

Limites de Detecção de Fluorescência utilizando o Espectrómetro de Fluorescência Lumilux 5100



Palavras-chave:

Espectrómetro de Fluorescência, Lumilux 5100, Software LuxMaster, Fluoresceína, LOD

Palavras-chave:

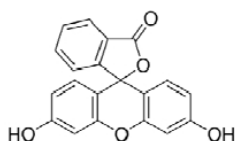
O Limite de Detecção (LOD) em fluorescência é a concentração mínima de analito que permite distinguir entre o sinal de fundo do branco e o sinal de fluorescência do analito, sendo um dos principais indicadores de desempenho do espectrómetro de fluorescência. Portanto, o limite de deteção é tipicamente definido como a concentração de analito que origina um sinal do instrumento igual a três vezes o desvio padrão do ruído. O limite de deteção foi determinado pela seguinte equação:

$$LOD = \left(\frac{\text{Concentração de Fluorescência}}{S} \right) \times (\text{Desvio padrão do branco} \times 3)$$

Onde S é a intensidade líquida do sinal, a partir da qual o ruído de fundo (background) é subtraído da média do sinal na intensidade máxima de fluorescência.

Reagentes e Aparelhos:

1. Espectrómetro de Fluorescência Lumilux 5100
2. Hidróxido de Sódio 0,01N
3. Cuvete de fluorescência com caminho ótico de 10mm
4. Fluoresceína (Sigma-Aldrich)



5. Software LuxMaster

Procedimento:

- I. Dissolver a Fluoresceína em Hidróxido de Sódio 0.01 N para preparar uma solução padrão de 1 mM.
- II. Diluir a solução stock até obter a concentração de 1 pM.

Medição de amostra:

- I. Configurar os parâmetros de ensaio conforme a Tabela 1 abaixo.

Modo de medição	Tempo de Scan
Correção de Excitação	Não
Escuro Inicial	Sim
Chopper (Hz)	-
Comprimento de Onda de Excitação (nm)	480
Largura de Fenda de Excitação (nm)	10
Filtro de Excitação	Ar
Comprimento de Onda de Emissão (nm)	515
Largura de Fenda de Emissão (nm)	10
Filtro de Emissão	Ar
Voltagem (V)	700
Tempo de Resposta (s)	1
Correção de Emissão	Não
Ganho	X8
Duração (s)	60
Intervalo de Dados (s)	0.1

- I. Medir o branco (Hidróxido de Sódio 0.01 N).
- II. Medir as soluções padrão de Fluoresceína de 1 pM.
- III. Assim que a medição terminar, guardar os dados.

Resultados:

A Fluoresceína em Hidróxido de Sódio é medida para confirmar as condições de fluorescência. Os espectros de excitação (linha vermelha) e de emissão (linha preta) de Fluoresceína 0.1 µM são apresentados na Figura 1. As intensidades de emissão do branco e da Fluoresceína no modo Time Scan a 515 nm, utilizando o Lumilux 5100, são apresentadas abaixo na Figura 2.

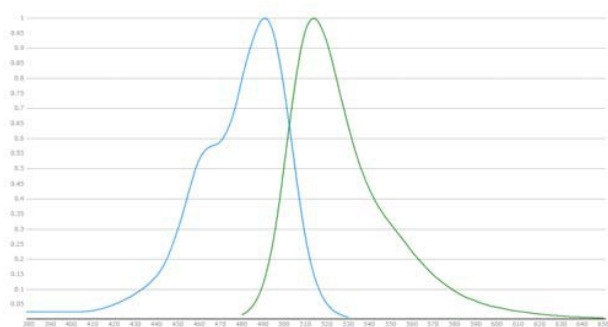


Figura 1: Espectros da Fluoresceína

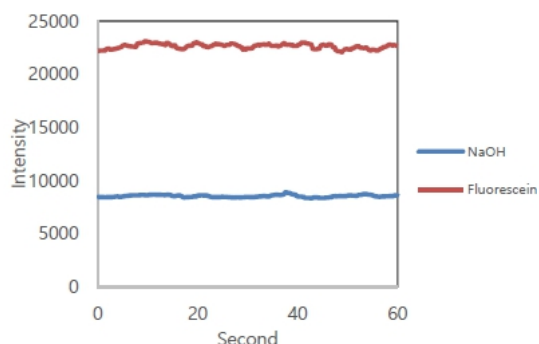


Figura 2: Varrimento Temporal (Time Scan) da Fluoresceína e do Branco.

As intensidades dos sinais da solução em branco e da solução de fluoresceína foram adquiridas através da média dos sinais durante um tempo total de recolha de 60 s, respetivamente. O desvio padrão do sinal do branco também foi obtido nas mesmas condições.

O limite de deteção da fluoresceína para o Lumilux 5100, utilizando a Equação 1 e as configurações especificadas do instrumento na Tabela 1, foi de 11,5 fM.

Intensidade fluorescência (± STD)		Fluoresceína Limite de Deteção (LOD)
Branco (NaOH)	Fluoresceína (1 µM)	fM
8531.9 ± 54.04	22627.17 ± 225.24	11.5

Conclusão:

O espectrómetro de fluorescência Lumilux 5100 demonstra uma boa sensibilidade nos testes para o limite de deteção de fluoresceína em solução de hidróxido de sódio. O LOD de fluoresceína utilizando o Lumilux 5100 foi determinado em 11,5 fM. Estes limites de deteção relatados são alcançáveis apenas utilizando fluoresceína com as definições do instrumento especificadas.

Referências:

1. Comité E-13 da ASTM sobre Espectroscopia Molecular (E579-04), Método de Ensaio Padrão para o Limite de Deteção por Fluorescência do Sulfato de Quinina em Solução.