



Medidor de Fluorescência Caseiro

Paulo Henrique dos Santos Sartori e Élçion Lúcio da Silva Loreto

Propõe-se a construção de um sistema de medição de fluorescência de configuração simples que permite uma análise quantitativa do fenômeno. Tal instrumento simula, por exemplo, o funcionamento de fluorômetros e clorofilômetros usados em laboratórios didáticos e de pesquisa. A sua exploração didática viabiliza conexões entre diversos conceitos de química moderna por meio de uma abordagem interdisciplinar, envolvendo fotoquímica, níveis de energia, orbitais moleculares, interação entre radiação e moléculas orgânicas e biológicas, permitindo, por exemplo, uma melhor compreensão dos mecanismos fotoquímicos da fotossíntese.

► fluorescência, fotossíntese, material de baixo custo ◀

Recebido em 18/08/08, aceito em 12/03/09

150

Muitas moléculas possuem a propriedade de, quando estimuladas pela energia de uma radiação eletromagnética de comprimento de onda adequado, reemitirem parte dessa energia sob a forma de uma radiação visível. Pacotes de energia, conhecidos por fótons, associados a essas radiações, interagem com os níveis de energia moleculares, dando origem ao fenômeno da fluorescência (Figura 1).

A clorofila, assim como outros pigmentos, pode absorver fótons. Nesse caso, as cores correspondentes aos comprimentos de onda absorvidos desaparecem do espectro eletromagnético visível, mas a energia não pode desaparecer. Quando a clorofila é exposta à radiação de luz visível, a cor azul e a vermelha são as mais fortemente absorvidas, enquanto que a verde é transmitida, o que lhe dá a cor característica. Quando a configuração eletrônica da molécula de pigmento ocupa seus orbitais mais estáveis ("normais" ou característicos),

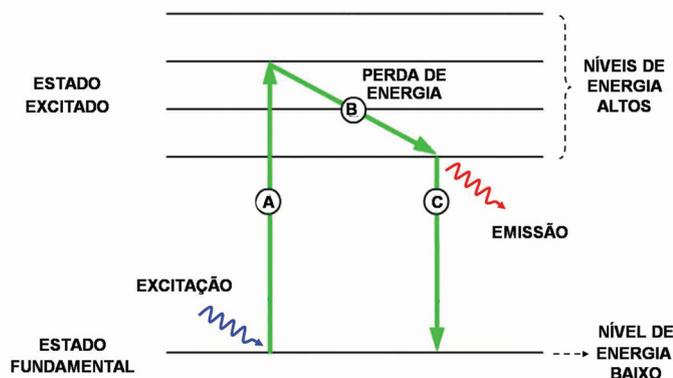


Figura 1: Diagrama do processo de fluorescência. Na fase de excitação (A), ocorre o estímulo por um fóton de energia específica. Na fase intermediária (B), inicia-se a desexcitação, havendo perda de energia. Na fase final (C), o retorno ao estado fundamental ocorre com dissipação energética através da emissão de radiação visível – a fluorescência propriamente dita.

considera-se que esteja no seu estado fundamental. Se algum dos elétrons da molécula absorver a energia de um fóton excitante, ele será elevado para outra região orbital, produzindo uma nova configuração eletrônica denominada estado excitado. Os únicos fótons absorvidos são aqueles cujas energias são exatamente iguais

à diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Tal diferença varia de um tipo de átomo ou molécula para outro. Portanto, um composto específico absorve somente fótons correspondentes a determinados comprimentos de onda, o que explica o fato de cada pigmento ter um único espectro de absorção (Pitt-Bradford, 2006; Invitrogen™, 2006).

A energia de um fóton absorvido é capaz de elevar um elétron do estado fundamental para o estado excitado.

A seção "Experimentação no ensino de Química" descreve experimentos cuja implementação e interpretação contribuem para a construção de conceitos científicos por parte dos alunos. Os materiais e reagentes usados são facilmente encontráveis, permitindo a realização dos experimentos em qualquer escola.

No entanto, esse estado, como todos os de alta energia, é instável e o elétron não pode permanecer nele por muito tempo. Em geral, após o pigmento absorver luz, seus elétrons excitados decaem muito rapidamente – cerca de um bilionésimo de segundo (10^{-9} s) –, retornando ao orbital do estado fundamental com liberação de energia, devido a mudanças nos estados vibracionais e rotacionais da molécula, geralmente sob a forma de calor. Alguns pigmentos, incluindo a clorofila, emitem luz assim como calor depois de absorverem fótons. O elétron salta para um estado de alta energia e, quando decai para o estado fundamental, um fóton (na maioria das vezes de maior comprimento de onda) é liberado. A emissão luminosa (brilho) correspondente é denominada fluorescência (Pitt-Bradford, 2006; Invitrogen™, 2006; Atkins e Paula, 2006).

No processo fotossintético, a clorofila e outros pigmentos fotossintéticos absorvem fótons, fazendo com que elétrons de suas moléculas saltem para orbitais mais distantes do núcleo do átomo, ficando em um nível energético mais alto (estado excitado). Esses elétrons excitados serão transferidos para a cadeia transportadora de elétrons para serem utilizados na produção de ATP e, posteriormente, na síntese de açúcares. Os pigmentos que perderam elétrons receberão outros, menos excitados, provindos do hidrogênio da H_2O , que se “quebrará” em próton + elétron + O_2 (este será liberado da célula). Quando ocorre excesso de energia ou mecanismos que interfiram no processo natural de

fotossíntese, parte ou toda a energia absorvida pelos pigmentos fotossintéticos pode ser dissipada na forma de fluorescência (Carvalho e Recco-Pimentel, 2007).

A análise da fluorescência da clorofila é amplamente empregada no entendimento dos mecanismos da fotossíntese, bem como na avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos ou abióticos pelos quais as plantas possam passar como temperatura, radiação, deficiência hídrica, salinidade, presença de insetos ou fungos, herbicidas etc. Para esse tipo de avaliação, são utilizados fluorômetros de luz modulada, cujas aplicações variam desde a rápida identificação de injúrias causadas ao aparelho fotossintético, mesmo quando o sintoma ainda não é visível, até a análise detalhada da alteração da capacidade fotossintética da planta (Catunda e cols., 2005).

Atualmente, o uso da fluorescência tornou-se uma poderosa ferramenta de investigação em diversas áreas. Algumas aplicações em pesquisas envolvem, por exemplo, um incremento no processo de sequenciamento de DNA ou sua quantificação por meio da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) em tempo real; detectores fluorescentes para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) usada na identificação, quantificação, separação e purificação de inúmeros compostos; a microscopia de fluorescência usada na detecção

de diversas estruturas celulares; estudos sobre expressão gênica por meio de DNA Microarray.

Descrição dos principais componentes do fluorímetro proposto

- Fonte de iluminação: usamos um diodo de emissão luminosa (LED) cuja faixa de comprimento de onda emitido situa-se próxima ao violeta/ultravioleta (aproximadamente 400 nm).
- Sistema de detecção: consiste de um filtro para permitir a passagem de comprimentos de onda que se deseja investigar, e de um fotorresistor (LDR) sensível às variações de intensidade da luz proveniente da fluorescência das amostras. O filtro desempenha o papel de permitir a passagem dos comprimentos de onda de interesse, ou seja, aqueles associados à cor da fluorescência, bloqueando os demais.
- Registrador: um multímetro digital usado na função de ohmímetro, que mede o valor da resistência elétrica do LDR.

As especificações técnicas do LED e do LDR estão detalhadas nas Figuras 2 e 3.

Material

Indicamos, a seguir, os materiais necessários, onde poderão ser encontrados e o custo aproximado de cada um (valores aproximados dos tipos mais comuns, que poderão variar bastante dependendo do modelo).

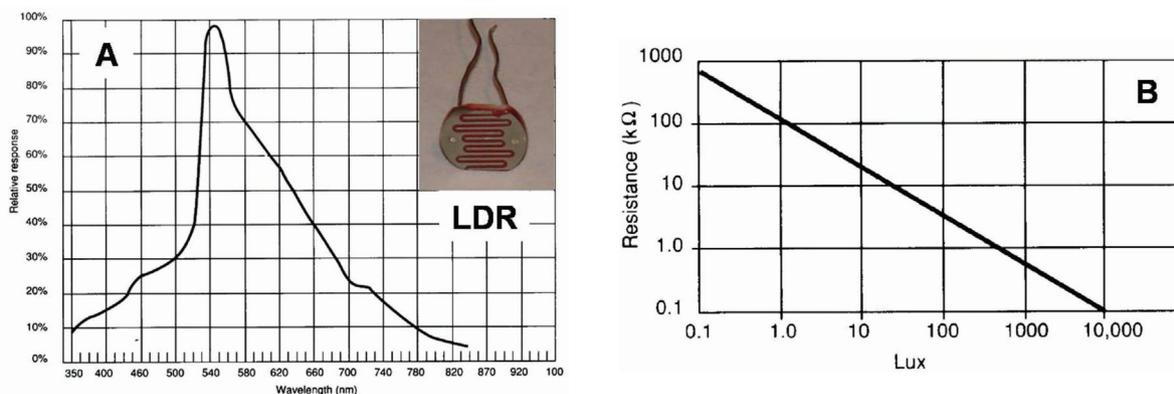


Figura 2: (A) Resposta espectral do LDR: resposta relativa (faixa de 0 a 100%) em função do comprimento de onda (região de 350 a 820 nm). (B) Sensibilidade do LDR: Resistência elétrica (faixa de 0,1 a 1000 kΩ) em função do iluminamento (faixa de 0,1 a 10.000 lx) (Sunrom, 2008).

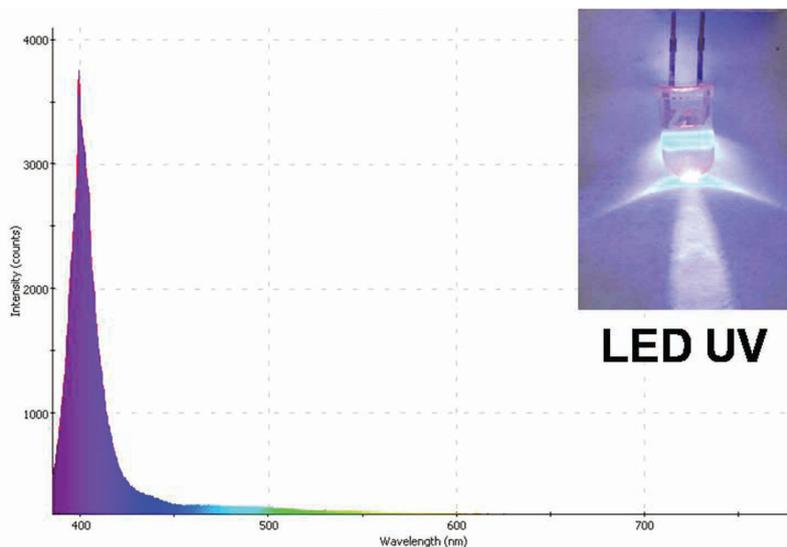


Figura 3: Análise espectrográfica de um LED violeta/NUV (Near Ultra Violet – ultravioleta próximo) genérico: intensidade (na faixa de 0 a 4000 unidades arbitrárias) em função do comprimento de onda (região de 400 nm a 700 nm) (Led Museum, 2008).

a) *Lojas de componentes eletrônicos, de variedades ou na sucata doméstica:*

- Multímetro analógico ou digital (R\$ 12,00 a R\$ 50,00);
- Resistor dependente da luz (LDR – Light Dependence Resistor) de 1,0 cm de diâmetro (R\$ 4,00);
- Diodo de emissão luminosa ultravioleta, conhecido como LED violeta ou ultravioleta (LED UV – Light Emission Diode Ultraviolet) de alto brilho 5,0 mm (R\$ 2,00);
- Fonte de corrente contínua de 6,0 V (quatro pilhas tipo AA em série) ou carregador de celular com voltagem similar (R\$ 4,00);
- Resistor de 380 Ω de 1/8 W ou similar (R\$ 0,20);
- Conector para LED ou conector para drive de disquete (R\$ 3,00);

b) *Lojas de equipamentos de som ou de luz:*

- Filtro de cor verde, de preferência filtro colorido conhecido como “gelatina” (R\$ 4,00/folha A4).

c) *Papelarias, armarinhos, lojas de variedades ou na sucata doméstica:*

- Caixa de papel tipo porta-carretéis de aproximadamente 20,0 x 6,0 x 2,0 cm (R\$ 0,50);
- Cubeta (recipiente transparente pequeno e incolor como o depósito de um apontador de lápis – R\$ 1,50);

- Folha de EVA (borracha de Etil Vinil Acetato) de 8 mm de espessura e cerca de 20,0 x 20,0 cm (R\$ 2,00).

- Diversos: cola, fios de conexão elétrica, fita dupla face, tinta guache preta (R\$ 5,00).

d) *Mercados:*

- Água tônica (garrafinha ou lata de 350 mL – R\$ 1,00);
- Cloreto de sódio (sal de cozinha – R\$ 0,80/kg).

Custo aproximado total de R\$ 40,00 a R\$ 78,00. Vale ressaltar que muitos dos materiais podem ser facilmente encontrados na sucata doméstica, reduzindo bastante o custo total. Também alguns itens serão usados em quantidades muito pequenas, sobrando material para outras atividades ou repetições. Já o multímetro é um instrumento permanente e servirá para diversos experimentos que envolvam medições elétricas.

A respeito do filtro, é importante destacar que não dispomos facilmente de filtros tão específicos ou de cor tão próxima à da fluorescência a ser observada a um custo acessível e sem ser necessário recorrer às empresas especializadas. Por isso, escolheu-se o que mais se aproximava do tom azul-esverdeado da fluorescência da água tônica. Se fosse escolhido um filtro de cor azul, por exemplo, este permitiria maior passagem de comprimentos de onda da própria fonte de iluminação (o LED ultravioleta) que está muito próxima do sensor. Então a escolha recaiu no filtro de cor verde.

Montagem

Construir uma caixinha de EVA de tamanho suficiente para comportar a cubeta, fazendo dois orifícios: um na lateral para acoplar o LDR e um na frente para entrada do feixe de iluminação. Pintar as paredes internas com tinta preta para minimizar reflexões espúrias de luz sobre o sensor. Cortar o filtro no tamanho da lateral do porta-cubeta e encaixá-lo na frente do LDR.

As conexões elétricas devem seguir o esquema da Figura 4. Os terminais do LDR devem ser conectados diretamente aos terminais utilizados para medição de resistência elétrica no multímetro (verificar no manual do aparelho – geralmente estão indicados por ‘COM’ e ‘ Ω ’). O cátodo (terminal mais curto) do LED deve ser ligado à saída negativa da fonte de alimentação, enquanto o ânodo deve ser conectado ao resistor e este, à saída positiva da fonte.

Preparação das amostras

Preparar uma amostra de água tônica (cerca de 100 mL) e outra de

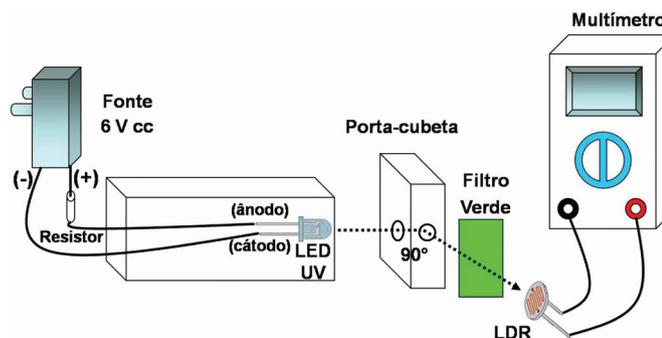


Figura 4: Esquema de montagem e disposição dos elementos que constituem o conjunto do medidor de fluorescência.

água salgada (uma colherzinha rasa de sal em 100 mL de água) com as quais serão feitas soluções em diferentes proporções. Por exemplo, em partes iguais (1:1); uma parte de água tônica e duas partes de água salgada (1:2); uma parte de água tônica e quatro partes de água salgada (1:4); duas partes de água tônica e uma parte de água salgada (2:1); quatro partes de água tônica e uma parte de água salgada (4:1).

Existe a possibilidade de bolhas de gás presentes na água tônica interferirem nas medições. Recomenda-se, então, mexer com uma colherzinha ou agitar a amostra e deixá-la em repouso de um dia para outro ou por alguns minutos no caso de preparar a amostra na hora.

Procedimento

A fluorescência é medida a 90° em relação ao feixe incidente, pois nesse caso não estamos interessados na absorção da luz pela solução, mas sim no brilho que a solução emitirá ao fluorescer.

Recomenda-se, durante as medições, cobrir o conjunto do detector com uma caixa de papelão ou um tecido escuro, diminuindo a incidência de luz espúria do ambiente sobre o LDR, a fim de minimizar as oscilações na leitura dos valores. Também convém fixar na mesa ou bancada cada um dos elementos que constituem o aparato (inclusive os fios de ligação) com o intuito de imobilizá-los durante as trocas das amostras e manter os ajustes de posicionamento inalterados. O uso de fita adesiva dupla face é indicado para essa finalidade.

Para iniciar a coleta de dados, é necessário ajustar a escala de medida de resistência elétrica do multímetro, posicionando o seletor do aparelho em uma escala compatível com a disposição e montagem que for feita. Para tanto, testar se a faixa selecionada gera registro no aparelho. Caso contrário, mudar de escala até que seja registrado algum valor. As medidas são tomadas diretamente do valor indicado no display (ou ponteiro) do multímetro. Na montagem que elaboramos, a faixa de 20 MΩ foi sensível o suficiente.

Colocar a amostra na cubeta e esta, no porta-cubeta. Em seguida, ligar a fonte e o multímetro e anotar os valores registrados.

Resultados

Verifica-se que, à medida que a proporção de água salgada na solução aumenta em relação à água tônica, os valores de resistência elétrica aumentam, indicando menor brilho da amostra, ou seja, menor fluorescência. A Tabela 1 indica os valores médios observados numa configuração montada para coletar os resultados.

Para fim de comparação, a observação do efeito visual da fluorescência de algumas amostras, submetidas à iluminação direta de luz ultravioleta (procedimento que requer proteção adequada dos olhos e partes do corpo expostas), é mostrada na Figura 5.

A diminuição da intensidade da fluorescência deve-se ao fato de que o íon cloro (Cl⁻), proveniente da dissociação iônica do NaCl na água, atua como um dissipador (“quencher”) da fluorescência, pois ao se encontrar com a molécula de quinina (responsável pela fluorescência da água tônica) desativa-a antes de ter

a chance de decair por intermédio da emissão de radiação.

Comentários

O experimento poderá ser realizado de maneira similar utilizando extrato alcoólico de folhas verdes (que conterá predominantemente clorofila) e iodeto de sódio. Nesse caso, será necessário trocar o filtro para a cor vermelha.

Os resultados numéricos apresentados dificilmente se repetirão em outras construções, pois as especificidades de cada montagem (distanciamento dos elementos, ajustes, intensidade luminosa do LED, variações da coloração do filtro, transparência da cubeta etc.) são variáveis que produzem resultados numericamente diferenciados. Importa salientar que os resultados serão comparativamente coerentes e compatíveis com o fenômeno.

Paulo Henrique dos Santos Sartori (paulo-sartori@ibest.com.br), licenciado em Ciências e Matemática (UNICRUZ), mestre em Educação em Ciências: Química da Vida e Saúde (UFRGS), é doutorando em Educação em Ciências (UFRGS/UFSM/FURG). **Élgion Lúcio da Silva Loreto** (elgion@base.ufsm.br), bacharel em Ciências Biológicas (UFSM), mestre e doutor em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), é docente da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

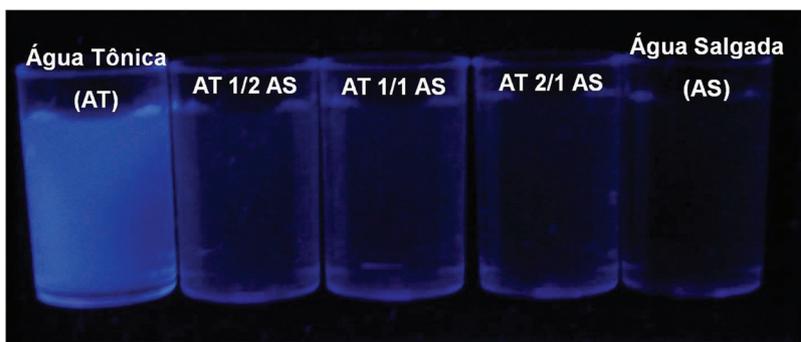


Figura 5: Visualização da fluorescência de algumas amostras.

Tabela 1: Medidas de resistência elétrica encontradas para as amostras.

Amostra	Resistência elétrica (escala: 20 MΩ)
Água Tônica (AT)	0,26
Proporção de	
Água Tônica em relação à	
Água Salgada – AT:AS	
4:1	0,30
2:1	0,89
1:1	1,12
1:2	1,14
1:4	1,33
Água Salgada (AS)	1,75

Referências

ATKINS, P. e PAULA, J. *Physical Chemistry*. 8. ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.

CARVALHO, H.F. e RECCO-PIMENTEL, S.M. *A célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007.

CATUNDA, M.G.; FREITAS, S.P.; OLIVEIRA, J.G. e SILVA, C.M.M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi. *Planta Daninha*.

Viçosa, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2005.

INVITROGEN™. *Fluorescence Tutorials*. Disponível em: <<http://probes.invitrogen.com/resources/education/>> Acesso em: 10 out. 2006.

LED MUSEUM. *Spectra of Low-Powered Violet LEDs (2)*. Disponível em: <<http://ledmuseum.home.att.net/specx78.htm>> Acesso em: 14 nov. 2008.

PITT-BRADFORD. University of Pittsburgh at Bradford. *Fluorescence of*

Chlorophyll. Disponível em: <http://www.upb.pitt.edu/uploadedFiles/About/Sponsored_Programs/Science_In_Motion/Biology_Labs/bio003_Fluorescence%20of%20Chlorophyll.doc> Acesso em: 22 ago. 2006.

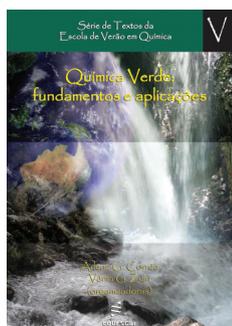
SUNROM. *Light Dependent Resistor*. Disponível em: <<http://www.sunrom.com/files/3190-datasheet.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2008.

Abstract: *A Homemade Fluorimeter*. It aims the construction of a simple system of fluorescence measurement that allows a quantitative analysis of the phenomenon. Such an instrument simulates, for instance, the operation of fluorimeters and chlorophyllometers used at didactic and research laboratories. Its didactic exploration enables innumerable connections among several concepts of modern chemistry, through an interdisciplinary approach that involves photochemistry, energy levels, and interaction between radiation and organic/biological molecules, all of these allowing, for example, a better understanding of photochemistry mechanisms of the photosynthesis.

Keywords: Fluorescence, photosynthesis, low cost material.

Resenha

Química Verde: fundamentos e aplicações



Elaborado pelas professoras Arlene Gonçalves Corrêa (DQ) e Vânia Gomes Zuin (DME) da Universidade Federal de São Carlos (SP), o livro *Química*

Verde: fundamentos e aplicações, recentemente publicado pela editora EdUFSCar, constitui-se numa importante referência acadêmica e científica para a Química no Brasil. Tal assertiva sustenta-se tanto pela qualidade da obra, quanto pela inequívoca demonstração de compromisso que a ciência química, por meio de seus profissionais, tem com a prevenção e a resolução dos problemas ambientais. A divulgação de algumas produções científicas e técnicas já espelham a nova conduta que a química assume diante dessa tão grave questão e aponta um caminho a ser seguido por todos profissionais de nossa área, sejam os mais ligados à pesquisa científica, à educação química e/ou ainda aqueles que atuam diretamente nos processos produtivos.

A Química Verde, como bem apre-

sentam as duas pesquisadoras, pode ser definida como “a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente”. Ressalta-se que, desde 2003, esse novo campo de intervenção e produção científica da Química se organiza no subcommittee da Divisão III da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

O livro é resultado de uma série de trabalhos de pesquisa das professoras-pesquisadoras e de outros acadêmicos, que também serviram à Escola de Verão em Química (EVQ), evento promovido pelo Departamento de Química da UFSCar, que já se encontra na sua XXIX edição. *Química Verde: fundamentos e aplicações* está organizado em sete capítulos, escritos numa linguagem simples e acompanhado de uma criteriosa referência bibliográfica. Ele descreve, a partir dos princípios básicos da QV, os conceitos e as aplicações no desenvolvimento C&T de algumas de suas áreas mais relevantes como a da catálise, dos solventes alternativos, da minimização de resíduos e do desenvolvimento de processos mais seguros e eficientes. Para tanto, foram incluídos exemplos de sua aplicação industrial como aqueles de reações ativadas por ultrassom

e irradiação de microondas; as de células fotovoltaicas e a combustível; a de biocatálise e biotransformação; a de metodologias analíticas verdes; e a dos tratamentos de efluentes com tecnologias verdes, demonstrando a importância da Química Verde em todos os setores produtivos.

A publicação dessa obra permitirá ainda o estabelecimento de diálogos mais consistentes com os diferentes setores nos quais intervimos como profissionais da química, com destaque para o campo da formação e da educação científica. Ensina-nos que, se tomarmos os princípios da QV como referência, poderemos construir uma imagem mais positiva da química; orientar as pessoas para uma atuação baseada em fundamentos ético-científicos de tutela e prevenção ambiental; auxiliar o poder público e os agentes sociais na formulação de programas e ações de prevenção e salvaguarda ambiental; e tantas outras medidas ligadas a esse importante tema-problema planetário.

Recomendamos sua leitura.

Prof. Dr. Carlos Alberto Marques (UFSC)

CORRÊA, Arlene G. e ZUIN, Vânia G. *Química Verde: fundamentos e aplicações*. São Carlos: EdUFSCar, 2009. 172 p. ISBN: 978-85-7600-150-8.