

Artigo

Desenvolvimento de um Fluorímetro Artesanal e Propostas para sua Aplicação nas Aulas Práticas de Disciplinas de Química Analítica Instrumental nos Cursos de Graduação**de Oliveira, D. M.;* Novaes, C. G.; Silva Junior, L. J. C.; Pereira, R. S.; Bezerra, M. A.***Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), 2438-2456. Data de publicação na Web: 14 de outubro de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Development of a Handmade Fluorometer and Proposals for its Application in Practical Courses of Instrumental Analytical Chemistry in the Graduation**

Abstract: This work proposes the development and use of a homemade fluorimeter from electric/electronic low cost materials and scraps, as a didactic resource for motivating the investigation of the fluorescence phenomena in analytical chemistry courses. Some tasks about quinine using this craft are also proposed, such as, analysis of excitation and emission spectra so that the student can learn how to set the best wavelengths to perform quantitative measurements, studies of pH changes and halide ions effects on its fluorescence signal. The developed equipment is very simple allowing the student to understand the principles involved on its construction.

Keywords: Molecular fluorescence; homemade fluorimeter; quinine.

Resumo

Este trabalho propõe o desenvolvimento e utilização de um fluorímetro artesanal fabricado a partir de materiais elétrico/eletrônico de baixo custo e sucata, como recurso didático na motivação da investigação do fenômeno de fluorescência em cursos de química analítica. Algumas atividades são propostas em relação à quinina usando-se este equipamento, como: análises dos espectros de excitação e emissão de forma que o estudante possa aprender como escolher os melhores comprimentos de onda para a realização de medidas quantitativas, estudos de mudança de pH e efeitos de íons haletos sobre o sinal de fluorescência. O equipamento desenvolvido é muito simples permitindo que o estudante compreenda os princípios envolvidos em sua construção.

Palavras-chave: Fluorescência molecular; fluorímetro artesanal; quinina.

* Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Química e Exatas, CEP 45206-190, Jequié-BA, Brasil.

✉ djalmao23@gmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20150145](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150145)

Desenvolvimento de um Fluorímetro Artesanal e Propostas para sua Aplicação nas Aulas Práticas de Disciplinas de Química Analítica Instrumental nos Cursos de Graduação

Djalma M. de Oliveira,* Cleber G. Novaes, Lauro José C. Silva Jr., Rafael S. Pereira, Marcos A. Bezerra

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Química e Exatas, CEP 45206-190, Jequié-BA, Brasil.

* djalmao23@gmail.com

Recebido em 22 de maio de 2015. Aceito para publicação em 23 de setembro de 2015

1. Introdução

2. Parte experimental

2.1. Materiais

2.2. Construção do fluorímetro (FCP)

3. Proposta de Atividade Prática

3.1. Estudo dos espectros de excitação e emissão da quinina

3.2. Estudo da dependência da fluorescência em relação ao pH da solução de quinina

3.3. Estudo do efeito da supressão da fluorescência pelo íon cloreto

3.4. Determinação do teor de quinina em água tônica

4. Resultados e discussão

5. Conclusão

1. Introdução

Luminescência é um termo que se refere ao fenômeno de emissão de radiação por moléculas após sua excitação, gerando uma espécie cujo espectro emitido fornece informações que permitem análises qualitativas e quantitativas. Existem três técnicas analíticas relacionadas com este fenômeno que são: as espectrometrias de fluorescência molecular, de fosforescência e

de quimiluminescência.^{1,2}

Na quimiluminescência a espécie excitada é gerada por uma reação química. Esta espécie pode ser o produto da reação do analito com um reagente apropriado (geralmente um oxidante forte como o peróxido de hidrogênio, H₂O₂), o que torna possível obter o espectro do produto da oxidação do analito ou do reagente. Outra circunstância é aquela em que o analito não está diretamente envolvido na reação, mas pode inibir ou catalisar a reação

quimioluminescente e estar relacionado quantitativamente com estes processos.^{1,3}

Os fenômenos da fluorescência e fosforescência se assemelham quanto à forma de excitação da molécula que é feita por absorção de fótons de uma fonte externa de radiação e, desta forma, podem ser denominados por um termo mais genérico: a fotoluminescência. A liberação de fótons pela molécula excitada está associada a fenômenos radiativos em que parte da energia inicialmente absorvida é dissipada em outras formas de transição não radiativas, como por exemplo, produzindo calor e vibrações nas moléculas, antes de retornar ao estado fundamental (Figura 1). A fosforescência se difere da fluorescência pelo fato das transições eletrônicas responsáveis por esta última não envolver mudança de spin eletrônico, mas apenas relaxamento vibracional até níveis eletrônicos menos energéticos sem desemparelhar os spins. O emparelhamento de spins caracteriza o estado singleto. Antes da emissão de fluorescência, ocorre a transição de um estado singleto excitado para outro estado singleto excitado menos energético, correspondendo a um fenômeno chamado de conversão interna. Como consequência, a emissão de fluorescência se manifesta em um período de tempo menor que 10^{-5} s cessando, quase que instantaneamente, quando a fonte de excitação é desligada. Em contraste, na fosforescência ocorre uma mudança de spin, antes da emissão da radiação, com desemparelhamento de elétrons. O sistema passa de um estado singleto excitado para um estado tripleto excitado (que é mais estável e menos energético), fenômeno este conhecido como cruzamento intersistemas. Isto faz com que a emissão de radiação se mantenha por um período de tempo maior, geralmente vários segundos, mesmo após o término da excitação.^{1,4}

Nos métodos de fotoluminescência, a substância é excitada por radiação de comprimento de onda mais curto (mais energético) do que a radiação emitida (menos energética). A luz emitida por fluorescência ou fosforescência costuma se situar na região visível, enquanto a radiação original (excitante), absorvida pela substância, geralmente está na região do ultravioleta. A emissão de luz em comprimento de onda maior do que a aplicada na excitação decorre da perda de energia por relaxamento não radiativo dos elétrons para níveis eletrônicos mais baixos (Figura 1). Este fenômeno é conhecido como deslocamento Stokes.²

A maioria das moléculas não apresenta fluorescência eficiente. Em vez de liberar a maior parte da energia de seu estado excitado sob a forma de luz, grande parte é perdida na forma de calor para seu entorno. As moléculas que apresentam fluorescência, em geral, têm estruturas rígidas, muitas vezes são planas e apresentam sistemas aromáticos.⁶

O fenômeno da fluorescência é muito atraente e desperta interesse. É muito curioso perceber que uma solução brilha quando submetida a um tipo de luz imperceptível aos olhos. Em algumas casas noturnas a iluminação é feita com lâmpada UV conhecida por “luz negra”, uma fonte de radiação ultravioleta menos energética, que consiste de lâmpadas que emitem luz com comprimento de onda médio em torno de 360 nm, utilizada para provocar efeitos visuais de fluorescência nas vestes das pessoas e em algumas bebidas a base de quinina (água tônica). Lâmpadas que emitem luz na região UV de onda longa ou “luz negra” são também utilizadas na indústria, laboratórios químicos e em artes visuais para revelar imagens e traços que não são visíveis à luz convencional.

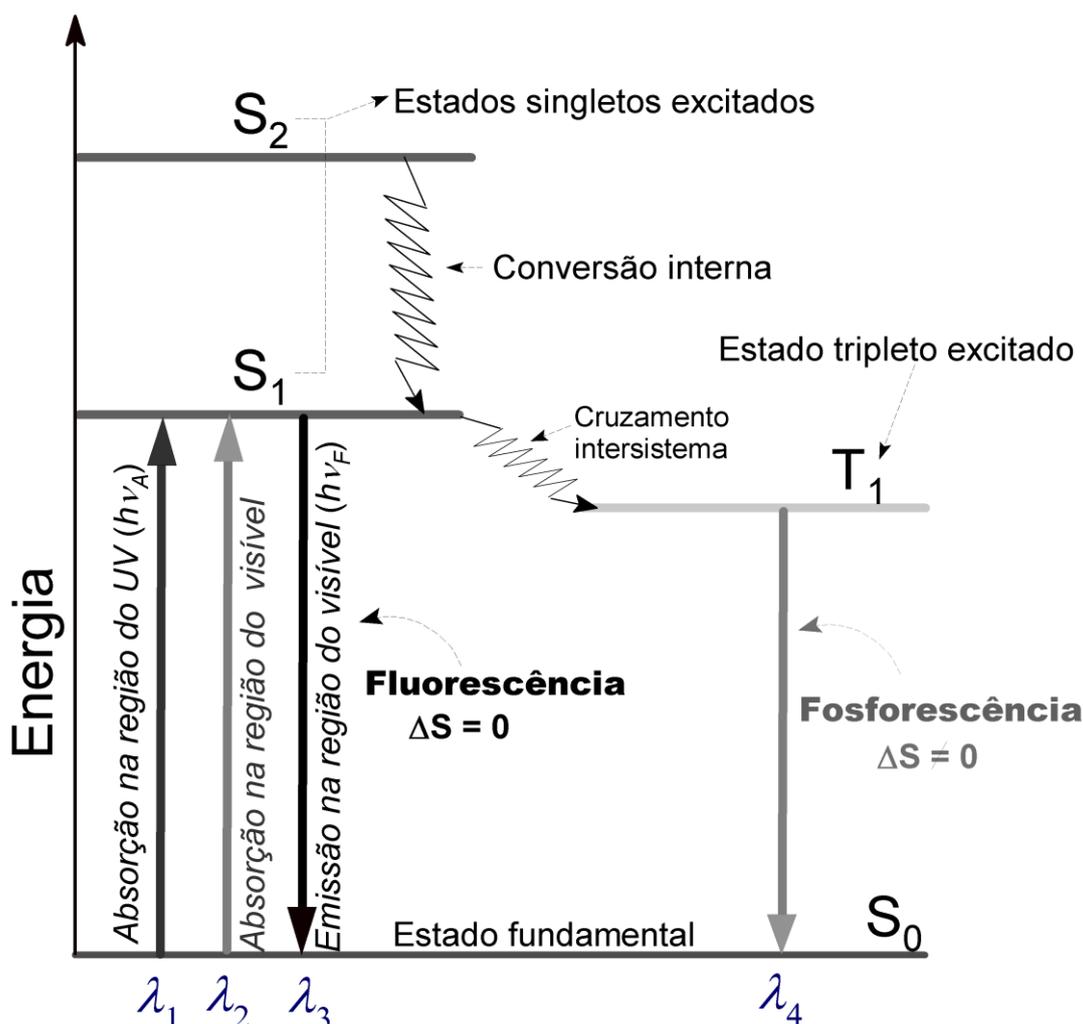


Figura 1. Diagrama de Jablonsky mostrando as transições eletrônicas e relaxamento não radiativo antes da emissão da radiação de fluorescência e fosforescência. (Professor Aleksander Jablonsky nasceu em 26 de fevereiro de 1898 em Voskresenovka, na Ucrânia. Antes de se dedicar totalmente à Física, atuou como músico (violino) na Ópera de Varsóvia (1921-1926). O seu estudo de doutorado em Física rendeu-lhe o artigo “On the influence of the change of the wavelength of excitation light on the fluorescence spectra” publicado em 1930. Em 1935, propôs um diagrama de transições eletrônicas, conhecido pelo seu nome, que explicava a cinética e ambos os espectros de fluorescência, fosforescência.⁵⁾

A fluorescência molecular está presente em muitas substâncias que fazem parte do nosso dia-a-dia. Além da quinina da água tônica, alguns exemplos são os alvejantes ópticos presentes em sabões para roupas, as vitaminas do complexo B, a clorofila, pigmentos presentes em algumas tintas, flavonoides em flores, o alcaloide β -carbolina e a 4-metil-7-hidroxycumarina existentes na cutícula de escorpiões, etc.^{7,8} Atualmente, o

uso da fluorescência molecular é uma poderosa ferramenta de investigação em diversas áreas. Algumas aplicações em Química Analítica são: a quantificação de substâncias de interesse ambiental,⁹⁻¹³ farmacológico,¹⁴⁻¹⁶ alimentar.¹⁷⁻²⁰ Os sensores de fluorescência são muito empregados em detectores para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), técnica analítica empregada na identificação, quantificação,

separação e purificação de inúmeras espécies químicas;²¹⁻²² principalmente no desenvolvimento de métodos mais sensíveis que se baseiam no aumento da fluorescência provocado por nanoestruturas.²³⁻²⁵ Podemos citar ainda, o emprego de detectores de fluorescência em sistemas de análise por injeção em fluxo,^{12,26} bem como, a associação desses detectores a métodos de separação e pré-concentração para melhoria do poder de detecção de espécies químicas que ocorrem em quantidades muito pequenas,^{27,28} entre outras aplicações. Na Biologia podemos citar o emprego da microscopia de fluorescência na detecção de estruturas celulares.^{29,30}

A intensidade de fluorescência de uma substância é proporcional à sua massa, uma propriedade bastante útil para o desenvolvimento de métodos quantitativos. Os equipamentos disponíveis para este fim, a depender do nível de complexidade, podem ser muito caros e a aquisição dos mesmos apenas se justifica quando aplicados à pesquisa. No entanto, os princípios aplicados na construção destes equipamentos podem ser simplificados, tanto em escala, como na parte tecnológica, de modo a permitir a fabricação de instrumentos artesanais capazes de realizar medidas de fluorescência. É claro que estes instrumentos artesanais apresentam limitações quando comparados aos equipamentos comerciais, porém, sua construção possibilita aos alunos de graduação um melhor domínio dessa técnica instrumental e uma maior compreensão do fenômeno da fluorescência.

Normalmente, as aulas práticas de Química Analítica Instrumental na graduação, que abordam técnicas de espectrometria de fluorescência molecular, só ocorrem quando há a disponibilidade de espectrofluorímetros comerciais, geralmente adquiridos com recursos destinados a cursos de pós-graduação e projetos de pesquisa, devido ao custo elevado deste equipamento.³¹ Desta forma, os alunos de instituições que não desenvolvem pesquisas nesta área deixam de vivenciar um importante fenômeno óptico e uma sensível técnica de quantificação.

Neste trabalho, pretende-se propor

atividades para aulas práticas de disciplinas relacionadas à Química Analítica Instrumental que despertem o interesse dos alunos da graduação na investigação do fenômeno da fluorescência molecular desenvolvendo as seguintes abordagens: (1) construção de um fluorímetro artesanal com material de baixo custo, (2) análise de espectros de fluorescência da quinina, (3) a investigação do efeito do pH e da presença de sais de haletos na intensidade de fluorescência da quinina e (4) medição da intensidade da radiação de emissão empregando um medidor de fluorescência artesanal de forma que o aluno perceba os princípios de seu funcionamento, e seja capaz de entender a correlação entre a concentração da substância fluorescente e a intensidade da fluorescência emitida, bem como, a aplicação dessa técnica na análise de amostras reais.

2. Parte experimental

2.1. Materiais

Para a medida da intensidade de fluorescência das soluções trabalhadas foi utilizado um fluorímetro de construção própria (FCP). O sinal analítico obtido no FCP, relacionado à intensidade de fluorescência, foi medido em milivolts (mV). Sulfato de quinina ($(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$, Sigma-Aldrich) foi utilizado no preparo das soluções padrão. As soluções de quinina foram preparadas em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções tampão utilizadas foram de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH entre 1,6-5,7: glicina (1,6 e 2,0) e acetato (3,7; 4,8 e 5,7). Uma solução de NaCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada para o estudo do efeito de supressão da fluorescência por íons cloreto. As amostras de água tônica foram adquiridas no comércio local. Os dados foram coletados e tratados utilizando o programa Origin Pro 8.1®.

2.2. Construção do fluorímetro (FCP)

O fluorímetro de construção própria (Figura 2) foi projetado visando o aproveitamento ou reciclagem de materiais eletrônicos de baixo custo e material de sucata. A motivação para construção do fluorímetro de construção própria surgiu a partir da leitura de artigos sobre o tema

publicados pelos autores: Sartori & Loreto³²; Wahab³³ e Tedetti, Joffre & Goutx.³⁴ O modelo construído apresenta algumas características, tais como: a montagem compacta do sistema; a obtenção do sinal analítico na forma de voltagem; a instalação de um vão após o compartimento da cubeta, para evitar a reflexão da radiação e geração de luz espúria e o acoplamento do filtro de radiação na própria cubeta da amostra.

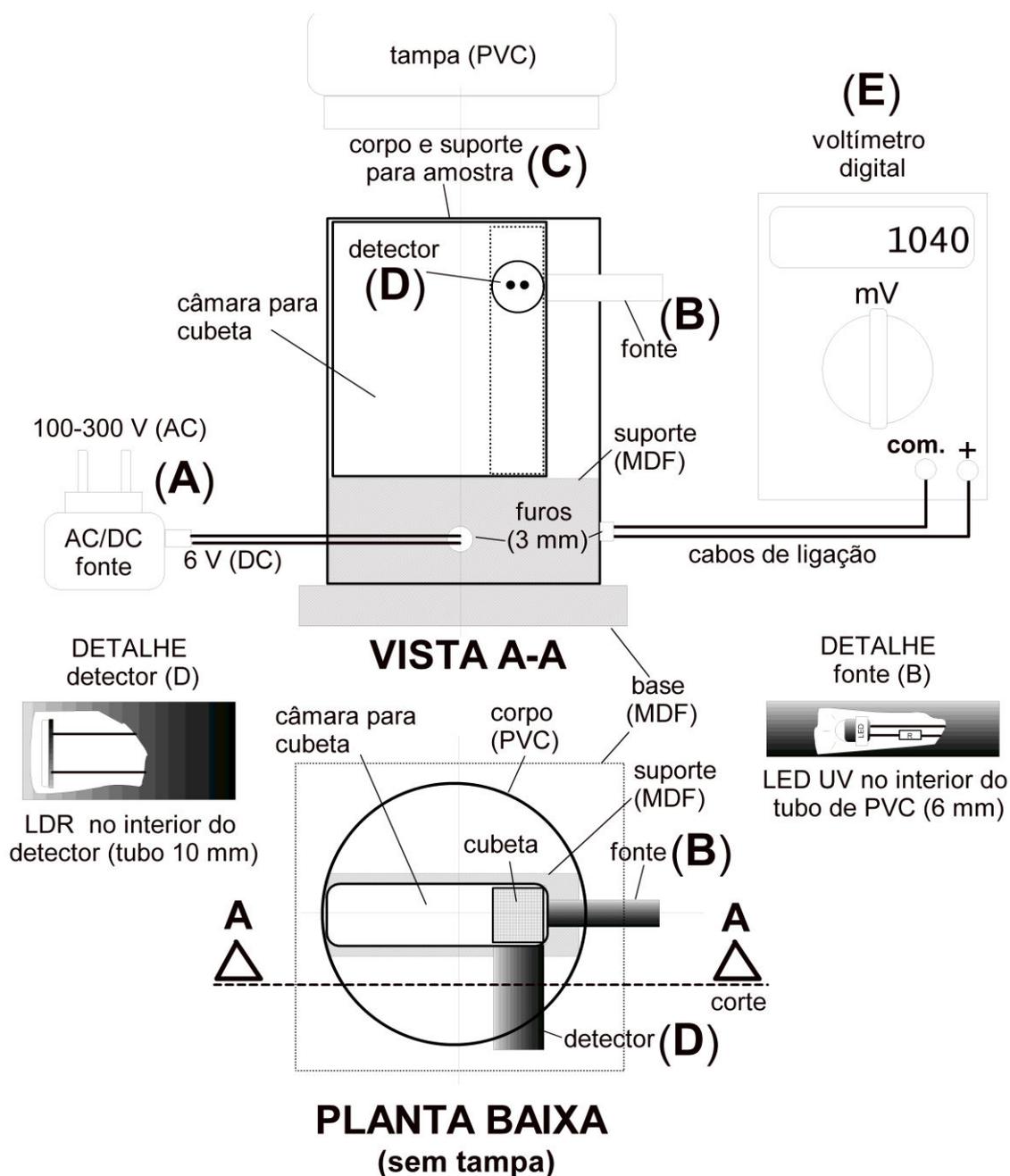


Figura 2. Projeto esquemático do FCP. As dimensões estão disponíveis na Parte Experimental

A montagem do FCP (Figura 3) foi feita utilizando um tubo de PVC preto de 7,0 cm de diâmetro interno e 10,5 cm de comprimento (suporte), montado sobre uma placa de compensado de fibra de madeira (base), tipo MDF, de 12 x 12 cm. No interior do tubo, na parte superior, foi fixada uma caixa de polipropileno preta com tampa (dimensões: 1,5 x 4,5 x 7,0 cm), a qual constitui a câmara com encaixe para a cubeta. Esta câmara foi conectada ao detector e à fonte de luz UV por meio de furos laterais. No espaço entre a câmara e as paredes internas do tubo suporte de PVC foram instalados os circuitos de alimentação, conversão e amplificação do sinal analógico como tensão de saída (V_s), correspondente à intensidade de luz fluorescente detectada da amostra.

As peças e componentes eletrônicos do FCP foram adquiridos no mercado e sucata doméstica reutilizada, constituindo as seguintes partes (Figura 3): (A) suprimento de energia elétrica para funcionamento do FCP, obtido de uma fonte de alimentação tipo conversor AC/DC com tensões de entrada de 100-300V (CA), tensão de saída para 6,0 V (CC) e 1,2 Amperes de capacidade. Alternativamente, a fonte de alimentação pode ser substituída por 4 pilhas AA de 1,5 V ligadas em série em um suporte plástico para pilhas; (B) fonte de radiação de excitação constituída de LED de InGaN/Safira (400nm) e resistor de 100 ohms, embutida em um pequeno tubo de polipropileno preto de 0,6 cm, reutilizado de caneta esferográfica; (C) recipiente com a dupla função de porta amostra e filtro de comprimento de onda, constituído por uma cubeta quadrada de polimetilmetaacrilato (PMMA, 1x1x5 cm) forrada com três lâminas sobrepostas de celofane; (D) detector da radiação fluorescente, formado por um fotorresistor tipo LDR, instalado no interior de um tubo de PVC preto de 2,0 cm de comprimento e 1,3 cm de diâmetro e circuito para extração do sinal analógico de tensão, V_s , ligado ao detector e constituído de um potenciômetro de 10^6 ohms (1 M Ω) conectado em série com o fotorresistor e (E) medidor indicador, tipo multímetro digital, modelo DT-830B, ajustado

na função voltímetro e conectado aos terminais do potenciômetro. Os tubos contendo a fonte luminosa e o detector foram fixados com massa epóxi nos furos laterais na caixa de polipropileno com tampa (câmara). O assoalho da câmara foi preenchido com tiras de espuma vinílica acetinada (EVA), de cor preta para acomodar a cubeta-filtro perpendicularmente à fonte de luz e ao detector de modo a estabelecer o caminho óptico do fluorímetro. Todo o interior da câmara foi lixado internamente para não refletir a radiação da fonte diretamente para o detector. Foi deixado um espaço vazio, após o porta cubeta, para atenuar a radiação que emerge após esta atravessar a amostra. O acabamento final do exterior e do interior da câmara foi feito com uma camada de tinta acrílica preta fosca, para reforçar a vedação e evitar a sensibilização do detector com luz não fluorescente vinda do meio exterior. O detector e a fonte de radiação foram instalados à mesma altura em lados adjacentes da cubeta-filtro formando um ângulo de 90°.

Foram preparadas quatro cubetas-filtros, variando as cores dos celofanes (azul, verde, laranja e vermelho). O número ideal de folhas de celofane sobrepostas para constituir um filtro eficiente foi definido com base no valor máximo de fluorescência obtido para uma determinada concentração do analito. Para a determinação da quinina, p. ex., foram necessárias três camadas de celofane verde para o filtro.

A extração do sinal de saída do FCP foi feita com um circuito divisor de tensão, que permitiu a obtenção de sinais de resposta entre 0-2000 mV, com precisão de ± 25 mV. Parâmetros considerados satisfatórios para um equipamento analítico de uso didático, constituído por um detector baseado em um sensor óptico simples, sem recursos de amplificação óptica de sinal, como tubos fotomultiplicadores, os quais são altamente sensíveis, mas que elevariam significativamente o custo final do fluorímetro caseiro proposto. O diagrama de blocos (Figura 3.I) mostra os componentes

básicos do FCP.

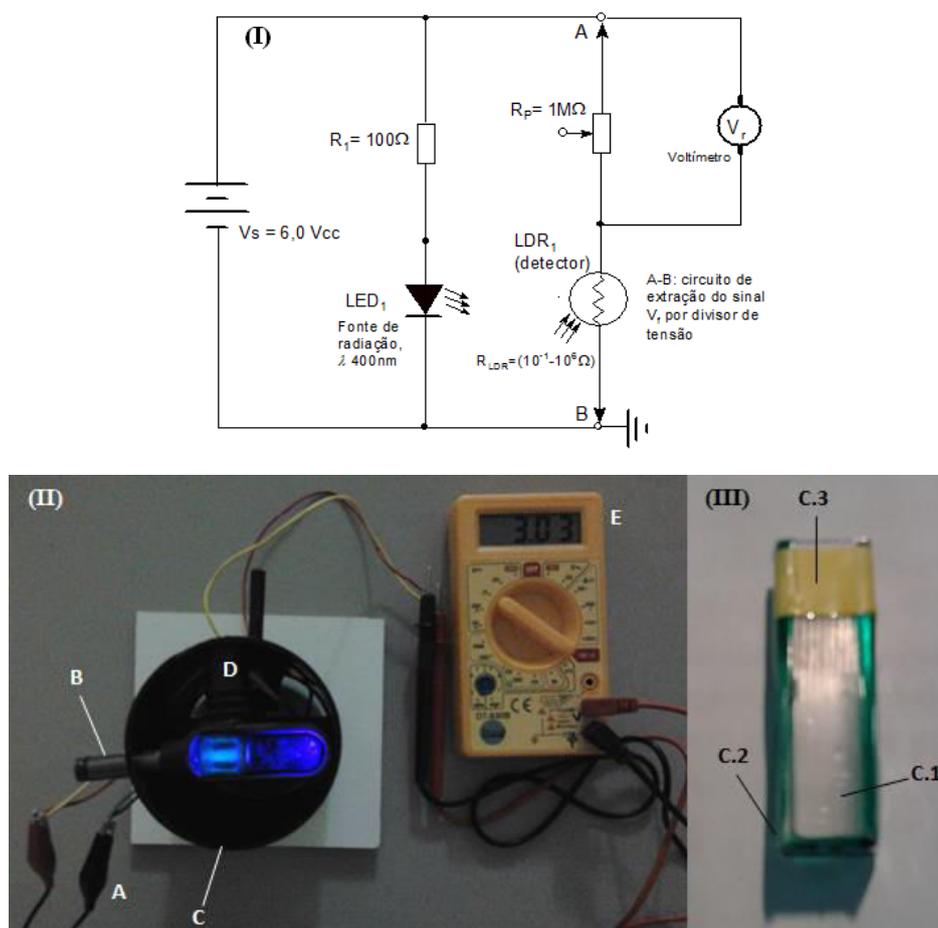


Figura 3. (I) Circuito elétrico do medidor de fluorescência molecular FCP com extração do sinal por divisor de tensão, (II) FCP em funcionamento: A – Conexão elétrica da fonte retificada de 100-300 VCA/6 VCC, 1A, (saída); B – fonte de radiação ultravioleta (UV-LED); C - Porta cubeta (caminho óptico 1,0 cm); D – detector LDR em ângulo de 90° com o tubo da fonte de radiação, E - multímetro, (III) Detalhe da cubeta modificada para medida de fluorescência: C.1 - cubeta quadrada de polimetilmetacrilato (PMMA) 10 mm, 4,5 mL; C.2 – filtro verde de celofane para medida da fluorescência da quinina e C.3 – suporte do filtro. Fonte: acervo de fotos dos autores

3. Proposta de Atividade Prática

3.1. Estudo dos espectros de excitação e emissão da quinina

Inicialmente, o aluno é levado a analisar os espectros de excitação e emissão, bem como condições experimentais necessárias ao desenvolvimento da prática visando à

determinação do analito, tais como: parâmetros instrumentais, influência do pH e da presença de íons haletos. Foi escolhida a quinina em amostra de água tônica. Para que essa etapa da atividade se efetive, os estudantes recebem os espectros de excitação e de emissão da quinina impressos para observação e análise. Cabe ao professor estimular a exploração destes espectros chamando a atenção para suas características e peculiaridades, além de formular perguntas

sobre a escolha do comprimento de onda adequado à excitação, bem como a escolha do filtro que melhor selecionará o comprimento de onda correspondente à emissão de fluorescência para a quantificação da quinina em uma solução.

3.2. Estudo da dependência da fluorescência em relação ao pH da solução de quinina

Nesta etapa, os estudantes são orientados a preparar soluções padrão de concentração $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de quinina, usando tampões adequados, em diferentes valores de pH (1,6; 2,5; 3,7; 4,8 e 5,7). Em sequência, as intensidades de fluorescência das soluções são medidas no FCP. Os estudantes são conduzidos à reflexão sobre o fenômeno e propor explicações com base na observação da estrutura molecular da quinina (Figura 4) e interpretação da curva referente ao gráfico de pH *versus* o sinal de saída, V_s (Figura 6.II).

3.3. Estudo do efeito da supressão da fluorescência pelo íon cloreto

Para a avaliação da influência do íon cloreto presente em soluções de quinina, os estudantes preparam soluções padrão de concentração $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de quinina, contendo volumes crescentes (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mL) de solução de NaCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. A intensidade de fluorescência dessas soluções é medida empregando-se o FCP e os

dados utilizados para construir as curvas da concentração de cloreto de sódio *versus* V_s e do logaritmo da concentração do íon cloreto ($\log[\text{Cl}^-]$) *versus* V_s . Ao estudante é solicitada a análise do comportamento das curvas e a explicação às variações que ocorrem na intensidade de fluorescência ao se aumentar a concentração de NaCl na solução contendo quinina.

3.4. Determinação do teor de quinina em água tônica: observando a relação entre a concentração de quinina e a intensidade de fluorescência

A partir da solução estoque $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de quinina em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, os estudantes preparam soluções padrão nas concentrações de 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 24,0 e $32,0 \text{ mg L}^{-1}$. Estas soluções têm as intensidades de fluorescência medidas no FCP utilizando uma cubeta-filtro verde. Os valores de concentração e do sinal V_s são utilizados para construir a curva analítica. A água tônica utilizada na determinação da quinina é previamente diluída na razão de 1:5 (v/v) com H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e as amostras, preparadas em triplicata, são agitadas vigorosamente para homogeneização e eliminação de bolhas de CO_2 , evitando com isso, possíveis erros de medida do sinal analítico. Os estudantes definem a equação da reta ajustada à curva analítica, e com os valores de tensão, V_s medidos nas amostras de água tônica, calculam o valor da concentração média de quinina nas mesmas e a estimativa do erro experimental.

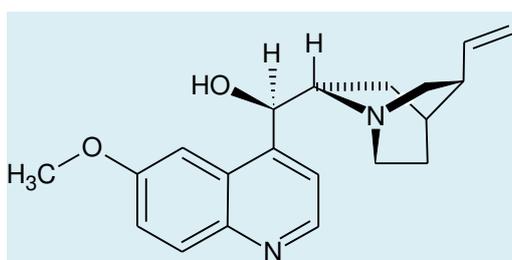


Figura 4. Estrutura molecular da quinina

4. Resultados e discussão

A apresentação da fluorescência molecular a partir de materiais facilmente encontrados no cotidiano desperta nos alunos o interesse pelo seu entendimento. Esta abordagem pode ser utilizada como recurso didático ao se tratar de conteúdos relacionados com a estrutura molecular da matéria e suas interações com a luz, bem como as transições eletrônicas decorrentes e os métodos analíticos desenvolvidos com base nesses fenômenos.³⁵⁻³⁹

A principal inovação tecnológica introduzida no dispositivo artesanal apresentado neste trabalho consiste na possibilidade de medir os valores de intensidade de fluorescência em unidades de tensão elétrica, de modo similar ao que ocorre em um fluorímetro comercial, considerando que a voltagem é o sinal analógico de saída comum aos equipamentos disponíveis em laboratórios de Química Analítica.

O medidor de fluorescência artesanal FCP mostrou ser um equipamento fácil de construir e de operar, confiável, robusto e de baixo custo. As medidas da intensidade de fluorescência foram, dentro da faixa testada, proporcionais às concentrações do analito nas amostras analisadas, mostrando que o equipamento pode ser utilizado para análise quantitativa, bastando para isso aplicar um procedimento de calibração com soluções padrão.

Alguns recursos técnicos propostos na construção do FCP proporcionaram medições e aferições mais cômodas e confiáveis, como por exemplo, o design do compartimento de amostra, construído para possuir um vão de espaço vazio entre a cubeta e os limites dessa câmara, além de apresentar características especiais (paredes internas sem arestas, de cor negra e fosca) para evitar que parte da radiação de excitação retorne por reflexão para o detector como radiação espúria e afete a precisão das medidas. A instalação do

filtro na própria cubeta torna a sua substituição um procedimento bastante cômodo e prático; se uma substância demandar um filtro diferente para sua determinação, basta substituir a cubeta por outra com um filtro adequado.

A construção do fluorímetro artesanal contribui para desmistificar a ideia de “caixa preta” atribuída aos equipamentos científicos, cujo conteúdo e funcionamento se desconhecem, ou apenas pessoas ditas “experts” têm acesso. Algumas propostas de fluorímetros artesanais simples ou cuja construção demanda maior complexidade podem ser encontradas na literatura.^{32-34,40-42}

O dispositivo FCP foi construído com sucata e material elétrico e eletrônico de fácil aquisição e custo final acessível, conforme Tabela 1. A Figura 3.II mostra o dispositivo FCP depois de montado e em funcionamento e a Figura 3.III mostram detalhes das cubetas com filtros acoplados.

Durante a construção do fluorímetro, o aluno é convidado a pensar nas seguintes questões: (1) Por que utilizar uma fonte que emita radiação ultravioleta para excitação da molécula? (2) Por que o detector é posicionado a um ângulo de 90° em relação à fonte de excitação? (3) Quais dificuldades poderiam ser enfrentadas ao utilizar um ângulo de 180°? (4) Qual a função do filtro de celofane posicionado em frente ao detector? (5) Por que algumas espécies químicas demandam filtros de cores diferentes? (6) Como escolher estes filtros?

A quinina, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 4, é um alcaloide de massa molar 324,43 g mol⁻¹, extraído da casca de *Cinchona officinalis* L, planta conhecida pelo nome popular de quinquina que foi utilizada por muitos anos como agente no combate aos sintomas da malária. As formas de uso medicinal são o di-hidrocloridrato de quinina ou o sulfato de quinina.⁴³

Tabela 1. Componentes do FCP adquiridas no comércio de Jequié/BA

Componentes	Especificação	Fabricante	Custo (R\$)
A- Fonte de alimentação	1 fonte retificada de 100-300VCA/6VCC (saída)	D-Link (China)	10,00
B- Fonte de excitação	1 LED-UV (λ 390-405 nm) ⁽¹⁾	Genérico (China)	1,50
B.1- Resistor	1 Resistor 100 Ohm/1/8 W/ 5% tolerância.	Genérico (China)	0,50
C- Porta amostra	1 Caixa de polipropileno de cor preta utilizada para embalar chicletes	Clicletes Mentos (Brasil)	4,00
C.1- Cubeta	3 Cubeta de polimetilmetacrilato (PMMA) 45 x 10 mm - 4,5 mL	Genérico (China) LojaLab	16,00
C.2- Padrão quinina 5% (amostra teste)	Refrigerante a base de quinina	Schim (Brasil)	1,80
C.3- Filtros de banda de frequência de fluorescência	4 Folhas de papel celofane transparente (verde, amarelo, azul e vermelho). ⁽²⁾	Genérico, papelerias (Brasil)	2,80
D- Detector	1 LDR, d.i. = 10 mm/10-3-10 K Ω ⁽³⁾	Token (Taiwan)	5,00
D.1- Resistor de ajuste da tensão de saída	1 Potenciômetro de 1 M Ω	Shenzhen Sealand (China)	12,00
E- Registrador	1 Multímetro digital DT-830B com voltímetro VCC (escala 0-4,0 volts)	Smart (China)	25,00
F- Invólucro externo de Sucata de tubo de PVC	1 tubo de PVC de 15,0 cm (d.i de 50 mm).	Sobras material construção da UESB.	4,00
F.1- Tubos para sustentação, colimação da luz e proteção da fonte de UV e do detector.	3 Tubos de plásticos PU ou PVC: 1 de 10,5 cm (d.i de 70 mm) 1 de 5,0 cm (d.i.= 6 mm) e 1 de 2,0 cm (d.i = 10 mm), utilizados para (1) montar o FCP, (2) embutir os conjuntos LED-resistor e (3) proteger o LDR.	Recurso próprio obtido de canetas usadas	0,00
F.2- Sucata MDF4	2 Placas de compensado MDF 6 mm de espessura (10 x 5 e 12 x 12 cm).	Sobras de marcenarias	0,00
Custo Total			82,60

Notas: (1) LED – Light emissor diode; (2) Para amostras de riboflavina (Vitamina B2) e quinina, utilizar filtro verde. Para clorofila, utilizar filtros vermelhos. (3) LDR – Light dependent resistor; (4) MDF – Medium-Density Fiberboard (em inglês) ou placa de fibra de madeira de média densidade.

A água tônica é uma bebida carbonatada que contém quinina. A bebida ganhou este nome pelos seus efeitos terapêuticos e pelo seu sabor desagradável. Quinina era adicionada à bebida como um profilático contra a malária, desde que foi originalmente intencionada para seu consumo nas zonas tropicais da Índia e África onde a doença era uma epidemia. Contudo, hoje em dia, a água tônica contém uma insignificante quantidade de quinina para ter efeitos terapêuticos, e é somente consumida pelo seu apreciado sabor levemente amargo. A quinina é um composto que apresenta alta fluorescência em soluções ácidas diluídas, podendo ser determinado em quantidades traço. O sulfato de quinina é utilizado como padrão pelos fabricantes de fluorímetros e espectrofluorímetros para indicar a sensibilidade de seus equipamentos.

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência não podem ser obtidos no FCP. Porém, a análise destes espectros é uma atividade muito elucidativa e contribui para o aluno entender como se dá a escolha dos comprimentos de onda de excitação e emissão para cada substância estudada, antes de um experimento quantitativo com o FCP.

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência molecular podem ser obtidos usando-se um espectrofluorímetro convencional. Este é um instrumento que

utiliza dois monocromadores sofisticados como as redes de reflexão (e não filtros de absorção como nos fluorímetros) para seleção dos comprimentos de onda de excitação e de emissão. A Figura 5 apresenta os espectros de excitação e emissão de fluorescência molecular obtidos em um espectrofluorímetro, a partir de uma solução de quinina em meio de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, em comprimentos de onda distintos.⁴⁴

A exploração dos espectros apresentados na Figura 5 é uma oportunidade didática de aprendizagem sobre o uso do fenômeno da fluorescência em análise quantitativa. Sendo assim, o aluno é convidado a pensar sobre as seguintes questões: (1) Nos espectros de excitação molecular da quinina se observa um pico intenso centrado em 240 nm. Por que não se utiliza este comprimento de onda para a determinação dessa substância? (2) Qual o segundo comprimento de onda pode ser utilizado para excitação da quinina? (3) Com base nos espectros da Figura 5, quais os comprimentos de onda de excitação e emissão que devem ser escolhidos para medir teores de quinina com maior sensibilidade? Por quê? (4) O que acontece com o perfil e com a intensidade de emissão da quinina quando se opta por trabalhar com os comprimentos de onda mais curtos do espectro de excitação?

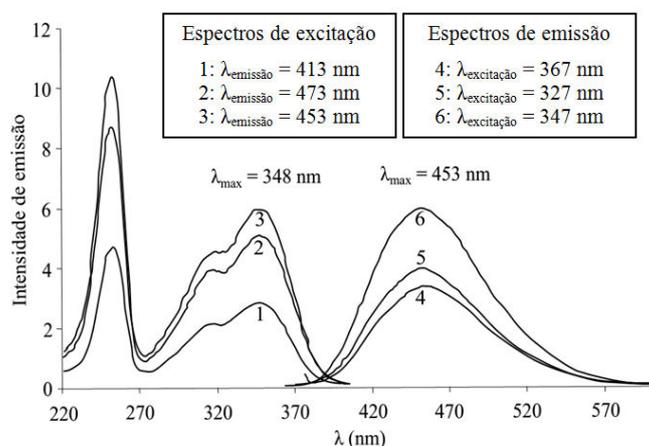


Figura 5. Espectros de excitação e emissão em diferentes comprimentos de onda para a quinina em meio de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol/L}$. Fonte: Aucejo, Estellés e Hernández, pag. 73⁴⁴

Respondendo estes questionamentos, o aluno é levado a considerar que, independente do comprimento de onda fixado para excitação ou emissão de uma molécula, os perfis dos espectros são mantidos, havendo mudanças na magnitude das intensidades. Na Figura 5 é mostrado o estudo do espectro de excitação, no qual foram selecionados três diferentes comprimentos de onda para a medida da intensidade de emissão. Deve-se notar que a intensidade mais alta ocorre para o comprimento de onda em 453 nm. Este é o valor que atinge o máximo da intensidade para o espectro de emissão de fluorescência. O mesmo raciocínio pode ser empregado para análise dos espectros de emissão obtidos para três diferentes comprimentos de onda que excitam as moléculas de quinina. Uma maior intensidade de emissão ocorre quando se utiliza luz de comprimento de onda em 347 nm para excitação. Notamos, no entanto, que este pico é o segundo mais intenso do espectro de excitação, depois do pico em 240 nm. A escolha do comprimento de onda de excitação para uma espécie fluorescente é decorrente da consideração de diferentes aspectos, não apenas a intensidade de emissão, mas também, a comodidade operacional e a robustez dos resultados gerados. Por isso, uma fonte de luz UV com $\lambda_{\text{máx}}$ em 240 nm não foi selecionada para excitar a molécula de quinina, pois, apesar de ser mais intensa, apresenta resposta com pouca robustez. Como se trata de uma banda de excitação muito estreita, em torno de 245 ± 15 nm, o efeito de uma pequena variação na fonte de excitação, além desses limites, resulta em grandes erros de medida. Além disso, a faixa de trabalho de comprimento de onda entre 230-260 nm fica situada em uma região do UV que encareceria significativamente o preço da fonte de radiação e exigiria cuidados adicionais com segurança, como o uso de óculos especiais, por se tratar de uma região do UV que pode provocar lesões aos olhos do operador.

A fonte de excitação utilizada no FCP foi um UV-LED, que emite luz UV em uma pequena faixa de comprimentos de onda em

torno de 400 nm (pico máximo), funcionou de modo eficaz na análise da quinina e pode também servir para analisar outras espécies com espectros de excitação entre 350-450 nm. Entretanto, para moléculas que necessitem de radiação eletromagnética de comprimento de onda mais energéticas, inferiores a 350 nm para excitação, o UV-LED deve ser substituído. Atualmente, encontramos disponíveis no mercado diversos UV-LED's que emitem radiação em comprimentos de onda que vão de 350 a 280 nm, e até mesmos UV-LED's de $\lambda_{\text{máx}}$ menor que 265 nm (deep UV-LED), utilizados para desinfecção biológica de água e ferramentas cirúrgicas.

A Lei de Beer-Lambert mostra que a intensidade de fluorescência molecular (I_f) é proporcional a intensidade da energia radiante absorvida ($P_0 - P$), sendo P_0 a energia total incidente e P a energia não absorvida ou transmitida. Para uma determinada substância, I_f está relacionada exponencialmente com a concentração (C) e com a absorvidade molar (ϵ) dessa substância. Sabendo-se que $I_f = K (P_0 - P) = K P_0(1 - P/P_0)$, onde K é uma constante que depende das condições experimentais e do rendimento quântico (razão entre número de fótons fluorescentes e fótons absorvidos), a fração de energia radiante absorvida pela substância é $P/P_0 = 10^{-\epsilon b C}$, onde b é igual ao caminho óptico, portanto, $I_f = K (1 - 10^{-\epsilon b C})$, nesta expressão o termo $(1 - 10^{-\epsilon b C})$ pode ser expandido a uma série de Maclaurin. A análise dos termos da série obtida, nos leva a concluir que a intensidade de fluorescência pode ser dada por $I_f = 2.303(\epsilon b C) K P_0$, quando a parcela correspondente a $2.303(\epsilon b C)$ for menor que 0,05 e, assim, os termos subsequentes da série tornam-se desprezíveis. E, isso só é possível para soluções diluídas da substância fluorescente. Sem dúvida, a análise deste fenômeno óptico nos leva a concluir que uma solução concentrada de uma substância que absorve fortemente (grande absorvidade molar) tenderá a absorver toda ou quase toda a radiação luminosa incidente na parte da solução que está mais próxima da fonte de radiação, não permitindo que o feixe de luz

atravesse toda a extensão da amostra, tornando-o fraco ou até mesmo extinguindo-o, assim, podemos verificar matematicamente que o valor de I_f tenderá a se tornar constante ($I_f = KP_0$), não mais respondendo às variações de concentração da substância fluorescente, C. Deste modo, visando contornar os fatores limitantes acima expostos, a análise de uma amostra real foi antecedida pela preparação de uma curva analítica. As soluções padrão do sulfato de quinina foram preparadas em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. As preparações em meio ácido objetivaram uma maior eficiência na fluorescência e melhoria da sensibilidade, porque a molécula de quinina apresenta maior estabilidade quando protonada.^{1,2}

A curva analítica da Figura 6.I obtida com as leituras das intensidades de fluorescência contra os valores das concentrações de soluções padrão ($4,0$ a $32,0 \text{ mg L}^{-1}$), mostrou um excelente ajuste a função linear ($y = 53,39x + 2644$) em que y é o sinal analítico (mV) e x é a concentração (mg L^{-1}). A curva analítica obtida apresentou linearidade, com coeficiente de determinação igual a $0,9980$. A amostra de água tônica foi diluída na razão de $1:5$ (v/v) com solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ para que seu sinal de emissão de fluorescência ocorresse dentro da faixa dinâmica linear do método. Na análise de uma amostra de água tônica, realizada com o FCP, a concentração de quinina encontrada foi de $79,80 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$. Como a concentração máxima de quinina permitida nesta bebida é 83 mg L^{-1} ,⁴⁵ pode-se notar que o equipamento desenvolvido pode ser aplicado na análise deste tipo de amostra.

Paralelamente, também foi realizado um estudo utilizando o FCP para se observar o efeito do pH sobre a intensidade de fluorescência de uma solução de quinina. Compostos aromáticos com substituintes ácidos ou básicos no anel, como é o caso da quinina, normalmente apresentam a fluorescência dependente do pH. Os comprimentos de onda e a intensidade de emissão são diferentes para as formas ionizadas e não ionizadas de um composto

fluorescente. Esse estudo, conforme representado na curva da Figura 6.II, foi realizado com soluções da água tônica cujos valores de pH variaram de $1,6$ a $5,8$. Nota-se que, à medida que o pH aumenta, a intensidade de fluorescência da quinina cai exponencialmente, mostrando a importância do controle cuidadoso dessa variável. As diferenças nas intensidades de emissão em diferentes valores de pH surgem do número de diferentes espécies ressonantes associadas às formas ácidas e básicas da molécula de quinina. Na Figura 4, observamos que a estrutura da molécula de quinina apresenta dois grupos alcaloides, um quinolizidínico e outro quinolínico (aromático), onde, os dois heteroátomos de nitrogênio são bases de Lewis que podem sofrer protonação em meios com distintos valores de pH ácido. A protonação do nitrogênio aromático origina estruturas de ressonância mais estáveis no estado excitado, evitando a desativação não radiativa. Como consequência, a intensidade de emissão de fluorescências em baixos valores de pH são maiores que em valores mais altos.^{1,2}

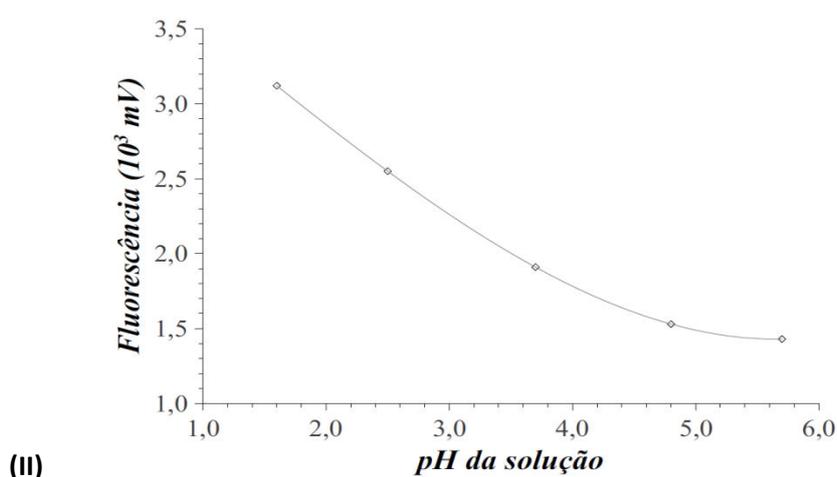
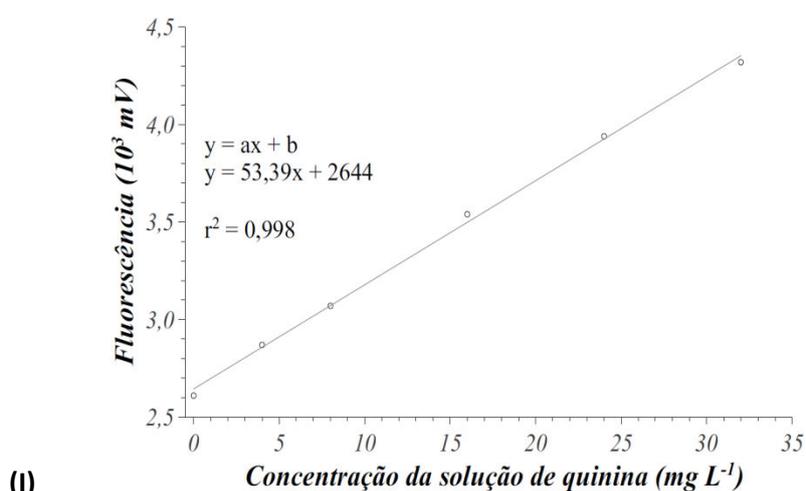
Os íons haleto, como o cloro, influem sobre a intensidade de fluorescência de compostos como a quinina causando um efeito chamado *quenching*, efeito que pode ser definido como uma transferência de energia da molécula excitada, por processos não radiativos, para outras espécies químicas, ditas agentes desativadores - ADs, fazendo com que uma parte de moléculas fluorescentes, proporcional a população desses ADs, passem para o estado fundamental, diminuindo o rendimento quântico. O *quenching* é um processo colisional, e por isso, requer o contato entre as espécies envolvidas. Em consequência, a magnitude dessa desativação é função da concentração do AD e da sua capacidade de difusão no meio. O efeito da desativação da quinina em solução, contida na água tônica, foi estudado por meio da adição de volumes crescentes (1 a 6 mL) de solução de $NaCl$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e utilizando o FCP na medida do sinal analítico. Os resultados deste estudo podem ser observados na Figura 6.III, onde se nota

uma queda exponencial do sinal com o aumento da concentração do íon Cl^- no meio.

O efeito *quenching* é um fenômeno que acontece de forma tão regular que existem métodos analíticos que se baseiam na sua aplicação.⁴⁶⁻⁵⁰ A determinação de cloreto, espécie que não apresenta fluorescência molecular, pode ser realizada indiretamente por meio da construção de uma curva analítica baseada na supressão de sua fluorescência causada por diferentes concentrações de cloreto. Como os sinais obtidos não se comportam de forma linear em relação à concentração, a curva analítica é obtida através do gráfico do logaritmo da

concentração de cloreto versus o sinal de intensidade de fluorescência da quinina (Figura 6.IV). A curva analítica resultante apresenta um coeficiente linear negativo (descrita pela equação de Stern-Volmer). A magnitude da supressão da fluorescência da quinina é proporcional à quantidade de cloreto na mistura e a concentração deste ADs é encontrada por interpolação na curva analítica.⁴⁴

Os estudos realizados com a quinina, aqui apresentados, são de simples realização, didáticos, facilmente reproduzíveis e incitam a curiosidade científica dos alunos.



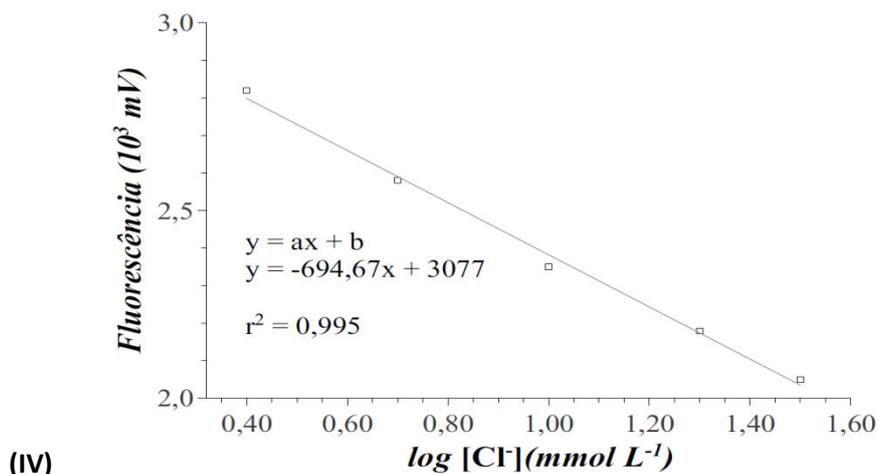
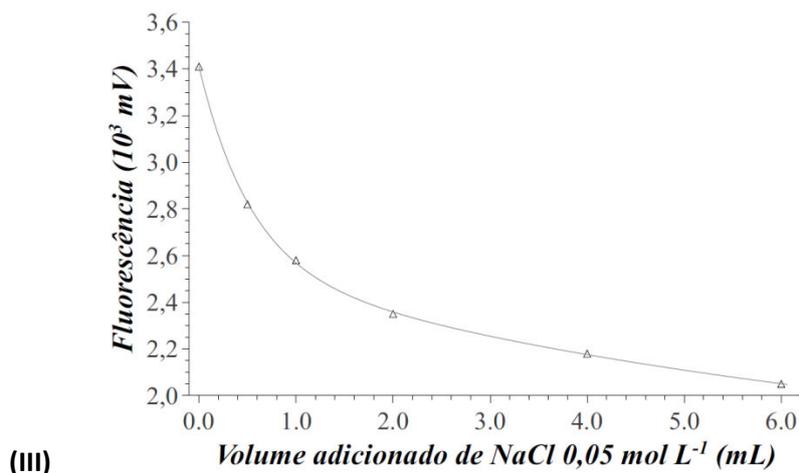


Figura 6. Estudos com a quinina usando o fluorímetro feito em casa (I) curva analítica mostrando a relação entre concentração da solução e a intensidade de fluorescência, (II) Efeito do pH de uma solução padrão de quinina 20 mg L⁻¹ sobre a intensidade de fluorescência, (III) Efeito do volume da solução de NaCl 0,05 mol L⁻¹ adicionado às soluções padrão de quinina 20 mg L⁻¹ sobre a intensidade de fluorescência e (IV) linearização dos dados do estudo do efeito do NaCl na fluorescência por obtenção do logaritmo das concentrações do cloreto

5. Conclusão

Aulas práticas sobre fluorescência molecular utilizando-se um fluorímetro artesanal e materiais de baixo custo podem ser introduzidas nas disciplinas relacionadas à Química Analítica Instrumental, contribuindo para que o aluno possa vivenciar esta importante técnica espectrométrica na graduação. As atividades propostas neste trabalho abrangem desde a observação do

fenômeno da fluorescência até investigações dos efeitos de variáveis experimentais sobre a intensidade de emissão de fluorescência. Ao se tomar a quinina como exemplo de substância fluorescente foi possível demonstrar que o FCP pode ser usado em aulas práticas para medidas quantitativas e na realização de estudos sobre a relação entre a concentração de uma espécie fluorescente, o pH da solução e o efeito da concentração de um agente desativador, como o íon haleto, sobre o sinal da

fluorescência. O fluorímetro caseiro pode ser desmontado, permitindo ao aluno analisar as partes que o compõe e entender os princípios de seu funcionamento, contribuindo para desmistificar o pensamento comum de que o domínio dos princípios tecnológicos envolvendo a construção de equipamentos científicos é de difícil acesso e despende recursos vultosos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

- ¹ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5a. ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.
- ² Vinadé, M. E. C.; Vinadé, E. R. C.; *Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa*, Ed. UFSM: Santa Maria, 2005.
- ³ Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 6a. ed, Ed. Livros Técnicos e Científicos S.A: Rio de Janeiro, 2005.
- ⁴ Harvey, D.; *Modern Analytical Chemistry*, Ed. McGraw-Hill: Washington, 2005.
- ⁵ Sítio da infopoland. Disponível em: <http://infopoland.buffalo.edu/web/sci_health/science/scientists/jablonski/link.shtml>. Acesso em: 21 agosto 2015.
- ⁶ Hage, D. S.; Carr, J. D.; *Química Analítica e Análise Quantitativa*, Ed. Pearson: São Paulo, 2012.
- ⁷ Nery, A. L. P.; Fernandez, C. Fluorescência e estrutura atômica: Experimentos simples para abordar o tema. *Química Nova na Escola* **2004**, *19*, 39.
- ⁸ Gaffin, D. D.; Bumm, L. A.; Taylor, M. S.; Popokina, N. V.; Mann, S. Scorpion fluorescence and reaction to light. *Animal Behaviour* **2012**, *83*, 429. [CrossRef]
- ⁹ Baker, A.; Curry, M. Fluorescence of leachates from three contrasting landfills. *Water Research* **2004**, *38*, 2605. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Fellman, J. B.; Hood, E.; Spencer, R. G. M. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnology and Oceanography* **2010**, *55*, 2452. [CrossRef]
- ¹¹ Nahorniak, M. L.; Booksh, K. S. Excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy in conjunction with multiway analysis for PAH detection in complex matrices. *Analyst* **2006**, *131*, 1308. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Conmy, R. N.; Coble, P. G.; Del Castillo, C. E. Calibration and performance of a new in situ multi-channel fluorometer for measurement of colored dissolved organic matter in the ocean. *Continental Shelf Research* **2004**, *24*, 431. [CrossRef]
- ¹³ Kröckel, L.; Lehmann, H.; Wieduwilt, T.; Schmidt, M. A. Fluorescence detection for phosphate monitoring using reverse injection analysis. *Talanta* **2014**, *125*, 107. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Villar, A. M. S.; Campmany, A. C. C.; Bellowa, L. H.; Trenchs, M. A.; Naveros, B. C. Validated spectrofluorometric method for determination of gemfibrozil in self nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). *Spectrochimica Acta A* **2013**, *113*, 22. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Wu, H.; Zhang, L.; Du, L. Ionic liquid sensitized fluorescence determination of four isoquinoline alkaloids. *Talanta* **2011**, *85*, 787. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Gong, A.; Zhu, X. Determination of epristeride by its quenching effect on the fluorescence of L-tryptophan. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2013**, *3*, 415. [CrossRef]
- ¹⁷ Liu, C.; Luo, F.; Chen, D.; Qiu, B.; Tang, X.; Ke, H.; Chen, X. Fluorescence determination

- of acrylamide in heat-processed food. *Talanta* **2014**, *123*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Markechová, D.; Májek, P.; Sádeck, J. Fluorescence spectroscopy and multivariate methods for the determination of brandy adulteration with mixed wine spirit. *Food Chemistry* **2014**, *159*, 193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Talio, M. C.; Alesso, M.; Acosta, M. G.; Acosta, M.; Fernández, L. P. Sequential determination of lead and cobalt in tap water and foods samples by fluorescence. *Talanta* **2014**, *127*, 244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Chen, Q.; Qi, S.; Li, H.; Han, X.; Ouyang, Q.; Zhao, J. Determination of rice syrup adulterant concentration in honey using three-dimensional fluorescence spectra and multivariate calibrations. *Spectrochimica Acta A* **2014**, *131*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Bruno, S. N. F.; Cardoso, C. R.; Maciel, M. M. A.; Vokac, L.; Silva Junior, A. I. Selective identification and quantification of saccharin by liquid chromatography and fluorescence detection. *Food Chemistry* **2014**, *159*, 309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Hashemi, M.; Taherimaslak, Z.; Rashidi, S. Application of magnetic solid phase extraction for separation and determination of aflatoxins B₁ and B₂ in cereal products by high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **2014**, *960*, 200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Yang, X.; Zhu, S.; Dou, Y.; Zhuo, Y.; Luo, Y.; Feng, Y. Novel and remarkable enhanced-fluorescence system based on gold nanoclusters for detection of tetracycline. *Talanta* **2014**, *122*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Cao, Y.; Shi, S.; Wang, L.; Yao, J.; Yao, T. Ultrasensitive fluorescence detection of heparin based on quantum dots and a functional ruthenium polypyridyl complex. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *55*, 174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Rodrigues, S. S. M.; Lima, A. S.; Teixeira, L. S. G.; Korn, M. G. A.; Santos, J. L. M. Determination of iron in biodiesel based on fluorescence quenching of CdTe quantum dots. *Fuel* **2014**, *117*, 520. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Flores, J. L.; De Córdova, M. L. F.; Díaz, A. M. Multicommutated flow-through optosensors implemented with photochemically induced fluorescence: Determination of flufenamic acid. *Analytical Biochemistry* **2007**, *361*, 280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Peralta, C. M.; Fernández, L. P.; Masi, A. N. Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method for Amiloride and Furosemide determination in urine samples. *Microchemical Journal* **2011**, *98*, 39. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Hu, Y.; Feng, T.; Li, G. A novel solid fluorescence method for the fast determination of quercetin in biological samples based on the quercetin-Al(III) complex imprinted polymer. *Spectrochimica Acta A* **2014**, *118*, 921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Winter, P. W.; Shroff, H. Faster fluorescence microscopy: advances in high speed biological imaging. *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *20*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Bergamini, C.; Angelini, P.; Rhoden, K. J.; Porcelli, A. M.; Fato, R.; Zuccheri, G. A practical approach for the detection of DNA nanostructures in single live human cells by fluorescence microscopy. *Methods* **2014**, *67*, 185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Jain, S. S.; LaFratta, C. N.; Medina, A.; Pelse, I. Proflavine-DNA binding using a handheld fluorescence spectrometer: A laboratory for introductory chemistry. *Journal of Chemical Education* **2013**, *90*, 1215. [[CrossRef](#)]
- ³² Sartori, P. H. S.; Loreto, E. L. S. Medidor de fluorescência caseiro. *Química Nova na Escola* **2009**, *31*, 150. [[Link](#)]
- ³³ Wahab, M. F. Fluorescence Spectroscopy in a Shoebox. *Journal of Chemical Education* **2007**, *84*, 1308. [[CrossRef](#)]

- ³⁴ Tedetti, M.; Joffre, P.; Goutx, M. Development of a field-portable fluorometer based on deep ultraviolet LEDs for the detection of phenanthrene- and tryptophan-like compounds in natural waters. *Sensors and Actuators B* **2013**, *182*, 416. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ MacCormac, A.; O'Brien, E.; O'Kennedy, R. Classroom Activity Connections: Lessons from Fluorescence. *Journal of Chemical Education* **2010**, *87*, 685. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Muyskens, M.; Vitz, E. The Fluorescence of Lignum nephriticum: A flash back to the past and a simple demonstration of natural substance fluorescence. *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 765. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Milanick, M. A. Fluorescence using turmeric. *Journal of Chemical Education* **2011**, *88*, 260. [[CrossRef](#)]
- ³⁸ Muyskens, M. pHantastic fluorescence. *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 768. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Blitz, J. P.; Sheeran, D. J.; Becker, T. L.; Danielson, N. D. Classroom demonstrations of concepts in molecular fluorescence. *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 758. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Wigton, B. T.; Chohan, B. S.; Kreuter, R.; Sykes, D. The characterization of an easy-to-operate inexpensive student-built fluorimeter. *Journal of Chemical Education* **2011**, *88*, 1188. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Wigton, B. T.; Chohan, B. S.; McDonald, C.; Johnson, M.; Schunk, D.; Kreuter, R.; Sykes, D. A portable, low-cost, LED fluorimeter for middle school, high school, and undergraduate chemistry labs. *Journal of Chemical Education* **2011**, *88*, 1182. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Dickens, J. E.; Vaughn, M. S.; Taylor, M.; Ponstingl, M.; An LED array-based light induced fluorescence sensor for real-time process and field monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *158*, 35. [[CrossRef](#)]
- ⁴³ Oliveira, A. R. M.; Szczerbowski, D.; Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. *Química Nova* **2009**, *32*, 1971. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁴ Aucejo, A. M.; Estellés, M. L.; Hernández, R. H.; Laboratorio de Análisis Instrumental, PUV: València, 2010.
- ⁴⁵ FDA (USA) - 21 CFR §172.575 Quinine. Acesso em: 15 dezembro 2014.
- ⁴⁶ Hy, J.; Senkbeil, E. G.; White, H. B.; Fluorometric analysis of riboflavin: An undergraduate biochemistry experiment. *Journal of Chemical Education* **1990**, *67*, 803. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁷ Weinberg, R. B.; Muyskens, M.; An iodine fluorescence quenching clock reaction. *Journal of Chemical Education* **2007**, *84*, 797. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Li, R.; Xu, P.; Fan, J.; Di, J.; Tu, Y.; Yan, J.; Sensitive iodate sensor based on fluorescence quenching of gold nanocluster. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *827*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Kavitha, S. R.; Umadevi, M.; Janani, S. R.; Balakrishnan, T.; Ramanibai, R.; Fluorescence quenching and photocatalytic degradation of textile dyeing waste water by silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta A* **2014**, *127*, 115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Tucker, S, A.; Acree Jr., W. E.; Modern laboratory experiment for instrumental analysis: Analytical method for simultaneous determination of chloride and bromide ions based upon fluorescence-quenching methods. *Journal of Chemical Education* **1995**, *72*, 31. [[CrossRef](#)]