

Construção e validação de um fluorímetro de baixo custo para determinação de quinina em água tônica⁽¹⁾

Maria Clara Castro Valle⁽²⁾, Victória Rodrigues Veloso⁽³⁾, Marcel Piovezan⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Trabalho de Projeto Integrador III do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio.

⁽²⁾ Estudante; Instituto Federal de Santa Catarina; Florianópolis, Santa Catarina; maria.clara.valle@gmail.com;

⁽³⁾ Estudante; Instituto Federal de Santa Catarina; victoria.rvv@outlook.com.

⁽⁴⁾ Orientador; Instituto Federal de Santa Catarina; Florianópolis, Santa Catarina; marcel.piovezan@ifsc.edu.br;

INTRODUÇÃO

Um fluorímetro é um aparelho que tem a capacidade de medir grandezas de substâncias fluorescentes. Seu funcionamento baseia-se na excitação de átomos ou moléculas por uma fonte de luz e a detecção do comprimento de onda por ela emitido (Figura 1).

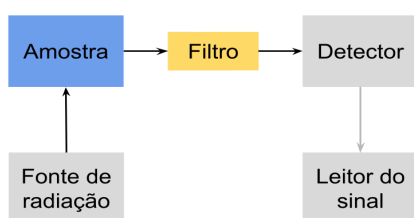


Figura 1 - Esquema da parte interna de um fluorímetro. Fonte: autoria própria

A quinina é um sólido branco extraído de árvores do gênero *Cinchona* e historicamente utilizada como fármaco (OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009). É muito conhecida por suas propriedades fluorescentes e por seu uso como flavorizante da água tônica e, muitas vezes, é utilizada como padrão em análises por métodos comparativos ou para calibração de equipamentos como os fluorímetros (CHEN, 1967). Seu espectro de emissão e excitação pode ser observado na figura 2(A). Essa característica se deve a sua estrutura molecular plana (Figura 2B), com presença de aromáticos, anéis fundidos, grupos hidroxí e metóxi que, segundo BETAEQ (2018), favorecem a fluorescência.

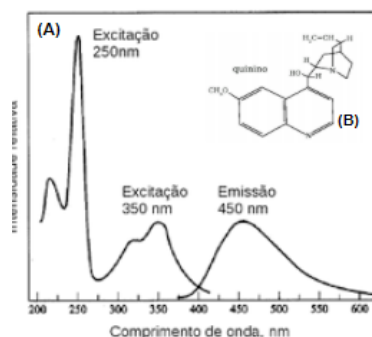


Figura 2 - (A) espectro de emissão e excitação da quinina. (B) Estrutura molecular da quinina. Fonte: UFJF, 2015.

Pela falta de recursos financeiros encontrada em diversas instituições do país, a compra do fluorímetro comercial não é acessível. Visando o contato prático com o conteúdo teórico pouco conhecidas, o objetivo deste trabalho foi a construção e validação de um fluorímetro de baixo custo e sua utilização para determinar quinina na água tônica comercial. Além disso, foram desenvolvidos dois roteiros de aula prática que servem como guia aos professores.

METODOLOGIA

2.1 Construção do fluorímetro

A construção do equipamento baseou-se nos trabalhos de OLIVEIRA et al., (2015) e Sartori e Loreto (2009). Para maiores detalhes do equipamento, incluindo a montagem do circuito, pode-se acessar o link: <http://bit.ly/roteirofluorimetro>.

2.1.2. Teste dos componentes do equipamento

Para a escolha da fonte de radiação testou-se LEDs amarelo, verde, azul e violeta.

Com relação ao filtro de radiação, foram avaliados o papel celofane e lentes de óculos de equipamento de proteção individual (EPI), ambos nas cores verde e amarelo. Realizou-se medidas no espectrofotômetro UV-Vis (ultravioleta-visível) com os materiais.

Como cubeta, uma tampa de caixa de fita de pH foi testada, comparando seu espectro na região do UV-Vis com os de cubetas plásticas e de quartzo.

2.2 Condições de operação

Para utilizar o equipamento foi atribuído o seguinte procedimento: a cubeta era inserida no equipamento, que era fechado e um cronômetro acionado. Após 10 segundos, a DDP obtida no multimetro era anotada. A medida do branco era feita, e, posteriormente, descontada da voltagem obtida das soluções de trabalho.

2.3 Preparo das soluções, amostras e construção das curvas de calibração

Tendo como base o artigo de OLIVEIRA et al. (2015), diluições de 5 a 35 ppm para curva de calibração externa foram preparadas (Figura 3A) a partir da solução estoque de padrão de quinina 1000 ppm, utilizando como solvente solução de H_2SO_4 (0,05M). A curva foi elaborada com a correlação entre o sinal de tensão medido no multimetro para as diluições..

As amostras de água tônica utilizadas foram adquiridas no comércio local. O seu preparo foi precedido de eliminação do gás carbônico, utilizando sistema conjunto de sonicação e vácuo até a não observação de bolhas. As amostras foram diluídas a 25% (v/v), com mesma solução ácida.

As soluções para construção da curva de adição de padrão foram feitas com 0, 40, 80 e 120 μL da solução padrão de 1000 ppm e seguiram o método da figura 3B para o total de 10 mL. A quantificação baseou-se em um gráfico de concentração x ddp, com pontos em 0, 4, 8 e 12 ppm de padrão adicionado na amostra. Na sequência foram realizados os ensaios de recuperação.

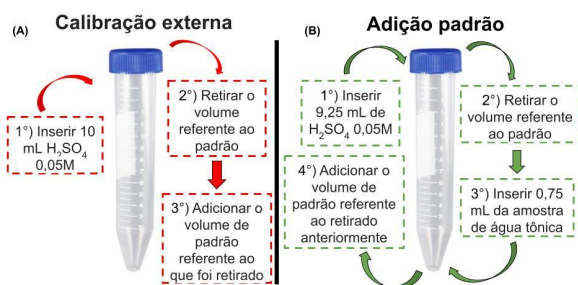


Figura 3. Preparo das soluções para curva de calibração externa (A) e adição padrão (B) Fonte: autoria própria

2.4 Parâmetros de mérito

Para as medidas de precisão instrumental e intra-ensaio foram realizadas, respectivamente, 7 medidas sucessivas da mesma amostra e 7 de preparações independentes, usando solução padrão (30 ppm de quinina) e amostra (25 % água tônica). Já a inter-ensaio foi calculada com a média dos desvios-padrão encontrados em cada medida de precisão intra-ensaio. Outros parâmetros como o limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com Ribani et al.(2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Componentes do equipamento

Como fonte de radiação, o LED violeta foi escolhido, pois emite radiação na faixa do pico de excitação da molécula de quinina - aprox. 368 a 450 nm (Figura 2A).

Quanto ao filtro a ser utilizado, deveria atender dois requisitos: (i) Absorver a luz emitida pelo LED para que o fotoresistor (LDR), detectasse a menor quantidade de luz proveniente da fonte e (ii) Não absorver a luz emitida pela substância analisada (400 - 550 nm), pois caso contrário, o fotoresistor não iria captar a fluorescência. O espectro da figura 4A mostra que o celofane amarelo (linha amarela) seria o ideal para as análises, pois é o que melhor absorve na região do ultravioleta (UV) e deixa passar na região de 400 - 550 nm. Contudo, as lentes de óculos eram muito mais fáceis de manusear, por serem mais rígidas, e proporcionarem uma melhor reprodutibilidade para compor o instrumento. Ambas as lentes, no entanto, absorviam o comprimento de onda máximo emitido pela quinina (450 nm), portanto a lente escolhida foi aquela que menos retinha na região de emissão como um todo (400-550 nm), ou seja, a lente amarela (figura 4B).

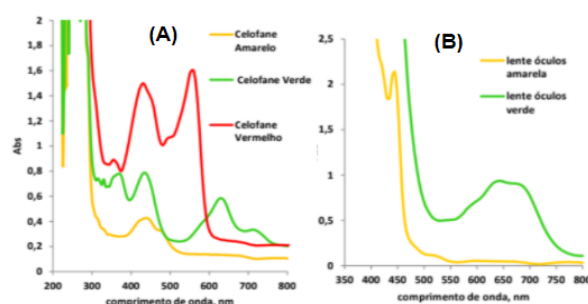


Figura 4 - (A) Absorvância dos papéis celofane. (B) absorvância das lentes.

Linha vermelha - celofane vermelho
 Linha verde - (A) celofane verde. (B) lente verde
 Linha amarela - (A) celofane amarelo. (B) lente amarela
 Fonte: autoria própria

As cubetas convencionais de plástico, vidro e quartzo não eram adequadas para o fluorímetro, por possuírem dois lados adjacentes foscos. A parte

fosca ficaria virada para o LED ou LDR, o que impossibilitaria uma leitura precisa da medida feita, já que o fosco prejudica a passagem de luz. Devido a esse empecilho, uma tampa de caixa de fita de pH foi testada para possível substituição. Por possuir um espectro de absorção muito próximo ao das cubetas de plástico comumente usadas (Figura 5), e não absorver intensamente na região do visível (acima de 400 nm) - região de fluorescência do analito-, ela foi a escolhida.

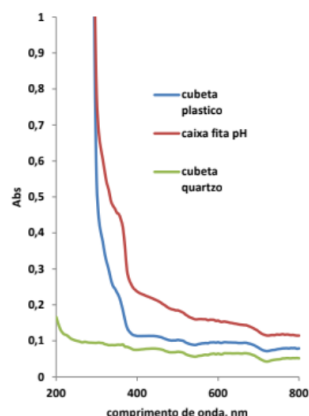


Figura 5 - Absorbância das cubetas testadas. Fonte: Autoria própria

3.2 Validação e análise de amostra

Na tabela 1 estão reunidos os parâmetros de validação do equipamento e do método utilizado para a determinação e quantificação de quinina em água tônica.

Tabela 1 - Parâmetros de validação de método.

Prâmetros	Quinino
Faixa linear (ppm)	5-35
Intercepto (ppm)	$0,00469 \pm 0,0169$
Coefficiente angular	$0,0212 \pm 0,0030$
Coefficiente de determinação (a)	$0,9932 \pm 0,0054$
LOD (ppm)	2,63
LOQ (ppm)	7,97
Precisão intra-ensaio, padrão 30 ppm (%) (b)	0,97
Precisão inter-ensaio, padrão 30 ppm (%)	2,88
Precisão instrumental, padrão 30 ppm (%) (c)	0,69
Precisão intra-ensaio, água tônica 25% (%) (b)	0,79
Precisão inter-ensaio, água tônica 25% (%)	0,78
Precisão instrumental, água tônica 25% (%) (c)	1,59
Recuperação água tônica 4,04 ppm de adição (%)	57,1
Recuperação água tônica 8,08 ppm de adição (%)	71,9
Recuperação água tônica 12,12 ppm de adição (%)	71

(a) para valores de $n = 7$, cada ponto da curva medidos em triplicata

(b) para valores de $n=7$, medidas de preparações independentes

(c) para valores de $n=7$, para medidas sucessivas

Fonte: autoria própria

Para a determinação da linearidade da curva e seu coeficiente angular, foram construídas algumas curvas de calibração prévias, que mostraram a faixa linear obtida na tabela 1. Assim, o preparo das soluções se deu nesta faixa e fez-se outras 5 curvas de calibração externa, em que o coeficiente de determinação médio e o coeficiente médio angular puderam ser calculados.

Com os resultados de LOD e LOQ obtidos, é possível inferir que o aparelho construído pode

detectar e quantificar o analito em amostras diluídas numa faixa maior que 8 ppm. O fluorímetro construído, portanto, é adequado para análises de traço, em que a concentração de analito está entre 1 ppb à 100 ppm (SILVA, 2015). Esses parâmetros poderiam ser melhorados se o comprimento de onda que chegasse ao detector fosse aquele de máxima emissão da molécula, o que aumentaria a sensibilidade do instrumento.

Ao observar a tabela 1, as medidas de precisão instrumental e intra-ensaio, tanto para a amostra de água tônica quanto nas soluções com padrão de quinina, ficaram abaixo de 1% e a precisão inter-ensaio se manteve inferior à 3%. Esses valores mostram que o aparelho construído e o método de preparo das amostras foram satisfatórios, já que atendem as exigências da ANVISA (2003) que admite valores até 5% de precisão.

De acordo com Ribani (2004), o intervalo aceitável de recuperação para análise de traços está entre 70% e 120%. A recuperação média obtida com a marca comercial analisada foi de 66,7%, se mostrando assim, abaixo do indicado e indicando possível interferência de matriz. Na tabela 1, em que se encontram as recuperações para as respectivas concentrações adicionadas, é possível observar que apesar da recuperação média estar abaixo do indicado, os resultados dos percentuais individuais demonstram um resultado satisfatório.

Para verificar qual método deveria ser adotado para a quantificação da amostra, realizamos estudos de seletividade pela comparação das curvas construídas (Figura 6).

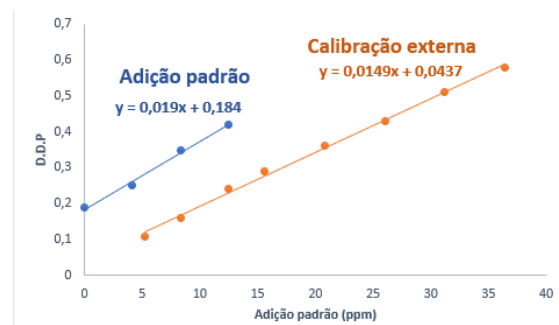


Figura 6 - Curvas de calibração externa e adição padrão. Fonte: Autoria própria.

Os coeficientes angulares obtidos demonstram que não ocorreu a condição de paralelismo esperada, comprovando que o método empregado não possui seletividade, ou seja, ocorre a interferência da matriz da amostra na determinação do analito. Portanto, verifica-se que ao realizar a análise, é necessário efetuar o procedimento de adição padrão, mesmo sendo mais trabalhoso, já que este corrige o efeito da matriz.

A quantificação de quinina na água tônica comercial foi realizada em duplicata e obteve-se $28,93 \pm 0,607$ ppm de quinina.

No Brasil, conforme definido no art. 25, do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 6.781, de 4 de junho de 2009, Água Tônica de Quinina é o refrigerante que contiver, obrigatoriamente, entre 30 - 70 mg L⁻¹ (BRASIL, 2009).

O resultado encontrado condiz com o previsto, mesmo estando ligeiramente abaixo do mínimo permitido. Uma explicação plausível para o valor obtido, é o fato de que a utilização do filtro de radiação escolhido já traz um erro associado. Medidas de fluorescência precisam respeitar a lei de Lambert-Beer, que preconiza uma medida feita em um único comprimento de onda. Como a lente amarela absorvia o comprimento máximo de emissão da quinina e deixava passar uma região ampla de radiação, a quantificação não foi tão exata. Uma possível alternativa para obter um resultado mais exato seria efetuar mais réplicas para a quantificação e buscar por filtros mais seletivos ou um detector que distinga os comprimentos de onda.

Um roteiro para aula prática visando a determinação da quinina em água tônica por técnica fluorimétrica foi desenvolvido e pode ser acessado em: < <http://bit.ly/roteiroanalise> >.

CONCLUSÃO

O equipamento proposto pôde ser construído de maneira bastante satisfatória, utilizando materiais acessíveis e que se comprovaram bastante eficientes, como a lente de óculos de proteção e a cubeta de tampa de caixa de fita de pH. A validação realizada indicou o bom funcionamento do equipamento e do método para determinar a quinina em água tônica, já que todas as medidas de precisão ficaram abaixo de 5%, o padrão estabelecido pela ANVISA. A quantificação da amostra comercial de água tônica foi condizente com o descrito na legislação brasileira, embora maiores análises futuras poderiam alcançar resultados mais exatos.

Dessa maneira, torna-se evidente que a construção desse equipamento como instrumento complementar ao aprendizado teórico nas salas de aula é de extrema relevância. Para isso, os roteiros de aula prática montados podem ser utilizados.

A participação no 1º Congresso Online Nacional de Química Analítica e Ambiental (CONQUIAMB) em 2020, e a conquista de menção honrosa como melhor apresentação oral na área educacional, além da publicação do resumo do trabalho (ISBN: 978-65-86861-45-7), refletem a qualidade e importância do trabalho desenvolvido.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução Nº 899**: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. [S.L.], 2003. 12 p. Disponível em: < http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf >. Acesso em: 20 mar. 2021.

BETAEQ. Você realmente sabe o que tem na água tônica? Já ouviu falar sobre quinina? Disponível em: < <https://betaeq.com.br/index.php/2018/05/04/ja-ouviu-falar-sobre-quinina/#~:text=A%20água%20tônica%20fica%20fluorescente,causa%20da%20presença%20da%20quinina.&text=A%20quinina%2C%20p%20branco%2C%20inodoro,como%20flavorizante%20da%20água%20tônica> >. Acesso em 04 fev. 2021.

BRASIL. **Decreto Nº 6.871, de 4 de Junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm#:~:text=Decreto%20n%C2%BA%206871&text=DECRETO%20N%C2%BA%206.871%2C%20DE%204,que%20lhe%20confere%20o%20art >. Acesso em 19 out. de 2020.

CHEN, Raymond F.. Some characteristics of the fluorescence of quinine. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 374-387, maio 1967. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90174-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(67)90174-1).

OLIVEIRA, Alfredo Ricardo Marques de; SZCZERBOWSKI, Daiane. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000700048>.

OLIVEIRA, Djalma M. de et al. Desenvolvimento de um Fluorímetro Artesanal e Propostas para sua Aplicação nas Aulas Práticas de Disciplinas de Química Analítica Instrumental nos Cursos de Graduação. *Revista Virtual de Química, Bahia*, v. 7, n. 6, p.1-19, 14 out. 2015. Disponível em: <<http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v7n6a35.pdf>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; MELO, Lúcio Flávio Costa. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>.

SARTORI, Paulo Henrique dos Santos; LORETO, Élgion Lúcio da Silva. Medidor de fluorescência caseiro. **Química Nova na Escola**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 2438-2456, 2 maio 2009. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150145>. Disponível em: < http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc31_2/13-EEQ-4508.pdf >. Acesso em: 6 abr. 2019.

SILVA, Julio C. J.. Métodos Espectroanalíticos: Aula 1 – Parte 1 – Elementos-traço. Universidade Federal de Juiz de Fora (ufjf), Juiz de Fora, v. 2, n. 1, p.1-68, 6 jul. 2015. Disponível em: < <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:1X6OzP9jQ3wJ:www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Aula-1-Parte-1-Elementos-tra%25C3%25A7o.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br> >. Acesso em: 29 out. 2019.

UFRJ. **Espectrometria de luminescência molecular**. Rio de Janeiro: Ufrj, 2015. Color. Disponível em: <https://www.ufjf.br/nupis/files/2015/10/aula-9-fluoresc%c3%aancia-parte-1.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2021.