrico . . . . .	.132
Tabela 5.4:	Dependência da força iônica . . . . .	.132
Tabela 5.5:	Resultado da calibração de dez sensores . . . . .	.135
Tabela 5.6:	pH medido nas amostras de suco gástrico . . . . .	.141
Tabela 6.1:	Características do sensor e dos eletrodos . . . . .	.150

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

As medições médicas e biológicas têm recebido muita atenção nos últimos anos, dada sua importância principalmente no diagnóstico de disfunções do organismo humano. O projeto e o desenvolvimento dos sistemas de medição biomédica, além das restrições normais de um sistema de medida convencional, devem considerar a anatomia do ponto de medida, a atividade fisiológica e a segurança do paciente [Payne, 1989]. Dessa maneira, a teoria e o projeto dos sistemas dependem de várias áreas do conhecimento, tais como, fisiologia e anatomia humana, física do estado sólido, engenharias eletrônica, elétrica e mecânica, acústica, óptica e mecânica dos fluidos. O tema é portanto complexo e interdisciplinar.

Dentre os sistemas de medição biomédica, a aplicação que tem atraído a maior atenção é a monitoração contínua de grandezas químicas em pacientes em tratamento intensivo. Equipamentos para a monitoração do pH, dos gases do sangue, tais como,  $PCO_2$  e  $PO_2$ , e gases anestésicos já se encontram disponíveis comercialmente. Além desses, sensores para a medição de potássio, cálcio, glicose, etc., estão em contínuo desenvolvimento, principalmente

com respeito à miniaturização e biocompatibilidade.

Particularmente o pH, a sua medição tem merecido uma contínua investigação, pois a sua regulação é um fator importante no organismo humano. O valor do pH nas diferentes soluções pode variar desde menos de 0 até mais de 14. Baseado na concentração do íon hidrogênio (moles/litro), Soren Peter Lauritz Sorensen enunciou em 1909 o conceito do pH [Stock, 1989]:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] \quad (1.1)$$

Após o desenvolvimento do conceito termodinâmico da atividade iônica, 15 anos mais tarde, a definição anterior foi modificada e o pH foi redefinido como o negativo do logaritmo da atividade do íon hidrogênio [Emde, 1990]. A atividade, em linhas gerais, expressa a disponibilidade de um íon em participar de uma reação química [Cobbold, 1974]. Entretanto, como a atividade do íon hidrogênio e a sua concentração são grandezas muito próximas, o pH pode ser considerado em termos práticos como função da concentração [Crockford e Knight, 1964].

## 1.1 Monitoração do pH gástrico

O sistema digestivo tem a função principal de absorver os nutrientes e eliminar a parcela não nutritiva do alimento. Essa tarefa é realizada pela movimentação do alimento ingerido através de compartimentos seqüenciais, cada um com adequado valor de pH e conteúdo enzimático, possibilitando a digestão e a absorção dos nutrientes. Os principais fatores determinantes do valor do pH gástrico são as secreções de ácido e muco, o alimento ingerido, a saliva engolida, as regurgitações duodenais, pancreáticas e biliares, e a eficácia da mistura e da evacuação do quimo [Fuchs et al., 1991].

O valor do pH gástrico durante um período de 24 horas tipicamente se encontra entre 1 e 2 (60% deste período de tempo). Raramente o pH atinge o valor 1. Por outro lado, elevações transitórias até pH 7 podem ser observadas após a ingestão de alimento e, em alguns casos, durante a noite. As flutuações do pH após as refeições possivelmente refletem a heterogeneidade da composição do suco gástrico, ao passo que os episódios alcalinos durante a noite são provavelmente devido ao refluxo duodenal [Fimmel et al., 1985; Pounder e Fraser, 1993].

A monitoração contínua por 24 horas da acidez gástrica é um procedimento clínico importante na investigação de desordens no estômago e na avaliação de drogas antissecretórias e antiácidos [Walt, 1986]. Clinicamente, o pH de pacientes em estado crítico deve ser mantido acima de 4, evitando-se assim o desenvolvimento de úlceras e sangramentos [Ahern e Rice, 1991]. Além disso, o procedimento é empregado para detectar o refluxo duodenal [Fuchs et al., 1991].

As técnicas validadas e empregadas na determinação do pH gástrico são basicamente a aspiração e determinação do pH do suco gástrico e a monitoração contínua do pH intragástrico com eletrodos de vidro ou antimônio, através da inserção do dispositivo via ducto nasal [Meiners et al., 1982].

As medições em amostras de suco gástrico aspirado apresentam uma série de limitações. O procedimento de aspiração afeta a medida diretamente, devido à própria remoção do suco gástrico, ou indiretamente pela estimulação do refluxo duodenal ou provocação de respostas secretórias. A presença de alimento sólido no estômago impõe dificuldades na aspiração. Procedimentos repetitivos de amostragem são inconvenientes e desconfortáveis para o paciente. A amostragem noturna é freqüentemente impossível devido aos baixos volumes existentes e a técnica apresenta uma reprodutibilidade pobre [Fimmel et al., 1985; Merki, 1989].



A monitoração do pH gástrico com eletrodo tem sido apontada como a alternativa em substituição ao método de aspiração, pois não requer a remoção do suco gástrico e o valor do pH pode ser medido com baixos volumes do fluido. Essa técnica permite determinar continuamente por 24 horas o valor do pH, fornecendo um perfil detalhado da acidez gástrica [Fimmel et al., 1985]. A partir dos dados obtidos, a identificação de anormalidades no sistema gástrico é obtida com uma análise estatística do perfil detectado, notadamente através de uma distribuição em frequência dos dados [Fuchs et al., 1991].

No procedimento clínico, o eletrodo pré-calibrado é inserido até o estômago, via ducto nasal. A distância entre o nariz e a terminação do eletrodo em pacientes adultos é aproximadamente de 57cm. O posicionamento do eletrodo no "corpus fundus" do estômago é geralmente controlado por fluoroscopia.

A figura 1.1 apresenta um registro contínuo por 24 horas do pH gástrico médio de dez voluntários saudáveis. A monitoração foi efetuada simultaneamente com os eletrodos de vidro (referência incorporada) e de antimônio (referência externa). O período de monitoração iniciou-se às 7:45h e as refeições padronizadas foram realizadas às 08:15h, café da manhã; 13:00h, almoço e 19:00h, jantar [Angerer et al., 1990].

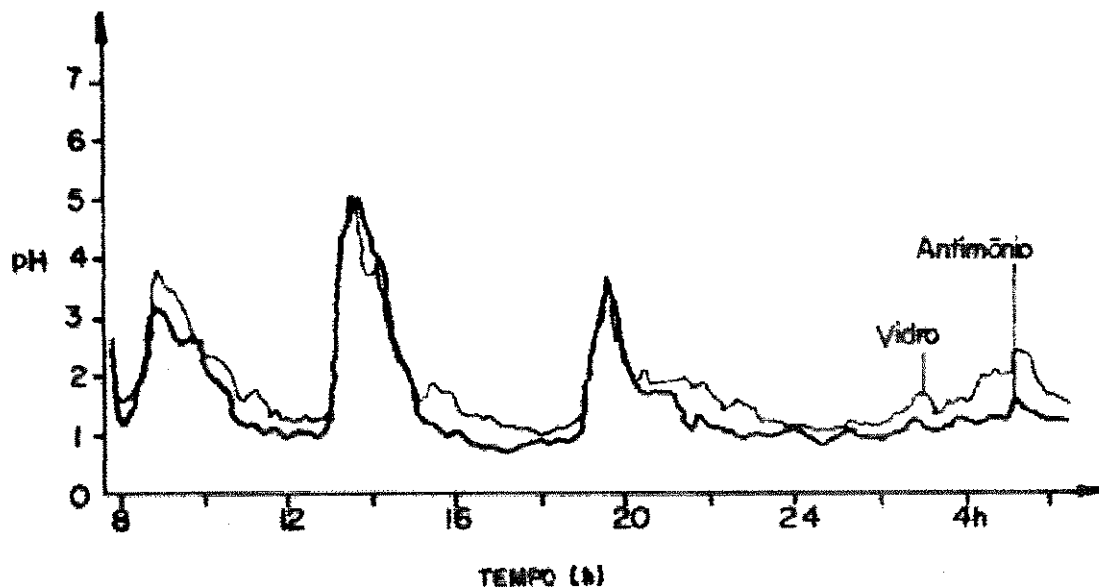


Figura 1.1: Perfil do pH gástrico médio em dez voluntários saudáveis (modificado de Angerer et al., 1990).

Os valores dos pHs medidos pelos eletrodos de vidro e antimônio (figura 1.1) apresentam um perfil similar, com uma elevação pronunciada do pH, no caso até pH 5, durante e após cada refeição e o retorno ao valor basal, entre pH 1 e 2, algumas horas depois. As transições do pH são lentas, variando entre dezenas de minutos a algumas horas, e a frequência das variações basicamente acompanha a frequência das refeições. Os pequenos desvios existentes entre as leituras são devidos aos artefatos inerentes nas avaliações "in vivo" e os erros introduzidos pelo eletrodo de referência externo do eletrodo de antimônio [Angerer et al., 1990].

## 1.2 Eletrodos de vidro e antimônio

O eletrodo de vidro é o sensor mais empregado para a medição do pH de solução aquosa [Emde et al., 1989] e fluidos corporais [Caestecker e Heading, 1990]. A medição do pH é baseada na geração de um potencial elétrico na interface líquido-vidro, a qual é proporcional à razão das concentrações do íon hidrogênio nos dois lados do vidro. O bulbo de vidro contém uma solução com concentração constante de hidrogênio (geralmente HCl) e um eletrodo de potencial definido (geralmente prata/ cloreto de prata) [Bennett, 1987]. Um eletrodo de referência é necessário para fechar o circuito, formando uma célula eletroquímica.

O eletrodo de vidro com referência incorporada é também empregado em pílula radiotelemétrica, a qual, geralmente presa por um cabo de "nylon", é ingerida pelo paciente. O procedimento pode interferir com a mastigação e induzir vômito com frequência maior que o eletrodo de vidro convencional, devido a rigidez do cabo. As desvantagens principais da radiopílula são a perda de sinal e interferências eletromagnéticas de fontes externas [Caestecker e Heading, 1990]. O seu custo é em torno de US\$ 250,00 [Bennett, 1987].

O eletrodo de antimônio policristalino é um eletrodo do tipo metal / metal-óxido e foi desenvolvido por Uhl e Kestranek em 1923 [Ask et al., 1982]. O princípio de funcionamento baseia-se na fina camada de óxido de antimônio presente na superfície do

antimônio, a qual gera um potencial de corrosão proporcional à concentração do íon hidrogênio da solução. Atualmente, o eletrodo é construído com antimônio monocristalino, reduzindo assim o tempo de corrosão e aumentando, em consequência, o tempo de utilização do mesmo [Oesch et al., 1987].

### **1.2.1 Limitações e vantagens dos eletrodos**

Os eletrodos de vidro estão disponíveis tanto com o eletrodo de referência externo quanto com o eletrodo de referência incorporado. O primeiro dispositivo possui um diâmetro na faixa de 1,6 a 5,0mm. O outro possui um diâmetro entre 3,0 a 4,5mm e apresenta um comprimento maior.

A dimensão física do último dificulta a inserção via ducto nasal [Emde et al., 1987; Caestecker, 1989] e causa maior desconforto ao paciente quando períodos de monitoração prolongados são necessários [Oesch et al., 1987]. Pelo mesmo motivo, restringe o seu uso tanto em aplicações pediátricas [Vandenplas et al., 1987; Vandenplas, 1990], quanto combinado com certos endoscópios [Oesch et al., 1987].

Apesar das dimensões menores do primeiro, a utilização de um eletrodo de referência externo apresenta algumas inconveniências [Emde et al., 1989]. Perda de contacto com a pele, mudança na composição dos íons devido à perspiração [Vandenplas et al.,

1987] e alterações nas propriedades do gel de acoplamento [Vandenplas, 1990] têm sido apontadas como fontes de discrepâncias em relação aos registros obtidos com o eletrodo de referência incorporado. Os desvios podem resultar em erros da ordem de 0,3 a 0,6 unidades de pH durante a monitoração [Caestecker e Heading, 1990].

No aspecto físico, o eletrodo de vidro apresenta uma robustez mecânica pobre, pois o bulbo de vidro (50 a 100 $\mu$ m de espessura), geralmente feito artesanalmente, pode quebrar durante o manuseio [Oesch et al., 1987]. O alto preço praticamente obriga a sua reutilização. Como nem calor e nem gás esterilizante são recomendados para qualquer tipo de eletrodo e não existe um procedimento padrão adotado, eletrodos descartáveis são a melhor opção para prevenir a transmissão de doenças infecciosas [Emde et al., 1987; Emde, 1990].

O eletrodo de antimônio, por sua vez, apresenta uma robustez mecânica boa e diâmetro diminuto (1,2 a 4,0mm). Adversamente, o dispositivo emprega um eletrodo de referência externo e sua resposta é afetada por oxigênio, dióxido de carbono, agentes oxidantes e redutores, fosfatos e citratos [Emde, 1990], restringindo o seu uso em avaliações gástricas [Emde et al., 1987].

O tempo de vida médio de um eletrodo de vidro é da ordem de 40 a 60 monitorações contínuas por 24 horas, embora o

envelhecimento produza uma redução no tempo de resposta [Vandenplas et al., 1987], provavelmente devido ao ataque do HCl ao bulbo de vidro [Ask et al., 1982]. Por outro lado, o eletrodo de antimônio é indicado para um máximo de 5 monitorações, devido ao fenômeno de corrosão envolvido [Vandenplas et al., 1987; Klinkenberg et al., 1989]. A tabela 1.1 apresenta de forma comparativa as principais características estáticas e dinâmicas dos dispositivos mencionados.

Tabela 1.1: Comparação entre as características do eletrodo de vidro com referência externa, do eletrodo de vidro com referência incorporada e do eletrodo de antimônio.

Característica	Vidro referência externa	Vidro referência incorporada	Antimônio	Referência bibliográfica
Diâmetro (mm)	1,6 a 5,0	3,0 a 4,5	1,2 a 4,0	Caestecker, 1989
Faixa de pH	0 a 12	0 a 12	1 a 10	Klinkenberg et al., 1989
Seletividade ao H <sup>+</sup>	total	total	parcial	McLauchlan et al, 1987
Sensibilidade	55mV/pH	55mV/pH	48mV/pH	McLauchlan et al, 1987
Desvio temporal (pH / 24 horas)	0,11	0,11	0,47	McLauchlan et al, 1987
Desvio temp. (pH/ °C de 22 a 37°C)	0,0033	0,0033	0,0367	McLauchlan et al, 1987
Característica de transferência	linear	linear	histerese	McLauchlan et al, 1987
Tempo de resposta (segundos)	10 a 45	< 25	< 30	Klinkenberg et al., 1989
"Buffers" de calibração (pH1 a 7)	2	2	2	Bennett, 1987
Características do "buffer"	qualquer	qualquer	especifico	Ask et al, 1982
Monitoração gástrica	sim	sim	c/restrições	Emde et al., 1989
Risco de choque elétrico	sim	sim	sim	-
Rigidez mecânica	ruim	ruim	boa	Oesch et al., 1987
Descartável	não	não	não	Oesch et al., 1987
Referência	externa	incorporada	externa	Klinkenberg et al., 1989
Preço médio (US\$)	250	500	150	Klinkenberg et al., 1989
Vida útil (x 24 horas)	50	50	5	Vandenplas et al., 1987

### 1.3 Sensor de pH com fibra óptica

Sensores com fibra óptica para a medição de parâmetros químicos em meio biológico têm apresentado um desenvolvimento significativo nos últimos anos [Peterson e Vurek, 1984; Seitz, 1988; Seitz, 1989; Ashworth e Narayanaswamy, 1989]. Os sensores possuem tipicamente um transdutor químico imobilizado na extremidade de uma única fibra óptica ou de um feixe de fibras ópticas e um instrumento opto-eletrônico para excitação/deteção (figura 1.2). A substância a ser medida, que normalmente é incolor e não luminescente, interage com o transdutor químico, alterando o equilíbrio de um indicador colorimétrico ou luminescente. Quando iluminado, o transdutor reflete ou emite radiação, a qual retorna para o detector. A luz de retorno apresenta uma distribuição espectral diferente da radiação da fonte, sendo utilizada portanto para determinar a concentração da substância sob investigação.

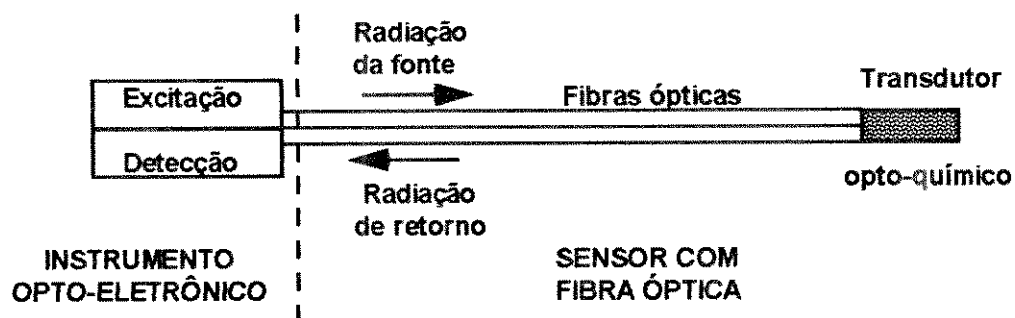


Figura 1.2: Diagrama esquemático de um sistema genérico com sensor de fibra óptica.

Dentre os inúmeros sensores confeccionados, a aplicação clínica que tem atraído maior atenção é a monitoração contínua e "in vivo" do pH, PCO<sub>2</sub> e PO<sub>2</sub> do sangue arterial. Isso se deve principalmente ao substancial mercado que existe para a monitoração dos parâmetros citados em pacientes em estado crítico [Seitz, 1988].

Particularmente aos sensores de pH, o emprego da técnica óptica na aplicação supramencionada é simplificado devido à faixa estreita de variação do pH do sangue arterial, tipicamente entre 7,38 e 7,44 [Wheeler, 1978]. Como as substâncias sensoras (indicadores de pH) apresentam tipicamente sensibilidade numa faixa de até 3 unidades de pH, a confecção dos sensores desenvolvidos foi baseada no emprego de apenas uma única substância sensora. Essa característica apresenta três vantagens imediatas. Primeiro, o sensor pode ser projetado para operar na faixa linear da curva de sensibilidade óptica do indicador de pH, o que simplifica o processamento eletrônico no sistema detector. Segundo, o indicador de pH pode prontamente ser identificado, a partir da sua faixa de sensibilidade óptica. Terceiro, a reprodutibilidade do sensor é facilitada, devido ao emprego de apenas uma única substância sensora.

Entretanto, recentemente, Posch et al. (1989) desenvolveram o primeiro sensor com fibra óptica para a medição do pH na faixa de 0 a 7, que pode ser aplicado para monitorações gástricas. O



sensor é baseado no emprego de dois indicadores fluorescentes de pH, imobilizados separadamente em celulose, a qual é posicionada na terminação de um feixe de fibras ópticas. No entanto, o instrumento opto-eletrônico consiste de um espectrofluorímetro comercial, o qual não compensa as não linearidades do sensor, sendo utilizado apenas para a determinação dos espectros de emissão do sensor em função do pH. O procedimento de calibração dos sensores não foi apresentado e o seu desempenho não foi avaliado em suco gástrico "in vitro" e "in vivo".

#### **1.4 Objetivos do presente trabalho**

A técnica de sensores com fibras ópticas apresenta algumas vantagens na aplicação biomédica em relação aos eletrodos convencionais. O princípio óptico garante segurança contra choques elétricos, imunidade à radiação eletromagnética e a eliminação da referência externa. O diâmetro milimétrico ou micrométrico do sensor facilita a sua inserção via ducto nasal, viabilizando o seu uso em aplicação pediátrica, e reduzindo o desconforto do paciente em monitorações prolongadas. O custo reduzido, se comparado aos eletrodos convencionais, possibilita que o sensor possa ser considerado um item descartável, assegurando a assepsia nas monitorações e eliminando a mão-de-obra necessária para o procedimento de reesterilização.

Considerando a importância clínica da monitoração contínua do pH estomacal e as vantagens da técnica óptica, ainda não devidamente exploradas na aplicação pretendida, o objetivo principal deste trabalho é apresentar o projeto e a construção de um sensor com fibra óptica e do correspondente instrumento optoeletrônico para a medição do pH gástrico. Além disso, apresentam-se os resultados do desempenho do sistema desenvolvido em solução tampão (Apêndice A), em amostras de suco gástrico "in vitro" e em um animal "in vivo". Finalmente, apresenta-se uma análise comparativa entre as características do sistema construído com as dos eletrodos de vidro e antimônio.

Dentre as características principais do protótipo, o sensor deve apresentar sensibilidade na faixa de pH 1 a pH 7, tipicamente necessária para a avaliação gástrica (Pounder e Fraser, 1993). Conforme apresentado anteriormente, esta característica implica que o sensor deve empregar uma mistura de no mínimo dois indicadores de pH, visando atender a faixa de medida de 6 unidades de pH. Dentro dessa faixa, a exatidão e a resolução devem ser de 0,1 unidades de pH, considerando a larga faixa de medida da aplicação proposta.

O sensor deve ainda apresentar um tempo de resposta de no máximo alguns minutos, o que permite acompanhar as variações típicas do pH estomacal (figura 1.1). Além disso, o desvio no valor do pH nas monitorações contínuas por 24 horas deve ser inferior a 0,2 unidades de pH, valor aceito para esta aplicação

clínica (Klinkenberg et al., 1989).

Dentre as suas características físicas, o sensor deve apresentar resistência mecânica adequada e dimensões reduzidas para viabilizar as avaliações "in vivo". Ainda, o sensor deve ser construído com fibras ópticas de plástico, devido às suas características de flexibilidade e integridade física na torção, necessárias para a aplicação biomédica.

O custo do sensor deve ser o menor possível, permitindo que o dispositivo possa ser considerado um item descartável.

Além do sensor, algumas características do instrumento optoeletrônico devem ser delineadas. A fonte óptica deve ser preferencialmente de baixa potência, o que permite a obtenção de um sistema compacto, e possuir uma vida útil de no mínimo uma centena de horas, considerando que as monitorações típicas do pH gástrico são por um período de 24 horas. O sistema de fotodeteção e processamento do sinal deve continuamente, durante o período de monitoração proposto, transduzir a radiação incidente, determinar o pH, apresentar graficamente o perfil do pH medido e armazenar os valores determinados para análises posteriores.

Finalmente, um procedimento de calibração deve ser determinado, permitindo a utilização serial do sensor projetado.

A apresentação deste trabalho está dividida em seis capítulos, incluindo esta Introdução. O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica de um sistema típico com sensor de fibra óptica para a medição do pH. No Capítulo 3, os parâmetros de projeto do sistema proposto foram delineados, a partir da avaliação de um sistema básico desenvolvido. O Capítulo 4 apresenta o protótipo construído. No Capítulo 5, apresentam-se os resultados obtidos dos testes em solução, "in vitro" e "in vivo". Por fim, o Capítulo 6 é dedicado às discussões gerais e conclusões.

## CAPÍTULO 2

### SISTEMA ÓPTICO PARA A MEDIÇÃO DO pH

Métodos ópticos têm se mostrado relevantes em vários campos da química analítica. A colorimetria e a fotometria têm sido utilizadas, por quase um século, na determinação qualitativa de espécies químicas e bioquímicas. O exemplo mais típico é provavelmente a fita de papel de pH contendo indicadores colorimétricos immobilizados em celulose. Em 1930, um método baseado na extinção ("quenching") da fosforescência para a detecção de baixos níveis de oxigênio foi apresentado por Kautsky e Hirsch. Em 1968, Bergman foi o primeiro a desenvolver um equipamento de medição de oxigênio baseado na extinção da fluorescência [Wolfbeis, 1992]. Na década de 70, Lübbers e Optiz (1975) elaboraram o primeiro esquema do sensor com fibra óptica, baseado num indicador de pH. Finalmente, Peterson et al. (1980) desenvolveram um protótipo portátil de um sistema com sensor de fibra óptica para a medição do pH sanguíneo e apresentaram uma avaliação "in vivo" dessa técnica.

## 2.1 Sistema genérico com sensor de fibra óptica para a medição do pH

Nos últimos anos têm havido um notável interesse no desenvolvimento de sensores químicos com fibra óptica. Os principais fatores que contribuíram para o surgimento e o crescimento da área foram a disponibilidade das fibras ópticas, desenvolvidas para as comunicações ópticas; a potencialidade de desenvolver sensores com melhores características estáticas e dinâmicas, quando comparado aos sensores convencionais; e por fim, a disponibilidade dos computadores para o processamento digital da informação [Seitz, 1989].

Os sistemas de medição de pH construídos com a técnica óptica possuem dois blocos básicos: o sensor propriamente dito e o instrumento opto-eletrônico, conforme mostrados na figura 2.1.

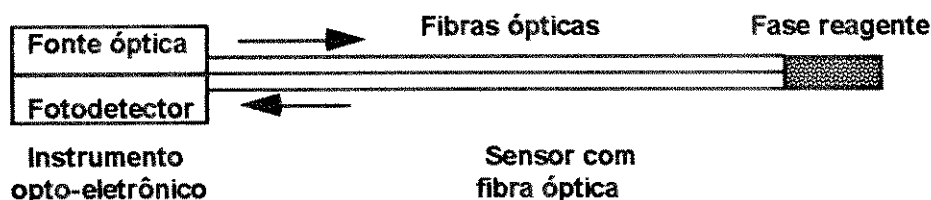


Figura 2.1: Representação esquemática de um sistema genérico de medição de pH, composto do sensor de fibra óptica e do instrumento opto-eletrônico.

Embora exista uma variedade de configurações, os sensores tipicamente compartilham uma fase reagente (indicador de pH), imobilizada na extremidade de uma ou mais fibras ópticas. A fase reagente pode, por exemplo, ser confinada no interior de uma membrana permeável, cujos poros permitem a difusão da substância a ser analisada (analítico), mas impedem a saída da fase reagente. Assim, o analítico interage com a fase, produzindo uma alteração na sua coloração ou no seu nível de luminescência. A variação óptica obtida é então monitorada pela radiação presente na porção terminal da fibra óptica.

O instrumento opto-eletrônico, por sua vez, é basicamente composto pela fonte óptica, que gera a radiação na faixa adequada, e pelo sistema de fotodeteção, responsável pela discriminação e transdução da radiação e o processamento eletrônico do sinal elétrico. Sendo assim, a radiação emitida pela fonte trafega no sentido da fase reagente, a qual reflete parcialmente a radiação absorvida ou emitida por luminescência. A distribuição espectral da radiação de retorno é alterada em função da concentração do analítico. Essa propriedade é o princípio de operação dos sensores que empregam a técnica óptica [Seitz, 1989].

A seguir, apresentam-se os componentes principais que compõem o sensor e os elementos principais do instrumento opto-eletrônico.

### **2.1.1 Sensor com fibra óptica**

O sensor com fibra óptica é basicamente constituído das substâncias químicas sensoras (indicadores de pH) e da fibra óptica.

#### **2.1.1.1 Indicador de pH**

Os indicadores de pH são substâncias orgânicas de caráter fracamente ácido ou básico, que têm a propriedade de alterar a coloração ou luminescência com a variação do pH. A mudança de coloração não ocorre bruscamente, mas de uma maneira gradual entre valores definidos da escala de pH. A faixa dentro da qual se processa a mudança de coloração é conhecida como zona de transição ou sensibilidade.

As primeiras descobertas de indicadores de pH limitaram-se à identificação de substâncias vegetais (extratos) que, em contacto com determinadas soluções, alteravam a sua coloração. Curiosamente, a primeira substância provavelmente identificada e noticiada foi o "extrato de pau brasil", por volta de 1555. Como o extrato era largamente utilizado como corante, observou-se que a sua coloração alterava quando tratado com diferentes soluções [Madsen, 1972].



Em 1664, com a publicação do livro História Experimental das Cores, Robert Boyle reconheceu que as substâncias alteram a sua coloração em função da acidez ou alcalinidade do meio, podendo portanto serem empregadas como indicadores de pH. Dentre as primeiras aplicações dos indicadores, destacam-se o estudo da qualidade de água mineral e o emprego em análise titulométrica, tal como a efetuada por W. Lewis em 1767, empregando o indicador "litmus" [Madsen, 1972].

A partir do início do século XIX, a alcalimetria e, posteriormente, a acidimetria já eram conhecidas e aplicadas como métodos analíticos. Os indicadores colorimétricos, ainda baseados em substâncias naturais, eram utilizados para a monitoração do ponto final nas titulações [Madsen, 1972].

A desvantagem dos indicadores até então conhecidos era o desempenho limitado, devido principalmente às impurezas existentes nos extratos. Por isso, um desenvolvimento importante e significativo teve início com a introdução dos indicadores sintéticos. Os primeiros a serem desenvolvidos foram os indicadores da família das sulfoneftaleínas, proposto por Luck em 1877, seguidos pelos da família "azo", apresentado por Miller em 1878 [Tomicek, 1951].

A partir das primeiras descobertas, um número crescente de indicadores colorimétrico e luminescente foi desenvolvido e utilizado extensivamente em titulometria até por volta da década

de 30, a partir da qual o eletrodo de vidro se tornou um dispositivo cada vez mais comum nos laboratórios de análises químicas. Entretanto, no final dos anos 70 e início do anos 80, os indicadores de pH retornaram ao cenário científico com a introdução do conceito de sensores de fibra óptica. Atualmente, vários grupos de pesquisa se dedicam exclusivamente ao desenvolvimento de novos indicadores, particularmente com características ópticas no infravermelho próximo, podendo assim utilizar o "hardware" já disponível para as comunicações ópticas [Fabian e Zahradnik, 1989; Jones e Porter, 1989].

Embora a teoria descrita a seguir seja aplicada tanto para os indicadores colorimétricos quanto para os luminescentes, a análise desenvolvida considera apenas indicadores do tipo colorimétrico.

A primeira tentativa para explicar o seu funcionamento teve como base a teoria da dissociação eletrolítica. Baseado nessa, Oswald em 1894 formulou a *Teoria Iônica* dos indicadores, segundo a qual os indicadores são ácidos ou bases fracas, em que a molécula não dissociada e o íon respectivo possuem colorações diferentes [Ohlweiler, 1968].

Um indicador ácido qualquer pode ser representado pelo símbolo  $H.Ind$ . A sua dissociação é dada pela equação 2.1 [Seitz, 1984]:



(2.1)

Se a substância se encontra em um meio nitidamente ácido, o equilíbrio se desloca para a esquerda, reprimindo a ionização. O predomínio das moléculas não dissociadas confere à solução a coloração A. De outro lado, se o indicador se encontra em uma solução alcalina, os íons  $\text{OH}^-$  combinam-se com os íons  $\text{H}^+$  do indicador, formando moléculas não dissociadas de  $\text{H}_2\text{O}$ . Dessa maneira, o equilíbrio se desloca para a direita. A predominância dos íons  $\text{Ind}^-$  faz com que a solução apresente a coloração B. Analogamente, a teoria explica o funcionamento dos indicadores básicos [Ohlweiler, 1968].

A *Teoria Iônica* trata de uma maneira simples a mudança de coloração dos indicadores conforme as soluções em teste sejam ácidas ou básicas. Essa não é, todavia, uma teoria completa, pois a coloração de uma substância orgânica depende da estrutura da molécula. Assim sendo, a mudança de coloração de um indicador é o resultado de um reagrupamento intermolecular, que acarreta uma modificação na estrutura do indicador [Bishop, 1972].

A coloração das substâncias orgânicas é devida à presença de determinados grupos atômicos ou grupos de ligações duplas nas respectivas moléculas. Entre os grupos cromóforos, destacam-se:

nitro ( $O=N=OH$ ); azo ( $-N=N-$ ) e o quinoídico, obtido a partir do núcleo benzênico e ilustrado na figura 2.2.



Figura 2.2: Estrutura química dos cromóforos núcleo benzênico e núcleo quinoídico.

A *Teoria Cromófora* explica a mudança de coloração como o resultado de um reagrupamento intermolecular. Como o reagrupamento envolve a formação e o desaparecimento de grupos cromóforos, haverá mudança de coloração. A interconversão das duas formas isômeras (isomeria reversível) do indicador é um processo reversível, conhecido como tautomeria. Os correspondentes isômeros são portanto chamados de tautômeros. De acordo com a *Teoria Cromófora*, um indicador pode ter diferentes formas tautômeras com distintas colorações e em equilíbrio entre si [Ohlweiler, 1968].

O mecanismo da mudança de coloração de um indicador de pH pode ser ilustrado com o comportamento do paranitrofenol, conforme apresentado na figura 2.3.

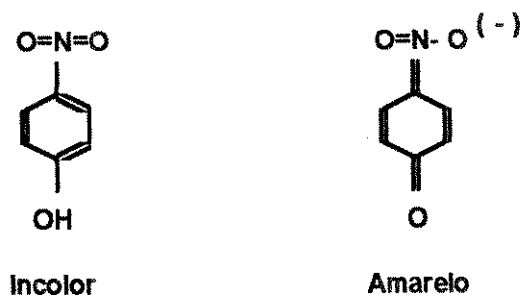
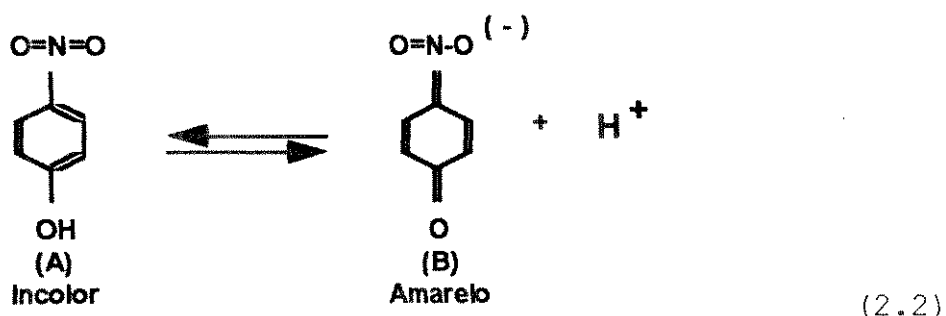


Figura 2.3: Estrutura química dos tautômeros da substância paranitrofenol.

A modificação na estrutura do paranitrofenol consiste na conversão de um núcleo benzênico em um núcleo quinoídico (ver figura 2.2). A coloração amarela do paranitrofenol em solução alcalina é devida à formação do núcleo quinoídico. A acidificação do meio desloca o equilíbrio entre as duas formas tautômeras, resultando num acréscimo na concentração do tautômero incolor.

As *Teorias Iônica e Cromófora* não são incompatíveis. Ao contrário, elas se completam, resultando na *Teoria Iônico-Cromófora* dos indicadores. De fato, a mudança do pH causa tanto uma mudança no equilíbrio da dissociação eletrolítica do indicador quanto um rearranjo interno na estrutura da sua molécula.

Exemplificando, uma solução de paranitrofenol se encontra em equilíbrio de acordo com a seguinte equação:



Em solução alcalina, o indicador se encontra quase todo na forma de ânions (B), em equilíbrio com uma pequena quantidade de moléculas não ionizadas de tautômero (A). Com a adição de ácido à solução, o equilíbrio se desloca para a esquerda. A maior parte dos ânions do indicador se combina com íons  $H^+$  do ácido formando moléculas não ionizadas do tautômero (A), tornando a solução incolor. Inversamente, a adição de base à solução incolor de paranitrofenol acarreta a remoção dos íons  $H^+$ , deslocando o equilíbrio para a direita. Dessa maneira, desaparecem quase completamente as moléculas do tautômero (A), ao mesmo tempo que aumenta a concentração dos ânions (B), tornando a solução de cor amarela [Bishop, 1972].

O equilíbrio entre os tautômeros (ou fases) do indicador e o pH da solução é calculado pela equação 2.1. A aplicação da lei de ação das massas ao equilíbrio permite escrever, em termos de concentração [Ohlweiler, 1968]:

$$[H^+] \cdot [Ind^-] / [H.Ind] = K \quad (2.3)$$

K é denominada de constante de equilíbrio do indicador de pH, pois representa o produto da verdadeira constante de ionização e da constante de equilíbrio do tautômero. Resolvendo a equação anterior para o íon hidrogênio, obtém-se:

$$[H^+] = K \cdot [H.Ind] / [Ind^-] \quad (2.4)$$

Aplicando-se a definição do pH ( $pH = -\log[H^+]$ ) e definindo-se pK ( $pK = -\log K$ ), obtém-se a relação exata entre as concentrações dos cromóforos, segundo a equação de Henderson-Halssselbalch [Tucker et al., 1989]:

$$pH = pK + \log\{[Ind^-] / [H.Ind]\} \quad (2.5)$$

Denominando-se T a concentração total do indicador, pode-se escrever:

$$pH = pK + \log\{[Ind^-] / [T] - [Ind^-]\} \quad (2.6)$$

Portanto, o valor do pH pode ser conhecido se o valor da concentração do íon  $[Ind^-]$  for determinado, pois pK é a constante do indicador de pH (tabelado) e T é a concentração total do indicador (invariante).

A concentração da substância cromófora ( $[Ind^-]$ ) pode ser determinada por espectrofotometria, utilizando a Lei de Beer-Lambert. Essa lei permite calcular a absorvância da radiação

óptica monocromática que atravessa um comprimento conhecido da substância absorvedora [Mandel e Shen, 1988]. A fração da radiação absorvida pela amostra, a absorbância, depende linear e diretamente do comprimento do caminho óptico percorrido no interior da amostra (L), do coeficiente de absorção molar (e) e da concentração da substância absorvedora em análise ([C]):

$$\text{Abs} = e \cdot L \cdot [C] \quad (2.7)$$

ou, para o caso de um indicador colorimétrico:

$$\text{Abs} = e \cdot L \cdot [\text{Ind}^-] \quad (2.8)$$

rearranjando a equação 2.6:

$$[\text{Ind}^-] = [T] / (10^{(\text{pK}-\text{pH})} + 1) \quad (2.9)$$

combinando-se a equação 2.9 com a equação 2.8, obtém-se:

$$e \cdot L \cdot [\text{Ind}^-] = e \cdot L \cdot [T] / (10^{(\text{pK}-\text{pH})} + 1) \quad (2.10a)$$

ou:

$$\text{Abs}[\text{Ind}^-] = \text{Abs}[T] / (10^{(\text{pK}-\text{pH})} + 1) \quad (2.10b)$$

Na equação 2.10b, as variáveis são Abs[Ind<sup>-</sup>] (absorbância devido à concentração do íon Ind<sup>-</sup>) e pH (valor do pH da solução



em teste), e as constantes são  $Abs[T]$  (absorbância devido a concentração total do indicador) e  $pK$  (constante de equilíbrio do indicador (tabelado)). Portanto, o valor do pH da solução em teste pode ser determinado a partir da medição por meio óptico da concentração do íon  $Ind^-$  ( $[Ind^-]$ ).

A figura 2.4, baseada na equação 2.10b, apresenta a dependência da absorbância com a variação do pH em torno do  $pK$  do indicador [Peterson e Netto, 1993].

O gráfico mostra que a absorbância é uma função sigmóide com a variação do pH. Além disso, a faixa de sensibilidade de um único indicador é de aproximadamente  $\pm 1,5$  unidades de pH em torno do  $pK$  do indicador, totalizando 3 unidades de pH.

A ampliação da faixa de sensibilidade implica na utilização de uma mistura de indicadores. Teoricamente, a solução mais simples seria a utilização de um conjunto de indicadores com espectros de absorção similares e  $pKs$  espaçados uniformemente dentro da faixa de interesse. A figura 2.5 propõe uma mistura de três indicadores com  $pKs$  espaçados de duas unidades de pH [Peterson e Netto, 1993].

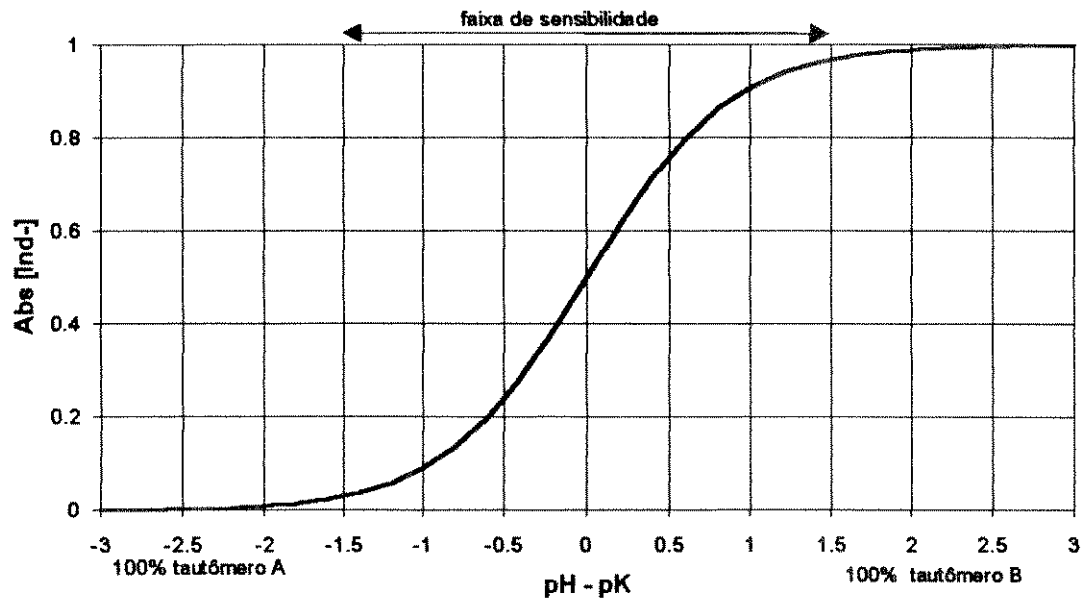


Figura 2.4: Absorbância do íon  $\text{Ind}^-$  de um único indicador de pH em função do desvio entre o pH da solução em teste e o pK do indicador.

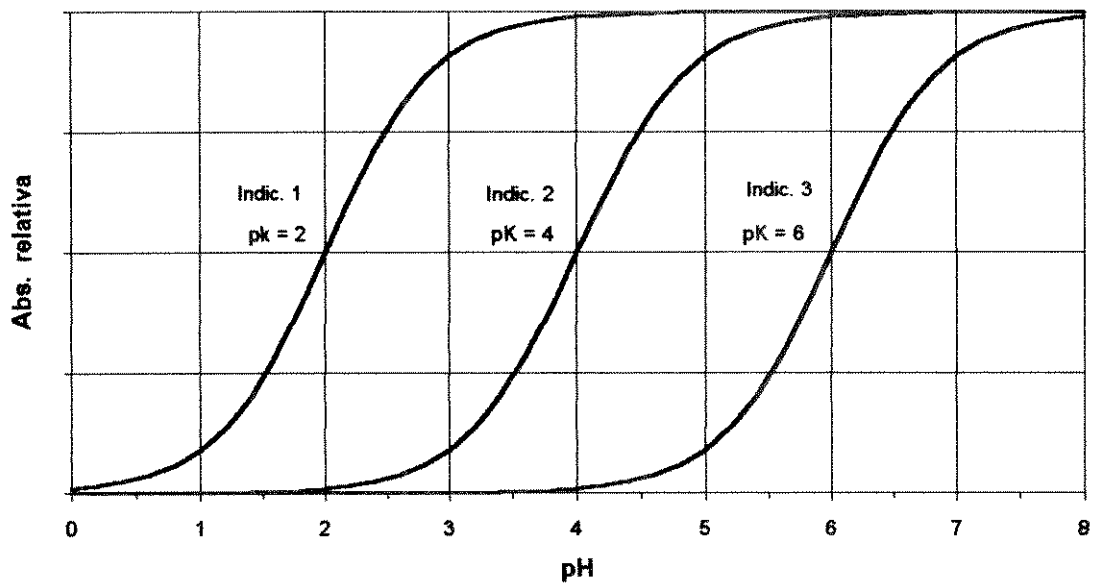


Figura 2.5: Curva de absorbância (sensibilidade óptica) teórica de 3 indicadores com pK em 2, 4 e 6.

Um aumento progressivo do valor do pH resulta na acumulação da absorvância de cada indicador. Caso contrário, uma redução da absorvância é observada. Essa característica é apresentada na figura 2.6 [Peterson e Netto, 1993].

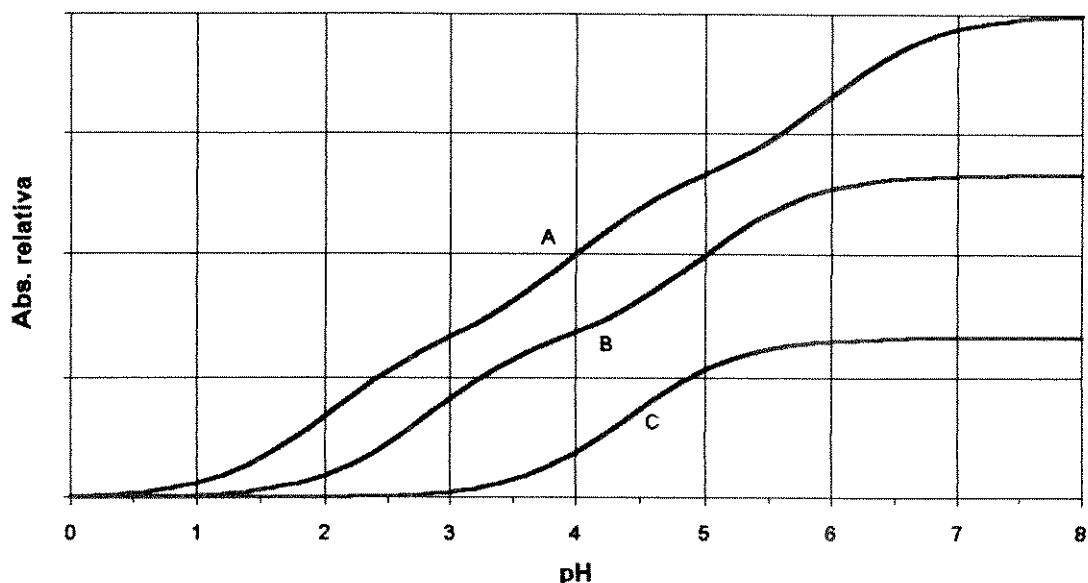


Figura 2.6: Curva de sensibilidade teórica resultante da mistura A: composta por 3 indicadores de espectros de absorção similares e pKs em 2, 4 e 6; da mistura B, composta por 2 indicadores de espectros de absorção similares e pKs em 2,8 e 5, e, em C, a curva típica de sensibilidade óptica de um indicador com pK = 4,5.

O espectro da mistura de indicadores pode também ser apresentado em um gráfico tridimensional, utilizando o modelo matemático proposto por King e Kester (1990). O modelo, baseado na deconvolução do espectro em componentes gaussianas, permite obter os espectros de absorvância e/ou transmitância de cinco sulfoneftaleínas. A figura 2.7 apresenta o espectro de

transmitância ( $T = 10^{-Abs}$ ) da mistura de dois indicadores em função do pH.

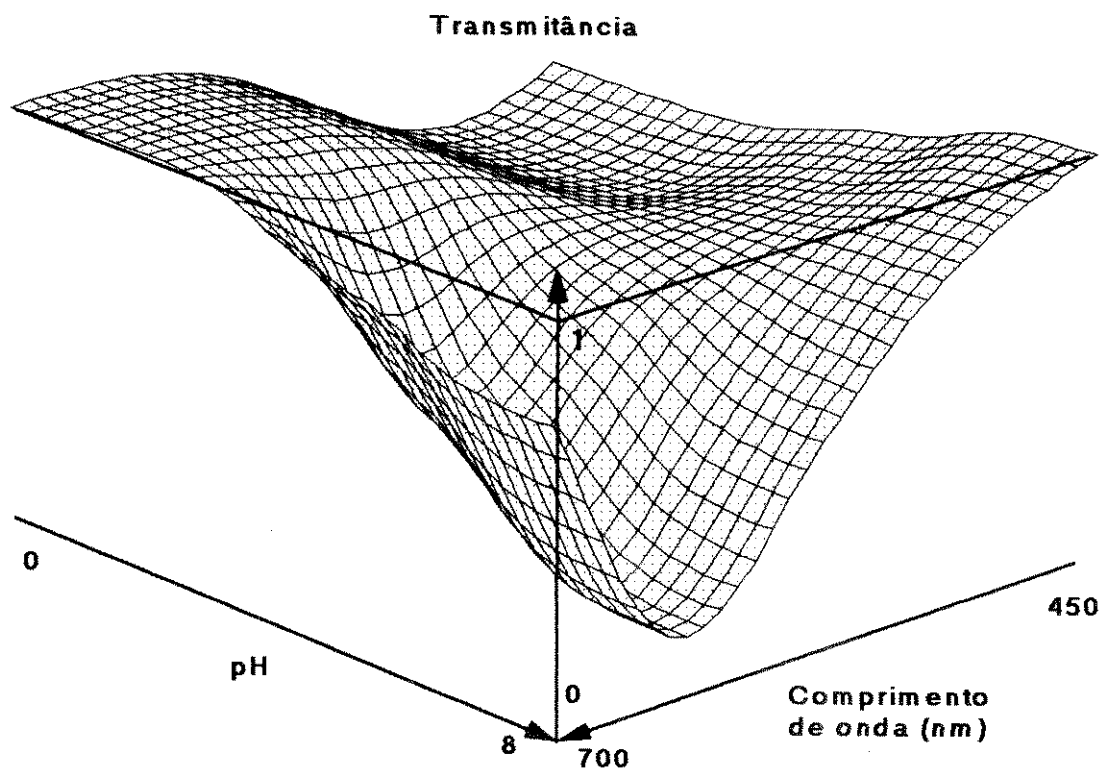


Figura 2.7: Espectro de transmitância da mistura de "bromophenol blue" ( $pK = 3,7$ ) e "bromocresol purple" ( $pK = 6,0$ ), em função do pH da solução.

O espectro apresentado tridimensionalmente permite visualizar com mais detalhes o comportamento da mistura. Por exemplo, as fases protonadas (meio mais ácido) dos dois indicadores apresentam um coeficiente de absorção molar menor e

absorvem na faixa de aproximadamente 450 a 500nm. A absorção nesta faixa (azul) confere à solução a coloração amarela. Por outro lado, as fases desprotonadas (meio menos ácido) apresentam um coeficiente de absorção molar maior e apresentam um pico de absorção no comprimento de onda de aproximadamente 600nm. A absorção dos comprimentos de onda nesta faixa do laranja, confere à solução uma coloração azul. Dentre as duas fases, a monitoração da transmitância (ou absorbância) da última fase é mais indicada, caso a mistura venha a ser empregada em um sensor com fibra óptica. Basicamente, a escolha é devido a melhor sensibilidade óptica das fases desprotonadas em função da variação do pH.

#### **2.1.1.2 Imobilização do indicador de pH**

O emprego de indicador de pH em sensor com fibra óptica implica, primeiramente, na sua imobilização em um suporte (substrato), formando uma fase reagente. A imobilização é necessária para impedir que o indicador migre para a amostra e assim assegurar a estabilidade temporal do sensor. O método de imobilização adotado deve ser reprodutível e possibilitar a obtenção de uma fase reagente densamente impregnada com indicador, melhorando a sensibilidade óptica da medida. A fase deve também ser permeável ao analítico de interesse para que as reações químicas requeridas para a detecção possam ocorrer e deve manter os indicadores numa posição fixa em relação à fibra,

garantindo a estabilidade óptica. Ainda, a fase deve possuir resistência mecânica adequada para as avaliações "in vivo".

Existem basicamente duas técnicas para se confeccionar a fase reagente dos sensores com fibra óptica. No primeiro, denominado intrínseco, a imobilização é produzida diretamente na fibra, alterando uma característica na sua transmissão óptica. No outro, o extrínseco, a fase reagente preparada previamente é posicionada na extremidade da(s) fibra(s) com o auxílio de uma membrana permeável. Esse método tem sido empregado largamente devido à reprodutibilidade obtida e algumas configurações são mostradas na figura 2.8 [Seitz, 1988].

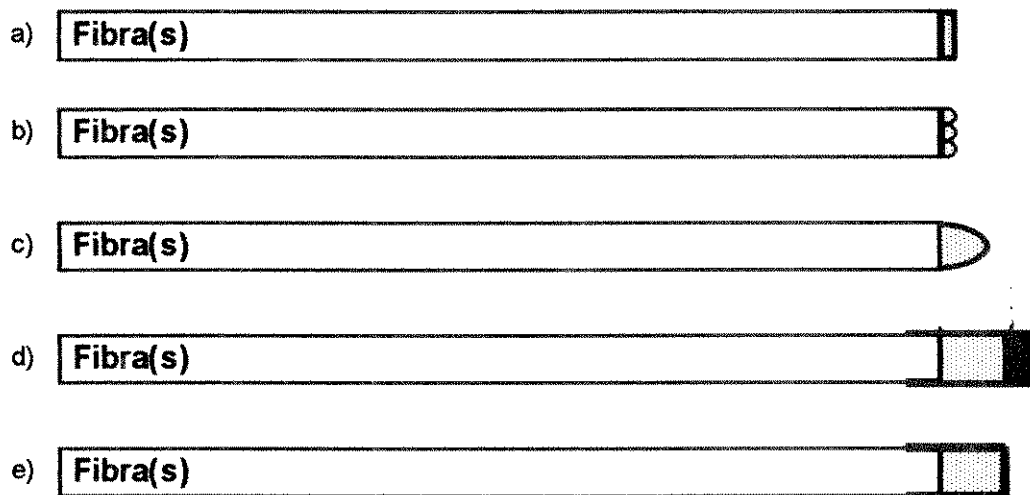


Figura 2.8: Configurações típicas de um sensor do tipo extrínseco.

Na configuração "a", o indicador é imobilizado diretamente na membrana, a qual é posicionada e fixada na extremidade de uma

ou mais fibras ópticas. Exemplos típicos incluem a imobilização por ligação covalente do indicador em membrana de celulose e eletrostaticamente em membrana de troca iônica.

O arranjo "b" ilustra a fixação do produto da imobilização na superfície externa de uma membrana.

Em "c", o indicador imobilizado é confinado por uma membrana posicionada e selada na extremidade das fibras. Além de manter o indicador numa posição fixa, a membrana impede a penetração de substâncias interferentes na fase reagente.

O arranjo mostrado em "d" adota o confinamento da fase reagente no interior de uma membrana tubular, permeável ao analítico. A membrana tubular é ajustada e selada na fibra, numa extremidade, e na outra, simplesmente selada. O emprego dessa configuração permite a utilização de membrana tubular de pequeno diâmetro, o que reduz o tempo requerido para a transferência do analítico para e da fase reagente, melhorando o tempo de resposta.

Por fim, na configuração "e", a substância sensora imobilizada é confinada no interior de um tubo capilar de vidro ou metal. A vantagem desta técnica é a produção de sensores com melhor resistência mecânica.

### 2.1.1.3 As fibras ópticas

Como a fase reagente é preparada separadamente e selada posteriormente, as fibras ópticas servem meramente como condutores de luz. A transmitância na faixa de frequência de operação do indicador e a abertura numérica (definida adiante) são os seus parâmetros ópticos mais importantes. Uma fibra de transmitância alta melhora o nível da intensidade luminosa no detector, aumentando a relação sinal/ruído. Uma abertura numérica grande facilita o acoplamento na fibra da radiação gerada pela fonte óptica. Além das características citadas, a aplicação biomédica impõe que a fibra seja flexível e mantenha sua integridade mecânica.

No aspecto construtivo, a fibra óptica é tipicamente constituída de um núcleo ("core") transparente, de índice de refração  $n_1$ , circundado por uma casca ("cladding") de menor índice de refração,  $n_2$  (figura 2.9). O mecanismo de propagação ocorre porque a radiação que atinge a interface núcleo-casca com um ângulo maior que o ângulo crítico ( $\alpha$ ) é refletida de volta para o núcleo. Como os ângulos de incidência e reflexão são iguais, a radiação refletida atingirá a interface com o mesmo ângulo, sendo novamente refletida. Assim, o mecanismo de reflexões sucessivas na interface é o princípio de propagação da luz [Hochberg, 1986].



O grau de acoplamento da radiação na fibra depende basicamente do seu cone de aceitação (figura 2.9). O valor do seno da metade do ângulo ( $\beta$ ) que define esse cone é denominado abertura numérica (NA), a qual é determinada pela equação 2.11 [Sterling, 1987].

$$NA = n_0 \cdot \text{sen } \beta = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (2.11)$$

onde  $n_0$  é índice de refração do ar.

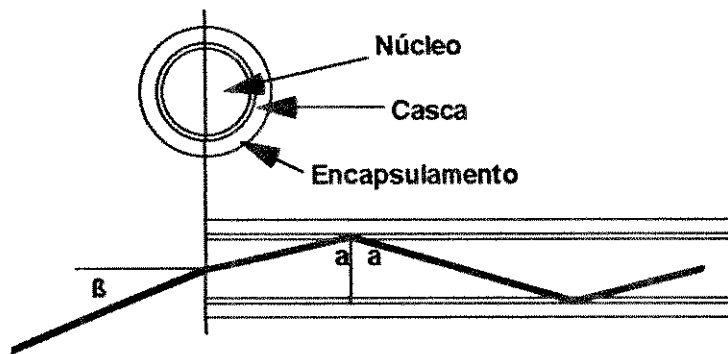


Figura 2.9: Mecanismo de transmissão da radiação eletromagnética em fibra óptica.

Os materiais tipicamente utilizados na fabricação da fibra óptica são o vidro (sílica) e o plástico (acrílico) [Seitz, 1989]. A fibra de vidro transmite radiação desde o ultravioleta até o infravermelho, passando pelo visível. A faixa com menor

atenuação é no infravermelho próximo, entre 1500 a 1600nm, razão pela qual as comunicações ópticas modernas estão centradas nessa faixa do espectro.

A fibra de plástico apresenta um espectro de transmissão centrado na região do visível, embora não transmita luz tão eficientemente como a de vidro. No entanto, as características mecânicas de flexibilidade e a integridade física do material elegem-no como o mais adequado para a confecção de sensores de aplicação biomédica. No aspecto construtivo, a preparação da fibra é simples, pois ao contrário das fibras de vidro não exige ferramentas sofisticadas para corte e polimento. Comparativamente, o custo da fibra de plástico é menor.

### **2.1.2 Instrumento opto-eletrônico**

O instrumento opto-eletrônico é basicamente composto dos sub-sistemas de geração da radiação de excitação, de condicionamento óptico, de fotodeteção e processamento eletrónico, conforme o diagrama em blocos ilustrado na figura 2.10.

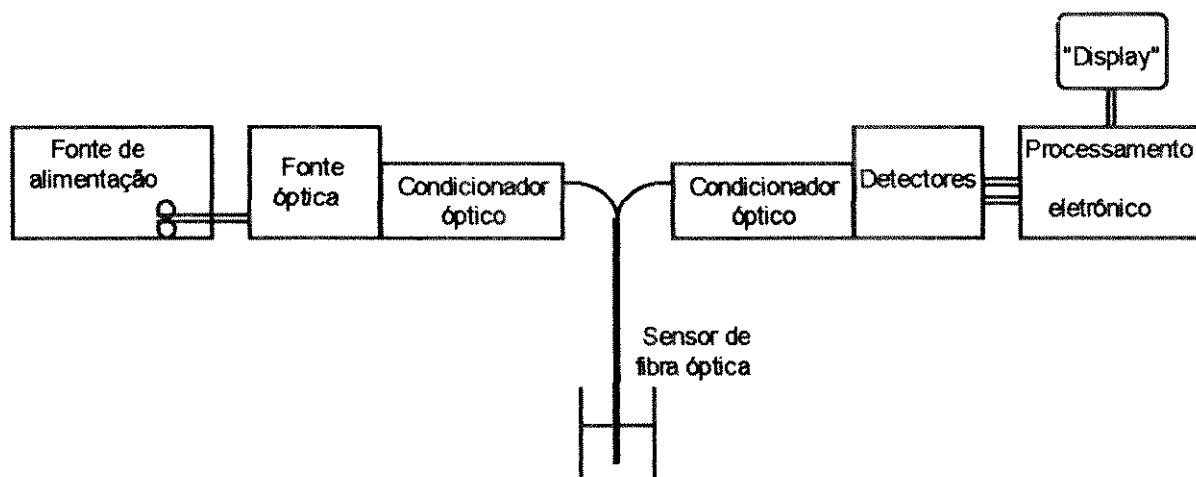


Figura 2.10: Diagrama em blocos do sistema típico de medição, composto do sensor de fibra óptica e do instrumento optoeletrônico.

### 2.1.2.1 Fonte óptica

A fonte óptica deve fornecer radiação na faixa de frequência adequada com alta intensidade e estabilidade. As fontes tipicamente utilizadas são a lâmpada incandescente e o diodo emissor de luz (LED). O laser é raramente empregado devido à faixa espectral estreita e o custo elevado.

#### 2.1.2.1.1 Lâmpada incandescente

A lâmpada incandescente basicamente consiste de um filamento de tungstênio envolvido num bulbo de vidro ou de quartzo. A corrente elétrica que circula no filamento aquece-o, gerando luz

por incandescência. A radiação emitida apresenta uma distribuição espectral contínua desde o ultravioleta até o infravermelho [Narayanaswamy e Sevilla, 1988].

As lâmpadas geralmente são de menor custo e requerem um sistema de alimentação e suporte mais simples. O tempo de vida é primariamente determinado pela razão da vaporização do tungstênio do filamento.

Uma melhoria no tempo de vida e na estabilidade das lâmpadas foi obtida com a introdução da lâmpada de tungstênio halogenado. Nesse caso, além do gás inerte, o bulbo é preenchido com um composto de halogênio. O gás inerte reduz parcialmente a vaporização, enquanto que o composto de halogênio se combina quimicamente com o tungstênio vaporizado do filamento. Através de um ciclo regenerativo, o tungstênio é redepositado no filamento e o composto de halogênio fica novamente livre para repetir o ciclo [Modlin e Milanovich, 1992].

Uma versão moderna é a lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado. Com dimensões físicas comparáveis às do diodo emissor de luz, a lâmpada citada possibilita acoplar eficientemente a radiação na fibra óptica, sendo portanto adequada para sensores com fibra óptica.

### **2.1.2.1.2 Diodo emissor de luz (LED)**

O diodo emissor de luz (LED) gera fótons quando um par elétron-lacuna se recombina no interior da junção P-N. A recombinação resulta na emissão espontânea de um fóton com energia igual à banda de valência do material [Newman e Ritchie, 1986].

O emprego dos LEDs em sensores de fibra óptica é geralmente um desafio. Os LEDs são disponíveis em relativamente poucos comprimentos de onda e com estreita largura de banda (20 a 40nm). A amplitude e a frequência de emissão apresentam desvios com a temperatura e tempo de utilização. O acoplamento da radiação na fibra óptica é ineficiente, pois os LEDs na faixa do visível são projetados para indicação luminosa [Modlin e Milanovich, 1992]. No entanto, o consumo de energia elétrica do LED é baixo, o que facilita o projeto de sistemas portáteis.

### **2.1.2.2 Condicionadores ópticos**

Os condicionadores ópticos são necessários na seleção dos comprimentos de onda de operação do sensor, dentre os gerados pela fonte óptica; na separação das radiações de excitação e de retorno, caso o sensor utilize uma única fibra; e na discriminação da radiação de retorno em no mínimo duas faixas de frequência, possibilitando ao(s) detector(es) compensar(em) as

perdas e/ou variações ópticas do sistema. A seleção da radiação é realizada no sistema de excitação e a separação e discriminação, geralmente, no sistema detector.

#### **2.1.2.2.1 Seleção dos comprimentos de onda**

A seleção da faixa de frequência da radiação para o sensor é obtida com o emprego de filtros ópticos de absorção ou de interferência. Os filtros de absorção são geralmente da incorporação de materiais absorvedores na estrutura do vidro. Como o vidro é um substrato amorfo, os filtros são caracterizados pela ampla faixa de passagem (50 a 150nm), para os filtros tipo passa faixa ou corta faixa, e ampla faixa de corte (50 a 100nm), para os filtros tipos passa alta ou passa baixa.

Os filtros de interferência, por sua vez, são construídos com materiais dielétricos de diferentes índices de refração. A radiação incidente é parcialmente refletida na interface dos dielétricos, dado o descasamento nos índices. Dependendo da distância entre os dielétricos, uma faixa de frequência da radiação incidente é transmitida através do filtro, devido ao fenômeno de superposição construtiva. Os filtros de interferência permitem selecionar faixas com alguns nanômetros de banda passante [Modlin e Milanovich, 1992].

#### 2.1.2.2.2 Separação das radiações

Sensores com indicador do tipo colorimétrico são geralmente confeccionados com duas fibras ópticas, pois os comprimentos de onda de excitação e de retorno são os mesmos. A separação das radiações é efetuada pelas fibras ópticas, conforme apresentado na figura 2.11.

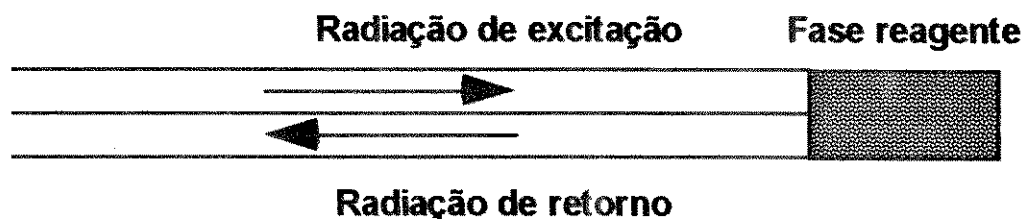


Figura 2.11: Separação das radiações em um sensor do tipo colorimétrico com duas fibras ópticas.

Sensores com indicador do tipo luminescente (fluorescente ou fosforescente) empregam normalmente uma única fibra óptica, porque a frequência da radiação excitadora ( $\Delta\lambda_1$ ) é superior à da radiação emitida por luminescência ( $\Delta\lambda_2$ ). Conforme apresentado na figura 2.12, um espelho dicróico pode ser utilizado para separar as radiações.

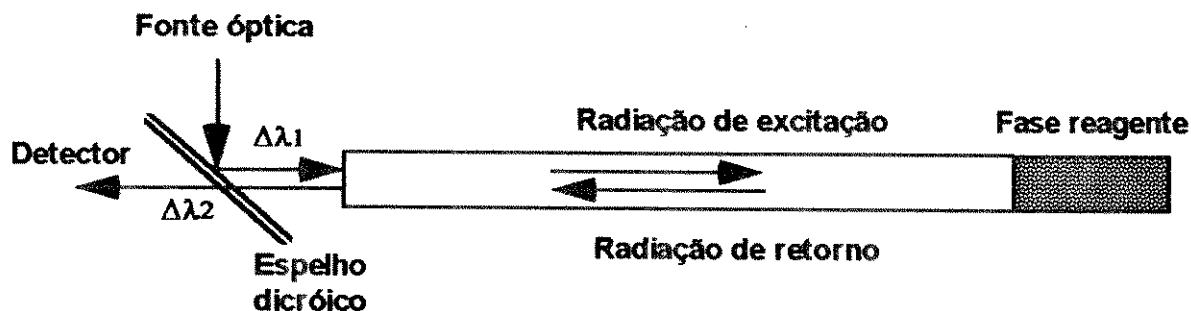


Figura 2.12: Separação da radiação em sensor luminescente com uma única fibra óptica.

A radiação incidente no espelho dicróico é separada em baixa e alta frequência (refletida ou transmitida), dependendo do ângulo de incidência.

#### 2.1.2.2.3. Discriminação da radiação de retorno

Para sensores baseados na medição da intensidade luminosa, independente se o sensor é com uma única fibra ou duas fibras, com indicador colorimétrico ou luminescente, a radiação de retorno deve ser discriminada em duas faixas de frequência ( $\Delta\lambda_1$  e  $\Delta\lambda_2$ ) antes de ser entregue aos fotodetectores (figura 2.13).  $\Delta\lambda_1$  está centrada na faixa de máxima absorção do indicador colorimétrico ou na faixa de máxima emissão do indicador luminescente.  $\Delta\lambda_2$ , utilizada como referência, é uma faixa de comprimentos de onda na qual o indicador não absorve e nem emite radiação. Este arranjo, de forma similar a um espectrofotômetro



comercial, compensa tanto as flutuações da intensidade da fonte óptica quanto as variações nos acoplamentos.

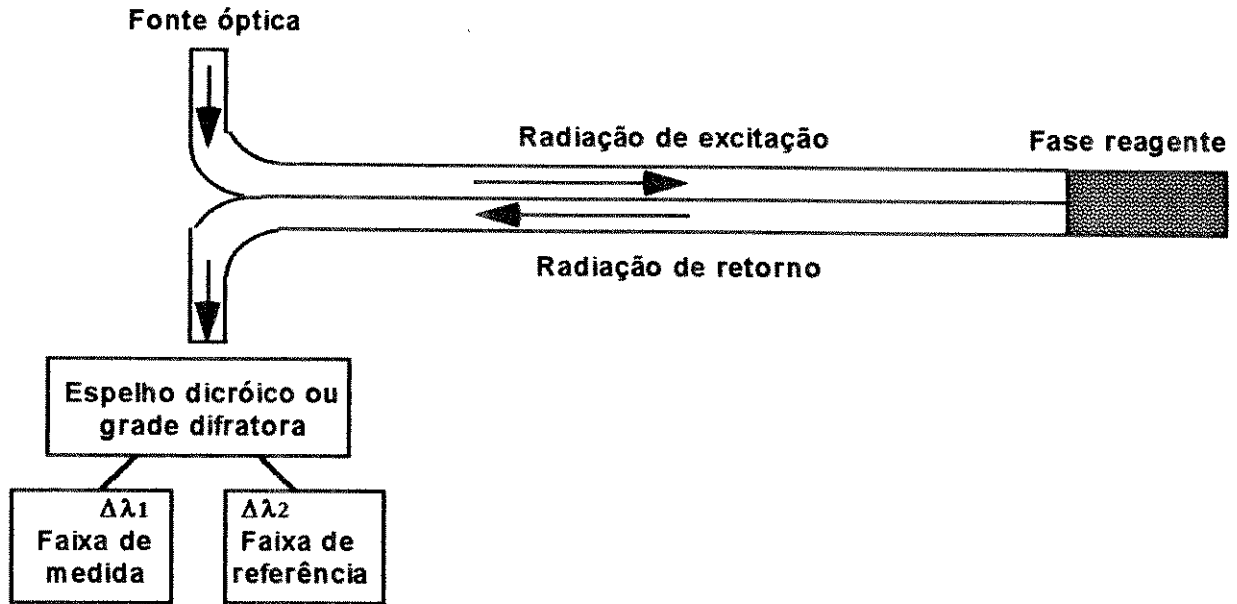


Figura 2.13: Discriminação da radiação de retorno em comprimentos de onda de medida e de referência.

Os componentes ópticos geralmente utilizados na discriminação da radiação de retorno são o espelho dicróico e/ou a grade difratora.

### 2.1.2.3 Fotodetector

Os detectores ópticos tipicamente empregados são a válvula fotomultiplicadora e o fotodiodo PIN.

### **2.1.2.3.1 Válvula fotomultiplicadora**

A válvula fotomultiplicadora é o detector fotoemissivo mais utilizado. A válvula é composta de um tubo com vácuo, uma superfície fotoemissiva (fotocatodo) e um multiplicador de elétrons. Quando um fóton com energia suficiente atinge o fotocatodo, um elétron é liberado devido ao efeito fotoelétrico. O elétron gerado é então acelerado por uma diferença de potencial existente no tubo para uma superfície secundária de emissão de elétrons ("dynodo"), no qual é multiplicado. Este processo é repetido por vários estágios, caracterizando o chamado ganho da válvula fotomultiplicadora. O pulso resultante é coletado no anodo e processado eletricamente [Modlin e Milanovich, 1992].

Ganho da ordem de  $10^6$  é a razão primária de sua elevada sensibilidade, sendo portanto indicado em aplicações com reduzido nível luminoso. Devido às suas características espectrais, o dispositivo é adequado para uso entre 150nm a 700nm [Modlin e Milanovich, 1992]. Adversamente, a válvula é um dispositivo volumoso e exige um sistema de alimentação de alta tensão.

### 2.1.2.3.2 Fotodiodo PIN

O fotodiodo gera uma corrente elétrica e/ou uma diferença de potencial quando a sua junção P-N fica exposta à luz. A zona de depleção é uma região de alguns microns em torno da junção, na qual os elétrons e lacunas se difundiram de seus respectivos íons e as suas concentrações são muito baixas. A diferença de concentração dos elétrons e lacunas na junção (nível de dopagem) causa a difusão de elétrons e lacunas em sentidos opostos na junção, onde as suas concentrações no material são muito menores. Como a difusão das cargas deixa um doador e um receptor ionizados, a diferença de potencial (e o campo elétrico) entre a região P e a N aumenta até que o número de elétrons e lacunas que cruzam a junção, devido o campo elétrico, seja exatamente igual ao número que cruza a junção devido à difusão [Newman e Ritchie, 1986].

Fótons incidentes com energia maior que a banda de transição geram um par elétron-lacuna no material semiconductor. Se os pares são gerados na zona de depleção, os elétrons da região P são atraídos para a região N devido ao potencial de junção, enquanto que o oposto ocorre com as lacunas. A separação das cargas causa um fluxo de corrente num circuito externo quando a diferença de potencial no diodo é igual ou menor que zero [Modlin e Milanovich, 1992].

Os materiais comumente utilizados na fabricação dos fotodiodos são o silício (Si), arseneto de gálio (GaAs), germânio (Ge) e arseneto de índio (InAs). A sua resposta espectral se encontra basicamente entre 400 e 1200nm, sendo portanto mais adequado para a medição de radiação na faixa do infravermelho [Modlin e Milanovich, 1992].

#### **2.1.2.3.3 CCD (Charge coupled device)**

O elemento básico de formação do CCD é o capacitor de "metal-oxide-semiconductor" (MOS), apresentado na figura 2.14. O elemento é formado a partir do crescimento de uma camada de dióxido de silício (isolante) sobre um substrato de silício do tipo P e, a seguir, um eletrodo de metal é vaporizado na parte superior da camada de óxido.

O eletrodo de metal, denominado "gate" (porta), é polarizado positivamente em relação ao silício. Os pares elétron-lacunas fotogerados dentro da camada de silício são separados entre si, sendo os elétrons atraídos para a interface  $\text{SiO}_2 - \text{Si}$ , devido ao potencial da porta. Os elétrons permanecem armazenados enquanto o potencial da porta for positivo. A quantidade de carga armazenada é proporcional à intensidade luminosa que incidiu sobre o

dispositivo durante o período de exposição [Wilson e Hawkes, 1989].

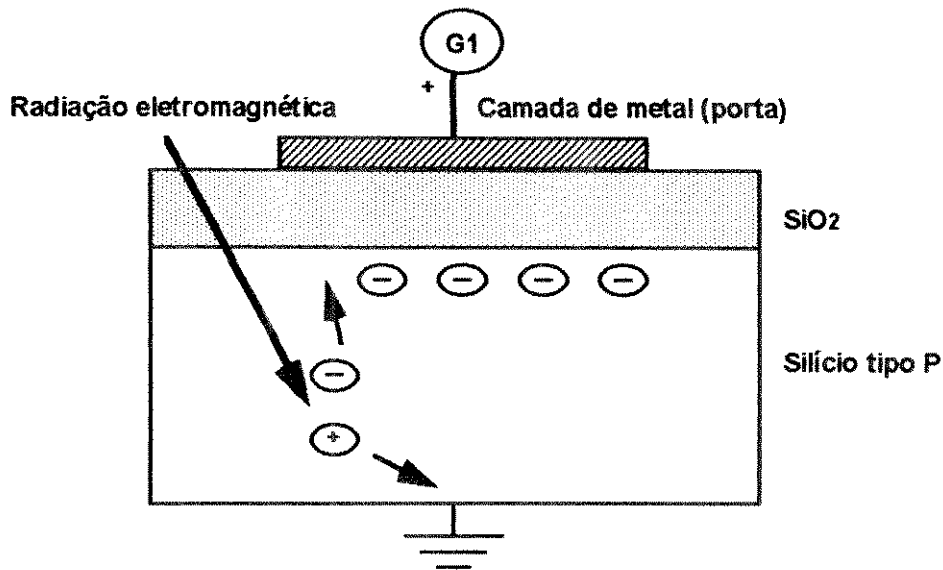


Figura 2.15: Estrutura do capacitor "metal-oxide-semiconductor (MOS) "

O agrupamento dos dispositivos básicos forma um "array" de CCD, conforme mostrado na figura 2.14. No arranjo apresentado, a quantidade de carga armazenada nas portas G1, devido à excitação luminosa, é seqüencialmente deslocada, no caso para a direita, até o circuito pré-amplificador de baixo ruído. Uma técnica de deslocamento das cargas é apresentada na parte inferior da figura 2.15. As portas G1, G2 e G3 são alimentadas por três diferentes linhas de potencial, L1, L2 e L3, respectivamente. No tempo T1, o potencial de L1 é positivo e os potenciais de L2 e L3 são iguais a zero (figura 2.15b). Assim, as cargas fotogeradas serão armazenadas sob os eletrodos G1, proporcionalmente à intensidade luminosa incidente. Após um tempo de integração adequado, as

cargas podem ser deslocadas ao longo da cadeia capacitiva "MOS" pela aplicação de uma seqüência de potenciais nas linhas de alimentação. Para isso ocorrer, no tempo T2, os potenciais de L1 e L2 são positivos e L3 continua igual a zero, o que resulta no compartilhamento das cargas entre as portas G1 e G2 (figura 2.15c). No próximo ciclo, o potencial de L1 é reduzido para zero, resultando no deslocamento da carga armazenada para a porta G2 (figura 2.15d). Repetindo-se o ciclo, as cargas são progressivamente deslocadas ao longo da cadeia de capacitores MOS. No final da cadeia, a quantidade de carga detectada em função do tempo representa os registros das transduções dos fotodetectores G1 [Wilson e Hawkes, 1989].

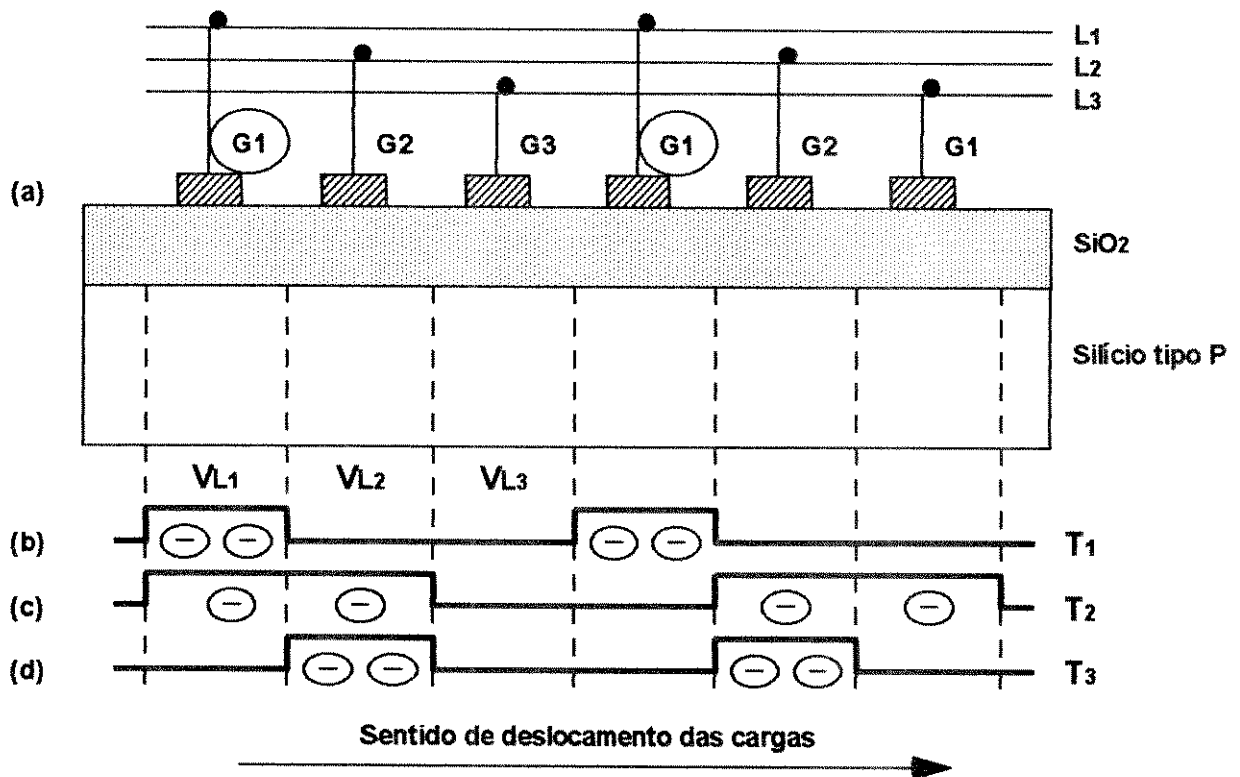


Figura 2.15: Princípio de funcionamento de um mecanismo de deslocamento das cargas fotogeradas no CCD. (a) representação das

portas ("gates") e (b), (c) e (d) são os potenciais de alimentação das portas nos tempos T1, T2 e T3, respectivamente.

Os detectores a CCD são adequados para vários tipos de aplicações, como por exemplo em espectrofotometria. As suas vantagens são o baixo nível de ruído (comparado ao "array" de fotodiodos), adequada sensibilidade na faixa do visível e a capacidade do controle total por "software" ("full programmability") [Prettyjohns, 1992].

#### **2.1.2.4 Processamento eletrônico**

Os sinais transduzidos (medida e referência) são amplificados geralmente por um amplificador operacional na configuração transimpedância. A diferença de potencial na saída do amplificador é direta e linearmente proporcional à intensidade da radiação luminosa detectada.

Os sinais amplificados são normalmente processados por um divisor eletrônico, que determina o quociente entre as duas leituras. O valor do quociente obtido é então corrigido por uma função de calibração, permitindo determinar o valor do pH, o qual é apresentado no "display".

## 2.2 Conclusão

Um sistema com sensor de fibra óptica para a medição de pH é composto basicamente pelo sensor e pelo instrumento opto-eletrônico. O sensor emprega um indicador de pH (colorimétrico ou luminescente) como elemento transdutor. Tipicamente, a sensibilidade de um indicador é de três unidades de pH. A ampliação da faixa de medição implica no emprego de uma mistura de indicadores. O indicador selecionado deve ser imobilizado em um substrato, formando a fase reagente. A fase é mantida na extremidade da(s) fibra(s) óptica(s) por uma membrana permeável. A fibra óptica transmite a radiação de excitação e a radiação refletida pela fase reagente. O instrumento opto-eletrônico é tipicamente composto pela fonte óptica (lâmpada incandescente ou LED), condicionadores ópticos (filtros e grades), fotodetector (válvulas fotomultiplicadoras ou fotodiodos PIN) e circuitos eletrônicos.



## CAPÍTULO 3

# AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DE SENSORES ÓPTICOS BÁSICOS PARA A MEDIÇÃO DO pH GÁSTRICO

Uma avaliação experimental foi desenvolvida para determinar os principais parâmetros básicos de projeto do sensor com fibra óptica, com características adequadas para a aplicação proposta. Para tanto, as substâncias químicas e os componentes do sensor foram selecionados e um sensor foi construído e avaliado em solução tampão. Essa metodologia foi adotada porque material bibliográfico específico e detalhado versando sobre o objetivo proposto não era disponível.

O capítulo inicia-se com a seleção dos indicadores de pH e os espectros dessas substâncias diluídas em soluções tamponadas. O item seguinte propõe a construção do sensor e define o método de imobilização do indicador, a membrana tubular, o elemento refletor e a fibra óptica. A seguir, um instrumento optoeletrônico é desenvolvido para avaliar o sensor construído. Por fim, alguns parâmetros do sensor são verificados, particularmente o tempo de resposta.

### **3.1 Tipos e seleção dos indicadores de pH**

Dentre as definições preliminares, a seleção dos indicadores de pH é provavelmente a mais importante. Considerando a aplicação proposta, a mistura de indicadores deve apresentar sensibilidade na faixa de pH 1 a 7 e estabilidade adequada para permitir monitorações contínuas por um período de no mínimo 24 horas. Dentre os existentes, os indicadores do tipo colorimétrico são os mais adequados, pelas razões apresentadas a seguir. Essas substâncias são comercialmente disponíveis em maior número com espectros de absorção similares e pKs diferenciados, facilitando a obtenção de uma mistura apropriada. Esses indicadores são mais estáveis que os luminescentes, assegurando a estabilidade temporal do sensor [Peterson e Netto, 1993]. Do ponto de vista da instrumentação, a intensidade da radiação luminosa no fotodetector é geralmente maior que a intensidade geralmente obtida com sensores luminescentes, o que torna o equipamento opto-eletrônico mais simples tecnicamente e de baixo custo [Wolthuis et al., 1992].

Os indicadores colorimétricos, por sua vez, são distribuídos em diversas classes, as quais diferenciam-se entre si pela estrutura básica da molécula transdutora. Dentre as classes mais representativas, destacam-se "azo", "nitro", "phftaleínas" e sulfoneftaleínas [Banyai, 1972].

Uma revisão bibliográfica mostrou que a maioria dos sensores de fibra óptica com indicadores colorimétricos construídos empregaram indicadores da classe sulfoneftaleína, exceção a um trabalho com o emprego de azo [Mitchell et al., 1991]. Exemplificando, Peterson et al. (1980) utilizaram "phenol red" imobilizado em microesferas de "polyacrylamide". Kirkbright et al. (1984) confeccionaram um sensor com "bromothymol blue" imobilizado num polímero (Xad-2). Serra (1990), usando "phenol red" imobilizado em uma resina, desenvolveu um sensor para a medição de pH marítimo. Baseado no "thymol blue" imobilizado numa membrana de celulose, Takai et al. (1991) construíram um sensor para análises bioquímicas. Por fim, Bacci et al. (1991) apresentaram a técnica de imobilização das sulfoneftaleínas em vidros de poros controlados.

As vantagens principais no emprego das sulfoneftaleínas são a sensibilidade com o pH e a discriminação existente entre os comprimentos de onda de máxima absorção das fases protonada (ácida) e desprotonada (básica), o que simplifica o projeto do instrumento opto-eletrônico. Além disso, a sua estrutura química permite que os mesmos possam ser imobilizados em vários tipos de substratos.

Optando-se pelas sulfoneftaleínas, doze indicadores de pH na forma de sal e com  $pK$  na faixa ácida ou neutra foram selecionados (tabela 3.1). Além desses, indicadores de outras classes mas com

fase desprotonada de cor azul/verde (absorção em torno de 600nm) e com pK na faixa de 1 a 2 foram também selecionados (tabela 3.2), visando facilitar a obtenção da mistura ideal.

Tabela 3.1 Denominação, zona de transição e coloração dos indicadores adquiridos da classe sulfoneftaleína.

SULFONEFTALEÍNA	pH									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
"Cresol red"		O-----		Y					Y---	
"m-Cresol purple"		R-----		Y					Y--	
"Thymol blue"		R-----		Y						
"Xylenol blue"		R-----		Y						
"Bromophenol blue"				Y-----						B
"Bromochlorophenol blue"				Y-----						B
"Tetrabromophenol blue"				Y-----						B
"Bromocresol green"					Y-----					G
"Chlorophenol red"						Y-----				R
"Bromocresol purple"							Y-----			P
"Bromothymol blue"								Y-----		
"Bromoxylenol blue"								Y-----		

----- zona de transição, avaliada visualmente [Green, 1990]

B - azul                      G - verde                      L - incolor                      O - laranja  
P - púrpura                      R - vermelho                      V - violeta                      Y - amarelo

Tabela 3.2 Denominação, zona de transição e coloração dos indicadores adquiridos de outras classes.

OUTROS INDICADORES	pH									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
"Crystal violet"		Y-----		V						
"Ethyl violet"		Y-----								B
"Malachite green oxalate"		Y-----		G						
"Malachite green carbinol"		Y-----		G						
"Brilliant green"		Y-----		G						
"Phloxine B"		L-----								P

----- zona de transição, avaliada visualmente [Green, 1990]

B - azul                      G - verde                      L - incolor                      O - laranja  
P - púrpura                      R - vermelho                      V - violeta                      Y - amarelo

### 3.2 Espectro dos indicadores diluídos em solução tampão

O espectro de transmitância dos indicadores selecionados foi inicialmente determinado em solução tampão, visando conhecer a função de sensibilidade óptica (transmitância x pH), a faixa e o comprimento de onda de máxima absorção, tanto da fase ácida como da básica.

Experimentalmente, uma massa apropriada do indicador em teste foi primeiramente dissolvida em água bidestilada, até a obtenção de uma concentração de 500 partes por milhão (ppm). A solução obtida foi novamente diluída (100 vezes) na solução tampão em questão, fornecendo uma concentração final de 5ppm. Essa concentração, determinada experimentalmente, se mostrou adequada para a maior parte dos indicadores em teste, considerando o caminho óptico de 10mm da cubeta e o coeficiente de absorção molar do indicador. Um conjunto com 15 soluções tampão foram preparadas, variando de pH 1 a pH 8, em intervalos de 0,5 unidade de pH. Antes de cada registro, o pH da solução tampão foi verificado com um eletrodo de vidro (Corning, modelo 476541), conectado a um pH-metro (Corning, modelo 12). Os espectros na faixa do visível foram obtidos com o espectrofotômetro Beckman (modelo DU-40).

A figura 3.1 apresenta a função de sensibilidade óptica do "bromocresol purple" em diferentes comprimentos de onda, obtida a

partir dos espectros registrados nas diferentes soluções tamponadas.

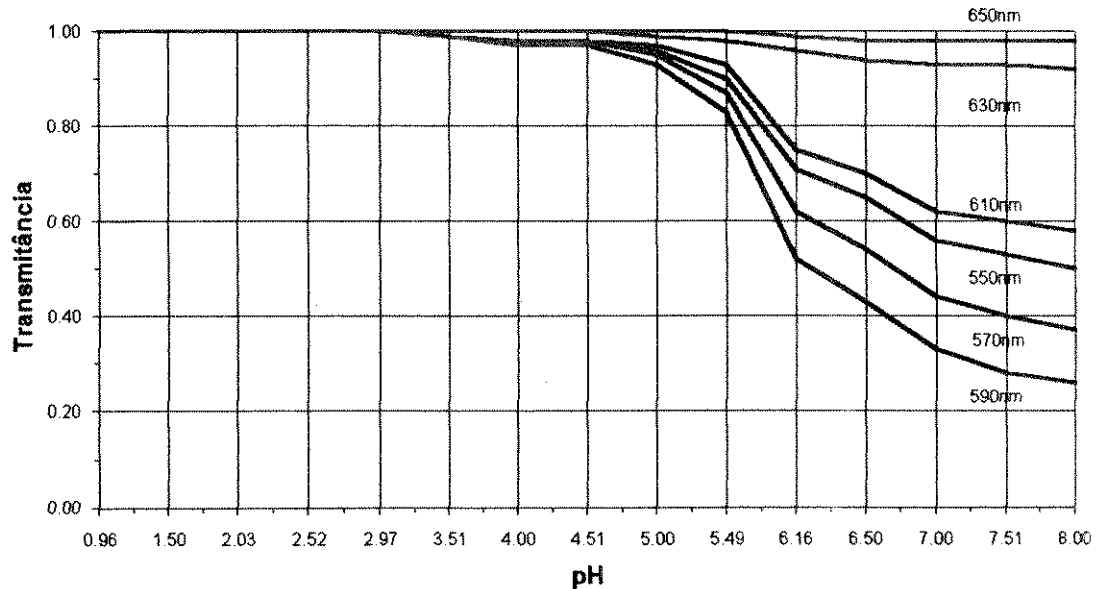


Figura 3.1: Sensibilidade óptica em diferentes comprimentos de onda da fase básica do "bromocresol purple" diluído em solução tampão (5ppm).

A figura 3.1 mostra que o "bromocresol purple" apresenta a máxima sensibilidade óptica no comprimento de onda de 590nm, na faixa aproximada de pH 5 a pH 8.

Conforme já apresentado, a faixa de sensibilidade óptica pode ser ampliada com o emprego de uma mistura de indicadores. O desenvolvimento experimental de um sistema com múltiplos indicadores pode ser trabalhoso, apesar de teoricamente simples. Várias combinações de indicadores, concentrações e comprimentos

de onda de medida devem ser explorados para maximizar a sensibilidade na faixa de interesse.

Dentre as misturas avaliadas experimentalmente, as mais promissoras foram as que envolviam indicadores com espectros de transmitâncias similares e com pKs distanciados entre si de 2 a 3 unidades de pH. A figura 3.2 apresenta a sensibilidade óptica obtida com a mistura de três indicadores. A concentração de cada indicador foi recalculada para o conjunto produzir uma resposta aproximadamente linear. O procedimento experimental empregado foi similar ao efetuado para a obtenção da figura 3.1.

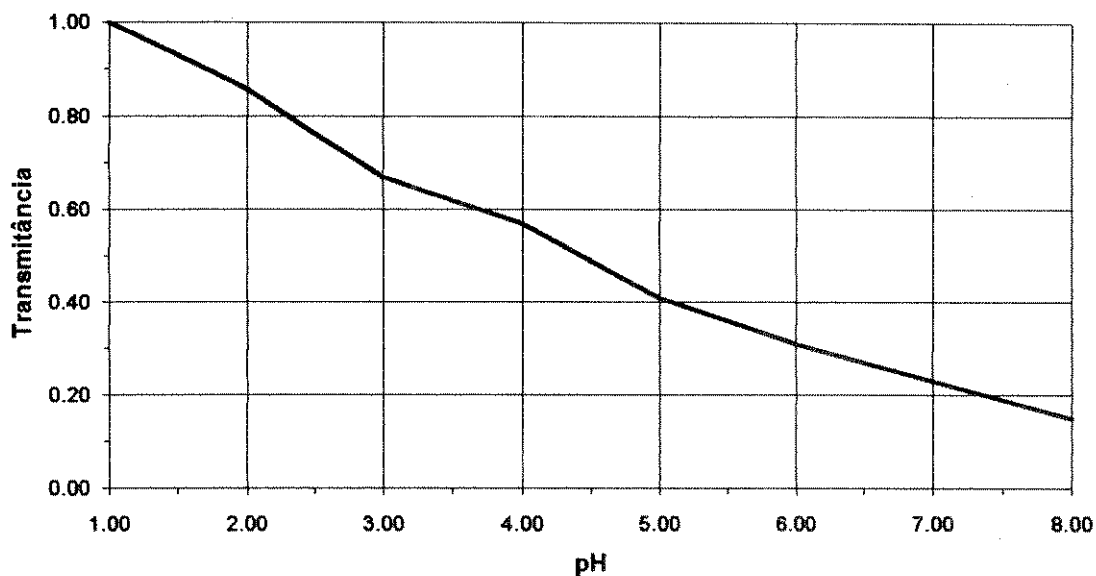


Figura 3.2: Sensibilidade óptica (transmitância no comprimento de onda de 620nm em função do pH da solução tampão) da mistura composta por "malachite green carbinol" (1,25ppm), "bromocresol green" (5ppm) e "bromoxilenol blue" (10ppm).

A sensibilidade óptica da mistura de indicadores apresentada na figura 3.2 permite determinar o pH na faixa de 1 a 8.

Entretanto, cabe ressaltar que os resultados obtidos com indicadores diluídos em solução tampão não representam rigorosamente a função de sensibilidade óptica dos mesmos indicadores quando immobilizados. Nesse caso, preso a um polímero, o indicador pode apresentar um desvio no seu pK, alterando a resposta global [Peterson et al., 1980]. Mesmo assim, os estudos foram necessários para identificar as misturas mais promissoras.

### **3.3 Definições, projeto e construção de um sensor básico**

Definido o indicador de pH, iniciou-se o desenvolvimento de um sensor básico. O dispositivo é tipicamente constituído pelo indicador immobilizado, formando a fase reagente, uma membrana permeável, um elemento refletor de radiação e duas fibras ópticas.

Dentre as possíveis configurações sensoras [Seitz, 1988] (Capítulo 2), adotou-se o arranjo baseado no confinamento da fase reagente no interior de uma membrana tubular, a qual é selada na extremidade de duas fibras ópticas. A figura 3.3 apresenta o



diagrama típico de um sensor de pH confeccionado com técnica adotada.

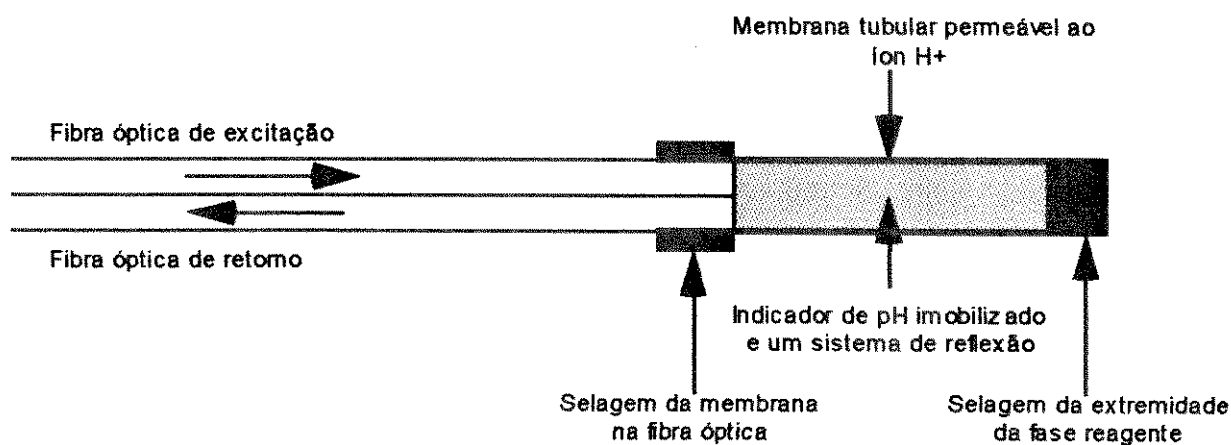


Figura 3.3: Diagrama esquemático de um sensor típico construído com a técnica adotada.

### 3.3.1 Imobilização do indicador de pH

Os métodos de imobilização geralmente baseiam-se nas ligações covalentes ou iônicas existentes entre o indicador e o substrato empregado. Os métodos por ligações covalentes produzem uma imobilização mais eficiente, pois a perda/vazão ("washing out") do indicador para a solução é inexistente ou muito pequena [Leiner e Wolfbeis, 1992], garantindo a estabilidade temporal.

O método empregado foi a imobilização por ligação covalente do indicador no polímero "polyacrylamide", formado a partir do monômero "acrylamide". Essa técnica foi adotada por ter

apresentado resultados satisfatórios no desenvolvimento de sensores com fibras ópticas [Peterson et al., 1980].

O "acrylamide" é um sólido cristalino de cor branca, inodor, estável à temperatura ambiente, altamente solúvel em água e produzido a partir do "acrylonitrile". A polimerização estimulada do monômero resulta no "polyacrylamide", também um composto branco e inodor. A figura 3.4 apresenta a estrutura química do monômero e do polímero [Aldridge, 1985].

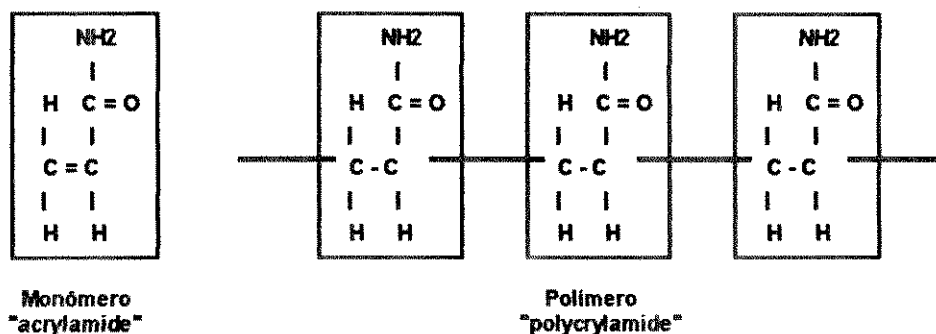


Figura 3.4: Estrutura química do monômero ("acrylamide") e do polímero ("polyacrylamide").

O "polyacrylamide" preparado em meio aquoso é um hidrogel [Sandler e Karo, 1992]. A viscosidade do composto é semelhante à do mel, devido ao deslocamento relativo existente entre as camadas independentes de "polyacrylamide". Essa propriedade é inadequada, pois dificulta o preenchimento da membrana tubular com o material sensor e, sobretudo, a selagem da extremidade distal da membrana. Uma consistência sólida é preferível, pois facilita o preenchimento e a selagem. Essa característica pode

ser obtida pela polimerização conjunta do "acrylamide" e "bis-acrylamide", conforme ilustrado na figura 3.5.

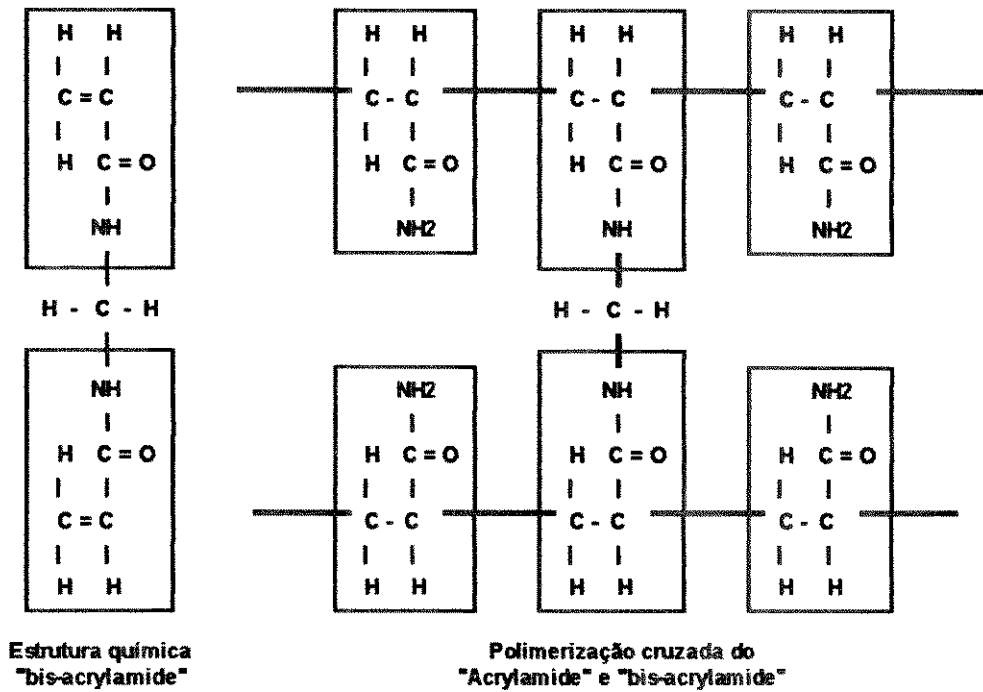


Figura 3.5: Estrutura química do "bis-acrylamide" e do "polyacrylamide" obtido por polimerização cruzada.

A polimerização cruzada produz um hidrogel sólido [Sandler e Karo, 1992], com o aspecto de uma gelatina. O grau de solidez pode ser alterado, variando o grau de diluição ou a razão entre as concentrações de "bis" e de "acrylamide".

No hidrogel sólido apresentado, o indicador de pH, em determinadas condições químicas e físicas, pode ser imobilizado. A imobilização é obtida com a polimerização em meio aquoso, da qual participam basicamente o(s) indicador(es) e os monômeros. A

figura 3.6 ilustra a imobilização de um indicador no polímero "polyacrylamide".

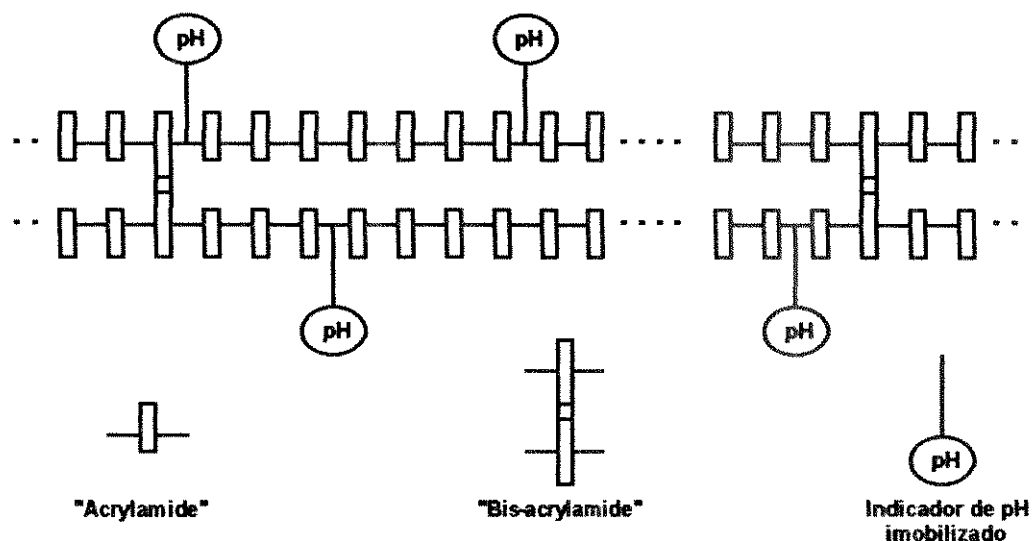


Figura 3.6: Representação da imobilização de um indicador de pH em "polyacrylamide".

A consistência do hidrogel sólido se mostrou apropriada para a confecção dos sensores, no entanto a sua dimensão física se mostrou inadequada. Por exemplo, o procedimento de preparação produz um hidrogel cilíndrico de aproximadamente 13mm de diâmetro por 10mm de altura. Essas dimensões são incompatíveis com os diâmetros das membranas tubulares e das fibras ópticas comerciais, disponíveis na faixa de 200 $\mu$ m a 1000 $\mu$ m. Em princípio, hidrogel de diâmetro pequeno pode ser produzido através do emprego de tubos micrométricos de vidro ou plástico. No entanto, além da dificuldade prática, o método dificulta a reprodutibilidade devido as pequenas quantidades de reagentes envolvidos.

Uma adaptação ao processo químico de preparação do hidrogel sólido foi então adotado, pois permite a produção de microesferas de hidrogel com diâmetro de algumas unidades a dezenas de micrometros. As microesferas produzidas possibilitam então o preenchimento adequado da membrana tubular do sensor. O método baseia-se na ocorrência da polimerização em meio oleoso, denominado polimerização em emulsão. O princípio da técnica consiste em misturar a solução aquosa, preparada basicamente com os monômeros e o indicador de pH, com o solvente tolueno e o emulsificador. A agitação mecânica do tubo de ensaio contendo a emulsão promove a formação de microesferas da solução aquosa descrita, circundada pelo emulsificador e, esse, pelo tolueno. A terminação hidrofílica do emulsificador forma uma película externa e adjacente à microesfera aquosa, facilitando a sua formação. Por outro lado, a sua terminação hidrofóbica se alinha na direção do tolueno, conforme ilustrado na figura 3.7. O diâmetro final das microesferas depende da intensidade da agitação mecânica imposta, devendo portanto ser controlada.

A adição de uma substância química iniciadora (TEMED), desencadeia o processo de polimerização das microesferas. O resultado é a formação de microesferas de hidrogel, conforme representado na figura 3.8. Após serem lavadas e desidratadas adequadamente, a sua aparência final é a de um pó colorido, devido ao indicador de pH imobilizado. O material produzido pode ser armazenado e utilizado posteriormente no preenchimento da membrana tubular do sensor.

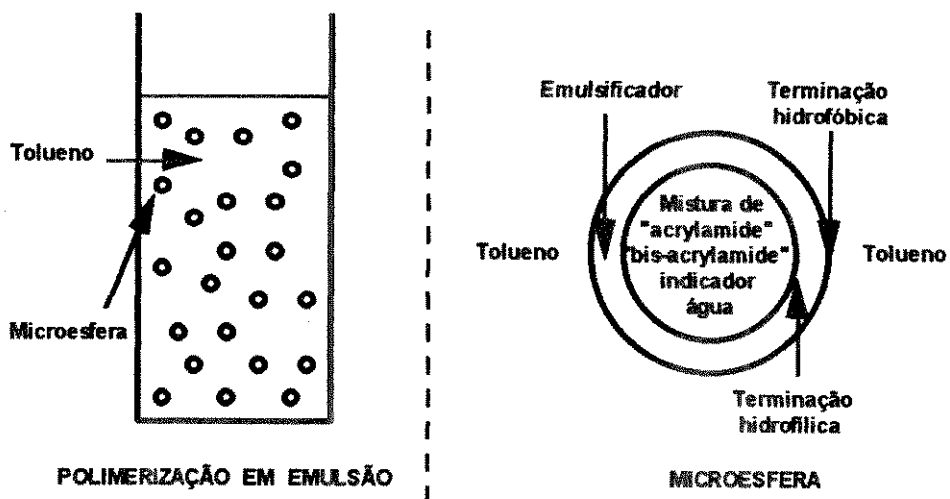


Figura 3.7: Microesferas aquosas em solução de tolueno e emulsificador. À direita, a representação ilustra a função exercida pelo emulsificador na separação da fase aquosa da oleosa.

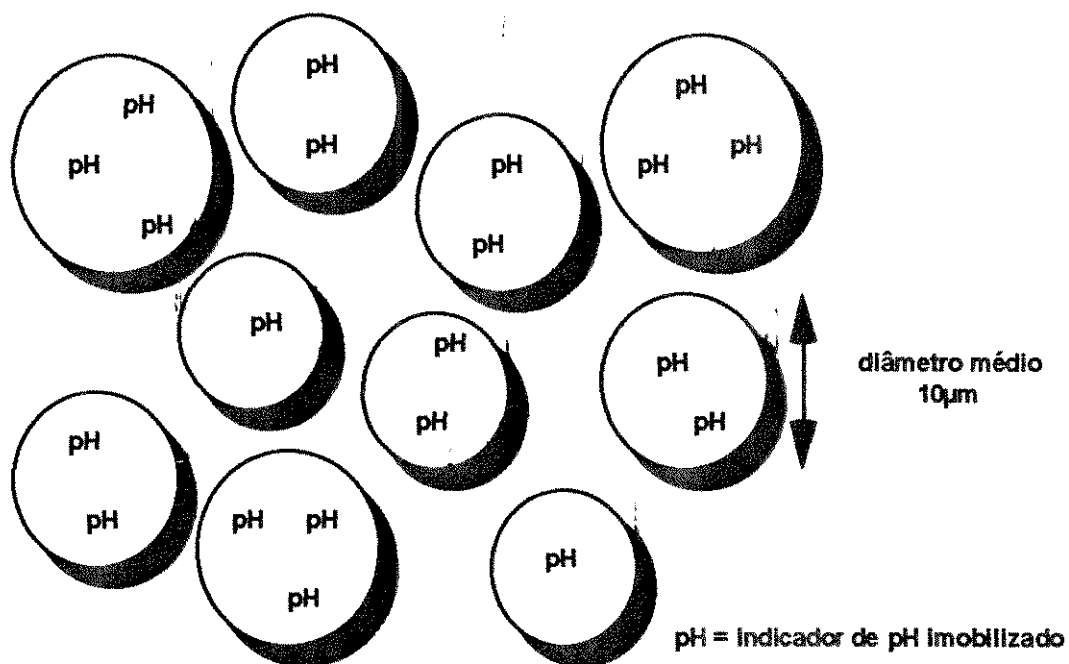


Figura 3.8: Microesferas de "polyacrylamide" com o indicador de pH imobilizado.

### 3.3.2. Elemento refletor

A incorporação de um elemento refletor de radiação na fase reagente é necessária para redirecionar parte da radiação incidente para os fotodetectores. A reflexão de luz pode ser obtida basicamente pela inclusão de uma superfície metálica/espelhada na extremidade distal da membrana tubular ou pela incorporação de micropartículas de dispersão ("scattering") no interior das microesferas de "polyacrylamide" [Peterson et al., 1980].

O primeiro método foi desconsiderado porque resultados experimentais mostraram que as superfícies metálicas tendem a alterar o seu coeficiente de reflexão quando imersas em soluções ácidas (pH 1) por um período prolongado (12 a 24 horas).

Por essa razão, adotou-se o outro método. Micropartículas de poliestireno, diâmetro médio de 0,966 $\mu$ m, 10% em solução aquosa, foram incorporadas nas microesferas de "polyacrylamide", conforme ilustrado na figura 3.9.

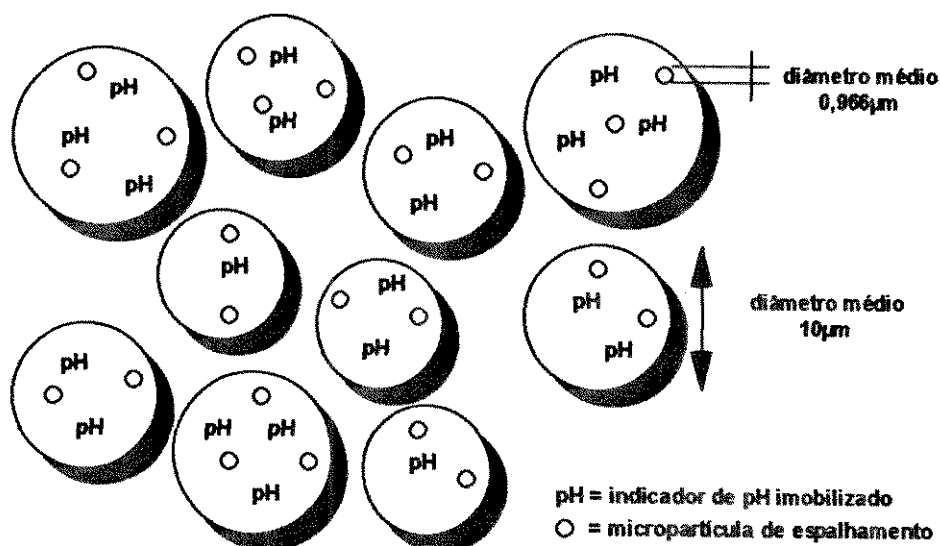


Figura 3.9: Microesferas de "polyacrylamide" com o indicador de pH imobilizado e micropartículas de poliestireno incorporadas.

### 3.3.3 Membrana tubular

A membrana tubular tem a função de confinar as microesferas e permitir a difusão do íon hidrogênio. A membrana deve ser resistente a um meio fortemente ácido (pH 1) e, preferencialmente, apresentar boa resistência mecânica. Dentre as disponíveis comercialmente, a membrana de material "polysulfone" (Supelco, #9-5558) se mostrou ser a mais adequada, considerando as dimensões do sensor a ser construído. Essa membrana possui diâmetro interno de 1,1mm e se encontra disponível comercialmente com diferentes tamanhos de poro.



### 3.3.4 Fibra óptica

A fibra deve possuir alta transmitância na faixa visível do espectro, particularmente entre 500 e 600nm, faixa de absorção dos indicadores empregados. A abertura numérica deve ser grande, facilitando o acoplamento da radiação da fonte. A fibra deve ser de plástico (acrílico), garantindo a integridade mecânica em caso de dobras, e ter diâmetro próximo de 550 $\mu$ m, metade do valor do diâmetro da membrana tubular. A fibra selecionada foi a fibra de plástico SH2001 (Mitsubishi Rayon Co.), diâmetro igual a 500 $\mu$ m.

### 3.3.5 Construção do sensor de fibra óptica

Neste item, apresentam-se os procedimentos para a construção do sensor apresentado na figura 3.10.

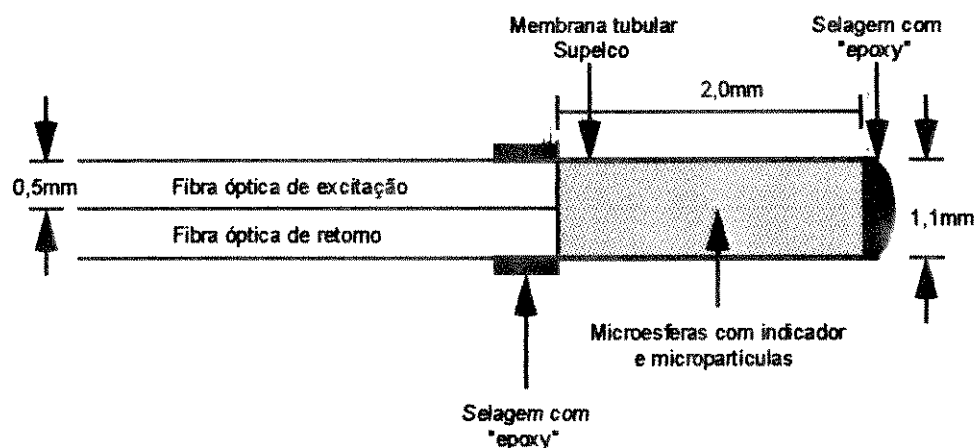


Figura 3.10: Sensor de pH com fibra óptica básico.

Os materiais para a construção do sensor já foram definidos anteriormente. Além desses, o selante "epoxy" foi selecionado, pois apresentou melhor resistência mecânica quando comparado com outros selantes disponíveis.

O primeiro passo na construção do sensor é a preparação das fibras ópticas. As terminações das duas fibras são inseridas no interior de um tubo de teflon (diâmetro de 1,1mm) e seladas com "epoxy". Um período de 24 horas é indicado para a secagem completa do selante. Após esse período, o tubo de teflon é retirado e as fibras envolvidas no "epoxy" são cortadas radialmente com uma lâmina pré-aquecida.

No passo seguinte, a terminação de fibra óptica é encaixada e selada com "epoxy" na membrana tubular. Um período de 24 horas é necessário para a secagem completa.

Por fim, a membrana tubular selada nas fibras ópticas é preenchida, através da outra extremidade, com as microesferas, as quais devem ser compactadas delicadamente com o auxílio de um bastão metálico até a obtenção do comprimento do caminho óptico desejado. A terminação da membrana é então selada com "epoxy" e deixada para secar por um igual período de tempo.

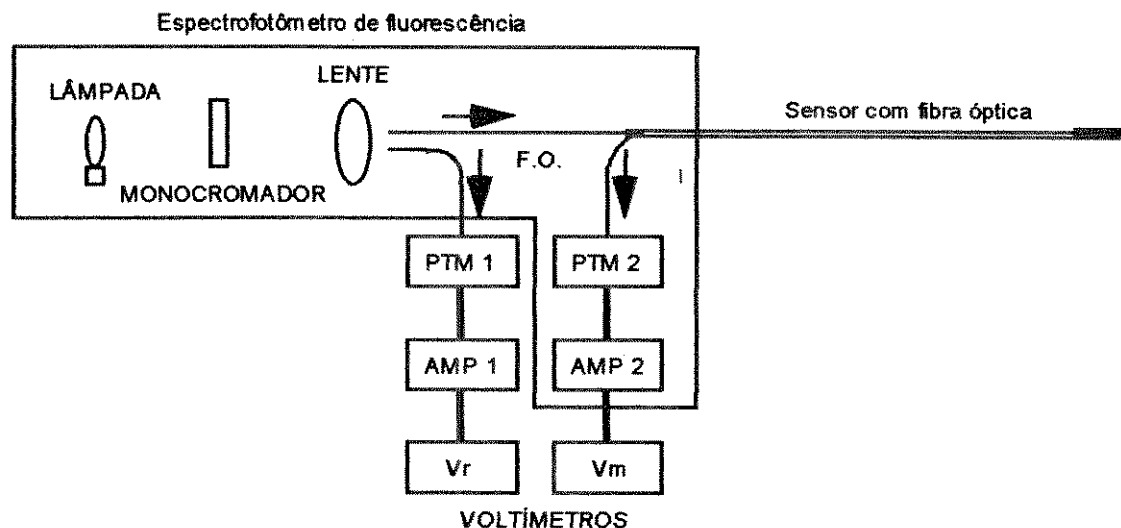
### **3.4. Instrumento opto-eletrônico do sistema experimental**

Para a avaliação do desempenho do sensor construído, foi necessário o desenvolvimento paralelo de um instrumento opto-eletrônico.

Genericamente, a instrumentação típica de um sistema com sensor de fibra óptica é basicamente composta por dois sub-sistemas distintos: o de excitação e o de detecção dupla, incluindo o processamento de sinal e apresentação dos resultados. Em linhas gerais, o primeiro sub-sistema é responsável pela geração, seleção dos comprimentos de onda e acoplamento da radiação na fibra óptica de excitação. A parcela da radiação refletida pela fase reagente é acoplada na fibra de retorno e, a seguir, discriminada em frequência, formando os canais ópticos de medida e o de referência. Geralmente, o canal de medida está centrado na faixa de comprimentos de onda de máxima absorção do indicador de pH e o de referência numa faixa invariável com as alterações de cor do indicador. No sistema de detecção, as radiações de medida e referência são transduzidas para sinais elétricos, os quais são amplificados em separado. Os circuitos eletrônicos processam os dois sinais elétricos resultantes e apresentam num "display" o valor do pH, baseado nas intensidades monitoradas nos dois canais e na curva de calibração do sensor. As características finais do sistema de medição do pH estão,

portanto, apoiadas no desempenho tanto do sensor quanto do instrumento.

Entretanto, uma instrumentação limitada foi implementada somente para a realização dos testes preliminares do sensor, a partir de adaptações no espectrofotômetro de fluorescência Perkin-Elmer, modelo 650-10S. O seu diagrama em blocos é apresentado na figura 3.11.



PMT: válvula fotomultiplicadora

AMP : amplificador

F.O. : fibra óptica

Vr e Vm : diferença de potencial de referência e medida, respectivamente

Figura 3.11: Diagrama em blocos do instrumento opto-eletrônico desenvolvido para os testes preliminares do sensor construído.

No diagrama mostrado na figura 3.11, a radiação excitadora gerada pela lâmpada de xenon (150 Watts), alimentada por uma fonte de alta tensão, é discriminada por uma grade monocromadora

em larguras de banda de 1,5 a 20nm, na faixa de 350 a 700nm. A radiação selecionada é focalizada, por um conjunto de lentes, nas fibras ópticas de excitação do sensor e de referência. A primeira transmite a radiação acoplada para a fase reagente do sensor, na qual é parcialmente absorvida e refletida para a fibra de retorno do sensor, formando o canal óptico de medida. A segunda fibra entrega a radiação diretamente para o sistema de medida, formando o canal óptico de referência.

As lentes focalizam a radiação selecionada numa área de  $5\text{mm}^2$  a uma distância de 5cm, aproximadamente. O posicionamento das fibras (medida e referência) na área de foco é feito por ajuste manual em um sistema mecânico desenvolvido especialmente para essa aplicação. Da mesma forma, duas outras montagens mecânicas possibilitam os alinhamentos da fibra de retorno (ou medida) e da fibra do canal de referência, nos seus respectivos fotodetectores.

A fotodeteção é efetuada por duas válvulas fotomultiplicadoras (RCA 1P28), uma para cada canal. Os sinais transduzidos são amplificados em separado por dois amplificadores operacionais na configuração transimpedância. A diferença de potencial produzida na saída de cada amplificador é monitorada por um voltímetro.

Os testes iniciais com os sensores mostraram duas limitações do instrumento. A primeira, a sensibilidade espectral inadequada

nos comprimentos de onda maiores que 550nm, faixa de absorção da fase básica dos indicadores colorimétricos. Dentre os componentes do sistema, a válvula fotomultiplicadora (RCA 1P28) era o elemento mais crítico. Sendo assim, o sistema de detecção foi reprojetoado, utilizando o fotodiodo PIN (EG&G, HUV- 4-000B) e um filtro de bloqueio de infravermelho. A figura 3.12 apresenta as respostas espectrais dos dois sistemas.

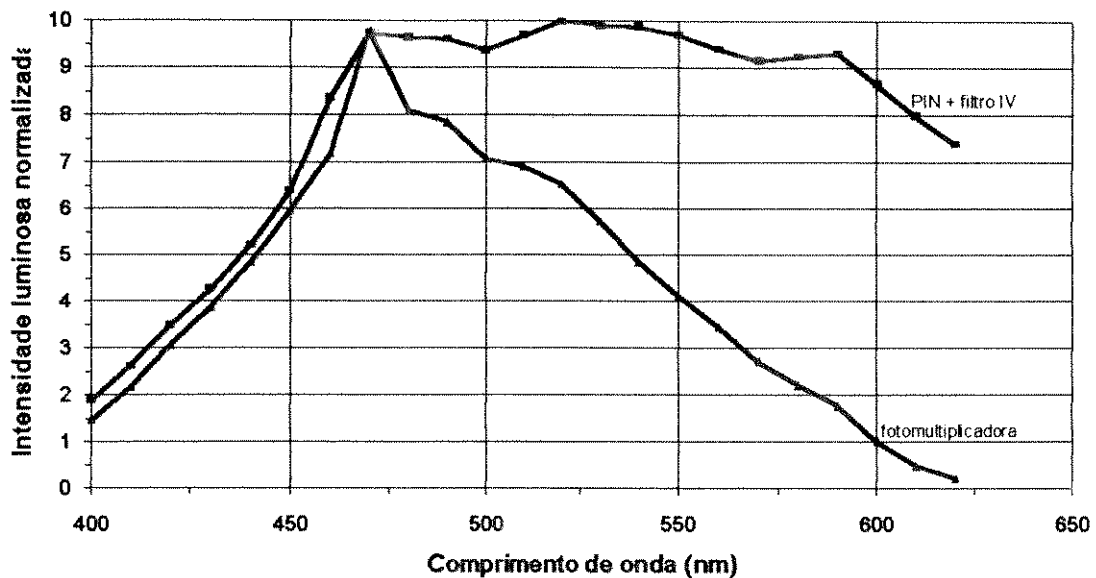
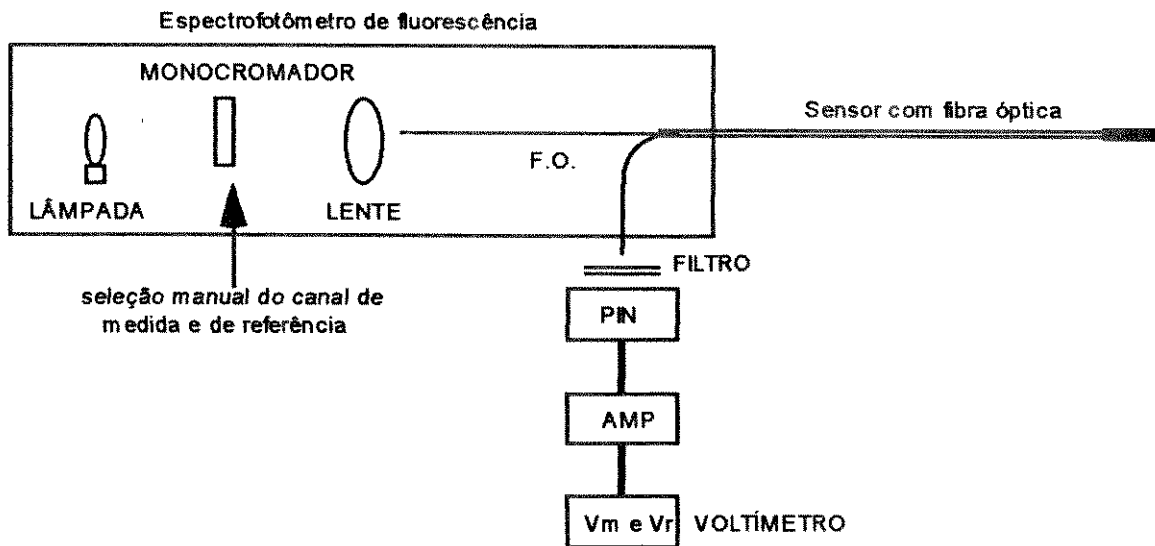


Figura 3.12: Respostas espectrais (normalizadas) dos instrumentos com fotomultiplicadora (RCA, #1P28) e com fotodiodo PIN (EC&G, #HUV-4-000B) e filtro de bloqueio de infravermelho.

A segunda limitação era devida ao fato do monocromador do espectrofotômetro estar posicionado no sistema de excitação. Nessa configuração, o canal óptico de referência não incorporava o sensor, impossibilitando compensar completamente as perdas ópticas do sistema. A solução temporária adotada foi utilizar somente um canal tanto para a medida como para a referência,

sendo portanto necessário selecionar manualmente o monocromador entre cada leitura. Embora trabalhoso, o arranjo, mostrado na figura 3.13, permitiu avaliar o desempenho do sensor construído.



F.O. : fibra óptica  
AMP : amplificador

FILTRO : filtro de bloqueio de infravermelho  
Vm e Vr : diferença de potencial de medida e de referência, respectivamente

PIN : fotodiodo PIN

Figura 3.13: Diagrama em bloco do instrumento utilizado para avaliar o desempenho dos sensores construídos.

### 3.5 Desempenho do sensor de fibra óptica básico

As características ópticas do sensor, notadamente o grau de modulação óptica obtido na radiação incidente, o comprimento do caminho óptico e a intensidade da radiação refletida, foram determinados e ajustados experimentalmente para a faixa adequada

de operação. Com isso, a construção do sensor pôde ser revista e melhorada.

No entanto, os testes preliminares em solução tampão mostraram que o sensor era excessivamente lento para a aplicação pretendida, que necessita um tempo de resposta de, no máximo, alguns minutos. Com uma dinâmica aproximadamente exponencial, típica de uma situação de difusão, o tempo de resposta (63% do valor máximo) do sensor era em torno de 30 minutos quando submetido a uma mudança instantânea de pH.

Uma avaliação dos principais fatores que poderiam estar prolongando o tempo de resposta teve que ser efetuada. Os fatores avaliados foram o tamanho do poro da membrana, o comprimento da fase sensora do sensor, a capacidade de tamponamento da solução empregada, a concentração do "bis-acrylamide", a concentração do "polyacrylamide" e o diâmetro da fase reagente. Com exceção do último, os fatores listados foram avaliados utilizando sensores com fibra óptica, construídos com microesferas de "chlorophenol red" ( $pK = 5,5$ ), cujo modelo foi apresentado na figura 3.10. A influência do diâmetro da fase reagente teve que ser avaliada com o emprego de hidrogéis cilíndricos, pois membranas e fibras ópticas com diâmetros variados não estavam disponíveis.

O teste com os sensores consistiu em determinar o tempo de resposta do mesmo quando submetido a uma variação brusca de pH 7 (Mallinckrodt, #0031) para pH 4 (Mallinckrodt, #0029). O tempo de



resposta do hidrogel (sem membrana) foi avaliado qualitativamente por observação visual, determinando-se o tempo aproximado para ocorrer a mudança de coloração do vermelho (pH 7) para o amarelo (pH 4).

### **3.5.1 Tamanho do poro da membrana**

Sensores foram construídos com membranas de tamanho de poro variado e diâmetro idêntico. O primeiro grupo utilizou membranas com poro de maior diâmetro (Supelco, 500000MW, #9-5558); o segundo, a membrana intermediária (Supelco, 100000MW, #9-5555) e o último, a membrana de poro menor (Supelco, 50000MW, #9-5554). Os tempos de resposta obtidos foram aproximadamente de 30, 50 e 75 minutos, respectivamente.

Dessa forma, um aumento significativo do tamanho do poro seria necessário para a obtenção de um tempo de resposta na faixa de alguns minutos. No entanto, membranas tubulares com essa característica não estão disponíveis comercialmente.

### **3.5.2 Comprimento da fase sensora**

Sensores com comprimento da fase sensora de 2,0mm e 1,5mm foram confeccionados e testados. Os testes mostraram que os sensores de 2,0mm respondem em aproximadamente 30 minutos e os de

1,5mm, em aproximadamente 20 minutos. Portanto, sensores com menor comprimento de membrana são preferíveis, respeitando-se os limites impostos pelo caminho óptico necessário para a sua modulação.

### **3.5.3 Capacidade de tamponamento**

A capacidade de tamponamento é uma propriedade da solução tampão (Apêndice A) de resistir a uma modificação do pH por efeito da diluição ou adição de pequenas quantidades de ácidos ou bases fortes. A avaliação da influência da capacidade tampão foi realizada com um conjunto de sensores idênticos.

Os sensores foram distribuídos em grupos 1 e 2 e imersos e mantidos por 24 horas respectivamente em água bidestilada de pH 7,0 e solução tampão de pH 7,0. Após este período, cada sensor foi retirado da solução e, imediatamente, imerso em solução tampão de pH 4.

A resposta dos sensores dos grupos 1 e 2 foi observada em aproximadamente 4 minutos e 30 minutos, respectivamente. Portanto, a capacidade tampão do meio de medida influencia fortemente no tempo de resposta, porém esta característica é uma propriedade da solução em teste.

#### **3.5.4 Concentração do "bis-acrylamide"**

O "bis-acrylamide" é a substância responsável pela consistência do hidrogel. A variação da sua concentração permite preparar hidrogel com consistência próxima a um fluido, num extremo, ou semelhante a um sólido, no outro extremo. Microesferas com uma concentração de "bis" de 8,0mg, 4,0mg (usual) ou concentração igual a zero foram preparadas e os sensores foram construídos. As avaliações mostraram que o tempo de resposta é praticamente independente da concentração do "bis-acrylamide".

#### **3.5.5 Concentração do "polyacrylamide"**

Como a polimerização química do "polyacrylamide" é realizada em meio aquoso, o grau de diluição do polímero foi investigado. Microesferas com concentrações de 3M (usual), 1,5M ou 0,6M de "polyacrylamide" foram preparadas e utilizadas por um conjunto de sensores com fibras ópticas. Resultados experimentais mostraram que independente da concentração, o tempo de resposta dos três grupos é praticamente o mesmo.

### 3.5.6 Diâmetro da fase reagente

A influência do diâmetro da fase reagente foi avaliada com hidrogéis (sem membrana tubular). Caso contrário, sensores com diferentes diâmetros teriam que ser desenvolvidos, envolvendo um conjunto variado de tamanhos de membrana, fibras ópticas e implicando em melhorias e adaptações no instrumento optoeletrônico.

O hidrogel foi preparado no interior de microtubos de polietileno. Os diâmetros internos dos microtubos eram 0,28mm, 0,38mm, 0,58mm, 0,86mm, 1,19mm e 1,40mm. O hidrogel produzido tinha a forma cilíndrica, com diâmetro igual ao do microtubo e comprimento de 10mm. Cada grupo foi imerso em solução tampão de pH 7 por 24 horas. Separadamente, cada grupo foi retirado e imerso em solução tampão de pH 4.

Os resultados obtidos são mostrados na figura 3.14 e 3.15, demonstrando, respectivamente, que a dependência do tempo de resposta é aproximadamente uma função quadrática do diâmetro da fase reagente e, conseqüentemente, uma função aproximadamente linear da área transversal da mesma.

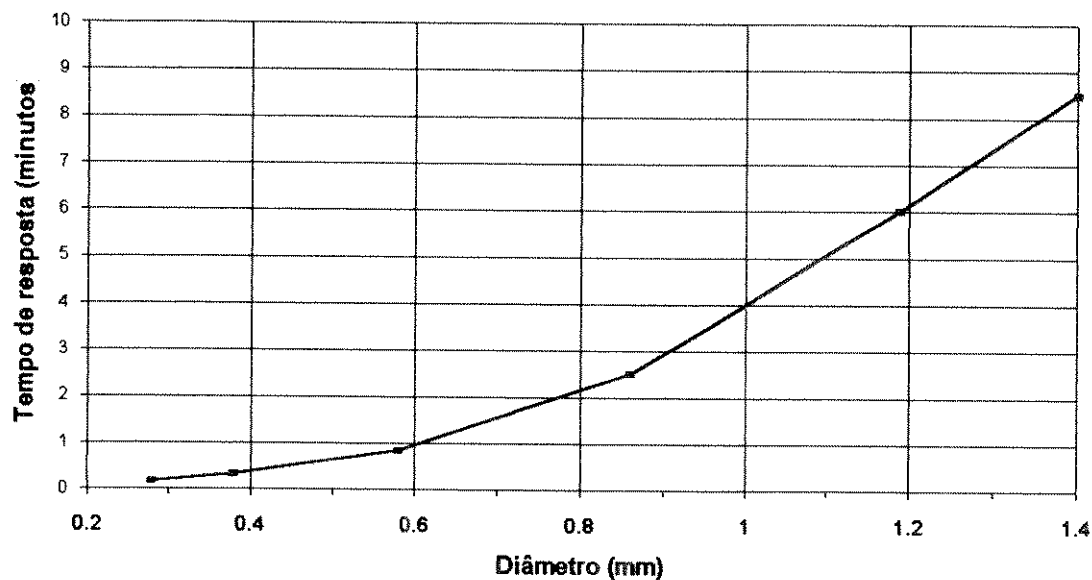
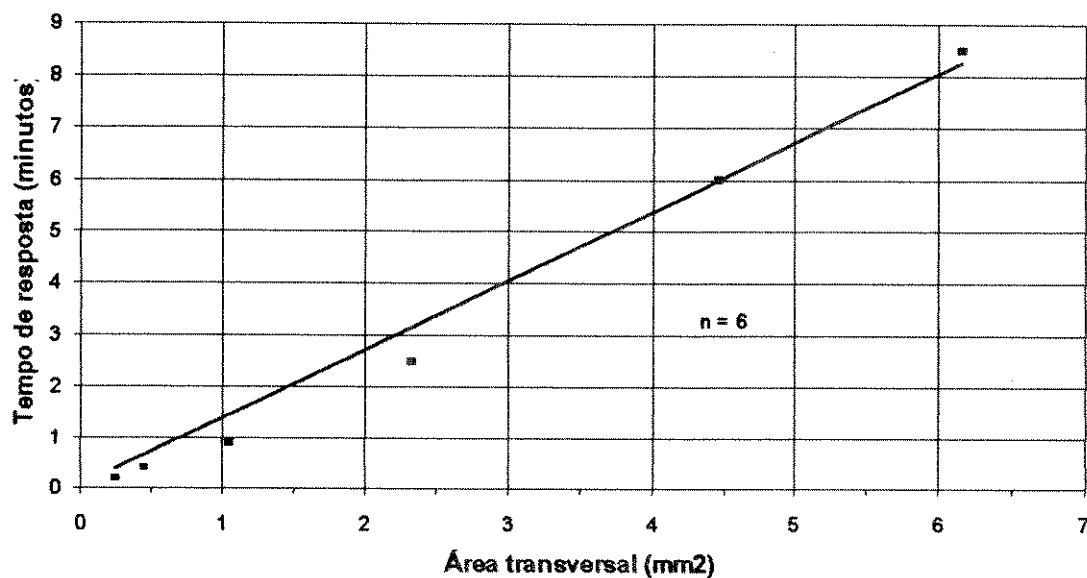


Figura 3.14: Tempo de resposta (aproximadamente 3 constantes de tempo) de transição do hidrogel de "chlorophenol red" de pH 7 (vermelho) para pH 4 (amarelo).



$$\text{Tempo de resposta} = 1,333904 \cdot \text{área transversal} + 0,048677;$$

$$r = 0,986933.$$

Figura 3.15: Tempo de resposta (aproximadamente 3 constantes de tempo) de transição do hidrogel de "chlorophenol red" de pH 7 (vermelho) para pH 4 (amarelo).

### 3.6 Conclusão

O procedimento desenvolvido permitiu selecionar os componentes e construir um sensor básico. Os indicadores de pH do tipo colorimétrico foram adotados e a sua imobilização em microesferas de "polyacrylamide" foi efetuada, obtendo-se assim uma fase reagente. A membrana tubular, o elemento refletor e a fibra óptica selecionadas completam os componentes para a construção do sensor. A avaliação do sensor exigiu o desenvolvimento de um instrumento opto-eletrônico, o qual foi obtido a partir de adaptações em um espectrofluorímetro comercial. O sistema completo permitiu, então, determinar os parâmetros principais de projeto para o desenvolvimento do sistema proposto. Os testes em solução tamponada mostraram a principal limitação do sensor desenvolvido: o tempo de resposta prolongado, de aproximadamente 30 minutos. Uma avaliação dos prováveis fatores que poderiam estar influenciando o tempo de resposta foi efetuada. Os resultados mostraram que, dentre os fatores avaliados, a redução da área transversal (fase reagente e a membrana) reduz o tempo de resposta na mesma proporção, aproximadamente. Por exemplo, para um sensor empregando uma membrana com o mesmo tamanho do poro, a redução do diâmetro da membrana de 1100 $\mu$ m para 300 $\mu$ m deve reduzir o tempo de resposta de 30 minutos por aproximadamente 15 vezes, resultando num tempo de resposta em torno de 2 minutos. Esse valor é adequado para a

aplicação proposta. Concluindo, os resultados obtidos serviram de base para o desenvolvimento do protótipo proposto, apresentado no próximo capítulo.

## CAPÍTULO 4

### DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA COM SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA A MEDIÇÃO DO pH GÁSTRICO

A partir das avaliações preliminares realizadas (Capítulo 3), foi possível implementar o sistema com sensor de fibra óptica para a aplicação proposta. A redução do tempo de resposta implicou em mudanças substanciais no sensor e na definição das características do instrumento opto-eletrônico, devido à exigência de um diâmetro menor para a fase reagente.

Este capítulo apresenta inicialmente as especificações gerais do sistema, considerando os compromissos existentes. A seguir, apresentam-se os projetos do sensor e do instrumento opto-eletrônico. Na seqüência, apresenta-se o desenvolvimento do sensor com faixa de sensibilidade de pH 1 a pH 7 e a metodologia empregada para a determinação do pH. O último item é dedicado para a apresentação do "software".



## 4.1 Especificação do sistema construído

A redução do diâmetro da fase sensora é necessária para obter um sistema com tempo de resposta na faixa adequada. Essa característica implica também na utilização de fibras ópticas de diâmetro menor, o que reduz o nível da potência luminosa acoplada na fibra excitadora e, por conseguinte, no fotodetector (figura 4.1). Além disto, dificulta a reprodutibilidade do sensor.

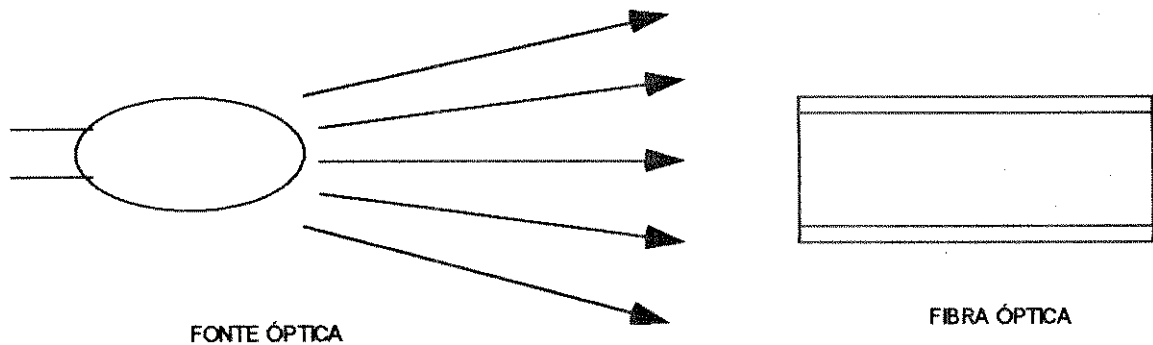


Figura 4.1: Desenho esquemático ilustrando o acoplamento da radiação da fonte na fibra óptica.

A variação na potência óptica acoplada, devido à substituição de uma fibra de área  $A_1$  por uma de área  $A_2$ , pode ser determinada de forma comparativa pela equação 4.1 (Hecht, 1988).

$$\text{Perda óptica (dB)} = 10 \log (A_1/A_2) + 20 \log (NA_1/NA_2) \quad (4.1)$$

Considerando fibras de mesma abertura numérica (NA), o emprego de fibras de menor seção transversal reduz a potência acoplada na mesma proporção. Por exemplo, a redução em 50% da área da fibra resulta numa perda de potência óptica acoplada em 3 dB, ou seja, em 50% (eq. 4.1).

Portanto, o emprego de fibras ópticas de diâmetro menor implica, certamente, na utilização de um instrumento optoeletrônico comparativamente mais sofisticado e conseqüentemente de custo maior.

Do exposto, fica evidente que existe um compromisso entre o tempo de resposta do sensor e o nível da intensidade luminosa no fotodetector. O compromisso apresenta uma relação proporcional à área transversal, pois a redução do diâmetro da fase sensora reduz de forma quadrática o tempo de resposta, mas reduz também quadraticamente a potência luminosa acoplada, devido o emprego de fibras ópticas com diâmetros menores.

A estratégia adotada foi desenvolver o sensor com o melhor tempo de resposta possível, considerando as limitações da disponibilidade comercial dos componentes empregados pelo sensor. Uma avaliação dos fornecedores de membranas tubulares mostrou que os diâmetros normalmente comercializados são de 1100 $\mu$ m, 500 $\mu$ m, 300 $\mu$ m e 250 $\mu$ m. Paralelamente, um procedimento similar mostrou que as fibras ópticas de plástico são geralmente disponíveis com

diâmetros de 1000 $\mu\text{m}$ , 500 $\mu\text{m}$ , 250 $\mu\text{m}$  e 125 $\mu\text{m}$ . Considerando um sensor típico (figura 3.3), o menor sensor obtido com a técnica adotada seria construído com duas fibras de 125 $\mu\text{m}$  e a membrana de 300 $\mu\text{m}$ .

No entanto, a construção manual do sensor proposto é trabalhosa e delicada, o que certamente dificultaria a sua reprodutibilidade. Uma alternativa é o desenvolvimento do sensor com uma única fibra de maior diâmetro, no caso, 250 $\mu\text{m}$ , selado na membrana de 300 $\mu\text{m}$ . Além de facilitar a construção e melhorar a reprodutibilidade, o custo do sensor é praticamente reduzido à metade, tendo em vista que o conector e a fibra são os elementos mais caros. Essa característica é atraente, uma vez que sensores descartáveis são preferíveis.

Entretanto, o projeto de um sensor colorimétrico com uma única fibra óptica não é simples. A dificuldade principal é o desenvolvimento de um arranjo óptico para a separação das radiações excitadora e de retorno, de mesma frequência. Porém, é preferível projetar um sistema óptico sofisticado, incorporado a um equipamento, ao invés de reproduzir inúmeros sensores com grau de dificuldade maior, confiabilidade menor e custo maior.

Basicamente, existem duas técnicas de separação de radiações possíveis de serem implementadas neste projeto: divisores de feixe com filtro ("half mirror") ou com fibra óptica ("splitter"), conforme ilustrado respectivamente nas figuras 4.2 e 4.3.

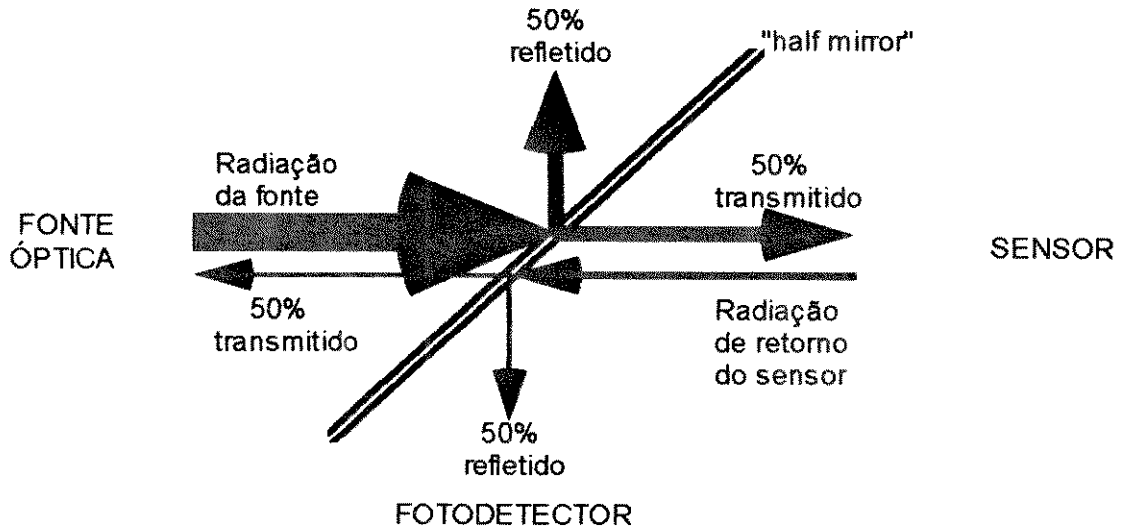


Figura 4.2: Divisor de feixe com "half mirror". Considerando um ângulo de incidência de 45 graus, o "half mirror" transmite 50% da potência e reflete 50% da potência incidente.

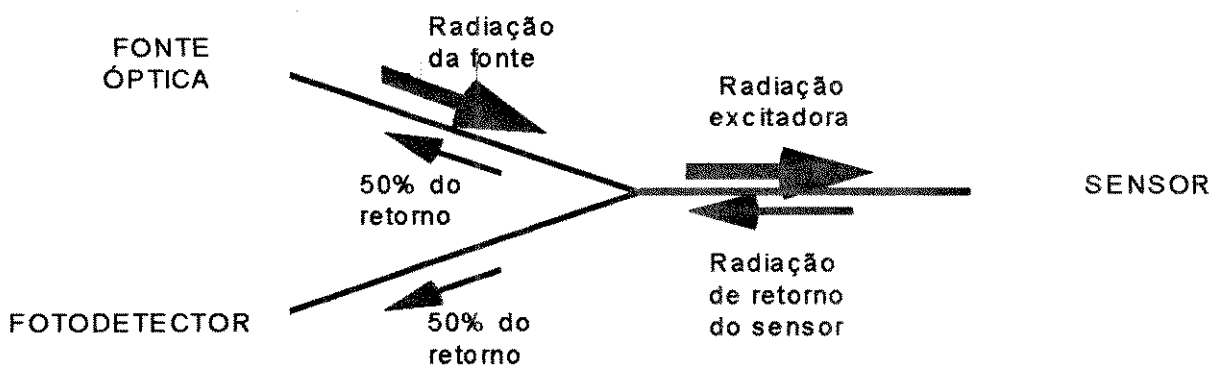


Figura 4.3: Divisor de feixe com fibra óptica ("splitter").

O divisor de luz com "half mirror" é um arranjo com óptica convencional. Além dos elementos mostrados, o arranjo exige o uso de lentes para focalizar as radiações. O "splitter" utiliza simplesmente um arranjo com três terminações de fibra óptica.

As duas configurações têm vantagens e desvantagens. No primeiro, os alinhamentos e os acoplamentos são críticos, dada a dimensão da fibra, e susceptíveis às variações com vibração e temperatura. Além disso, a intensidade da radiação de retorno é, teoricamente, menor. No entanto, os componentes ópticos para a sua montagem são disponíveis comercialmente. O segundo envolve apenas um acoplamento (lâmpada-fibra), apresenta melhor estabilidade à temperatura e a vibração e, ainda, transmite uma parcela maior da energia luminosa para o sensor. Porém, "splitter" construído com fibras ópticas de plástico não está disponível comercialmente.

Considerando as vantagens do "splitter", optou-se pelo seu emprego, mesmo exigindo o projeto e o desenvolvimento deste dispositivo.

Além das especificações anteriores, a fonte óptica do instrumento deve ser criteriosamente definida. Dentre as fontes disponíveis, a lâmpada de tungstênio halogenado foi selecionada devido o espectro de emissão amplo, o baixo custo e a simplicidade na alimentação elétrica. A sua desvantagem é a relação existente entre o período de utilização (vida útil) e a

potência óptica emitida. Por exemplo, a lâmpada "General Electric" (#EPF) de 120W apresenta um período de utilização de aproximadamente 30 horas, enquanto que a lâmpada "Welch Allyn (#01218) de 4,5W possui uma vida útil média de 600 horas. O emprego de uma lâmpada de potência alta é preferível, pois simplifica sobremaneira o projeto dos acopladores e do fotodetector. No entanto, a vida útil da lâmpada está relacionada com a sua estabilidade, pois o filamento de tungstênio é deteriorado ao longo do período de utilização, alterando as características da radiação gerada e emitida.

Considerando que na aplicação pretendida o protótipo será geralmente utilizado para monitorar continuamente o pH por um período de 24 horas, lâmpadas com vida útil de no mínimo uma centena de horas são necessárias. Além disso, o seu maior período de utilização reduz a frequência de substituição e, conseqüentemente, o custo operacional do equipamento. Por outro lado, a redução na potência óptica emitida pela fonte deve ser compensada com a otimização dos acoplamentos e do fotodetector.

A estratégia adotada foi empregar uma lâmpada com o maior período de vida útil possível, considerando as limitações dos acoplamentos e da fotodeteção.

A figura 4.4 ilustra o diagrama em blocos do sistema construído, composto do sensor e do instrumento opto-eletrônico, os quais são descritos a seguir.

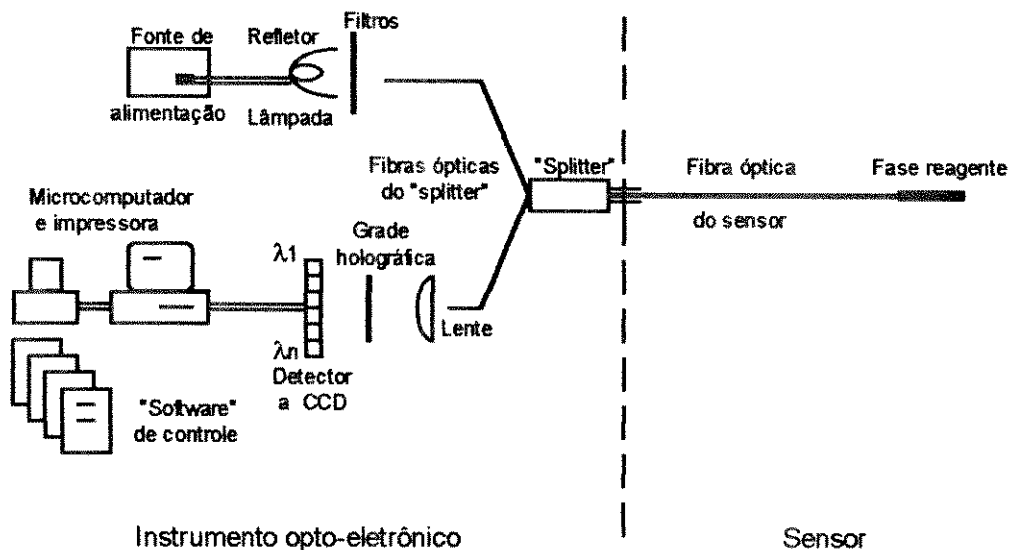
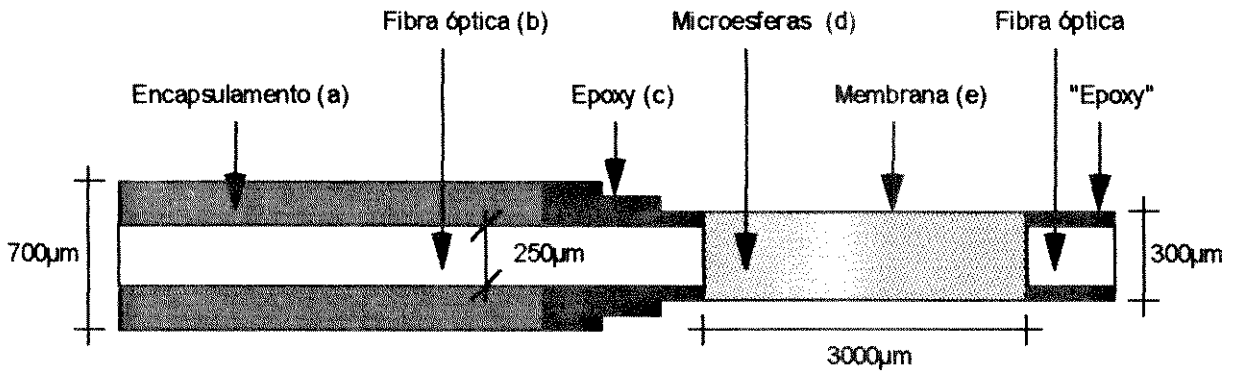


Figura 4.4: Diagrama em blocos do sistema com sensor de fibra óptica construído.

## 4.2 Sensor com fibra óptica

O sensor construído emprega uma única fibra óptica, que serve tanto para a transmissão da radiação de excitação quanto para o retorno da radiação refletida pela fase reagente. Uma fibra óptica de comprimento pequeno é utilizada na terminação do sensor, facilitando a selagem da extremidade. A figura 4.5 apresenta o diagrama da versão final do sensor construído e a figura 4.6, o conector utilizado pelo sensor.



(a) tubo de teflon (preto) (Chemplastic, #PW 012259); (b) fibra óptica de plástico 250µm (Poly-Optical, #PCM-1610); (c) selante "epoxy" (Hardman, #04005); (d) microesferas de "polyacrylamide" com os indicadores e as micropartículas de dispersão (e) membrana tubular de celulose 300µm (Enka, #B4AH).

Figura 4.5 : Diagrama esquemático do sensor de fibra óptica construído.

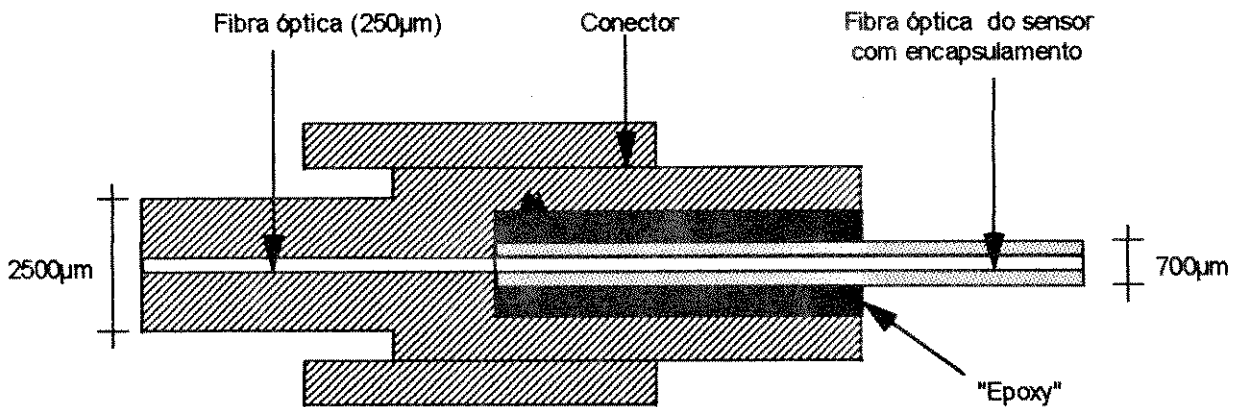


Figura 4.6: Conector SMA 905 (AMP, #504666-9) do sensor com fibra óptica.



### **4.3 Instrumento opto-eletrônico**

O instrumento opto-eletrônico construído pode ser dividido em três partes principais: o sistema de excitação, o "splitter" com fibra óptica e o sistema de fotodetecção.

#### **4.3.1 Sistema de excitação**

O sistema de excitação é composto do conjunto fonte óptica - fonte de alimentação elétrica, selecionador de comprimentos de onda e dispositivo para acoplar a radiação na fibra óptica.

A fonte óptica selecionada foi a lâmpada de tungstênio halogenado, pelos motivos apresentados no item 4.1. Aproximadamente dez tipos de lâmpadas foram testadas, sendo as primeiras de 120W, com tempo de utilização de aproximadamente 30 horas e com arrefecimento por ventilador. A otimização progressiva das interfaces ópticas, principalmente dos acoplamentos, possibilitou o emprego de uma lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado de 4,5W, 4,25V, temperatura de cor 3000K, tempo de vida médio de 600 horas. A figura 4.7 ilustra a lâmpada utilizada, comparando as suas dimensões com a do LED T1-3/4.

Com a definição da lâmpada, uma avaliação permitiu determinar o tipo de alimentação elétrica (corrente constante ou tensão constante) mais adequada, visando a melhor estabilidade temporal. Tecnicamente, qualquer lâmpada de tungstênio altera a intensidade luminosa emitida e a temperatura de cor com o tempo de utilização. As variações na intensidade são compensadas pelo sistema duplo de fotodeteção do equipamento, mas as alterações na temperatura de cor durante a monitoração implicam em erros na medida. Desta forma, os desvios na temperatura de cor devem ser minimizados entre os períodos de recalibração, no caso, 24 horas.

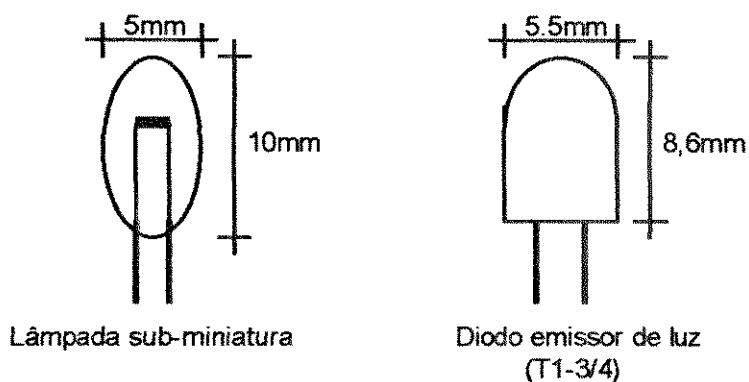


Figura 4.7: Lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado e o diodo emissor de luz (LED).

A temperatura de cor da lâmpada é basicamente função da potência elétrica dissipada no filamento, cuja resistência aumenta com o tempo de utilização devido à vaporização do

tungstênio. Assim sendo, a potência elétrica dissipada numa lâmpada alimentada a corrente constante aumenta ( $P = R.I^2$ ) com o aumento da resistência do filamento. O incremento na potência dissipada aumenta a temperatura interna do bulbo, aumentando também a resistência do filamento. O mecanismo de realimentação positiva altera a temperatura de cor e reduz o tempo de utilização da lâmpada.

Por outro lado, com alimentação a tensão constante, a potência dissipada tende a diminuir com o tempo de utilização ( $P = V^2/R$ ). No entanto, a redução da potência dissipada reduz ligeiramente a resistência do filamento, devido à queda da temperatura interna do bulbo. O mecanismo tende a compensar o aumento da resistência pelo uso, minimizando as variações na temperatura de cor da lâmpada. Portanto, a alimentação da lâmpada do protótipo é efetuada por tensão constante (4,25V).

O próximo passo foi definir a técnica para focalizar na fibra óptica a radiação gerada pela lâmpada. A eficiência do acoplamento determina praticamente o nível da intensidade luminosa no fotodetector e, por conseguinte, a relação sinal/ruído.

Duas técnicas foram experimentadas: o emprego de uma lâmpada sub-miniatura com lente focalizadora na porção terminal interna do bulbo e a utilização de um refletor metálico do tipo elíptico, conforme mostrados na figura 4.8. Os testes mostraram que a

intensidade luminosa no detector é superior com o uso do refletor metálico. O refletor selecionado possui distância focal de 12,7mm e abertura numérica de 0,40.

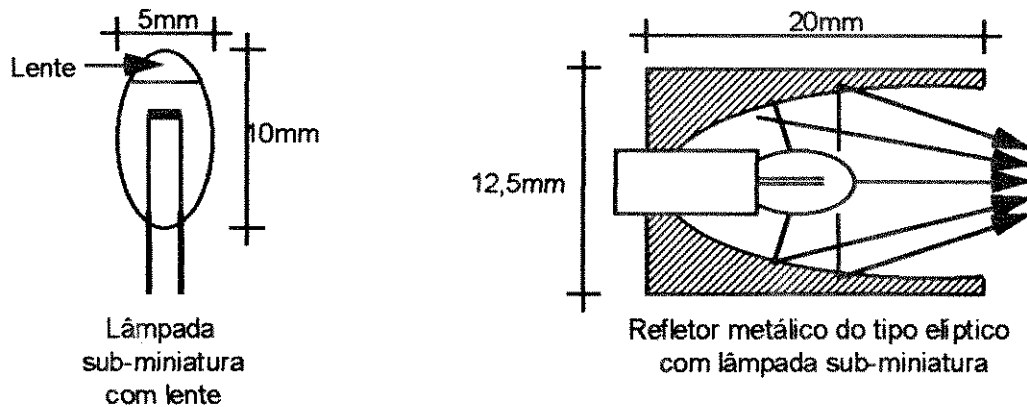


Figura 4.8: Técnicas de acoplamento experimentadas: lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado com lente focalizadora na porção terminal interna do bulbo e refletor metálico do tipo elíptico com lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado.

Além dessas definições, o sistema de excitação deve bloquear as faixas de comprimentos de onda indesejáveis, no caso, o infravermelho e o ultravioleta / azul visível. O infravermelho aquece as partes metálicas, principalmente o conector com as fibras ópticas que está posicionado na área de foco. O aquecimento do conector pode levar a fusão da fibra de plástico (temperatura de fusão = 80 °C). O ultravioleta / azul visível, por serem a faixa com maior energia da radiação gerada, podem promover a descoloração das microesferas durante exposições

prolongadas. As duas faixas foram portanto bloqueadas por dois filtros do tipo absorção. O primeiro possui um comprimento de onda de corte (50% da transmitância máxima) em 675nm (Reynard, #2502/KG-1), bloqueando o infravermelho. O outro tem um comprimento de onda de corte em 505nm, bloqueando o azul (400 a 500nm) e o ultravioleta (<400nm). A figura 4.9 apresenta a montagem final do sistema de excitação.

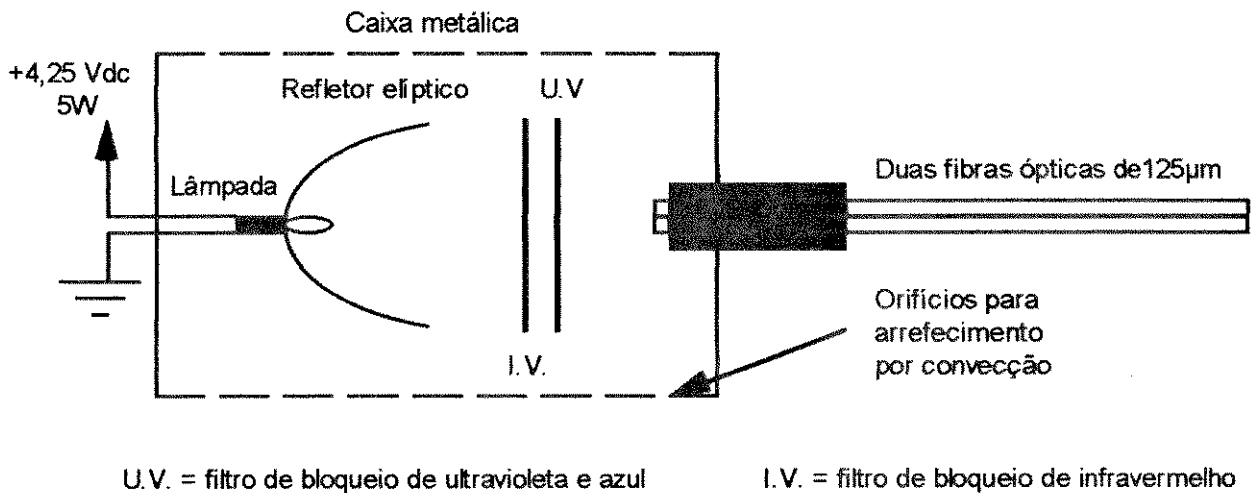


Figura 4.9: Sistema de excitação composto por uma lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado, um refletor elíptico, dois filtros de atenuação e o conector de fibra óptica.

#### 4.3.2 "Splitter" com fibra óptica

O divisor de luz é o dispositivo responsável pela separação da radiação incidente da luz de retorno. O primeiro arranjo

utilizou um "splitter" comercial com três fibras ópticas de vidro de 240 $\mu$ m (Canstar, #MCC/200-240-905), representado na figura 4.10.

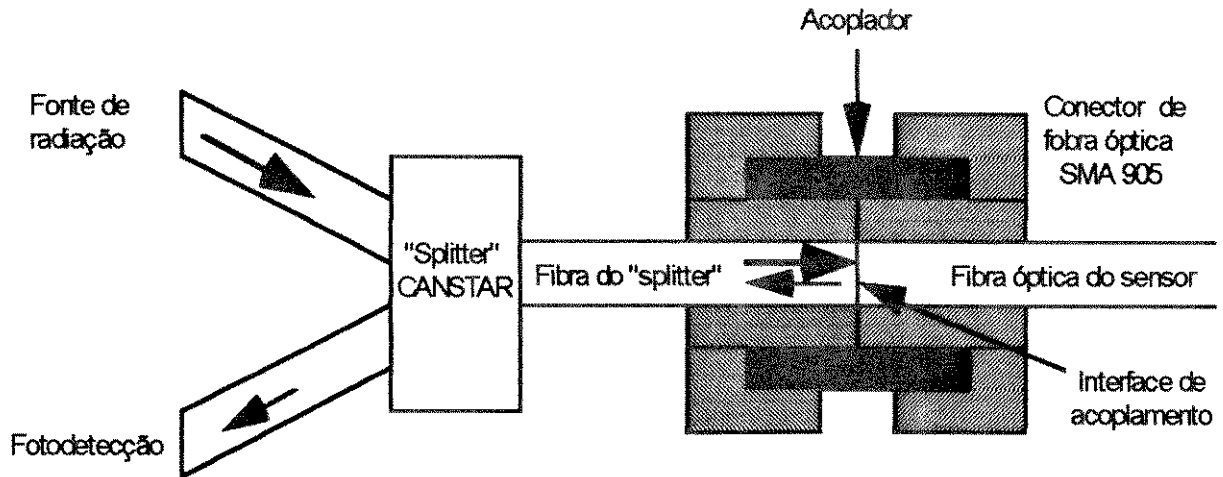


Figura 4.10: "Splitter" com três fibras ópticas de vidro.

Embora um "splitter" com fibra de vidro não seja completamente adequado, a principal limitação do "splitter" Canstar é a configuração com três fibras ópticas. Nesse caso, a radiação refletida na interface de acoplamento "splitter"-sensor, devido principalmente ao descasamento entre os índices de refração das fibras, retorna para o "splitter". Metade da radiação de retorno é direcionada para o fotodetector, elevando a parcela de radiação não modulada (que não alcançou o sensor).

A solução foi então desenvolver um "splitter" com fibra de plástico. Após vários arranjos testados, optou-se pela versão mostrada na figura 4.11. O "splitter" projetado utiliza 3 fibras ópticas de 125 $\mu$ m, sendo duas para a excitação e uma para a

detecção. As fibras de excitação são afiladas para um diâmetro aproximado de 110 $\mu$ m, permitindo a inserção das três fibras no conector SMA de 250 $\mu$ m de diâmetro.

A configuração do "splitter" desenvolvido permite aumentar a isolação óptica entre as terminações de excitação e detecção, pois a parcela da energia refletida na interface "splitter"-sensor é acoplada basicamente sobre a mesma fibra, no caso a de excitação. Assim, a intensidade luminosa detectada é composta principalmente por radiação modulada, ou seja, refletida na fase reagente.

Uma melhoria no acoplamento da energia óptica "splitter"-sensor foi obtida com a redução ou eliminação da possível camada de ar existente na interface, através da utilização de óleo de imersão (Cargille, #16482). Na prática, a superfície frontal do conector do sensor a ser testado deve receber uma quantidade mínima da substância acopladora, antes de ser conectado no "splitter". Resultados experimentais mostram que um ganho de aproximadamente 50% na potência transferida pode ser obtido com o uso da substância de acoplamento.

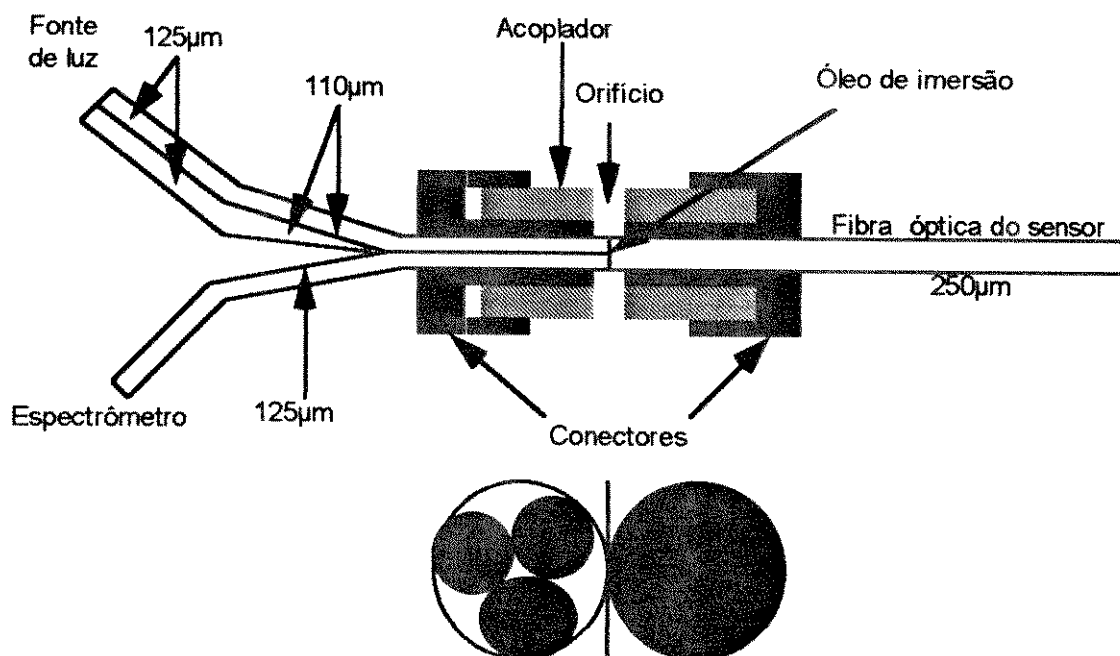


Figura 4.11: "Splitter" desenvolvido composto por três fibras de plástico.

#### 4.3.3 Sistema de fotodeteção

O sistema de fotodeteção é basicamente composto pelo discriminador de frequência, o transdutor opto-eletrônico e um microcomputador tipo PC.

A discriminação em frequência e a transdução da radiação de retorno é totalmente processada por um espectrofotômetro miniatura comercial (Ocean Optics, Inc., #SD1000). Dentre os motivos para a sua seleção, destacam-se o pico de sensibilidade no comprimento de onda de 550nm, as pequenas dimensões físicas, a



determinação do espectro contínuo numa faixa de 250nm e a entrega da radiação por fibra óptica (conector SMA 905).

O SD 1000 (figura 4.12a) é basicamente composto por uma lente (35mm), uma grade holográfica de 1200 linhas/mm e largura de faixa de 250nm, um detector a CCD ("charge coupled device), com 1024 pixels ativos, e os circuitos de condicionamento eletrônico. O CCD possui 76 "pixels falsos" na extremidade do espectro (figura 4.12b) que, segundo o fabricante, devem ser utilizados para compensar possíveis variações do nível de polarização (DC) do dispositivo durante as monitorações contínuas.

Os sinais transduzidos pelo CCD são inicialmente processados no espectrofotômetro e, posteriormente no microcomputador, convertidos em seus equivalentes binários por uma placa analógico-digital (Computer Boards, Inc., #CIO-AD16JR-AT), indicada pelo fabricante do espectrofotômetro.

Um microcomputador PC 386/ 25MHz e uma impressora matricial, disponíveis no laboratório, completam o "hardware" do sistema desenvolvido. Ressalta-se que as exigências impostas pelo sistema de medição no processamento digital são mínimas, principalmente porque as transições no pH são lentas, quando comparadas com a frequência do processamento digital.

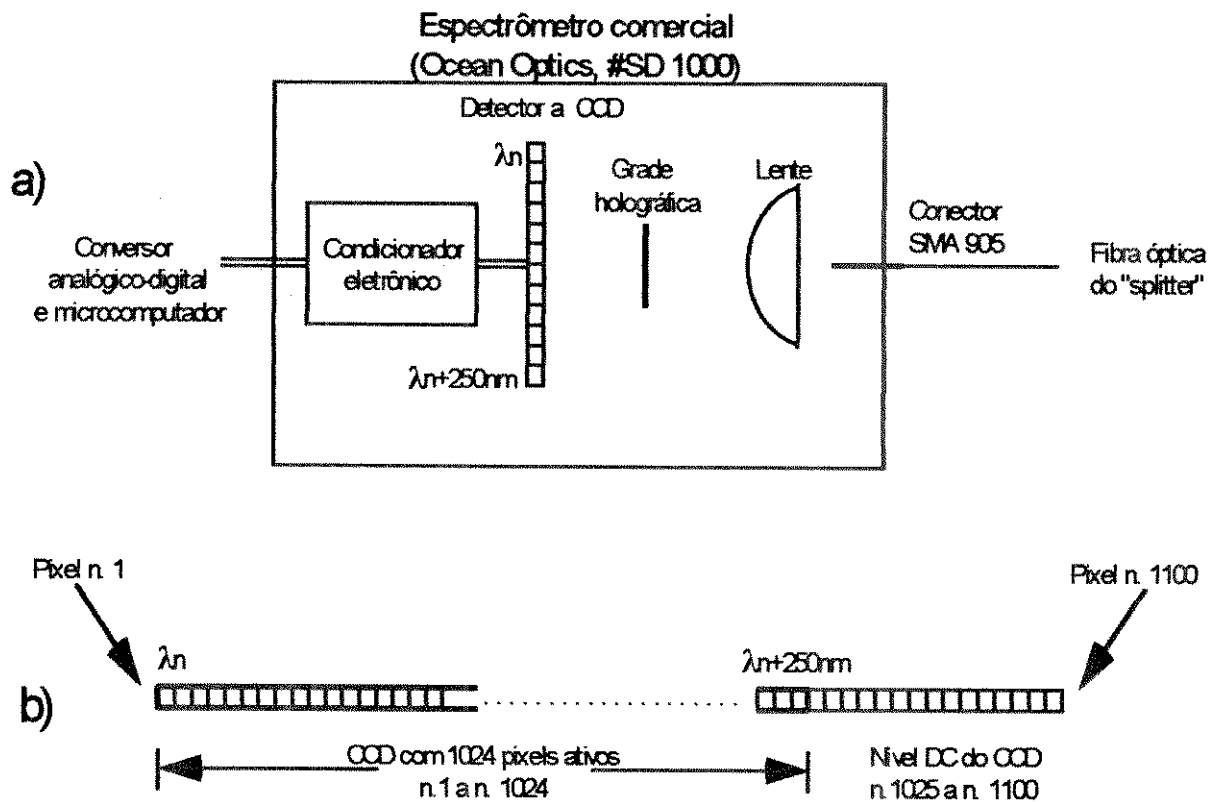


Figura 4.12: a) Diagrama em blocos do sistema de transdução opto-eletrônica utilizado. b) Mapa de localização dos pixels ativos e "pixels falsos" (nível DC) no CCD.

#### 4.4 Sensor de fibra óptica com sensibilidade na faixa de pH 1 a pH 7

Com o sistema opto-eletrônico projetado e construído, iniciou-se o procedimento químico experimental para a obtenção de microesferas com sensibilidade na faixa de pH 1 a pH 7. Conforme apresentado no Capítulo 2 (item 2.1), a medição do pH com um único indicador colorimétrico está restrita a uma faixa de +/- 1,5 unidades de pH em torno do seu pK. A ampliação da faixa

implica no emprego de uma mistura apropriada de indicadores, com pKs distintos e, preferivelmente, espectros de absorção similares. Os indicadores selecionados devem, preferencialmente, apresentar baixo coeficiente de dependência da força iônica do meio e, quando imobilizados, se fixar em altas concentrações nas microesferas de "polyacrylamide". Embora seja teoricamente possível conseguir uma mistura ideal, na prática foi necessário fazer concessões e atender aos compromissos existentes entre os parâmetros na busca do melhor resultado.

A sensibilidade do sensor na medição do pH é proporcional a capacidade de imobilização do indicador nas microesferas de "polyacrylamide", imprimindo maior modulação óptica na radiação em função da variação do pH da solução. Embora a imobilização dos indicadores da família das sulfoneftaleínas ocorra para a quase totalidade dos indicadores selecionados, o grau de imobilização é variado, pois depende da disposição dos radicais na sua estrutura molecular. Os resultados melhores foram obtidos com as sulfoneftaleínas com pK na faixa ácida (1,0 a 2,0), a saber: "m-cresol purple", "thymol blue", "cresol red" e "xylenol blue".

A definição da mistura final atendeu ao compromisso existente entre faixa de medida e os pKs, espectro de absorção, dependência da força iônica e capacidade de imobilização nas microesferas de "polyacrylamide". A mistura do "meta cresol purple" (mCP) e o "bromophenol blue" (BPB) foi a mais adequada

dentre as inúmeras misturas experimentadas. A mistura apresenta três pKs, 2 e 8 para o m-CP e 4,5 para o BPB.

A possibilidade de imobilização dos dois indicadores e as micropartículas de dispersão na mesma microesfera de "polyacrylamide" não tinha sido investigada anteriormente. Um trabalho experimental extensivo foi então desenvolvido baseado no procedimento conhecido para a imobilização de um único indicador. O objetivo foi obter microesferas com máxima concentração dos indicadores, melhorando a sensibilidade do sensor, e com adequada concentração de partículas de dispersão, obtendo uma intensidade de radiação de retorno compatível com o limiar do fotodetector. Ressalta-se que uma concentração excessiva das micropartículas aumenta o nível da radiação no detector, mas reduz a sensibilidade do sensor, devido à diminuição do caminho óptico na fase reagente. Por outro lado, uma baixa concentração não produz a intensidade suficiente para a fotodeteção.

Além desse compromisso, o diâmetro das microesferas deve ser o menor possível, permitindo o preenchimento uniforme e compacto da membrana tubular, melhorando assim a estabilidade temporal do sensor. No entanto, resultados experimentais mostraram que a redução do diâmetro dificulta a incorporação das micropartículas de dispersão. Assim, um diâmetro na faixa de 10 $\mu$ m pareceu ser o mais indicado, considerando as variáveis de empacotamento, sensibilidade e imobilização das micropartículas.

A figura 4.13 apresenta uma ilustração das microesferas obtidas.

O espectro produzido pelas microesferas mostradas na figura 4.13 apresenta sensibilidade na faixa de pH 1 a pH 10, conforme apresentado na figura 4.14. Essa característica vantajosa é porque o "m-cresol purple" (mCP) possui dois pKs, aproximadamente em pH 2,0 e pH 8, comportando-se como dois indicadores. O "bromophenol blue" possui um pK com valor aproximado de 4,5. Portanto, a mistura obtida representa na verdade a sensibilidade de três indicadores, totalizando uma faixa de nove unidades de pH.

Em termos de faixa de comprimentos de onda de absorção, a fase ácida dos dois indicadores absorve radiação na faixa do azul (450nm) e a fase básica na faixa do laranja (590nm). A fase fortemente ácida do mCP, particularmente abaixo de pH 3,0, absorve na faixa do azul-esverdeado (520nm) (figura 4.14).

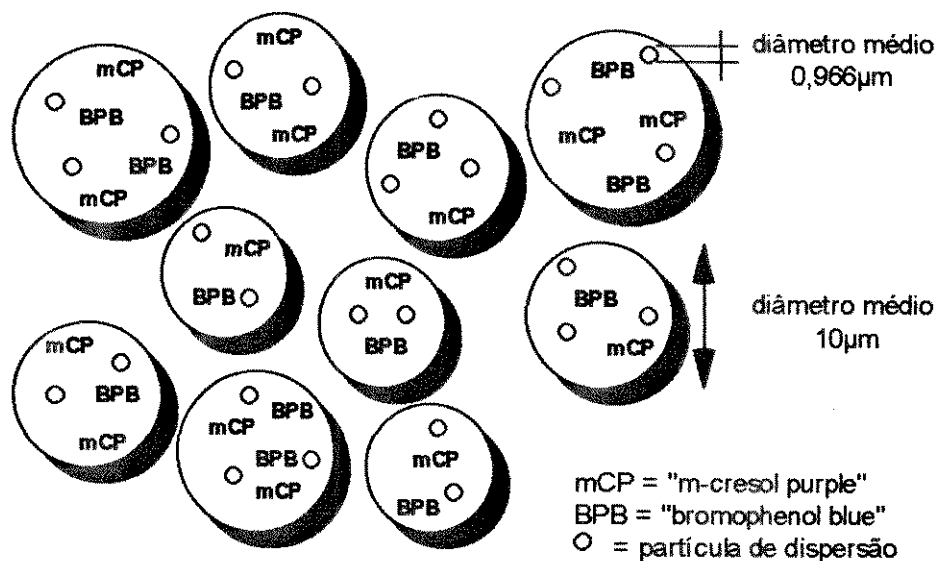


Figura 4.13: Microesferas de "polyacrylamide" com dois indicadores de pH imobilizados e com micropartículas de dispersão incorporadas.

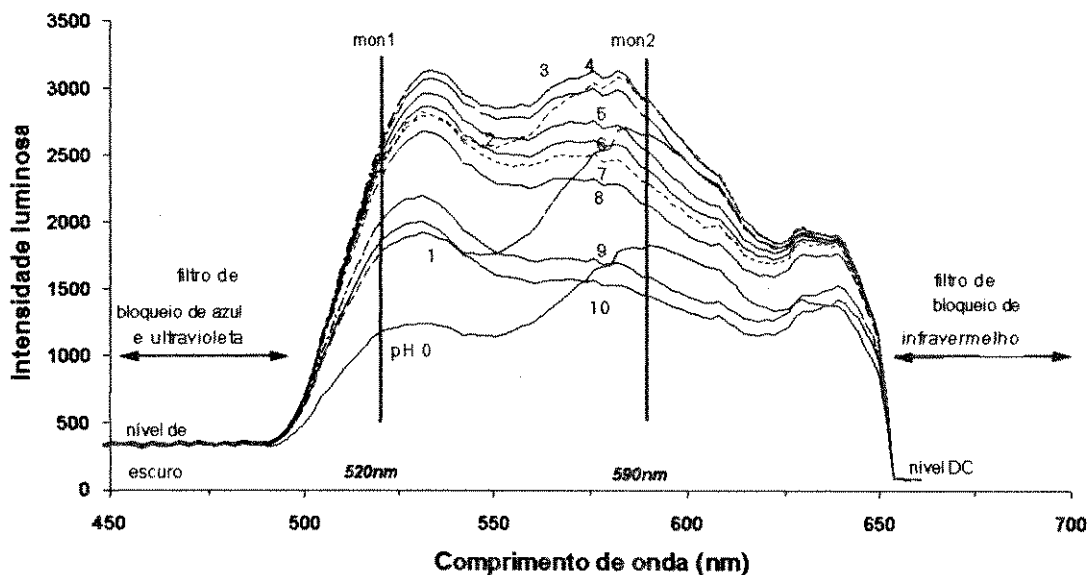


Figura 4.14: Espectro da intensidade luminosa refletida do sensor composto por microesferas de "polyacrylamide" impregnadas com "m-CP" e "BPB" em função do pH da solução tamponada. As faixas "mon1", "mon2", "níveis de escuro" e "DC" são utilizadas para determinação do valor do pH.

## **4.5 Método de determinação do pH**

A determinação do valor do pH a partir do espectro produzido por um indicador imobilizado é baseada necessariamente na medição da intensidade luminosa em, no mínimo, duas faixas de comprimentos de onda (medida e referência), compensando o sistema quanto as perdas ópticas. Em um sensor composto por um único indicador, o canal de medida é geralmente centrado na faixa de comprimentos de onda de máxima sensibilidade e o de referência, numa faixa na qual o indicador não absorve.

O espectro produzido pelos dois indicadores, mostrado na figura 4.14, é complexo porque os indicadores absorvem em frequências distintas. Devido às suas peculiaridades, um estudo foi desenvolvido e mostrou que o quociente das intensidades luminosas na faixa do comprimento de onda de 520nm (mon1) pelo de 590nm (mon2) é uma função unívoca com o valor do pH e apresenta sensibilidade na faixa desejada. Portanto, com o auxílio de uma curva de calibração, o quociente proposto acima pode ser utilizado para a determinação do pH.

## **4.6 "Software"**

O "software" de controle foi especialmente desenvolvido para atender todas as exigências do protótipo. As subrotinas de leitura e processamento do CCD foram fornecidas em linguagem "C"

(Turbo C, versão 2.0, Borland International) pelo fabricante do equipamento. Por essa razão, utilizou-se a mesma linguagem para a implementação das subrotinas específicas do protótipo. Todo o programa principal e as subrotinas específicas, incluindo a listagem final, estão descritas num Relatório Técnico Departamental (Netto, 1994).

A figura 4.15 apresenta "menu" de abertura do "software" de controle desenvolvido. A seguir descrevem-se as diversas inicializações possíveis do programa:

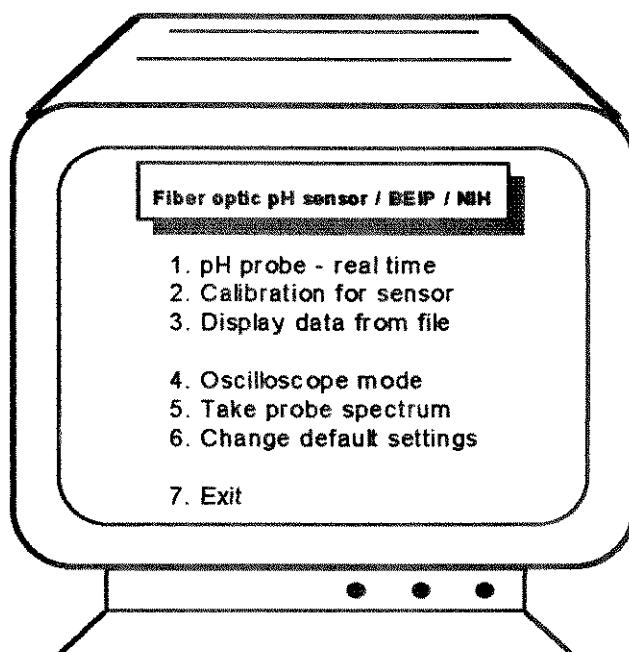


Figura 4.15: "Menu" de abertura do "software" de controle desenvolvido.

**1. "pH probe - real time"** é utilizada para a monitoração temporal do pH, sendo o valor atualizado em intervalos pré-determinados de tempo (de 10 segundos a 10 minutos). A subrotina



determina o valor do pH baseado no cálculo da variável "quociente" do sensor em teste e na curva de calibração típica (apresentada no próximo item). O cálculo da variável "quociente" é efetuado a partir das intensidades luminosas médias detectadas nas faixas de medida de cor (mon1 e mon2). Além desses, os valores das intensidades médias nas faixas de escuro (sem luz) e de nível DC são utilizados para compensar possíveis desvios no CCD. A variável "quociente" é definida como:

$$\text{quociente} = (\text{mon1} - \text{dark} - \text{dc}) / (\text{mon2} - \text{dark} - \text{dc}) \quad (4.2)$$

pH = f (quociente) "apresentada no próximo item"

onde: mon1 e mon2 são os valores da intensidade luminosa média na faixa de 518 a 522nm e 588 a 592nm, respectivamente; "dark" é o valor de escuro do CCD, registrado na faixa de 440nm a 450nm, pois nenhuma radiação nessa faixa alcança o detector e "dc" é o nível de polarização DC do detector, monitorado entre os pixels número 1050 a 1070.

A apresentação dos resultados na tela do monitor é efetuada na forma gráfica, com o valor do pH no eixo vertical e o período de tempo no horizontal (figura 4.16). O eixo de tempo pode ser ajustado para períodos de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, sendo a hora inicial automaticamente determinada e plotada em função da hora de início do procedimento clínico. Além do traçado, a subrotina apresenta na tela do monitor o dia da semana, mês e dia

do mês, ano, e horário do início do registro, e também um relógio em tempo real. Os resultados são periódico e automaticamente gravados no disco rígido até o final da monitoração, dado pelo comando "escape" ou caso a lâmpada queime ou o detector sature.

2. **"Calibration for sensor"** é a subrotina que calcula a curva de calibração de cada sensor, a partir da determinação do valor do quociente (quoc) nos pHs 4, 7 e 1 durante o procedimento de calibração. O método de calibração de cada sensor baseia-se no ajuste da sua curva de calibração (pH x quociente) às curvas típicas (pH x quociente nas faixas de 1 a 4 e 4 a 7) de um sensor típico.

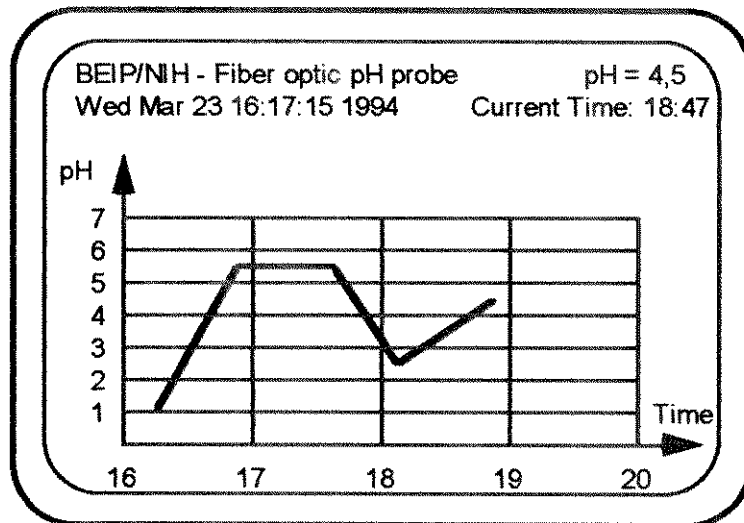


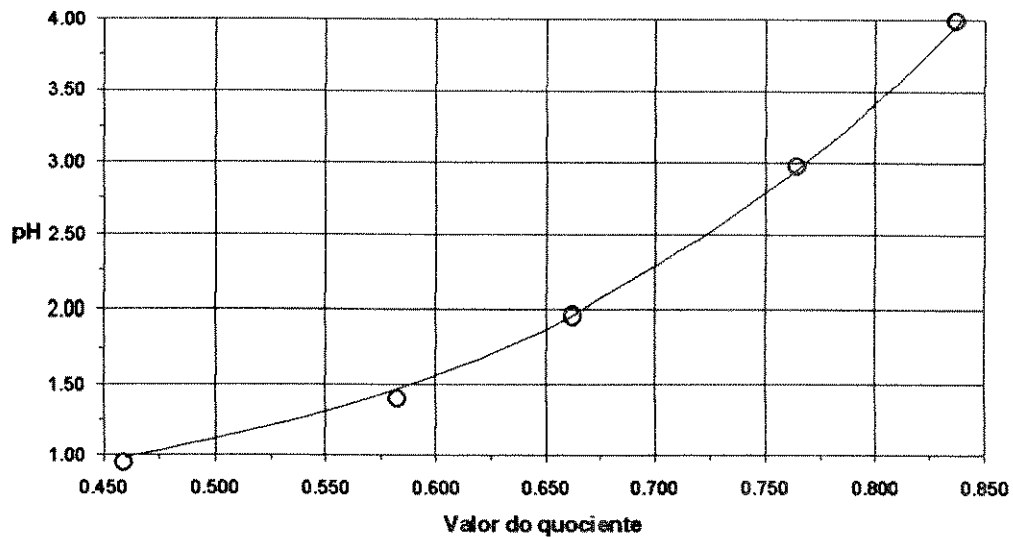
Figura 4.16: Apresentação dos resultados da monitoração contínua do pH na tela do monitor (subrotina 1).

A metodologia de calibração foi possível de ser implementada porque o procedimento construtivo do sensor é padronizado, resultando em sensores com características ópticas similares. Assim, pode-se eleger aleatoriamente as curvas (de pH 1 a pH 4 e de pH 4 a pH 7) de calibração de um sensor como curvas típicas, as quais, ajustadas, serão utilizadas por todos os demais sensores.

As curvas típicas são determinadas uma única vez e a suas equações (pH x quociente) são armazenadas manualmente no programa. Experimentalmente, os valores do quociente do sensor selecionado (QUOC&T) são calculados em no mínimo 7 valores de pH (de pH 1 a pH 7). A análise através de um programa de computador ("fitting") dos valores obtidos mostra que a função pH x QUOC&T pode ser aproximada por duas equações do terceiro grau, a primeira de pH 1 a pH 4 e a outra, de pH 4 a pH 7. As equações e curvas típicas são mostradas nas figuras 4.17 e 4.18.

Para a calibração de um sensor qualquer é necessário determinar o valor do quociente nos pHs 4 (quoc4), 7 (quoc7) e 1 (quoc1), seqüencialmente. Para tanto, o sensor em teste é primeiramente imerso em pH 4 e o valor do quociente é calculado a cada 30 segundos e comparado com o valor obtido na medição anterior. O valor do quoc4 será obtido automaticamente quando duas leituras subseqüentes apresentarem o mesmo valor numérico, considerando três casas decimais. Determinado quoc4, a subrotina informa ao usuário que o sensor deve agora ser imerso em pH 7. A

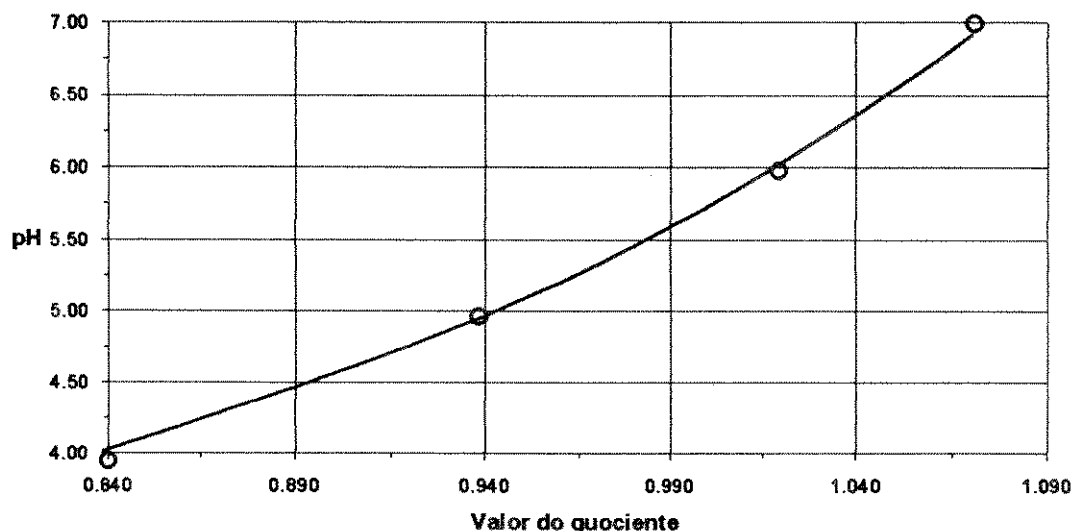
mesma metodologia é utilizada para determinar quoc7. Por fim, o sensor é imerso em pH 1 e, similarmente, o valor de quocl é calculado. Os valores dos quocientes (quoc4, quoc7 e quocl) determinados são armazenados automaticamente no programa.



$$\text{pH}(1 \text{ a } 4) = -1,252 + 11,263 \cdot \text{QUOC\&T} - 23,507 \cdot (\text{QUOC\&T})^2 + 20,897 \cdot (\text{QUOC\&T})^3$$

Figura 4.17: Curva de calibração típica de pH 1 a pH 4.

O método de ajuste é baseado numa correção linear, conforme apresentado a seguir. O valor de quoc4 deve ser corrigido para o valor do quociente (QUOC&T) no pH 4 da curva típica, a qual determina o valor do pH. A correção necessária é exatamente o desvio existente entre os dois quocientes. Similarmente, os desvios entre os quocientes obtidos nos pH 7 e pH 1 são também determinados e armazenados. Resultando, em termos genéricos:



$$\text{pH}(4 \text{ a } 7) = -32,741 + 119,028 \cdot \text{QUOC\&T} - 137,031 \cdot (\text{QUOC\&T})^2 + 56,471 \cdot (\text{QUOC\&T})^3$$

Figura 4.18: Curva de calibração típica de pH 4 a pH 7.

$$\Delta \text{pH4} = \text{quoc4} - \text{QUOC\&T}(\text{pH4}) \quad (4.3)$$

$$\Delta \text{pH7} = \text{quoc7} - \text{QUOC\&T}(\text{pH7}) \quad (4.4)$$

$$\Delta \text{pH1} = \text{quoc1} - \text{QUOC\&T}(\text{pH1}) \quad (4.5)$$

A partir dos desvios determinados, os coeficientes angulares e lineares de duas equações de desvio (de pH 1 a pH 4 (equação 4.6) e de pH 4 a pH 7 (equação 4.7)) são calculados, visando ajustar a curva do sensor em teste para a curva típica. Assim, estas equações permitirão corrigir o valor do quociente (quoc) calculado pelo sensor em teste para o quociente a ser utilizado na curva típica (QUOC&T) para a determinação do valor do pH.

$$\text{QUOC\&T} = a \cdot \text{quoc} + b \quad (\text{pH } 1 \text{ a pH } 4) \quad (4.6)$$

$$\text{QUOC\&T} = c \cdot \text{quoc} + d \quad (\text{pH } 4 \text{ a pH } 7) \quad (4.7)$$

onde: "a" e "c" são os coeficientes angulares e "b" e "d" são os coeficientes lineares das equações de desvio.

Desta forma, durante uma monitoração, o valor do quociente calculado (quoc) pelo sensor em teste é primeiramente comparado com o quociente obtido na sua calibração no pH 4 (quoc4), visando definir a equação linear a ser utilizada (pH 1 a pH 4 ou pH 4 a pH 7). Na seqüência, o valor de QUOC&T é determinado na equação selecionada a partir do valor do quociente calculado (quoc). Por fim, o valor de QUOC&T é utilizado na curva típica para determinar o valor do pH. O procedimento descrito é ilustrado abaixo, na forma de um "if" na subrotina.

```
/* cálculo do quociente */
```

```
quoc = (mon1 - dark - dc) / (mon2 - dark - dc);
```

```
/* comparar quoc com o quoc4, determinado e armazenado no programa */
```

```
se: quoc < quoc4;
```

```
    QUOC&T = a·quoc + b;
```

$$\text{pH}(1 \text{ a } 4) = -1,252 + 11,263 \cdot \text{QUOC\&T} - 23,507 \cdot (\text{QUOC\&T})^2 + 20,897 \cdot (\text{QUOC\&T})^3$$

se: quoc = quoc4;

$$\text{pH} = 4,0;$$

se: quoc > quoc4;

$$\text{QUOC\&T} = c \cdot \text{quoc} + d;$$

$$\text{pH}(4 \text{ a } 7) = -32,741 + 119,028 \cdot \text{QUOC\&T} - 137,031 \cdot (\text{QUOC\&T})^2 + 56,471 \cdot (\text{QUOC\&T})^3$$

**3. "Display data from file"** permite ao usuário recuperar e apresentar no monitor os arquivos \*.pH, para análises posteriores dos resultados da monitoração contínua do pH. Com o resultado mostrado na forma gráfica, o usuário pode selecionar a escala de tempo em intervalos de 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 horas.

As três subrotinas apresentadas encerram as opções dedicadas ao usuário. As restantes foram mantidas nesta apresentação porque são úteis no projeto e desenvolvimento do sensor.

**4. "Oscilloscope mode"** promove um número pré-especificado de varredura nas leituras do detector CCD e apresenta os resultados na forma espectral na tela do monitor. Essa opção é útil na especificação dos parâmetros operacionais, tais como: frequência de amostragem (de 5 a 110kHz) e ganho (1,2,4 e 8).

5. **"Take probe spectrum"** realiza um número pré-especificado de varreduras nas leituras do detector CCD, calcula o valor médio das intensidades luminosas em cada pixel, apresenta o espectro final no monitor e grava o resultado no disco rígido. Essa opção permite conhecer a resposta espectral do sensor num determinado pH e é utilizada também na recalibração do CCD.

6. **"Change default settings"** permite especificar os parâmetros operacionais, tais como: frequência de amostragem, número de varreduras, constantes de calibração do espectrômetro, período de tempo entre medidas de pH, ganho, nome das extensões de arquivo e comprimentos de onda inicial e final para as faixas "mon1" e "mon2".

## 4.7 Conclusão

Um sistema baseado em sensor com fibra óptica para medição do pH gástrico foi construído. O sensor emprega uma única fibra óptica de 250µm e utiliza dois indicadores colorimétricos ("bromophenol blue" e "m-cresol purple") imobilizados em microesferas de "polyacrylamide", as quais são confinadas no interior de uma membrana tubular de diâmetro igual a 300µm. No instrumento opto-eletrônico, a separação das radiações de excitação e de retorno é efetuada por um "splitter" de fibra



óptica de plástico. O sistema de excitação é composto por uma lâmpada sub-miniatura de tungstênio halogenado, um refletor elíptico metálico e dois filtros de bloqueio. O sistema de detecção é baseado em um espectrofotômetro miniatura comercial e um microcomputador PC. O "software" de controle permite basicamente determinar o valor do pH, calibrar os sensores e ajustar os parâmetros operacionais do sistema de detecção.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

A avaliação do protótipo desenvolvido iniciou-se com os testes em soluções tamponadas, visando determinar as suas principais características estáticas e dinâmicas. Testes subseqüentes em amostras de suco gástrico ("in vitro") e no estômago de um cão anestesiado ("in vivo") foram realizados para determinar o desempenho do sensor. Nos casos pertinentes, a avaliação do sensor foi efetuada por comparação ao desempenho do eletrodo de vidro.

#### 5.1 Desempenho do sensor em solução tampão

Os testes em soluções tamponadas serviram para determinar as principais características do sistema de medida. Dentre essas, a estabilidade temporal foi criteriosamente avaliada, considerando que a monitoração contínua do pH gástrico por um período de 24 horas é um procedimento rotineiro. A dependência do sensor com a variação da temperatura e da força iônica (Apêndice A) e o tempo

de resposta foram determinados. A eficácia do método de calibração adotado foi avaliada com a calibração de 10 sensores com fibra óptica.

### **5.1.1 Estabilidade temporal**

A estabilidade temporal do protótipo foi avaliada através da monitoração contínua do pH em períodos de 24 horas. Os testes iniciais foram realizados à temperatura ambiente com o sensor imerso em solução tampão pH 4 (Mallinckrodt, #0029). Os primeiros resultados mostraram um desvio da medição entre o tempo  $t=0$  e o  $t=24$  horas de até 1,5 unidades de pH. Como a estabilidade do protótipo depende tanto da estabilidade do instrumento quanto do sensor, foi necessário uma avaliação em separado. Assim, a estabilidade do instrumento foi avaliada inicialmente sem a participação do sensor, cujos resultados estão descritos no próximo item. O resultado da avaliação do sistema completo foi então possível e os resultados estão detalhados no item subsequente.

#### **5.1.1.1 Estabilidade do instrumento opto-eletrônico**

A estabilidade do instrumento foi verificada substituindo o sensor com fibra óptica por somente uma fibra óptica (figura 5.1). No arranjo experimental, a intensidade da radiação

refletida na interface fibra-ar é constante, pois depende da diferença dos índices de refração dos dois meios. A porção terminal da fibra foi mantida no interior de uma caixa de papelão de cor preta, evitando a interferência de luz ambiente.

Nos testes preliminares, as intensidades luminosas nas faixas de "mon1" e "mon2" da radiação refletida foram continuamente determinadas durante 24 horas pelo detector a CCD. O valor do quociente ("mon1/mon2") foi periodicamente calculado e armazenado pelo microcomputador. Como a radiação refletida apresenta um espectro similar à radiação de excitação, o valor do quociente calculado determina, a partir da curva de calibração, um valor de pH em torno de 3,5. A equivalência ocorre porque o sensor, caso fosse utilizado, também não altera o espectro da radiação de excitação no pH aproximado de 3,5 (ver figura 4.14). Por isso, os desvios são apresentados em termos de unidades de pH.

Os resultados iniciais mostraram um desvio de até  $\pm 0,2$  unidades de pH por 24 horas. As causas foram então investigadas e mostraram que os principais fatores responsáveis eram o tipo de alimentação elétrica da lâmpada, inicialmente alimentada com uma fonte de corrente constante, e a dependência do sinal de saída do detector a CCD da temperatura e do nível de polarização DC.

Conforme já discutido no Capítulo 4 (item 4.3.1), a alimentação da lâmpada com tensão constante foi então adotada, minimizando a variação da temperatura de cor da lâmpada.

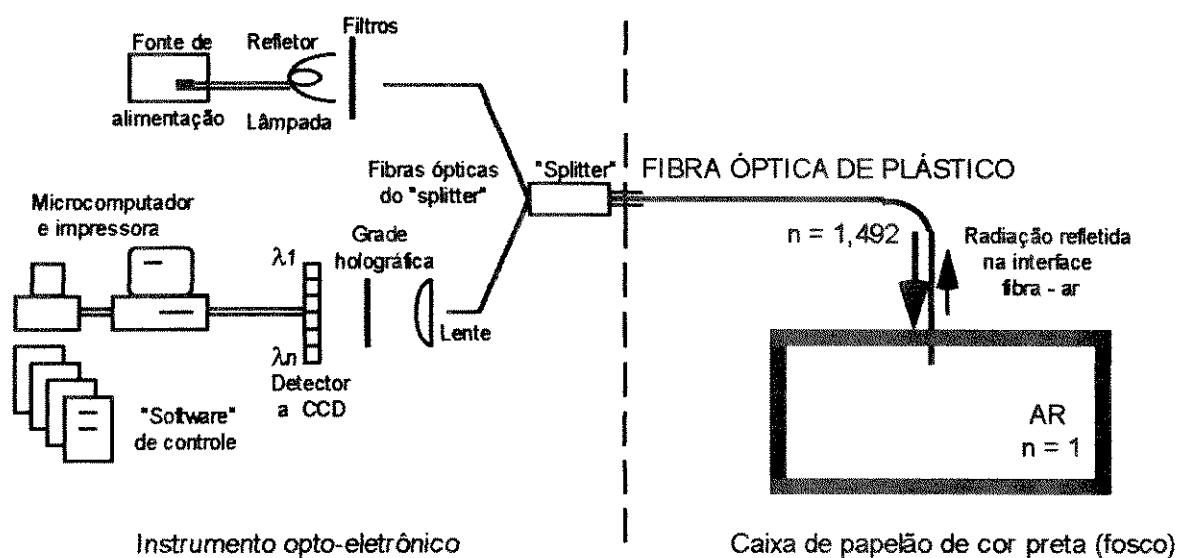


Figura 5.1: Diagrama em blocos do arranjo experimental utilizado para determinar a estabilidade temporal do instrumento opto-eletrônico.

Quanto ao detector a CCD, baseado nas orientações do seu fabricante, as medições dos níveis de escuro "dark" e de polarização DC ("dc") foram incorporadas na determinação do parâmetro "quociente", além das faixas de medida e referência ("mon1" e "mon2"), conforme equação 4.1. O nível de escuro é monitorado na faixa do azul, pois a radiação nessa faixa é bloqueada por um filtro de absorção (figura 4.9). O nível de polarização DC é monitorado entre os pixels número 1050 e 1070 (figura 4.12.b).

As modificações implementadas melhoraram a estabilidade do equipamento opto-eletrônico. Os resultados finais apresentaram um desvio de no máximo  $\pm 0,05$  unidades de pH por 24 horas, em torno do valor do pH obtido no início do teste, geralmente pH 3,5.

#### **5.1.1.2 Estabilidade do sensor com fibra óptica**

Com os desvios devido ao instrumento minimizados, iniciaram-se as avaliações dos sensores de "bromophenol blue / m-cresol purple". O sensor em teste foi imerso e mantido, por 24 horas contínuas, em solução tampão de pH 4 (Mallinckrodt, #0029), cujo valor do pH foi verificado antes e depois do teste com um eletrodo de vidro calibrado (Radiometer, GK 2801-1). O sistema detector calculava periodicamente o valor do quociente e, a partir da curva de calibração, determinava o valor do pH, o qual era armazenado na memória do computador.

Os resultados preliminares mostraram que o sensor apresentava um desvio de até  $\pm 1$  unidade de pH por 24 horas, em torno do pH 4. Dentre as possíveis causas responsáveis pelo desvio da medição do sensor, podem-se destacar: vazamento ("leaking") de microesferas, acomodação das microesferas (presença de ar), perda de indicador colorimétrico ("washing out") e/ou descoloração das microesferas ("bleaching"). Considerando a dificuldade de determinar quantitativamente a

participação de cada fator, a metodologia empregada foi reavaliar todas as possíveis causas citadas.

#### **5.1.1.2.1 Vazamento de microesferas.**

O vazamento das microesferas pode ocorrer tanto na emenda membrana-fibra óptica como na porção terminal da membrana, devido ao rompimento do selante. A ruptura microscópica, observada em alguns sensores, ocorre particularmente porque as microesferas, preparadas e confinadas na forma desidratada, aumentam de volume em solução aquosa (tampão). Essa propriedade implica num aumento da tensão mecânica nos pontos de selagem.

Uma variedade de adesivos (colas) foram então selecionados e testados, a saber: "Epoxy General Purpose" (Hardman Inc., #04005); "Epoxy Water-Clear Transparent" (Hardman Inc., #04004); "Epoxy Wet Surface Patching" (Hardman Inc., #04003); "Acrylic Fast Setting" (Hardman Inc., #04050); "Urethane" (Hardman Inc., #A-85 04024) e "Super Bonder 409" (Loctite Corporation, #40904).

Os testes basicamente consistiram em se manter os sensores em solução aquosa por algumas horas e, em seguida, avaliar a integridade da selagem com o uso de um microscópio óptico. Dentre os selantes especificados, o "Epoxy General Purpose" (Hardman Inc., #04005) foi selecionado, pois o rompimento não foi observado em nenhum sensor.

#### **5.1.1.2.2 Acomodação das microesferas.**

O termo acomodação é utilizado para designar a duração de tempo necessária para as microesferas desidratadas do sensor atingir a estabilidade óptica quando imersas em solução aquosa, devido ao aumento no volume. Caso o tempo seja longo (horas), a acomodação prejudica a estabilidade do sensor.

Aparentemente, o período de acomodação é diretamente proporcional ao volume de ar retido no interior da fase reagente, o qual concorre em espaço com o aumento de volume das microesferas. Assim sendo, o emprego de microesferas de diâmetro menor reduz o volume de ar retido, devido à melhor compactação das mesmas no interior da membrana tubular (figura 5.2).

Além do ar retido entre as microesferas, um volume de ar era também mantido na porção terminal da fase reagente (figura 5.2a). No processo de selagem da extremidade da membrana verificou-se que uma melhor compactação podia ser obtida utilizando-se uma segunda fibra óptica (ou outro componente cilíndrico com dimensões adequadas) para auxiliar a sua selagem, eliminando praticamente a presença de ar na terminação (figura 5.2b).

A avaliação do tempo de acomodação foi realizada com os sensores empregando microesferas com diâmetros na faixa de 50 $\mu$ m (sem fibra na terminação) e na faixa de 10 $\mu$ m (com fibra na terminação), conforme ilustrados na figura 5.2. Os testes



mostraram que a duração do tempo de acomodação foi de aproximadamente 60 minutos e 10 minutos, respectivamente. Assim, optou-se pela construção do sensor com microesferas de  $10\mu\text{m}$ , com fibra óptica na terminação.

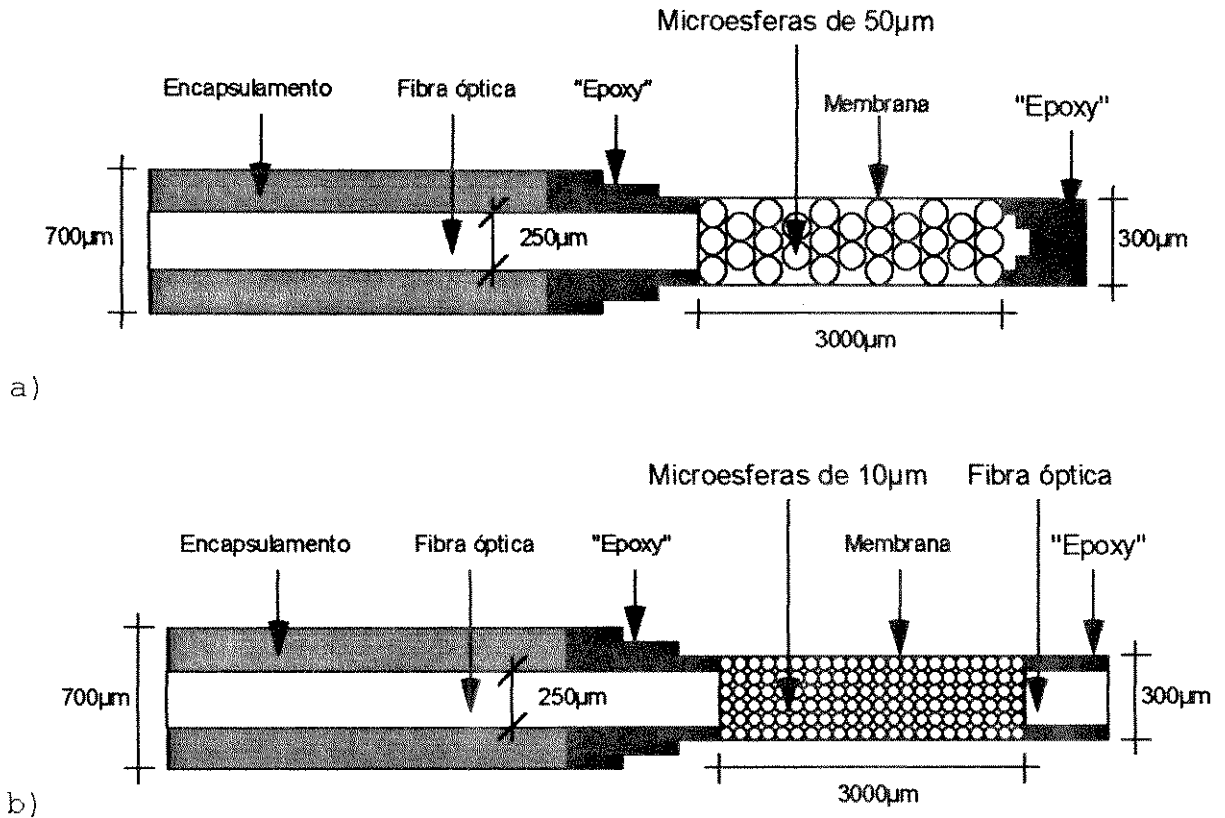


Figura 5.2: a) Representação esquemática do sensor com fibra óptica destacando a presença de ar entre as microesferas de  $50\mu\text{m}$  e entre essas e a selagem da porção terminal. b) Representação esquemática do sensor construído com microesferas de  $10\mu\text{m}$  e com fibra óptica na extremidade.

#### **5.1.1.2.3 Perda de indicador colorimétrico.**

A perda ("washing out") de indicador das microesferas durante o período de monitoração impõe um desvio nas medidas, reduzindo a estabilidade temporal e, também, a sensibilidade. Isso significa que as microesferas, durante o procedimento de preparação, não foram adequadamente lavadas, mantendo no seu interior uma parcela de indicador que não está imobilizado. A parcela mencionada pode migrar para a solução durante o procedimento de teste, caracterizando um desvio na medida.

Embora dados quantitativos não sejam disponíveis, alguns testes de monitoração contínua, com o sensor em solução tampão de pH 4, mostraram um desvio de estabilidade e sensibilidade. Assim sendo, o procedimento final utilizado para se lavar as microesferas preparadas (tabela 4.1) teve que ser ampliado em número e valores de pH das soluções utilizadas, em relação ao procedimento inicial (tabela 3.4).

#### **5.1.1.2.4 Descoloração das microesferas.**

Os indicadores colorimétricos estão sujeitos ao processo de descoloração ("bleaching") se expostos à radiação luminosa continuamente por um longo período de tempo (horas). O processo de descoloração é acentuado com o aumento da energia da radiação

luminosa, reduzindo tanto a estabilidade como a sensibilidade do sensor.

Conforme apresentado no Capítulo 4, os comprimentos de onda menores que 500nm não são utilizados pelo sistema detector e são justamente os de maior energia, dentro do espectro de emissão da lâmpada. Por essa razão, um filtro de bloqueio das radiações na faixa do ultravioleta e do azul foi incorporado ao sistema de excitação (item 4.3.1), eliminando a descoloração das microesferas em prolongados períodos de exposição.

### **5.1.1.3 Estabilidade final do sistema**

Após a implementação das melhorias descritas, a estabilidade temporal final do sistema foi avaliada (tabela 5.1). A tabela está dividida em três dias de teste. No início de cada dia ( $t=0$ ), o pH das soluções tamponadas (pH 1 a pH 7, em intervalos de 1 unidade de pH), foi avaliado utilizando o eletrodo de vidro (Radiometer, #GK 2801-1) e o sensor, ambos calibrados. Em seguida, o sensor foi mantido em funcionamento em solução tampão de pH 4 por um período de 24 horas. Finalizado o período de tempo, um novo conjunto de soluções tamponadas similares foi utilizado para determinar o desvio. Os pHs das novas soluções foram determinados primeiramente pelo eletrodo de vidro recalibrado e, a seguir, pelo sensor, sem recalibração. Os

desvios resultantes estão apresentados na última coluna da tabela.

Os dados obtidos mostram que o maior desvio (0,2 unidades de pH/ 24 horas) ocorre em pH 7 e o menor em pH 1 (0 unidades de pH/ 24 horas). Os resultados são consistentes, pois as variações no instrumento ou no sensor produzem um maior desvio em faixas com maior sensibilidade, tal como em pH 7 (curva de calibração, figura 4.18), em comparação com faixas de menor sensibilidade, tal como pH 1 (curva de calibração, figura 4.17).

### **5.1.2 Dependência da temperatura**

A dependência do sensor com a variação da temperatura foi verificada em solução tampão de pH 4 (Mallinckrodt, #0029). O procedimento experimental baseou-se em aumentar a temperatura da solução, na qual o sensor de "bromophenol blue / m-cresol purple" estava imerso. A temperatura inicial de 22 °C foi aumentada em intervalos de 5°C, até o limite de 47°C, determinada por um termômetro de Hg. Os valores dos pHs medidos pelo sensor estão listados na tabela 5.2, coluna "pH sensor", e os valores dos pHs da solução tampão, fornecidos pelo fabricante, são apresentados na coluna "pH tampão". Observe que a medição do pH utilizando-se o sensor desenvolvido foi efetuada com precisão de duas casas decimais, a mesma utilizada pelos valores de pH fornecidos pelo fabricante da solução tampão.

Tabela 5.1: Resultado da avaliação da estabilidade temporal do sistema completo.

PRIMEIRO DIA								
t = 0		pH		t = 24 h		pH		
eletrodo	sensor	eletrodo	sensor	desvio				
1,01	1,0	1,02	1,0	0,0				
2,04	2,0	2,04	2,1	0,1				
2,97	3,0	2,99	3,1	0,1				
4,00	4,0	4,00	4,1	0,1				
5,08	5,1	5,07	5,2	0,1				
5,98	6,0	6,00	6,1	0,1				
7,02	7,0	7,00	7,2	0,2				
SEGUNDO DIA								
t = 0		pH		t = 24 h		pH		
eletrodo	sensor	eletrodo	sensor	desvio				
1,00	1,0	1,00	1,0	0,0				
2,05	2,1	2,05	2,1	0,0				
3,02	3,1	3,03	3,1	0,0				
4,02	4,0	4,02	4,1	0,1				
5,11	5,1	5,10	5,1	0,0				
5,98	6,0	6,00	6,1	0,1				
7,02	7,0	7,02	7,1	0,1				
TERCEIRO DIA								
t = 0		pH		t = 24 h		pH		
eletrodo	sensor	eletrodo	sensor	desvio				
1,00	1,0	1,00	1,0	0,0				
2,04	2,1	2,03	2,1	0,0				
2,99	3,1	3,00	3,1	0,1				
4,00	4,0	4,00	4,1	0,1				
5,08	5,1	5,08	5,0	0,1				
5,99	6,1	6,00	5,9	0,1				
7,00	7,0	7,01	6,8	0,2				

Tabela 5.2: pH da solução e pH medido pelo sensor em função da temperatura da solução tampão.

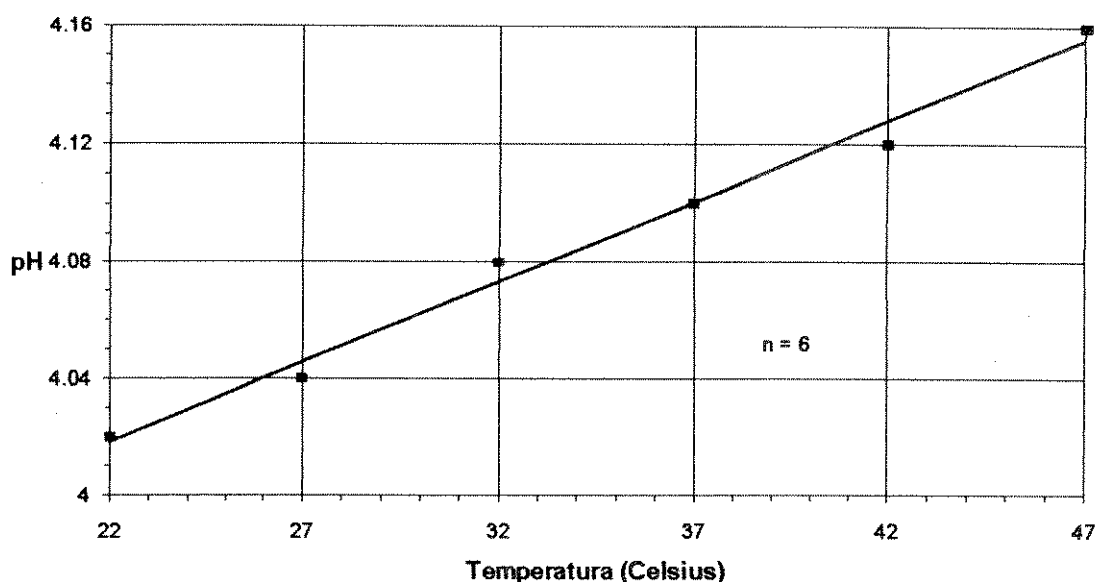
Temperatura	pH	
	tampão	sensor
22	4,00	4,02
27	4,01	4,04
32	4,01	4,08
37	4,02	4,10
42	4,03	4,12
47	4,04	4,16

Os resultados obtidos são também apresentados graficamente na figura 5.3. Nesse caso, considerou-se o pH da solução tampão constante, apesar de uma variação de 0,04 unidades de pH ter sido indicada pelo fabricante da solução (tabela 5.2). Baseado na reta de regressão, pode-se verificar que o coeficiente de temperatura do sensor é positivo, sendo de aproximadamente 0,0055 unidades de pH por grau Celsius, na faixa avaliada. Comparativamente aos eletrodos, o desvio é aproximadamente o dobro do produzido pelo eletrodo de vidro, igual a 0,0033 (tabela 1.1), e muito menor ao do eletrodo de antimônio, igual a 0,0367 (tabela 1.1).

### 5.1.3 Dependência da força iônica

As soluções tamponadas podem apresentar diferentes valores de forças iônicas ( $\mu$ ), as quais são função das concentrações e

das cargas dos íons dispersos (Apêndice A). A força iônica pode afetar a constante de equilíbrio (pK) dos indicadores colorimétricos, alterando o equilíbrio entre as fases ácida e básica [Janata, 1987] .



$$\text{pH} = 0,005486 \cdot T(^{\circ}\text{C}) + 3,89741; r = 0,98741.$$

Figura 5.4: Variação do pH medido pelo sensor em função da temperatura da solução tampão de pH 4 (Mallinckrodt, #0029).

Os valores das forças iônicas das soluções tamponadas utilizadas para teste foram baseados nos valores das forças iônicas do suco gástrico. A tabela 5.3 apresenta os valores das concentrações e das cargas dos íons geralmente presentes no suco gástrico, nos pHs 1 e 2 [Mountcastle, 1980]. A partir dos valores

listados, as forças iônicas foram determinadas utilizando-se a equação A1.3 (Apêndice A).

Tabela 5.3: Valores das concentrações (mN) médias dos íons tipicamente presentes no suco gástrico, nos pHs 1 e 2, e das forças iônicas ( $\mu$ ) calculadas.

	H <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	$\mu$
pH 1	0,10	0,14	0,04	0,01	0,14
pH 2	0,01	0,12	0,08	0,01	0,10

Como a faixa de variação é estreita (de 0,14 a 0,10), os efeitos da força iônica do suco gástrico nas medições do sensor são aparentemente desprezíveis, conforme será demonstrado adiante no teste "in vitro" (item 5.2). No entanto, soluções tamponadas com uma diferença de 0,3 unidades, a saber  $\mu=0,1$  e  $\mu=0,4$ , foram preparadas nos pHs 2,1 e 5,1, visando determinar a dependência do sensor com a força iônica. Os valores de pH foram selecionados devido a proximidade com os pKs dos indicadores "m-cresol purple" (mCP) e "bromophenol blue" (BPB). Os resultados do teste estão mostrados na tabela 5.4.

Tabela 5.4: Valor do pH medido pelo sensor em função da força iônica ( $\mu = 0,1$  e  $\mu = 0,4$ ) das soluções tamponadas (pH 2,1 e pH 5,1).

pH 2.1		pH 5.1	
$\mu = 0.1$	$\mu = 0.4$	$\mu = 0.1$	$\mu = 0.4$
2.1	2.1	5.1	5.3



Os resultados obtidos mostram que a ampla faixa de variação da força iônica não afeta o equilíbrio do indicador "mCP". Por outro lado, o desvio observado na faixa de sensibilidade do indicador BPB é de 0,2 unidades de pH. Os resultados obtidos eram esperados, considerando que o mCP apresenta uma melhor estabilidade que o BPB, quando diluídos em soluções tamponadas com diferentes forças iônicas (Tomicek, 1951; Bishop, 1972).

#### **5.1.4 Calibração**

Dois aspectos da calibração do sensor são importantes e devem ser apresentados. O primeiro é uma descrição do procedimento empregado para a calibração, salientando as considerações a serem adotadas. O segundo é a verificação da eficácia do método de calibração adotado (correção linear, item 4.6)

##### **5.1.4.1. Procedimento de calibração**

O procedimento de calibração consiste basicamente em se avaliar de forma seqüencial o sensor nas soluções tamponadas de pHs 4, 7 e 1 e força iônica 0,1 (a ordem não é relevante). Os valores de pH foram escolhidos por representarem os extremos (pH 1 e pH 7) e o valor central (pH 4) da faixa de medida do sensor.

Antes do procedimento de calibração, aconselha-se que o sensor já esteja imerso em uma solução aquosa (por exemplo, água destilada) por um período mínimo de 15 minutos, garantindo a acomodação das microesferas (item 5.2.2.2) e reduzindo assim o período de tempo de calibração. Além disso, a calibração deve ser efetuada com a extremidade do sensor protegida da luz ambiente, pois a mesma pode induzir desvios de até 0,1 unidades de pH.

O procedimento de calibração tem início com a seleção e inicialização da subrotina "Calibration for Sensor" do "Menu Principal". A subrotina orienta o usuário para posicionar o sensor na primeira solução e digitar o valor do seu pH com duas casas decimais (por exemplo: 4,03). Um período de tempo de alguns minutos é necessário para estabilizar as leituras, o qual é controlado automaticamente pelo "software". Obtido o valor final de calibração na primeira solução, o usuário, sob a orientação do "software", efetua o mesmo procedimento com as demais soluções de calibração (pH 7 e pH 1). Em média, o procedimento de calibração é realizado em aproximadamente 15 minutos, devido ao tempo de resposta do sensor.

#### **5.1.4.2 Eficácia do método de calibração**

O método de calibração consiste em ajustar por correção linear a curva de calibração do sensor em teste à curva típica

(item 4.6). Para a validação do método, um conjunto de dez sensores foram construídos, conforme procedimento descrito na tabela 4.1.

O sensor número 1, selecionado aleatoriamente, foi denominado de "sensor típico" e a sua curva foi previamente determinada e armazenada pelo programa. Os demais sensores foram calibrados conforme o procedimento descrito no item anterior.

Após a calibração, cada sensor foi utilizado para determinar o pH de oito soluções tamponadas diferentes. O valor do pH da solução tampão foi previamente determinado usando-se um eletrodo de vidro (Radiometer, #Gk 2801-1). A tabela 5.5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5.5: Valores dos pH medidos com dez sensores calibrados.

eletrodo pH	sensor com fibra óptica - número										Média	D. padrão	
	típico 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1,03	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	calibração	
1,44	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,40	0,00
2,09	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,2	2,1	2,1	2,11	0,03
3,11	3,1	3,2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,0	3,2	3,0	3,0	3,09	0,07
4,00	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	calibração	
5,10	5,1	5,1	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	5,2	5,1	5,1	5,2	5,13	0,05
6,00	6,0	6,0	6,1	6,1	6,1	5,9	6,1	6,0	6,1	6,1	6,1	6,05	0,07
7,00	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	calibração	

A análise dos resultados mostra que nos pHs de calibração (pH 1, pH 4 e pH 7) os valores medidos pelos sensores são idênticos, indicando que a calibração foi mantida. Nos pHs intermediários, o desvio máximo em relação ao pH determinado pelo eletrodo de vidro é de 0,1 unidade de pH.

### **5.1.5 Reprodutibilidade da medida**

A reprodutibilidade das medições do sensor foi avaliada utilizando-se um conjunto de sete soluções tamponadas (pH: 1,01; 2,11; 3,17; 4,09; 5,18; 6,03 e 7,15). O pH das soluções foi verificado imediatamente antes do seu uso com um eletrodo de vidro (Radiometer, GK 2801-1). Durante os testes, o sensor permanecia por 10 minutos imerso em uma das soluções (lentamente agitada com um agitador magnético), sendo então imediatamente retirado e imerso na solução seguinte. Os resultados estão apresentados na figura 5.4.

O perfil de resposta obtido mostra que o sensor reproduz com uma exatidão de 0,1 unidade de pH (considerando uma precisão de uma casa decimal) os valores dos pHs das soluções tamponadas. Além disso, as medições não apresentaram histerese, pois os valores obtidos se mostraram independentes do valor do pH da solução anterior.

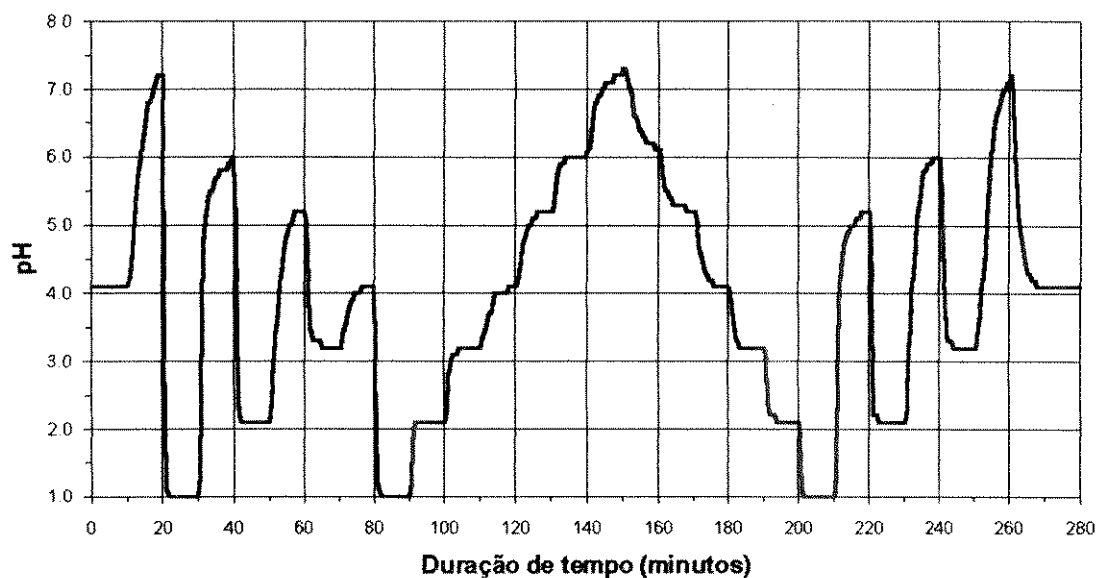


Figura 5.4: Reprodutibilidade das medidas do sensor em soluções tamponadas.

### 5.1.6 Tempo de resposta

O tempo de resposta do sensor, submetido a uma variação brusca do pH, foi adotado como o tempo necessário para atingir 63% da estabilidade plena, considerando que a resposta é aproximadamente exponencial. A partir dos resultados obtidos no item anterior, o tempo de resposta foi determinado e está apresentado na figura 5.5.

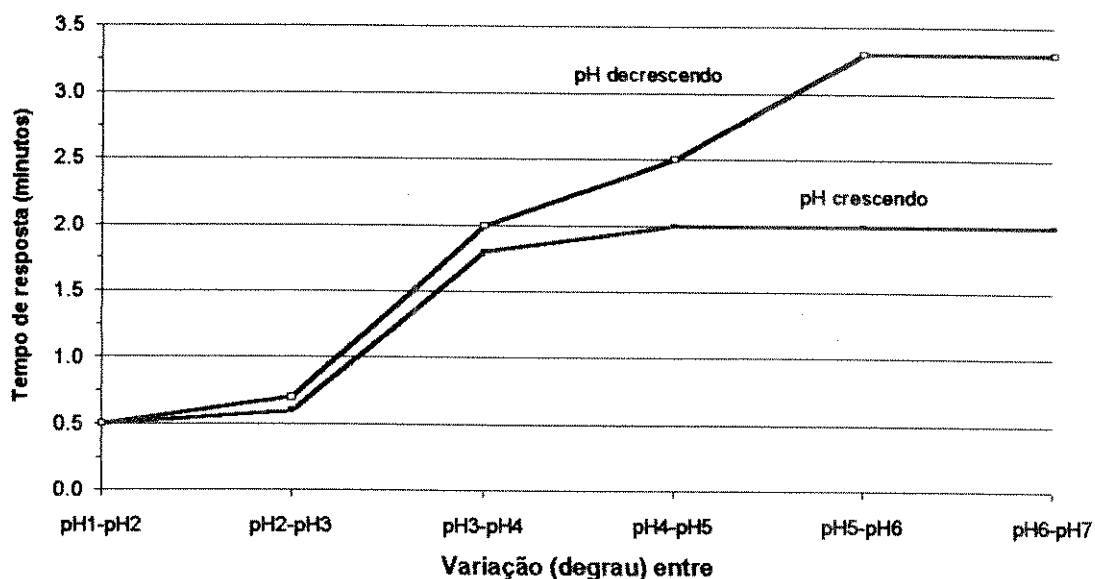


Figura 5.5: Tempo de resposta do sensor em função da variação (tipo degrau) do pH da solução tamponada.

A figura 5.5 apresenta duas particularidades do sensor. Primeiro, o sensor é aproximadamente seis vezes mais rápido (menor tempo de resposta) quando submetido a uma variação de pH na faixa mais ácida (pH 1 a pH 2) do que na faixa menos ácida (pH 6 a pH 7). Segundo, o sensor é mais rápido nas variações decrescentes de pH do que nas variações crescentes.

Possivelmente, o comportamento observado pode ser explicado pela modificação do volume das microesferas com o pH da solução em teste, as quais diminuem e aumentam ligeiramente o seu volume com a redução e o aumento do pH, respectivamente. O aumento de volume é dificultado pela membrana tubular, cuja capacidade de distensão é teoricamente nula. A característica da membrana pode, portanto, prejudicar o tempo de resposta nas transições em meios

menos ácidos. Por outro lado, a transição de volume é facilitada em soluções mais ácidas, melhorando o tempo de resposta.

Um outro aspecto que deve ser analisado é a influência da capacidade de tamponamento das soluções empregadas no tempo de resposta do sensor. Por definição (Apêndice A), uma solução tampão tem a função de resistir às modificações no pH. Nos testes efetuados, uma variação brusca do pH significa que a solução tampão em teste deve migrar para o interior da fase reagente e neutralizar a solução tampão anterior. Esse mecanismo é um dos responsáveis pelo aumento do tempo de resposta do sensor. Por exemplo, o tempo de resposta do sensor de pH 7 (solução tampão) para pH 4 (solução tampão) é de aproximadamente 2 minutos e o tempo de resposta de pH 7 (água bidestilada) para pH 4 (solução tampão) é de aproximadamente 0,4 minutos. No entanto, o emprego de soluções tamponadas é imprescindível para testes e calibrações de um sensor de pH.

## **5.2 Desempenho do sensor "in vitro"**

A avaliação do sensor "in vitro" foi realizada em 33 amostras de suco gástrico humano. As amostras eram originadas de pacientes com acidez gástrica elevada, a maioria devido a disfunções hormonais, e foram cedidas pelo Setor de Gastroenterologia do Hospital Geral do National Institutes of

Health. O suco gástrico foi aspirado pela manhã, com o paciente em jejum. As 33 amostras obtidas foram colhidas ao longo de aproximadamente 30 dias e mantidas sob refrigeração a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Antes do teste, um período de 24 horas foi utilizado para que a temperatura das amostras atingisse a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ).

### 5.2.1 Exatidão da medida do sensor

O teste de exatidão consistiu em determinar o valor do pH de cada amostra simultaneamente com o sensor e com o eletrodo de vidro (Radiometer, #GK 2801-0), ambos calibrados. A precisão utilizada para os dois dispositivos foi de 2 casas decimais. Além disto, o teste serviu para se avaliar a influência da coloração e da força iônica das amostras de suco gástrico na resposta do sensor. Os pHs medidos e a coloração de cada amostra estão apresentados na tabela 5.6. Os valores dos pHs determinados estão também apresentados sob a forma gráfica (figura 5.6), com o objetivo de facilitar a interpretação dos resultados.

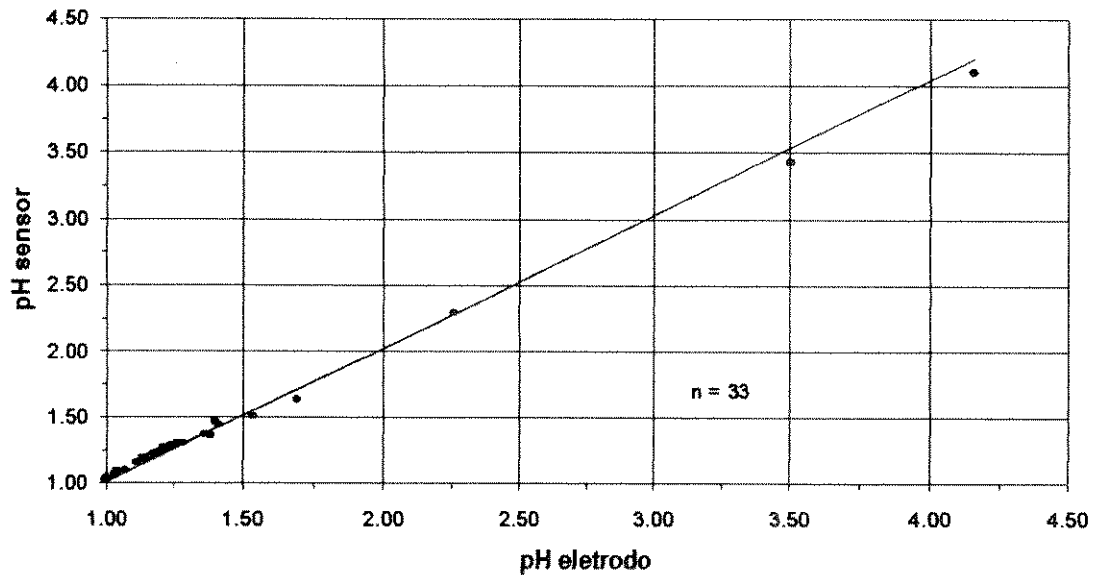
Os testes mostraram que a exatidão do sensor, comparativamente ao eletrodo de vidro, é de  $\pm 0,1$  unidade de pH (considerando uma precisão de 0,1 unidades de pH), pois o desvio máximo entre as leituras não foi em nenhum caso superior 0,07 unidades de pH. O coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,995887 demonstra a boa equivalência existente entre os dois instrumentos de medida.



A exatidão obtida demonstra também que a coloração e a força iônica do suco gástrico não afetam as medições do sensor, na faixa de pH investigada.

Tabela 5.6: Número, pH medido com o eletrodo de vidro e com o sensor, e coloração das 33 amostras de suco gástrico.

amostra	pH		desvio (pHe - pHs)	cor da amostra
	eletrodo (pHe)	sensor (pHs)		
1	1.40	1.47	-0.07	clara
2	1.41	1.44	-0.03	clara
3	1.15	1.19	-0.04	amarela
4	1.14	1.18	-0.04	amarela
5	1.15	1.19	-0.04	amarela
6	1.17	1.22	-0.05	clara
7	1.36	1.37	-0.01	clara
8	1.17	1.21	-0.04	amarela
9	3.50	3.43	0.07	amarela
10	4.16	4.10	0.06	amarela
11	1.69	1.63	0.06	verde-amarelada
12	1.53	1.51	0.02	clara
13	1.38	1.36	0.02	clara
14	1.03	1.06	-0.03	clara
15	1.20	1.24	-0.04	marrom escuro
16	1.26	1.29	-0.03	marrom escuro
17	0.99	1.02	-0.03	clara
18	1.03	1.07	-0.04	amarela
19	1.13	1.19	-0.06	verde-amarelada
20	1.26	1.30	-0.04	marrom escuro
21	1.04	1.09	-0.05	alaranjada
22	1.25	1.28	-0.03	verde
23	1.07	1.10	-0.03	verde
24	1.28	1.30	-0.02	amarela
25	1.11	1.16	-0.05	amarela
26	1.16	1.20	-0.04	amarela
27	1.00	1.04	-0.04	amarela
28	1.19	1.24	-0.05	amarela
29	2.26	2.30	-0.04	verde
30	1.23	1.28	-0.05	verde
31	1.36	1.37	-0.01	verde
32	1.21	1.27	-0.06	marrom escuro
33	1.22	1.26	-0.04	marrom escuro



$$\text{pHsensor} = 1,008551 \cdot \text{pHeleetrodo} + 0,004646; r = 0,995887$$

Figura 5.6: Valor do pH medido com o sensor em função do pH medido com o eletrodo de vidro nas 33 amostras de suco gástrico.

### 5.2.2 Reprodutibilidade da medida

Uma avaliação da reprodutibilidade da medida do pH em suco gástrico foi realizada, empregando um conjunto de quatro amostras de pHs diferentes. O sensor em teste foi imerso na primeira amostra e, após 10 minutos, foi retirado e imerso na amostra seguinte. O resultado obtido está apresentado na figura 5.7.

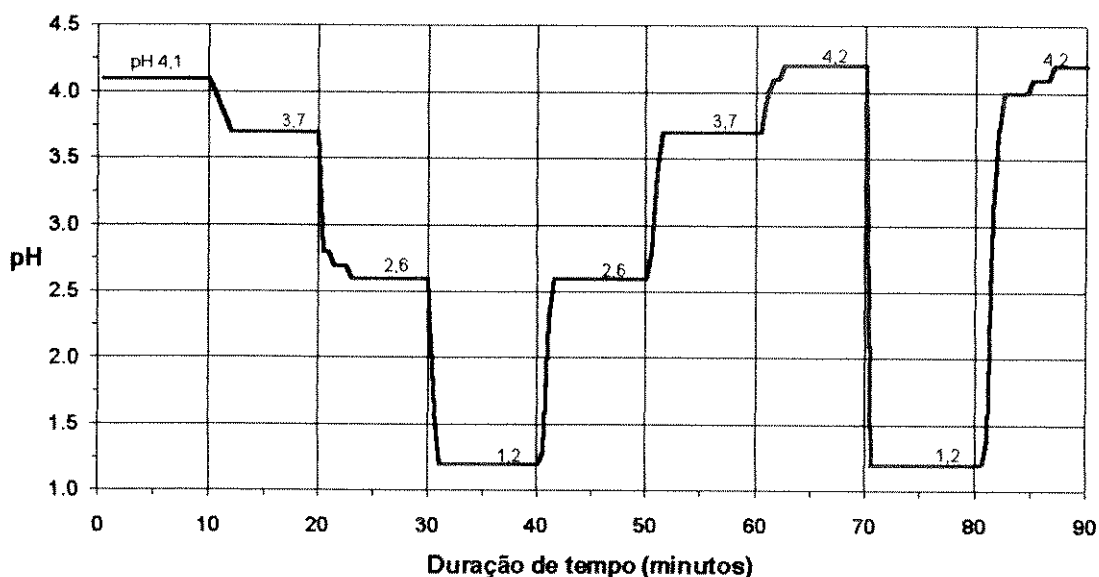


Figura 5.7: Resposta do sensor em amostras de suco gástrico.

Os resultados obtidos apresentaram uma boa reprodutibilidade das leituras do sensor. Apenas um valor apresentou um desvio de 0,1 unidades de pH entre as medições efetuadas nesta amostra. Isso provavelmente é devido ao pH desta amostra se encontrar em um valor intermediário entre pH 4,1 e pH 4.2.

### 5.3 Desempenho do sensor "in vivo"

O teste "in vivo" consistiu em medir continuamente o pH do estômago de um cão anestesiado com o sensor e com o eletrodo de vidro (Radiometer, #GK 2801-1), simultaneamente. Antes do teste,

algumas adaptações e desenvolvimentos tiveram que ser realizados para adequar o sensor e o eletrodo para a monitoração "in vivo".

A utilização do sensor em avaliações "in vivo" exige que a sua fase reagente seja protegida por uma estrutura, com a finalidade principal de aumentar a resistência mecânica. No entanto, a estrutura deve manter a maior possível a área de contacto entre o sensor e a solução, causando pouco impacto no tempo de resposta do sensor. Dentre os arranjos desenvolvidos, a proteção da fase reagente com uma espiral de fio metálico se mostrou a mais adequada. A espiral, confeccionada manualmente, envolve a fase reagente e é selada nas duas extremidades da membrana, conforme mostrada na figura 5.8.

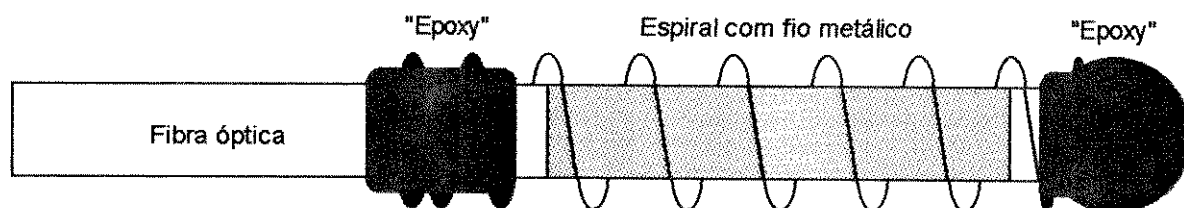


Figura 5.8: Sensor de fibra óptica utilizado na avaliação "in vivo".

O emprego do eletrodo de vidro (Radiometer, #GK 2801-1) em monitorações contínuas exigiu uma instrumentação para aquisição, processamento e armazenamento de dados. Como a mesma não era disponível, um sistema foi desenvolvido baseado em um pHmetro (Corning, modelo 12), uma placa conversora analógico-digital (Computer Boards, Inc., #CIO-AD16JR-AT) e um microcomputador PC

286/ 14MHz. A placa conversora selecionada é idêntica à utilizada pela instrumentação do sensor, o que facilitou o desenvolvimento do "software" para o sistema, escrito em código "C" (Turbo C, versão 2.0, Borland International). A instrumentação permitiu armazenar seqüencialmente os valores dos pHs determinados pelo eletrodo, os quais foram posteriormente comparados com as medições obtidas com o sensor desenvolvido.

Além das adaptações efetuadas, o teste comparativo entre o sensor e o eletrodo exige que as suas extremidades estejam tão próximas quanto possível, garantindo a mesma região de medida no meio estomacal. A estratégia adotada foi selar com uma fita adesiva os cabos dos dois dispositivos, mantendo as suas extremidades próximas, conforme ilustrado na figura 5.9.

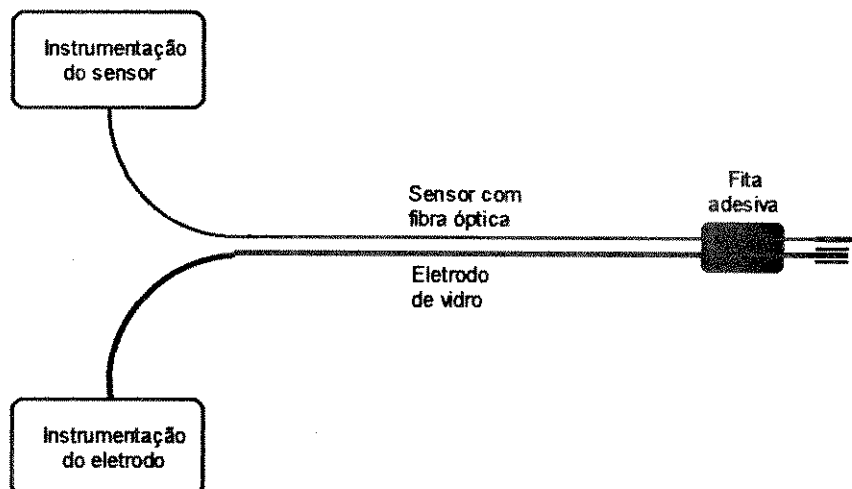


Figura 5.9: Combinação sensor/eletrodo empregada na avaliação "in vivo".

O teste "in vivo" iniciou-se com a preparação do animal. O animal selecionado foi um cão, da raça pastor alemão, massa 16kg, idade 3,5 anos. O primeiro procedimento foi anestésiar o cão pela administração intravenosa de 20mg/kg de pentobarbital de sódio, na pata direita anterior do animal. Após aproximadamente 30 minutos, um tubo de plástico (10mm de diâmetro) foi inserido via ducto alimentar até a porção terminal do esôfago do cão já anestesiado. A seguir, a combinação sensor/eletrodo foi inserida até o estômago do animal através do tubo de plástico. O posicionamento da combinação sensor/eletrodo no estômago foi verificada pelo decréscimo brusco do pH na interface esôfago/estômago. Um segundo tubo de plástico (diâmetro 5mm) foi inserido até o esôfago, com a finalidade de permitir a injeção de soluções ácidas ou básicas, variando o pH estomacal. As soluções utilizadas foram ácido hidrolórico (pHs 1,5 ou 2,0) e bicarbonato de sódio (pH 8). A primeira solução foi administrada aos 17, 40 e 43 minutos e a segunda, aos 29 e 52 minutos. A duração total do registro foi de 60 minutos, sendo que o valor do pH calculado era atualizado a cada minuto. O resultado obtido está apresentado na figura 5.10.

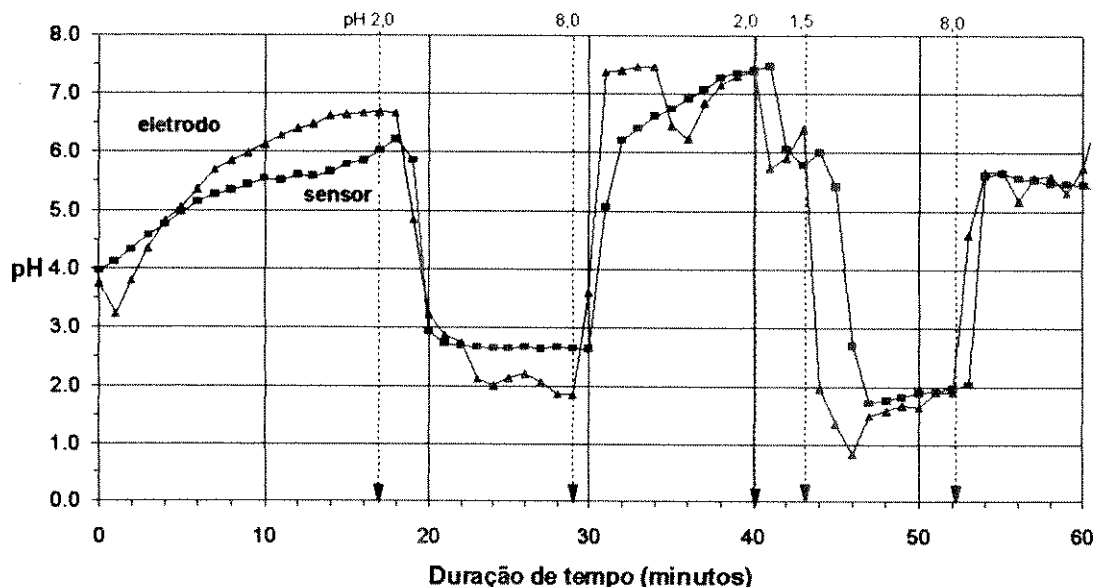


Figura 5.10: Respostas da avaliação "in vivo" do eletrodo de vidro e do sensor de fibra óptica.

O perfil da variação dos pHs medidos pelos dois sistemas é similar. Os pequenos desvios entre os dois traçados se devem provavelmente à configuração do arranjo experimental empregado, pois o teste "in vitro" demonstrou que os dois dispositivos apresentam medidas praticamente idênticas. Observe-se que um desvio semelhante foi encontrado quando da avaliação "in vivo" do pH gástrico com os eletrodos de vidro e de antimônio (figura 1.1).

Além do valor do pH, um retardo na resposta do sensor é observado em relação à resposta do eletrodo. Essa característica era esperada, pois o tempo de resposta do sensor (alguns minutos) é maior que o tempo de resposta do eletrodo (dezenas de segundos). Entretanto, ressalta-se que a frequência de variação

do pH imposta no teste é muito superior ao esperado em uma avaliação clínica (figura 1.1).

#### **5.4 Conclusão**

O sistema com sensor de pH desenvolvido foi avaliado em solução tampão, em amostras de suco gástrico e no estômago de um cão anestesiado. O desvio temporal máximo é 0,2 unidades por 24 horas. O coeficiente de temperatura é 0,0055 unidades de pH por °C. A força iônica, na faixa avaliada, influencia apenas o equilíbrio do indicador colorimétrico "bromophenol blue". O método de calibração é eficaz. A reprodutibilidade da medida é adequada e o tempo de resposta do sensor é de alguns minutos. As avaliações em amostras de suco gástrico humano mostraram que o sensor apresenta um exatidão de  $\pm 0,1$  unidades de pH, indicando também que as suas medições independem da coloração e da força iônica das amostras. Os testes "in vivo" mostraram que o perfil de pH determinado com o sensor é similar ao obtido com o eletrodo de vidro.



## CAPÍTULO 6

### DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O projeto e construção de um sistema com sensor de fibra óptica para a medição do pH gástrico está descrito em detalhes no presente trabalho. Pode-se observar que o sensor com fibra óptica desenvolvido apresenta algumas vantagens quando comparadas aos eletrodos convencionais, as quais serão resumidamente apresentadas no próximo item.

Além disso, neste capítulo, discute-se sobre a toxicidade das substâncias químicas empregadas no sensor e destacam-se as principais particularidades do sistema projetado. Finalmente, a continuidade deste trabalho e sugestões para futuros desenvolvimentos são também discutidas.

#### **6.1 Análise comparativa entre as características do sensor e dos eletrodos**

Uma análise comparativa entre as principais características estáticas e dinâmicas do sensor desenvolvido e dos eletrodos de vidro e antimônio pode ser realizada a partir dos dados

apresentados na tabela 6.1 (as características dos eletrodos foram obtidas da tabela 1.1).

Tabela 6.1: Tabela com as características principais dos eletrodos de vidro com referência externa e com referência incorporada, do eletrodo de antimônio e do sensor construído.

Característica	Vidro referência externa	Vidro referência incorporada	Antimônio	Sensor de fibra óptica
Diâmetro (mm)	1,6 a 5,0	3,0 a 4,5	1,2 a 4,0	1,0 (a)
Faixa de pH	0 a 12	0 a 12	1 a 10	1 a 7
Seletividade ao H <sup>+</sup>	total	total	parcial	parcial
Sensibilidade	55mV/pH	55mV/pH	48mV/pH	variável
Desvio temporal (pH / 24 horas)	0,11	0,11	0,47	0 a 0,2(b)
Desvio temp. (pH/°C de 22 a 37°C)	0,0033	0,0033	0,0367	0,0055
Característica de transferência	linear	linear	histerese	não-linear
Tempo de resposta (segundos)	10 a 45	< 25	< 30	30 a 300
"Buffers" de calibração (pH1 a 7)	2	2	2	3
Características do "buffer"	qualquer	qualquer	específico	específico
Monitoração gástrica	sim	sim	c/ restrições	sim
Risco de choque elétrico	sim	sim	sim	não
Rigidez mecânica	ruim	ruim	boa	boa
Descartável	não	não	não	sim
Referência	externa	incorporada	externa	incorporada
Preço médio (US\$)	250	500	150	6,00 (c)
Vida útil (x 24 horas)	50	50	5	ND

NA = não se aplica; (a) diâmetro considerando a proteção mecânica; (b) desvio de zero na faixa mais ácida (pH 1) e de até 0,2 na faixa neutra (pH 7); (c) custo aproximado do sensor construído no laboratório; ND = não foi determinado;

### **6.1.1 Característica desvantajosa do sensor**

A única característica do sensor construído que é, de fato, inferior a dos eletrodos é o procedimento de calibração, devido aos fatores apresentados a seguir. Primeiro, o tempo necessário para a calibração (em torno de 15 minutos) é mais prolongado em relação aos dispositivos convencionais (em torno de 5 minutos), devido ao tempo de resposta do sensor. Segundo, o sensor necessita de três soluções tamponadas (pH 1, pH 4 e pH 7), ao contrário dos eletrodos, que usualmente empregam apenas duas (pH 1 e pH 7). Terceiro, as soluções tamponadas devem ser específicas, com força iônica conhecida, similarmente ao eletrodo de antimônio.

### **6.1.2 Características similares**

Pelos dados apresentados na tabela 6.1, o desvio temporal do sensor é igual a zero na faixa mais ácida (pH 1) e de no máximo 0,2 unidades de pH por 24 horas na faixa neutra (pH 7). Esses desvios, na média, são comparáveis ao do eletrodo de vidro (0,11 unidades de pH/ 24 horas) e bem inferior, numericamente, ao apresentado pelo eletrodo de antimônio (0,47 unidades de pH/ 24 horas). Observa-se que um desvio de até 0,2 unidades de pH pode ser considerado aceitável para a monitoração do pH gástrico (Klinkenberg et al., 1989).

A faixa de medição de pH de 1 a 7 é mais estreita que a dos eletrodos (pH 0 a pH 12, para o de vidro, e pH 1 a pH 10, para o de antimônio), porém adequada para o aplicação proposta. Entretanto, ressalta-se que o sensor desenvolvido apresenta sensibilidade até pH 10, conforme apresentado na figura 4.14. Apesar de não ter sido explorada, essa característica indica que o sistema desenvolvido pode ser aproveitado em outras aplicações.

A função de transferência não-linear do sensor implicou num processamento eletrônico um pouco mais sofisticado. No entanto, esse tipo de problema foi facilmente solucionado utilizando-se um microcomputador.

A rigidez mecânica do sensor, protegido pela espiral de fio, se mostrou adequada e qualitativamente comparável à dos eletrodos para monitorações "in vivo".

O coeficiente de temperatura do sensor ( $0,0055 \text{ pH}/^{\circ}\text{C}$ ) é um pouco maior que o coeficiente do eletrodo de vidro ( $0,0033 \text{ pH}/^{\circ}\text{C}$ ) e aproximadamente sete vezes menor do que o observado no eletrodo de antimônio ( $0,0367 \text{ pH}/^{\circ}\text{C}$ ).

A seletividade do sensor ao íon  $\text{H}^+$  é inferior à do eletrodo de vidro, devido às características intrínsecas dos indicadores de pH. De forma similar ao eletrodo de antimônio, a resposta do sensor pode ser afetada em função dos íons que compõem a amostra

de medição. Entretanto, a avaliação do sensor nas amostras de suco gástrico não apresentou desvios significativos ( $< 0,1$  unidades de pH).

O tempo de resposta do sensor nos pHs 1 e 2 (valores típicos do pH do suco gástrico) é em torno de 30 segundos, comparável ao dos eletrodos. Por outro lado, o sensor é mais lento que os eletrodos nas transições em meios menos ácidos, por exemplo, de pH 6 a pH 7. Mesmo nessas faixas, o tempo de resposta é ainda adequado para acompanhar a frequência típica das variações do pH gástrico (figura 1.1).

### **6.1.3 Características vantajosas do sensor**

O diâmetro do sensor, 1,0mm (incluindo a espiral metálica de proteção), é inferior ao diâmetro do menor eletrodo disponível (1,2mm), que utiliza referência externa. A dimensão obtida pode ainda ser reduzida, encapsulando-se a fibra óptica com um tubo de diâmetro externo menor e reduzindo o diâmetro da espiral de fio que protege a fase reagente. Dadas as suas dimensões, o sensor desenvolvido é potencialmente adequado para investigar o pH em outras partes do organismo humano, inacessíveis aos eletrodos.

O princípio óptico do sensor elimina a necessidade da utilização do eletrodo de referência, excluindo portanto as fontes de erros nas medições encontradas em sistemas que utilizam

eletrodos com referência externa. Além disso, o princípio óptico garante imunidade à radiação eletromagnética e, particularmente para a aplicação biomédica, segurança do paciente contra riscos de choques elétricos.

Outro aspecto que pode ser considerado vantajoso é o custo do sensor. Baseado na aquisição de pequenas quantidades, os custos de 1,0m da fibra óptica e do conector SMA 905 utilizados são em torno de US\$ 0,50 e US\$ 4,00, respectivamente. A participação dos custos das substâncias químicas no custo final do sensor é baixa, considerando que uma receita de preparação de microesferas é suficiente para produzir algumas centenas de sensores. Da mesma forma, a participação do custo da membrana tubular, comercializadas em bobinas com centenas de metros para a utilização geralmente em máquinas de hemodiálise, é reduzida, tendo em vista que o sensor emprega uma membrana com aproximadamente 5mm de comprimento. Assim, considerando os materiais e as substâncias químicas empregadas, o custo do sensor produzido no laboratório é provavelmente de US\$ 6,00. Entretanto, o custo do sensor, caso seja industrializado, define se o mesmo poderá ser considerado um dispositivo descartável.

O custo da instrumentação de excitação e detecção, nesse projeto, é basicamente definido pelos custos do espectrômetro comercial e do microcomputador PC/AT, totalizando aproximadamente US\$ 3000,00. Entretanto, um sistema desenvolvido para o mesmo

propósito, baseado em fotodiodos PIN, filtros e lentes, e instrumento dedicado, reduziria esse custo drasticamente.

## **6.2 Toxicidade das substâncias químicas do sensor**

A aplicação biomédica de um sensor exige que a toxicidade das substâncias químicas que compõem o mesmo seja conhecida. Embora algumas dezenas de sensores baseados em indicadores, notadamente para a medição do pH sanguíneo, tenham sido estudadas, a toxicidade das substâncias empregadas não foi apresentada. No sensor construído, as duas principais substâncias químicas são os indicadores de pH e o "polyacrylamide", no qual os indicadores estão imobilizados.

O "polyacrylamide" é inócuo, tanto que é empregado para o tratamento de água potável. Ao contrário, o monômero "acrylamide" é tóxico [Sandler e Karo, 1992; Aldridge et al., 1985].

A toxicidade dos indicadores colorimétricos "m-cresol purple" e "bromophenol blue" pode, na carência de um estudo específico, ser delineada por comparação a um outro indicador colorimétrico, o "cardiogreen". Essa substância é empregada clínica e rotineiramente na determinação do débito cardíaco. No procedimento clínico, uma solução salina isotônica contendo o indicador diluído é injetada geralmente na artéria pulmonar,

através de um cateter [Webster, 1978]. A comparação sugere que os indicadores utilizados no sensor são inócuos, pois são substâncias do mesmo grupo do "cardiogreen". Além disso, dois aspectos devem ser ressaltados. Primeiro, os indicadores no sensor estão imobilizados num polímero inócuo, o que garante que os indicadores não estarão presentes na sua forma diluída. Segundo, a aplicação do sensor é no sistema gástrico, um ambiente de medida menos crítico, do ponto de vista da assepsia, que o sistema arterial.

### **6.3 Particularidades, continuidade e aprimoramentos no sistema desenvolvido**

O trabalho descrito apresenta, a partir da motivação inicial, a concepção, projeto e construção de um sistema com sensor de fibra óptica para a medição do pH gástrico e a avaliação do seu desempenho em solução tampão, "in vitro" e "in vivo". A primeira tentativa de um trabalho dedicado a esta aplicação foi publicada por Posch et al. (1989), que limitou-se em desenvolver um sensor com indicador fluorimétrico e avaliar o seu desempenho em solução tamponada. A seguir, os resultados preliminares deste trabalho foram publicados [Netto et al., 1993] e os resultados finais foram apresentados recentemente na Segunda Conferência Européia de Sensores Ópticos para Medições Químicas e Biosensores ("2nd European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors") [Netto et al., 1994]. Além desse, no mesmo



evento, um segundo sistema com sensor de fibra óptica para a medição do pH gástrico foi apresentado por Baldini et al. (1994). No entanto, uma comparação minuciosa entre os dois sistemas desenvolvidos não é possível, pois o trabalho ainda não foi impresso.

Uma comparação entre as expectativas no início do desenvolvimento deste trabalho e os resultados finais se mostra importante. Dentre os desafios preliminares, destaca-se o projeto de um sensor com fibra óptica com sensibilidade na faixa de pH 1 a pH 7. Baseado na literatura disponível, as primeiras avaliações indicavam que o sensor seria construído com três indicadores colorimétricos de pH. Essa característica indesejável dificultaria a calibração e a reprodutibilidade e necessitaria de uma análise espectral em provavelmente três faixas de comprimentos de onda. No aspecto construtivo, o sensor utilizaria duas fibras ópticas e o sistema de excitação seria projetado com uma fonte óptica de alta potência (centenas de Watts), necessitando arrefecimento.

O sistema final, entretanto, é composto por um sensor e um instrumento opto-eletrônico simplificados em relação às expectativas iniciais, pois buscou-se ao longo do projeto a otimização das suas características. O protótipo final emprega apenas dois indicadores de pH, duas faixas de comprimentos de onda de medida, uma única fibra óptica e uma lâmpada de tungstênio halogenado de 4,25 Watts, sem arrefecimento.

As otimizações mencionadas simplificaram o protótipo. O emprego de dois indicadores e uma única fibra óptica, além de facilitar a construção e reduzir o custo, produz sensores com características similares, melhorando a reprodutibilidade e, conseqüentemente, facilitando a calibração. A monitoração em apenas dois comprimentos de onda permite, num passo posterior, utilizar um sistema padrão de detecção baseado em dois fotodiodos do tipo PIN. O emprego de uma fonte de radiação de baixa potência possibilita a construção de um sistema compacto, de baixo consumo. Além disso, o protótipo não necessita de ventilador de arrefecimento, eliminando o ruído e a vibração.

Alguns aspectos do sistema final devem ainda ser discutidos. Os indicadores colorimétricos selecionados se mostraram adequados para o objetivo proposto, possibilitando uma faixa de sensibilidade de pH 1 a pH 7 (podendo ser estendida de pH 0 a pH 10) e boa estabilidade temporal. O método de imobilização conjunta dos indicadores e das micropartículas de dispersão nas microesferas de "polyacrylamide" atendeu as exigências. Embora essa técnica tenha sido utilizada anteriormente por Peterson et al. (1980), a imobilização conjunta de dois indicadores e a resistência química ao meio extremamente ácido (pH 1) não tinham ainda sido exploradas.

O projeto do "splitter" possibilitou a confecção do sensor com uma única fibra óptica, característica ímpar entre os

sensores com indicadores colorimétricos citados na literatura. O "splitter" projetado, incorporado a um instrumento, é potencialmente adequado para outras medições baseadas em refletometria, seja para a medição da intensidade luminosa ou da cor da superfície refletora. Uma possível aplicação biomédica é o desenvolvimento de um equipamento para avaliar a concentração de bilirrubina em recém-nascidos, baseado na refletância difusa da pele do recém-nascido [Yamanouchi et al., 1980].

Além dos testes já efetuados, o sistema desenvolvido necessita ainda ser extensivamente avaliado em monitorações "in vivo", pois considera-se que os testes de desempenho em soluções e "in vitro" foram conclusivos. Assim, testes posteriores de longa duração (24 horas) em animais e, possivelmente, em humanos devem ser realizados. Paralelamente, o microcomputador e monitor devem ser substituídos por um instrumento dedicado, o qual permitirá a obtenção de um sistema compacto e portátil.

O protótipo construído pode ser empregado também em outras aplicações, sendo a mais atraente, na área biomédica, o diagnóstico do refluxo gastro-esofágico a partir da monitoração contínua do pH do esôfago. A aplicação mencionada exige um sensor com faixa de sensibilidade em torno de pH 1 a pH 7, porém com um tempo de resposta menor que 30 segundos. Tecnicamente, a redução do tempo será possível com a utilização de uma membrana com maior tamanho de poro, a qual não foi ainda identificada comercialmente. Assim, a estratégia possivelmente será

desenvolver membranas tubulares com características apropriadas para os sensores, viabilizando o seu emprego em monitorações esofágicas.

Finalizando, o protótipo desenvolvido e testado demonstra que sensores com fibra óptica são adequados para a monitoração do pH gástrico, preenchendo assim mais uma lacuna dentre os vários campos de aplicação já explorados com essa técnica sensora.

# APÊNDICE A

## **Soluções tamponadas**

As soluções tamponadas apresentam a propriedade de resistir a uma modificação do pH por efeito de diluição ou adição de pequenas quantidades de ácidos ou bases fortes. As soluções tamponadas têm uma enorme importância; elas servem para preparar soluções com pH definido ou para manter o pH de um meio em torno de um valor desejado [Good et al., 1966].

Com o propósito de ilustrar o mecanismo tampão, apresenta-se a ação exercida por algumas substâncias.

A água pura praticamente não resiste à mudança no valor do pH caso um ácido ou uma base fortes seja adicionado. Por exemplo, se 1 gota de ácido clorídrico é adicionada a 1 litro de água a 25 °C, o pH altera-se de 7,0 para aproximadamente 3,2. No sentido oposto, 1 gota de hidróxido de sódio causa uma alteração comparável. Uma solução salina, tal como cloreto de sódio, apresenta um comportamento similar ao da água pura [Crockford e Knight, 1964].

Por outro lado, as soluções que contêm quantidades relativamente grandes de ácidos fortes ou bases fortes exibem

ação tamponante. De fato, a adição de uma pequena quantidade de ácido (ou base) apenas diminui (ou aumenta) levemente a concentração do íon hidrogênio, originalmente presente. Todavia, as soluções tampão do tipo mencionado são utilizadas nas extremidades da escala de pH. As soluções tampão mais empregadas são, entretanto, as constituídas de ácidos ou bases fracas, por exemplo ácido acético.

Considere-se uma solução tamponada contendo um ácido fraco (HA). A sua dissociação em meio aquoso é fornecida pela equação A1.1 (observe-se que as substâncias tamponadas e os indicadores colorimétricos, apresentados no item 2.1.1.1 deste trabalho, são ambos ácidos fracos ou bases fracas. Desta forma, utiliza-se neste apêndice a equação 2.5 demonstrada no item mencionado).

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{A1.1}$$

onde: pKa é a constante da substância tampão (tabelado);  $[\text{A}^-]$  e  $[\text{HA}]$  são as concentrações do íon e do ácido, respectivamente.

Caso um sal do ácido seja também adicionado na solução, a dissociação é dada por:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]} \quad \text{A1.2}$$

onde:  $[\text{sal}]$  e  $[\text{ácido}]$  são as concentrações dessas respectivas substâncias.

Para exemplificar a ação freadora das soluções tampão, considere-se uma solução preparada com ácido acético e acetato de sódio até a concentração de cada substância ser de 0,1 mol por litro. O pH dessa solução original, de acordo com a equação A1.2 ( $pK_a = 4,74$ ):

$$pH = 4,74 + \log 0,1/0,1 = 4,74$$

Suponha-se que em 100ml da solução tampão se adicionem 5ml de ácido clorídrico 0,1 mol por litro. Uma parte do íon acetato reagirá com o íon hidrogênio introduzido e formará ácido acético não ionizado. Haverá, pois, um aumento na concentração desse último e um decréscimo na concentração do primeiro. O cálculo do pH da solução resultante deve levar em consideração a nova relação das concentrações. Então:

$$pH = 4,74 + \log 0,95/1,01 = 4,70$$

Considere-se agora a adição de 5ml de hidróxido de sódio 0,1 moles por litro na solução tampão. Uma parte do ácido acético será neutralizada; conseqüentemente, a concentração do ácido fraco decrescerá, ao passo que a do sal aumentará. A nova relação de concentração resulta:

$$pH = 4,74 + \log 1,05/0,95 = 4,78$$

Duas questões importantes no uso das soluções tampão são a capacidade tampão, eficiência em resistir a uma variação no pH, e a faixa de pH, que pode ser coberta por um par ácido/sal.

A capacidade de uma dada substância tampão é maior quando a relação das concentrações dos seus componentes é igual à unidade. Essa propriedade pode ser ilustrada comparando-se os resultados abaixo com os obtidos anteriormente. Suponha-se a solução tampão definida, no seguinte equilíbrio:

$$\text{pH} = 4,74 + \log 1,80/0,20 = 5,70$$

Adicionando-se quantidades iguais de ácido clorídrico e hidróxido de sódio ao equilíbrio apresentado, tem-se:

$$\text{pH} = 4,74 + \log 1,75/0,25 = 5,58$$

$$\text{pH} = 4,74 + \log 1,85/0,15 = 5,83$$

Os valores dos pH calculados acima mostram que um desvio maior foi obtido em relação ao pH original, comparado ao exemplo anterior. Portanto, a eficiência da ação tampão diminui com o aumento e o decréscimo da relação das concentrações do ácido para o sal. Em geral, a eficiência da ação tampão se mantém satisfatória dentro de uma faixa definida pelos limites de 0,1 a 10 para a relação entre as concentrações. Isso significa que um



dado par ácido/sal pode ser usado para preparar soluções tampão com valores de pH dentro da faixa [Ohlweiler, 1968]:

$$\text{pH} = \text{pKa} \pm 1$$

## Força iônica

As soluções tamponadas podem apresentar valores diferentes de força iônica ( $\mu$ ), a qual é função da concentração e da carga dos íons dispersos, conforme equação A1.3 [Ohlweiler, 1968]:

$$\mu = 0,5 \cdot \sum_{i=1}^{i=n} C_i \cdot Z_i^2 \quad (\text{A1.3})$$

onde C é a concentração do íon "i" e Z é a carga do íon "i".

A força iônica pode afetar a constante de equilíbrio (pK) dos indicadores colorimétricos, alterando o equilíbrio entre as fases ácida e básica [Janata, 1987]. O desvio no pK depende basicamente do tipo e da família do indicador colorimétrico empregado, sendo mais acentuado na família das sulfoneftaleínas do que na família "azo".

## Soluções tamponadas preparadas

As receitas de preparação das soluções tamponadas empregadas neste projeto foram obtidas do programa de computador "The Buffer Stack" (Macintosh).

As soluções foram preparadas na temperatura ambiente (25 °C), nos valores de pH apresentados na tabela A2.1. Cada solução foi preparada com força iônica 0,1 e 0,4.

Tabela A2.1: Valor do pH da solução e substância tampão utilizada.

pH	Substância utilizada
1	ácido clorídrico
2	ácido clorídrico
3	"potassium hydrogen phthalate"
4	ácido acético
5	ácido acético
6	bicarbonato de sódio
7	"mops"

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahern, H.L., Rice, K.T. (1991). How do you measure gastric pH? **American Journal of Nursing**, **5**, 70-70.
- Aldridge, N. et al. (1985). Acrylamide, in **Environmental Health Criteria 49**, World Health Organization.
- Angerer, M., Koelzow, H., Londong, W. (1990). Simultaneous comparison of 24-hour intragastric pH recording using glass and antimony electrodes in man. **Dig. Dis**, **8(suppl.1)**, 38-45.
- Ashworth, D.C., Narayanaswamy, R. (1989). Transducer mechanisms for optical biosensors. Transducer design. **Comp. Meth. & Prog. in Biomed.**, **30**, 20-31.
- Ask, P., Edwall, G., Johansson, K.E., Tibbling, L. (1982). On the use of monocrystalline antimony pH electrodes in gastro-oesophageal functional disorders. **Med. & Biol. Eng. & Comput.**, **20**, 383-389.
- Bacci, M., Baldini, F., Bracci, S. (1991). Spectroscopic behavior of acid-basic indicators after immobilization on glass supports. **Appl. Spectr.**, **45(9)**, 1508-1515.
- Baldini, F., Bracci, S., Cosi, F. (1994). Optical fiber sensor for gastric pH measurements. Apresentado no **2nd European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors, Florença, Itália, Abril** (submetido para publicação).
- Banyai, E. (1972). Acid-base indicators, in **Indicators (Ed. E. Bishop)**, p.64-170, Pergamon Press Ltda.

- Bennett, J.R. (1987). pH measurement in the esophagus. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, **1(4)**, 747-767.
- Bishop, E. (1972). Theory and principles of visual indicators, in **Indicators (Ed. E. Bishop)**, p.13-63, Pergamon Press Ltda.
- Caestecker, J.S. (1989). Twenty-four-hours oesophageal pH monitoring: advances and controversies. **Netherlands Journal of Medicine**, **34**, S20-S39.
- Caestecker, J.S., Heading, R.C. (1990). Esophageal pH monitoring. **Gastroenterology Clinics of North America**, **19(3)**, 645-669.
- Cobbold, R.S.C. (1974). Transducers for the measurement of ions and dissolved gas, in **Transducers for Biomedical Measurements: Principles and Applications (Ed. R.S.C. Cobbold)**, p.323-410, John Wiley & Sons.
- Crockford, H.D., Knight, S.B. (1964). Ionic Equilibrium and Buffer Action, in **Fundamentals of Physical Chemistry (Eds. H.D. Crockford e S.B. Knight)**, p.188-230, John Wiley & Sons.
- Emde, C., Garner, A., Blum, A.L. (1987). Technical aspects of intraluminal pH-metry in man: current status and recommendations. **Gut**, **28**, 1177-1188.
- Emde, C., Hopert, R., Riecken, E.O. (1989). Basic principles of pH registration. **Netherlands Journal of Medicine**, **34**, S3-S9.
- Emde, C. (1990). Electrochemical aspects of pH electrodes. **Dig. Dis.**, **8(suppl.1)**, 18-22.
- Fabian, J., Zahradnik, R. (1989). The search for highly colored organic compounds. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, **28**, 677-694.

- Fimmel, C.J., Etienne, A., Cilluffo, T., Ritter, C., Gasser, T., Rey, J.P., Moscatelli, P.C., Sabbatini, F.P., Pace, C., Buhler, H.W., Bauerfeind, P., Blum, A.L. (1985). Long-term ambulatory gastric pH monitoring: validation of a new method and effect of H<sub>2</sub>-antagonists. **Gastroenterology**, **85**, 1842-1851.
- Fuchs, K.H., DeMeester, T.R., Hinder, R.A., Stein, H.J., Barlow, A.P., Gupta, N.C. (1991). Computerized identification of pathologic duodenogastric reflux using 24-hour gastric pH monitoring. **Ann. Surg.**, **213**(1), 13-20.
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, **5**(2), 467-477.
- Green, F.J. (1990). **The Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes and indicators**, Aldrich Chemical Company, Inc..
- Hecht, J. (1988). System design considerations, in **Understanding Fiber Optics** (Ed. J. Hecht), p.267-290, Howard W. Sams & Company.
- Hochberg, R.C. (1986). Fiber optic sensor. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, **35**(4), 908-911.
- Janata, J. (1987). Do optical sensors really measure pH. **Anal. Chem.**, **59**, 1351-1356.
- Jones, T.P., Porter, M.D. (1989). An optical sensor based on infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, **43**(6), 908-911.
- King, D.W., Kester, D.R. (1990). Spectral modeling of sulfonephthaleins indicators: application to pH measurements using multiple indicators. **App. Spectr.**, **44**(4), 722-727.

- Kirkbright, G.F., Narayanaswamy, R., Welty, N.A. (1984). Fibre-optic pH probe based on the use of an immobilised colorimetric indicator. **Analyst**, **109**, 1025-1028.
- Klinkenberg, C., Ogilvie, A.C., Meuwissen, S.G.M. (1989). Twenty-four hours oesophageal pH monitoring: experience in The Netherlands. **Netherlands Journal of Medicine**, **34**, S40-S54.
- Leiner, M.P.L, Wolfbeis, O.S. (1992). Fiber optic pH sensors, in **Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors (Ed. O.S. Wolfbeis)**, p.359-384, CRC Press.
- Lubbers, D.W., Optiz, N. (1975). The pCO<sub>2</sub> / pO<sub>2</sub> optrode: a new probe for measurement of pCO<sub>2</sub> e pO<sub>2</sub> of gases and liquids. **Z. Naturforsch. Teil C**, **30C**, 532-538.
- Madsen, E.R. (1972). The history of indicators, in **Indicators (Ed. E. Bishop)**, p.1-11, Pergamon Press Ltda.
- Mandel, R., Shen, W. (1988). Colorimetry, in **Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation (Ed. G. Webster)**, p.771-779, John Wiley & Sons.
- McLauchlan, G., Rawlings, J.M., Lucas, M.L., McCloy, R.F., Crean, G.P., McColl, K.E.L. (1987). Electrodes for 24 hour pH monitoring - a comparative study. **Gut**, **28**, 935-939.
- Meiners, D., Clift, S., Kaminski, D. (1982). Evaluation of various techniques to monitor intragastric pH. **Arch. Surg.**, **117**, 228-291.
- Merki, H.S. (1989). Assessment of intragastric acidity in man: modern aspects and reproducibility of intragastric pH monitoring. **Netherlands Journal of Medicine**, **34**, S74-S80.

- Mitchell, G.L., Hartl, J.C., McCrae, D., Wolthuis, R.A., Saaski, E.W., Garcin, K.C. (1991). Fiber optic pH measurement using azo indicators: optics development. **Proc. SPIE 1587**, 81-85.
- Modlin, D.N., Milanovich, F.P. (1992). Instrumentation for fiber optic chemical sensors, in **Fiber Optic Chemical Sensors (Ed. O.S. Wolfbeis)**, p.239-302, CRC Press.
- Mouncastle, V.B. (1980). **Medical Physiology** (Décima Quarta Edição) p.1295, C.V. Mosby Company.
- Narayanaswamy, R., Sevilla, F. (1988). Optical fibre sensors for chemical species, **J. Phys. E: Sci. Instrum.**, **21**, 10-17.
- Netto, E.J., Peterson, J.I., Wang, B. (1993). Fiber optic pH sensor for gastric measurements - preliminary results. **Fiber Optic Sensors in Medical Diagnostics, Proc. SPIE 1886**, 109-117.
- Netto, E.J., Peterson, J.I., McShane, M., Hampshire, V.A. (1994). A fiber-optic broad-range pH sensor system for gastric measurements". Apresentado no **2nd European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors, Florença, Itália, Abril** (submetido para publicação).
- Netto, E.J. (1994). Programa principal e as subrotinas específicas do sistema com sensor de fibra óptica para a medição do pH gástrico, **Relatório Técnico Departamental, DEB/FEE/UNICAMP**.
- Newman, D.H., Ritchie, S. (1986). Sources and detectors for optical fibre communications applications: the first 20 years. **Proceedings of the IEEE**, **68 (10)**, 1240-1245.
- Oesch, U., Brzozka, Z., Xy, A., Simon, W. (1987). Solvent polymeric membrane pH catheter electrode for intraluminal

measurements in the upper gastrointestinal tract. **Med. & Biol. Eng. & Comput.**,**25**,414-419.

Ohlweiler O.A. (1968). Volumetria de neutralização: acidimetria e alcalimetria in **Teoria e Prática da Análise Quantitativa Inorgânica**, p.355-405, Editora Universidade de Brasília.

Payne, P.A. (1989). Transducers, sensors, and instrumentation in clinical biomechanics. **J. Biomed. Eng.**,**11**:180-184.

Peterson, J.I., Goldstein, S.R., Fitzgerald, R.V. (1980). Fiber optic pH probe for physiological use. **Anal. Chem.**,**52**,864-869.

Peterson, J.I., Vurek, G.G. (1984). Fiber optic sensors for biomedical applications. **Science**,**224**,123-127.

Peterson, J.I., Netto, E.J. (1993). Design consideration in making a broad-range fiber-optic pH sensor. **Fiber Optic Sensors in Medical Diagnostics, Proc. SPIE 1886**,98-108.

Posch, H.E., Leiner, M.J.P., Wolfbeis, O.S. (1989). Towards a gastric pH-sensor: an optrode for the pH 0-7 range. **Fresenius Z Anal. Chem.**,**334**,162-165.

Pounder, R.E., Fraser, A.G. (1993). Gastric acid secretion and intragastric acidity: measurement in health and disease. **Baillière's Clinical Gastroenterology**,**7(1)**,55-80.

Prettyjohns, K. (1992). Improved CCDs meet special demands of spectroscopy. **Laser Focus World**, Outubro,127-136.

Sandler, S.R., Karo, W. (1992). Polyacrylamide and related amides, in **Polymer Synthesis**, p.420-460, Academic Press.

Seitz, W.R. (1984). Chemical sensors based on fiber optics. **Anal. Chem.**,**56(1)**,16A-34A.



- Seitz, W.R. (1988). Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics. **CRC Crit. Rev. in Anal. Chem.**, **19(2)**, 135-173.
- Seitz, W.R. (1989). Transducer mechanisms for optical biosensors. The chemical of transduction. **Comp. Meth. & Prog. in Biomed.**, **30**, 9-19.
- Serra, G. (1990). Fibre-optic pH sensor for sea-water monitoring using a single dye. **Anal. Chim. Acta.**, **232**, 337-344.
- Sterling, D.J. (1987). Fiber characteristics, in **Technician's Guide to Fiber Optic**, p.58-69, Delmar Publish Inc.
- Stock, J.T. (1989). Einar Biilman (1873-1946): pH determination made easy". **J. Chem. Education**, **66(11)**, 910-12.
- Takai, N., Sakuma, I., Fukui, Y., Kaneko, A., Fujie, T., Taguchi, K., Nagaoka, S. (1991). Studies of the development of optical fibers sensors for biochemical analysis. **Artificial Organs**, **15(2)**, 86-89.
- Tomicek, O. (1951). Theory of colour indicators, in **Chemical Indicators**, p.37-62, Butterworths Cientific Publications.
- Tucker, S., Robinson, R., Keane, C., Boff, M., Zenko, M., Batish, S. (1989). Colorimetric determinations of pH. **J. Chem. Education**, **66(9)**, 769-771.
- Vandenplas, Y., Helven, R., Goyvaerts, H. (1987). Comparative study of glass and antimony lectrodes for continuous oesophageal pH monitoring. **Gut**, **28**, 1177-1188.
- Vandenplas, Y. (1990). Diagnosis of gastroesophageal reflux. **Clinical Reviews in Allergy**, **8**, 443-455.

- Walt, R. (1986). Twenty four hours intragastric acidity analysis for the future. **Gut**,**27**,1-9.
- Webster, J.G. (1978). Measurement of flow and volume of blood, in **Medical Instrumentation, Application and Design** (Ed. J.G. Webster), p.385-433, Houghton Mifflin Company.
- Wheeler, L.A. (1978). Clinical laboratory instrumentation, in **Medical Instrumentation, Application and Design** (Ed. J.G. Webster), p.511-557, Houghton Mifflin Company.
- Wilson, J., Hawkes, J.F.B. (1989). Photodetectors, in **Optoelectronics, An Introduction**, p.296-300, Prentice Hall.
- Wolfbeis, O.S. (1992), Introduction, in **Fiber Optic Chemical Sensors** (Ed. O.S. Wolfbeis), p.1-23, CRC Press.
- Wolthuis, R., McCrae, D., Saaski, E., Hartl, J., Mitchell, G. (1992). Development of a medical fiber-optic pH sensor based on optical absorption. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**,**39** (5), 531-537.
- Yamanouchi, I., Yamauchi, Y., Igarashi, I. (1980). Transcutaneous bilirubinometry: preliminary studies of non-invasive transcutaneous bilirubin meter in the Okayama National Hospital. **Pediatrics**,**65**,195-202.