

USP Universidade de São Paulo Brasil

INSTITUTO DE QUÍMICA

COLÓQUIO

FLUORIMETRIA

MONITOR: Berlane Gomes Santos (berlanegsantos@gmail.com)
 Docente: Profª. Drª. Cassiana Seimí Nomura
 Disciplina: QFL 1313 – Química Analítica III
 06/10/2020

1

FLUORIMETRIA

A fluorimetria é uma técnica extremamente sensível que se baseia na fluorescência que é um processo de fotoluminescência no qual os átomos ou moléculas são excitados por absorção de radiação eletromagnética. As espécies excitadas então relaxam ao estado fundamental, liberando seu excesso de energia como fótons.

LUMINESCÊNCIA MOLECULAR

```

    graph TD
        A[LUMINESCÊNCIA MOLECULAR] --> B[Fotoluminescência]
        A --> C[Quimioluminescência]
        B --> D[FLUORESCÊNCIA]
        B --> E[Fosforescência]
    
```

2

Absorção, excitação e emissão

3

FLUORÓFOROS

Fluoróforo é um componente de uma molécula que faz com que esta seja fluorescente. É um grupo funcional da molécula que absorverá energia de um comprimento de onda específica e posteriormente a emitirá em outro determinado comprimento de onda maior.

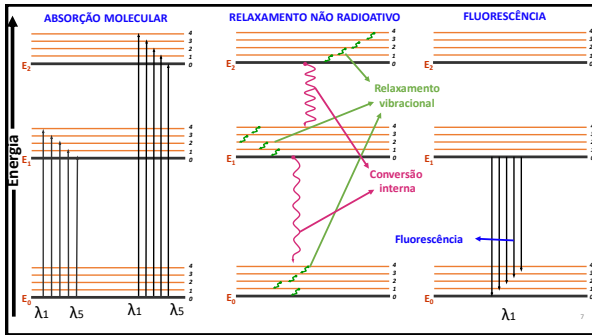
4

FLUORESCÊNCIA	Fosforescência	Quimioluminescência
<p> <chem>O=C1C=CC(=O)N1</chem> + <chem>O=C1C=CC(=O)N1</chem> + <chem>O2</chem> → <chem>O=C1C=CC(=O)N1</chem> + <chem>O=C1C=CC(=O)N1</chem> Luciferina do vaga-lume → Intermediário </p> <p> Luz + <chem>O=C1C=CC(=O)N1</chem> → <chem>O=C1C=CC(=O)N1</chem> + <chem>O=C1C=CC(=O)N1</chem> oxiluciferina → oxiluciferina* </p>		

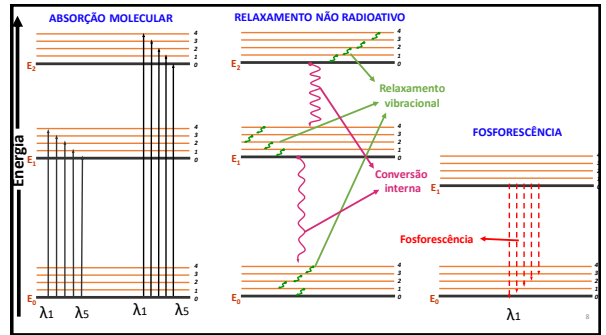
5

Estado eletrônico Fundamental	Transição simples-to-simples Altemente provável Fluorescência 10 ⁻⁵ s ou menos	Transição tripleto-simples-to Menos provável Fosforescência 10 ⁻⁴ a 10 ⁴ s
ESTADO FUNDAMENTAL SIMPLETO	ESTADO EXCITADO SIMPLETO	ESTADO EXCITADO TRIPLETO

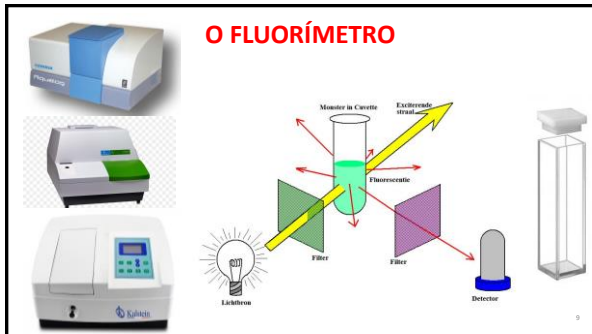
6



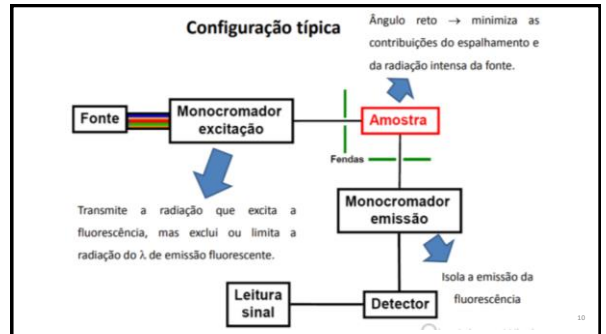
7



8



9



10

VANTAGENS

- Elevada sensibilidade (faixa de ppb)
- Elevada seletividade (raramente outra espécie tem espectro de excitação e de emissão coincidentes)

DESVANTAGENS

- Requer baixas concentrações para dar respostas lineares
- Requerem cuidados especiais: (evaporação, adsorção, instabilidade do analito, reação com traços de impurezas, com O₂ dissolvido, etc)
- Elevadas concentrações produzem desvio de linearidade
- Espécies podem causar supressão da fluorescência
- Substâncias coloridas podem também atuar como supressores

11

Quina

Sulfato de quina

- A quina, pó branco, inodoro
- Alcalóide de gosto amargo
- Tem funções antitérmicas, antimaláricas e analgésicas
- Tratamento de arritmias cardíacas
- Além de ser um fármaco é utilizada como flavorizante da água tônica

12

DETERMINAÇÃO DE SULFATO DE QUININO NA "ÁGUA TÔNICA"

OBJETIVO

Familiarizar-se com as medidas por fluorescência e determinar a concentração de quinino em água tônica por fluorimetria.

13

13

TÓPICOS IMPORTANTES:

1. Esquema fundamental dos fotômetros e espectrofotômetros
2. Escolha de comprimentos de onda de excitação e emissão em fluorímetro
3. Uso de soluções de referência e brancos analíticos
4. Avaliar interferências em fluorimetria

14

14

Instruções Gerais:

1. Ligar o fluorímetro Turner e a lâmpada, deixando aquecer por quinze minutos
2. Preparar por diluição da solução estoque de sulfato de quinino soluções de referência nas seguintes concentrações

SOLUÇÃO ESTOQUE

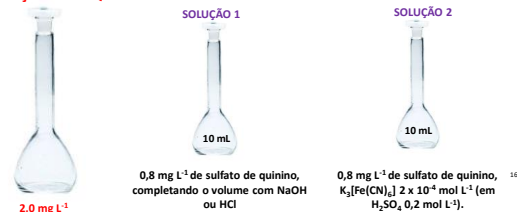


15

Instruções Gerais:

- 2.1 Preparar também duas soluções.

SOLUÇÃO ESTOQUE



16

Instruções Gerais:

3. Escolha dos filtros:

- Filtros primários são: NB 360, 440, 490 e 540
- Filtros secundários são: SC 415, 430, 515, 535, 585 e 665
- Escolha um filtro primário e dois secundários para a análise de sulfato de quinino.

NB 360
SC 430

17

Instruções Gerais:

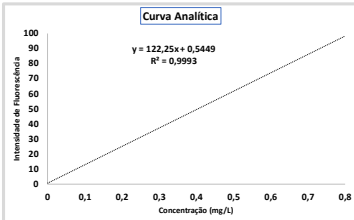
4. CALIBRAÇÃO DO FLUORÍMETRO;

- Posicionar no aparelho o filtro primário e um dos filtros secundários escolhidos
- Ajustar o zero com a solução branco (H₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹) e, com a solução de sulfato de quinino mais concentrada (0,8 mg L⁻¹) na cela de medida, acertar a escala em aproximadamente 100
- Medir a fluorescência das soluções 0,2; 0,4 e 0,6 mg L⁻¹
- Repetir essas medidas após trocar o filtro secundário
- Escolha o conjunto de filtros mais adequado para a determinação de quinino

18

Curva analítica

Concentração (mg/L)	Intensidade
0	0
0,2	25
0,4	51
0,5	62
0,6	73
0,7	85
0,8	99



19

Instruções Gerais:

5. Avaliação da influência do pH na fluorescência do quinino, assim como da absorção de energia por outra espécie (supressão):

➤ Com o aparelho equipado com os filtros mais adequados, acertar o zero usando a solução do branco (H_2SO_4) e o 100 com a solução mais concentrada de quinino.

➤ Em seguida, medir a intensidade de fluorescência das demais soluções de referência em H_2SO_4 e das soluções preparadas em HCl, NaOH e em meio contendo $K_3[Fe(CN)_6]$ $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

20

Instruções Gerais:

6. Com os dados obtidos, construir a curva analítica com as unidades arbitrárias de fluorescência

7. Quantificação de sulfato de quinino em água tônica



21

Instruções Gerais:

8. Fazer as análises de fluorescência, em triplicata, usando o mesmo par de filtros utilizado para construir a curva analítica

➤ Calcular a concentração de sulfato de quinino na "água tônica" em $g L^{-1}$

$$y = 122,25x + 0,5449$$

Análise	Intensidade	Conc. (mg/L)	Média	Desvio P.
1	44,54	0,36	0,35	0,01
2	42,09	0,34		
3	43,31	0,35		

Concentração no balão volumétrico **0,35 mg/L**
 Concentração no balão volumétrico **35 mg/L**

22

Instruções Gerais:

9. Para avaliar uma possível interferência de matriz, faça um teste de adição e recuperação.

➤ Siga o mesmo procedimento adotado no item 7, porém adicionando $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de quinino.

➤ Meça a intensidade de fluorescência da solução de referência de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, da amostra e da amostra adicionada com quinino.

➤ Calcule a porcentagem de recuperação de quinino.

Conc. calculada para a amostra **0,35 mg/L**

Conc. calculada para a amostra com adição de sulfato de quinino **0,54 mg/L**

$$0,54 - 0,35 = 0,19 \text{ mg/L}$$

$$\frac{0,19}{0,2} \rightarrow 100\%$$

$$X = 95\% \text{ de recuperação}$$

23

Exercício

1- A partir dos dados que seguem construa uma curva analítica, obtenha a equação da reta, o valor de R^2 e calcule a concentração de sulfato de quinino em duas marcas A e B de água tônica utilizando os valores de intensidade obtidos para as amostras.

Concentração (mg/L)	Intensidade
0	0
0,2	20
0,3	34
0,4	48
0,5	60
0,6	73
0,7	86
0,8	100

Amostra	Intensidade	Média	Desv. P.
A	55		
A	57		
A	56		
B	33		
B	37		
B	34		

2. Em cada uma de 4 soluções de sulfato de quinino preparadas com água, foram adicionados individualmente cloreto de lítio, hidróxido de potássio, ferricianeto de potássio, ácido sulfúrico e na solução 5 de sulfato de quinino foi borbulhado ar comprimido (mesma composição do ar atmosférico). Supondo que essas soluções fossem analisadas em um fluorímetro, qual delas teria a maior intensidade? Por quê? Justifique o fato das demais soluções apresentarem menores intensidades.

24

Bibliografia consultada

1. Princípios da Análise Instrumental, D. A. Skoog
2. Análise Química Quantitativa, D. C. Harris