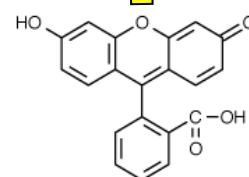


A FLUORESCEÍNA COMO SONDA DE pH: APLICAÇÃO À ESTIMATIVA DO pH DE UMA ÁGUA NATURAL



1. OBJETIVOS

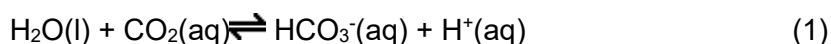
- Traçado de espectros de absorção no UV-Visível e de fluorescência.
- Estudo da influência do pH nos espectros de absorção e emissão da fluoresceína.
- Estimativa do pH de uma água natural utilizando a fluoresceína como sonda de pH.

2. INTRODUÇÃO

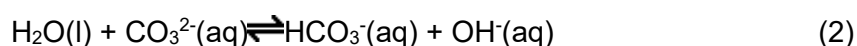
2.1. O pH das águas naturais

O pH das águas naturais depende da concentração relativa dos íons carbonato (CO_3^{2-}), íons hidrogenocarbonato (HCO_3^-), e dióxido de carbono dissolvido (CO_2).

Normalmente, a água da chuva é ligeiramente ácida ($\text{pH}=5.7$), devido à reação da água com o dióxido de carbono dissolvido a partir da atmosfera onde a chuva cai, segundo a equação:



Ao contrário, a água subterrânea é, em geral, ligeiramente alcalina ($\text{pH}=8.0$), devido à reação da água com os íons carbonato dissolvidos das rochas onde a água passa:



A água dos rios e lagos pode apresentar-se ácida ou alcalina, dependendo se o fator mais importante é a precipitação, as rochas ou a evaporação.

A forma como as concentrações relativas de $\text{CO}_2(\text{aq})$, $\text{HCO}_3^-(\text{aq})$ and $\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})$ varia com o pH encontra-se na figura 1. As concentrações de $\text{CO}_2(\text{aq})$ e de $\text{HCO}_3^-(\text{aq})$ igualam-se a $\text{pH} \approx 6.3$, e as concentrações de $\text{HCO}_3^-(\text{aq})$ e $\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})$ são iguais a $\text{pH} \approx 10.3$.

Em condições ácidas ($\text{pH} < 6.3$), a espécie dominante é o dióxido de carbono, enquanto em condições fortemente alcalinas ($\text{pH} > 10.3$) é o íon carbonato que domina. Em condições intermédias ($6.3 < \text{pH} < 10.3$), predomina o íon hidrogeno-carbonato.

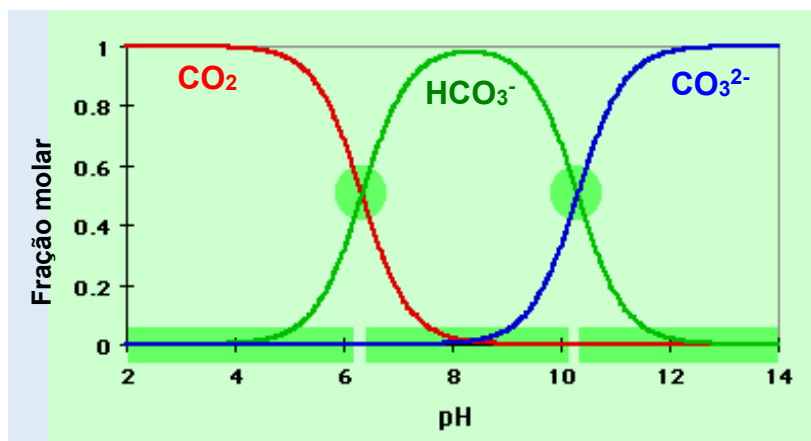


Figura 1 – Variação com o pH das concentrações de CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-} .

2.2. A fluoresceína como sonda de pH

A fluoresceína (figura 2) é um corante que tem sido utilizado como sonda de pH.

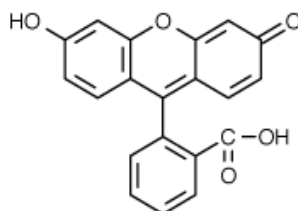


Figura 2 - Estrutura da fluoresceína.

As soluções deste corante apresentam uma forte absorção na região do azul, transmitindo a cor amarela (figura 3-A). A fluoresceína possui ainda uma emissão de fluorescência dependente do pH, e em soluções neutras ou básicas, é visível uma forte emissão na região do verde (figura 3-B). Assim, a fluoresceína é muito útil como sonda de pH, sendo utilizada neste trabalho para a estimativa do pH de uma água natural [1].

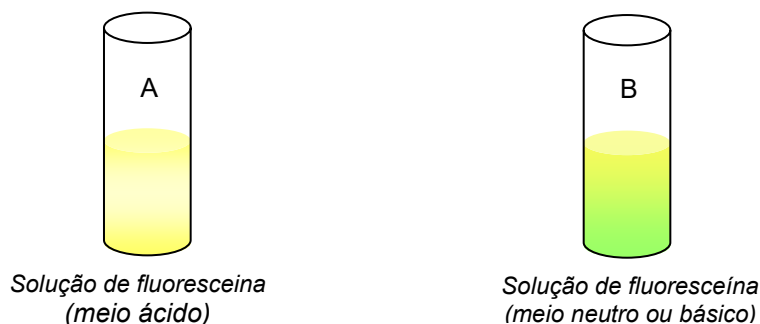
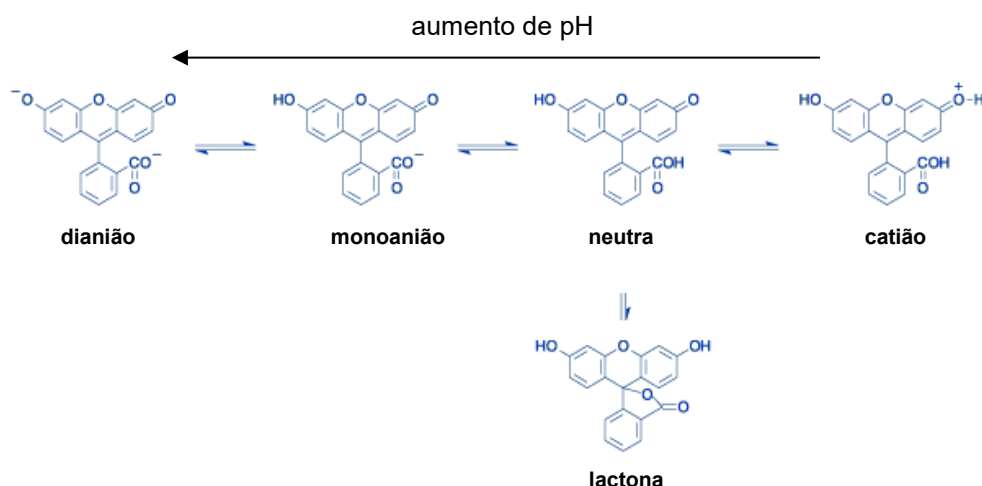


Figura 3 – Soluções de fluoresceína em meios de diferente pH.

2.3. Comportamento fotofísico da fluoresceína

Nas soluções de fluoresceína ocorre um equilíbrio iônico dependente do pH:



Em soluções aquosas com pH acima de 9, a fluoresceína encontra-se quase totalmente na forma de dianião (grupos fenol e ácido carboxílico ionizados). Por acidificação do meio, forma-se o monoânion (protonação do fenol), depois a espécie neutra (protonação do ácido carboxílico) e, por fim, o catião. O equilíbrio pode ainda envolver a formação de uma lactona.

Apenas os aniões são fluorescentes, sendo os rendimentos quânticos de 0.37 e 0.93, para o monoânion e dianião, respetivamente. Assim, o espectro de fluorescência é dominado pelo dianião (fig. 4), com apenas uma pequena contribuição do monoânion [5].

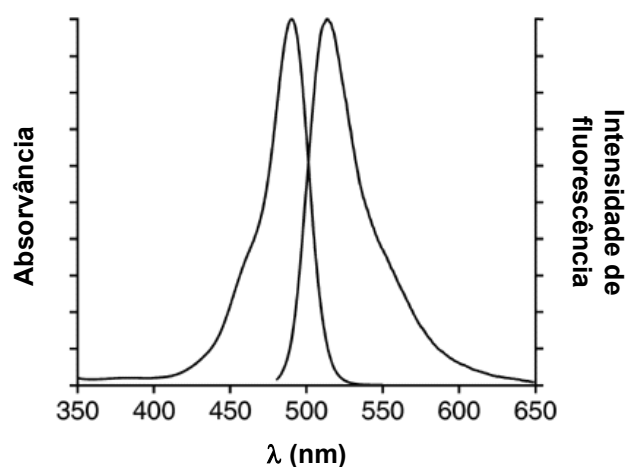


Figura 4 – Espectros de absorção e fluorescência da fluoresceína em meio básico.

3. TÉCNICA EXPERIMENTAL

3.1. Preparação de soluções

- Preparar, em balões de 5 ml, soluções de fluoresceína com concentração de 4×10^{-6} M em tampões com vários valores de pH. Existem já preparadas as soluções-tampão com pH=2; 3; 4; 5; 5.5; 6; 6.5; 7; 8; 9 e 10. Utilizar uma solução-mãe de fluoresceína em etanol, com a concentração de aprox. 4×10^{-4} M.
- Preparar 5 ml de solução de fluoresceína com concentração de 4×10^{-6} M numa água mineral engarrafada. Para tal, pipetar a quantidade requerida de solução de fluoresceína em etanol 4×10^{-4} M e evaporar o solvente sob corrente de azoto ou argon. Completar o volume com a água mineral.

3.2. Medidas de absorção

- Traçar os espectros de absorção, na gama 340 a 600 nm, das soluções de fluoresceína com diferentes valores de pH. Utilizar como referência o tampão de pH respetivo (*Escala de absorvância sugerida: 0 a 0.5*).
- Traçar, nas mesmas condições, o espectro de absorção da fluoresceína numa água mineral engarrafada.

3.3. Medidas de fluorescência

- Traçar os espectros de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}=460$ nm), na gama 470-600 nm, das soluções de fluoresceína com diferentes valores de pH (*Utilizar sensibilidade baixa*).
- Traçar, nas mesmas condições, o espectro de fluorescência da fluoresceína na água engarrafada.

4. ANÁLISE DE RESULTADOS

- Interpretar os espectros de absorção da fluoresceína a vários valores de pH.
- Analisar o espectro de absorção da fluoresceína na água e identificar as formas de fluoresceína presentes em solução.
- Interpretar os espectros de fluorescência da fluoresceína a vários valores de pH.
- Traçar o gráfico da intensidade de fluorescência em função do pH do meio. Comentar o gráfico obtido.
- A partir do gráfico anterior, e com base nos espectros da fluoresceína obtidos na água engarrafada, estimar o pH da água mineral. Comparar com o valor tabelado no rótulo.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, "Absorption and fluorescence properties of fluorescein", *Spectrochimica Acta Part A* **51**, L7-L21 (1995).
- [2] C. H. J. Wells, "Introduction to Molecular Photochemistry", Chapman and Hall, London, 1972.
- [3] J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, New York, 1983.
- [4] M.M. Martin, L.J. Lindqvist, "The pH Dependence of Fluorescein Fluorescence", *J. Luminescence* **10**, 381 (1975).