

ESPECTROFLUORIMETRIA MOLECULAR (FL)

Ficha técnica do equipamento

Espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC

Fonte de excitação: Lâmpada de arco de Xe, 150 W;

Seletores de comprimento de onda: Monocromadores

Monocromador de emissão: Grade de difração côncava controlada mecanicamente

Monocromador de excitação: Grade de difração côncava controlada mecanicamente

Detector: Fotomultiplicadora R928

Resolução: 1,0 nm

Faixa de varredura: 220 – 990 nm

Velocidade de varredura: até 5500 nm/min

Determinação de quinino em água tônica

O quinino (sulfato de quinina) é uma das drogas antimaláricas mais utilizadas contra a doença causada pelo *Plasmodium falciparum*, sendo adicionada em água para produzir água tônica, conferindo seu sabor amargo. A quantificação dessa molécula por fluorescência é de grande importância no controle de qualidade em indústrias farmacêuticas e de bebidas.

A fluorescência é o fenômeno de emissão de radiação por espécies previamente excitadas por radiação eletromagnética. As aplicações analíticas da fluorescência baseiam-se no fato de que os espectros de fluorescência são característicos de cada molécula, podendo ser utilizada tanto para identificação quanto para quantificação, destacando-se pelos baixos limites de detecção geralmente obtidos (de ng/mL a pg/mL).

A espectrofluorimetria molecular consiste na excitação de moléculas que apresentem o fenômeno de fluorescência (em geral, espécies contendo sistemas π conjugados e/ou aromáticos), excitando-se estas moléculas com o comprimento de onda apropriado ($\lambda_{\text{excitação}}$) e medindo-se a intensidade da radiação emitida ($\lambda_{\text{emissão}}$).

DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

Preparo das soluções para a curva analítica

A partir de uma solução estoque de quinino 10 mg/L em H₂SO₄ 0,05 M, preparar os padrões nas seguintes concentrações:

Tabela 1: Diluições para os padrões

| Concentração de quinino (mg/L) | Volume da solução estoque (mL) | Volume aproximado de H ₂ SO ₄ 0,05 M (mL) | Volume total do balão volumétrico (mL) |
|--------------------------------|--------------------------------|---|--|
| 0,4 | | | 10,0 |
| 0,8 | | | 10,0 |
| 1,2 | | | 10,0 |
| 1,5 | | | 10,0 |
| 2,0 | | | 10,0 |
| 5,0 | | | 10,0 |
| 10,0 | | | - |
| Amostra | | | - |

Aquisição do espectro de emissão

No espectrofluorímetro, obtenha o espectro de emissão do quinino, utilizando a solução de 2,0 mg/L. Tenha por base o conhecimento prévio do espectro de absorção dessa molécula no UV-Vis.

Tabela 2: Parâmetros do espectro de emissão do quinino

| | |
|--|--|
| Comprimento de onda do início da varredura, nm | |
| Comprimento de onda do fim da varredura, nm | |
| Comprimento de onda de emissão máxima, nm | |

Aquisição do espectro de excitação

No espectrofluorímetro, obtenha o espectro de excitação do quinino, utilizando a solução de 2,0 mg/L. Tenha por base o espectro de emissão obtido anteriormente.

Tabela 3: Parâmetros do espectro de excitação do quinino

| | |
|--|--|
| Comprimento de onda do início da varredura, nm | |
| Comprimento de onda do fim da varredura, nm | |
| Comprimento de onda excitação máxima 1, nm | |
| Comprimento de onda excitação máxima 2, nm | |

Curva analítica

Utilizando as informações espectrais obtidas anteriormente, escolher um comprimento de onda para excitação e outro para medir a intensidade de fluorescência emitida. Faça sua escolha considerando a intensidade do pico e sua posição no espectro. Lembre-se que comprimentos de onda muito energéticos podem degradar o analito. Faça a análise em triplicata.

Tabela 4: Curva analítica para o quinino

| Concentração Quinino (mg/L) | Intensidade da emissão (u.a.) | | |
|-----------------------------|-------------------------------|--|--|
| 0,4 | | | |
| 0,8 | | | |
| 1,2 | | | |
| 1,5 | | | |
| 2,0 | | | |
| 5,0 | | | |
| 10,0 | | | |
| Amostra diluída | | | |

Estudo da supressão por haletos

Preparo das soluções de NaBr

A partir de uma solução estoque de NaBr 0,05 M, preparar as seguintes soluções de NaBr, em solução de quinino 2,0 mg/L:

Tabela 5: NaBr em solução de quinino 2,0 mg/L

| Concentração de NaBr (mmol/L) | Volume de solução estoque de NaBr (mL) | Volume aproximado de H ₂ SO ₄ 0,05 M (mL) | Volume de solução estoque de quinino 10,0 mg/L (mL) | Volume total do balão volumétrico (mL) |
|-------------------------------|--|---|---|--|
| 0 | | | 2,0 | - |
| 2 | | | 2,0 | 10,0 |
| 4 | | | 2,0 | 10,0 |
| 8 | | | 2,0 | 10,0 |
| 16 | | | 2,0 | 10,0 |
| 32 | | | 2,0 | 10,0 |

Análise da supressão por haletos

Utilizando o mesmo comprimento de onda de excitação da curva analítica, analisar as soluções de quinino contendo NaBr. Faça a análise em triplicata.

Tabela 6: Curva da supressão por haletos

| Concentração de NaBr (mmol/L) | Intensidade da emissão (u.a.) | | |
|-------------------------------|-------------------------------|--|--|
| 0* | | | |
| 2 | | | |
| 4 | | | |
| 8 | | | |
| 16 | | | |
| 32 | | | |

* Essa leitura é chamada de F_0 ; As demais são denominadas F ;

Tratamento dos dados

Curva analítica

Construa a curva analítica do quinino, montando um gráfico de intensidade de emissão (u.a.) x concentração de quinino (mg/L), usando todos os dados obtidos e não apenas as médias. Obtenha o coeficiente angular e linear para sua curva. Coloque os erros em cada ponto do seu gráfico. A partir dessas informações, calcular a concentração de quinino na água tônica. Levar em consideração o fator da diluição inicial.

Análise da supressão por haletos

Construa uma curva de F_0/F x concentração de haleto adicionado (essa curva é chamada de gráfico de Stern-Volmer). Obtenha o coeficiente angular e linear para sua curva. Coloque os erros em cada ponto do seu gráfico. A partir dessas informações, calcular a constante de supressão para o íon Br^- , segundo a equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \cdot [Br^-]$$

Questões complementares

- 1) Faça um diagrama de blocos de um espectrofluorímetro, detalhando seus componentes principais e descrevendo sua função.
- 2) Por que o detector dos espectrofluorímetros geralmente é posicionado a 90° da direção do feixe de radiação incidente?
- 3) Quais são as principais diferenças entre um espectrofotômetro e um espectrofluorímetro, tanto em termos instrumentais e analíticos quanto em termos fenomenológicos?
- 4) Descreva quais são os tipos de supressão de fluorescência (*quenching*) e como podem ser evitados.