

**PUBLICAÇÃO CDTN – 959**

**CALIBRAÇÃO DO FLUORÍMETRO – 10AU**

**Bruno Garcia Batista  
Jaqueline Martins de Paulo  
Rubens Martins Moreira  
2006**

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR  
Comissão Nacional de Energia Nuclear

**PUBLICAÇÃO CDTN – 959**

**CALIBRAÇÃO DO FLUORÍMETRO – 10AU**

**Bruno Garcia Batista  
Jaqueline Martins de Paulo  
Rubens Martins Moreira  
2006**

Belo Horizonte  
Julho 2006

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	4
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2 OBJETIVO</b> .....	6
<b>3 PROCEDIMENTO</b> .....	6
3.1 Montagem do equipamento .....	7
3.2 Preparo das soluções Padrão.....	10
3.3 CALIBRAÇÃO .....	11
3.3.1 Procedimento.....	11
3.4 Resultados da validação .....	11
3.4.1 Procedimento para validação na faixa low.....	11
<b>4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	20
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	20
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	20

## **RESUMO**

A fluorescência é a base da fluorimetria que engloba o conjunto de técnicas analíticas baseadas na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas de caráter singleto quando estas retornam para o estado fundamental.

A fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de calibrar o fluorímetro de campo 10AU utilizado pela equipe do setor de Meio Ambiente do CDTN.



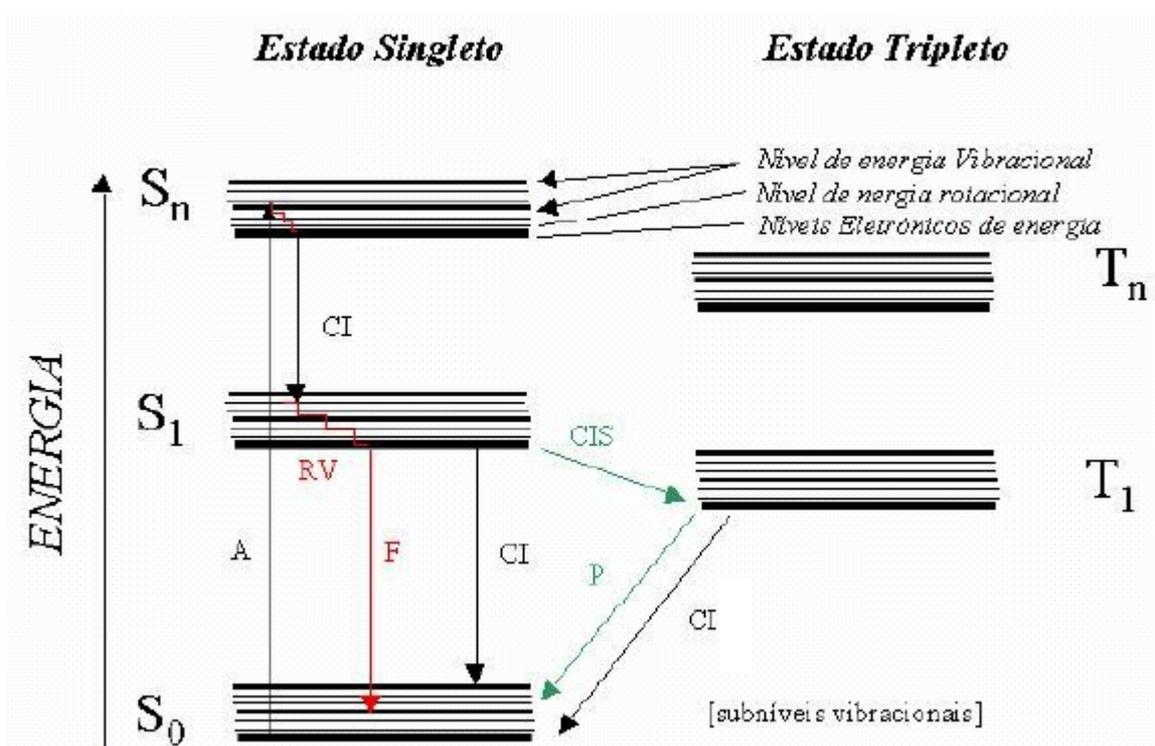


Figura 2: Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, ( $S_0$ ) estado fundamental, ( $S_n$ ) estado excitado singlete, ( $S_1$ ) primeiro estado excitado singlete, (RV) relaxamento vibracional, (CI) cruzamento interno, (CIS) cruzamento intersistemas, ( $T_n$ ) estado excitado tripleto. (Adaptado de Cardoso, 2003)

A partir de  $S_1$ , se a multiplicidade da população molecular não mudar, ela pode seguir dois caminhos para retornar ao estado fundamental. Primeiro, se a diferença de energia entre  $S_1$  e  $S_0$  (estado fundamental) não for muito grande e existir possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode ser levada ao mais baixo nível vibracional de  $S_1$  por relaxamento vibracional sem emissão de radiação eletromagnética, ou seja, ocorre um CI. Se, no entanto, a diferença energética entre  $S_1$  e  $S_0$  for relativamente grande, a desativação para o estado fundamental se dá com emissão de radiação na forma de fluorescência. A fluorescência é a base da fluorimetria que engloba o conjunto de técnicas analíticas baseadas na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas de caráter singlete quando estas retornam para o estado fundamental.<sup>(1)</sup>

## 2 OBJETIVO

Executar a calibração do fluorímetro de campo no modo contínuo.

Fabricante: Turner Designs

Modelo 10-AU

## 3 PROCEDIMENTO

### 3.1 Montagem do equipamento

A primeira etapa deste trabalho foi a substituição a cubeta. As Figuras de 1 a 6 ilustram as etapas para montagem do sistema.



Figura 1: Fluorímetro aberto para limpeza dos filtros e substituição da cubeta.

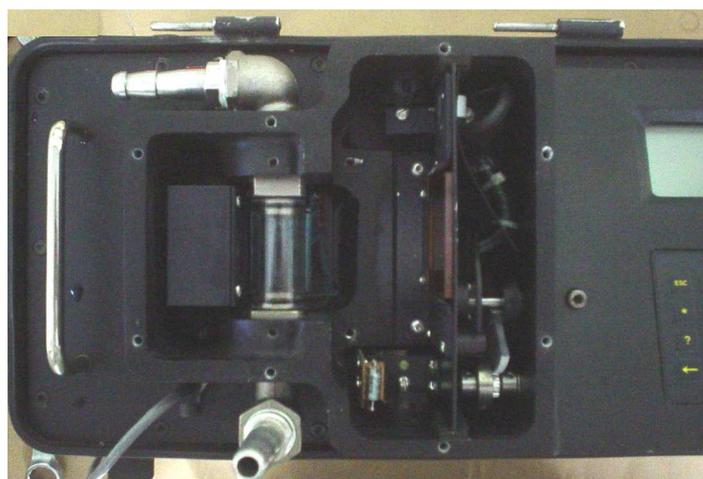


Figura 2: Cubeta para testes em fluxo contínuo



Figura 3: Fluorímetro com cubeta para fluxo contínuo.



Figura 4: Conexão das mangueira.



Figura 5: Teste em fluxo contínuo.



Figura 6: *Display* do fluorímetro

A principal dificuldade encontrada nesta etapa do trabalho foi o encaixe para substituição da cubeta (Figura 2). Atente-se para os seguintes itens:

- 1 - Lubrifique as paredes das conexões de metal com silicone.
- 2 - Cuidado ao manusear as partes ópticas do equipamento (cubetas, lâmpada, filtros), estas devem estar limpas e secas.
- 3 - O compartimento da cubeta deve ser fechado de modo que os parafusos allen sejam apertados cruzadamente, para evitar entrada de luz.
- 4 - O conjunto deve estar bem vedado e livre de vazamentos.

### 3.2 Preparo das soluções Padrão

Reagente de partida: Rodamina WT(20%)

1mL Rodaminha WT → 0,2 gramas  
X → 1 grama  
5mL de Rodamina

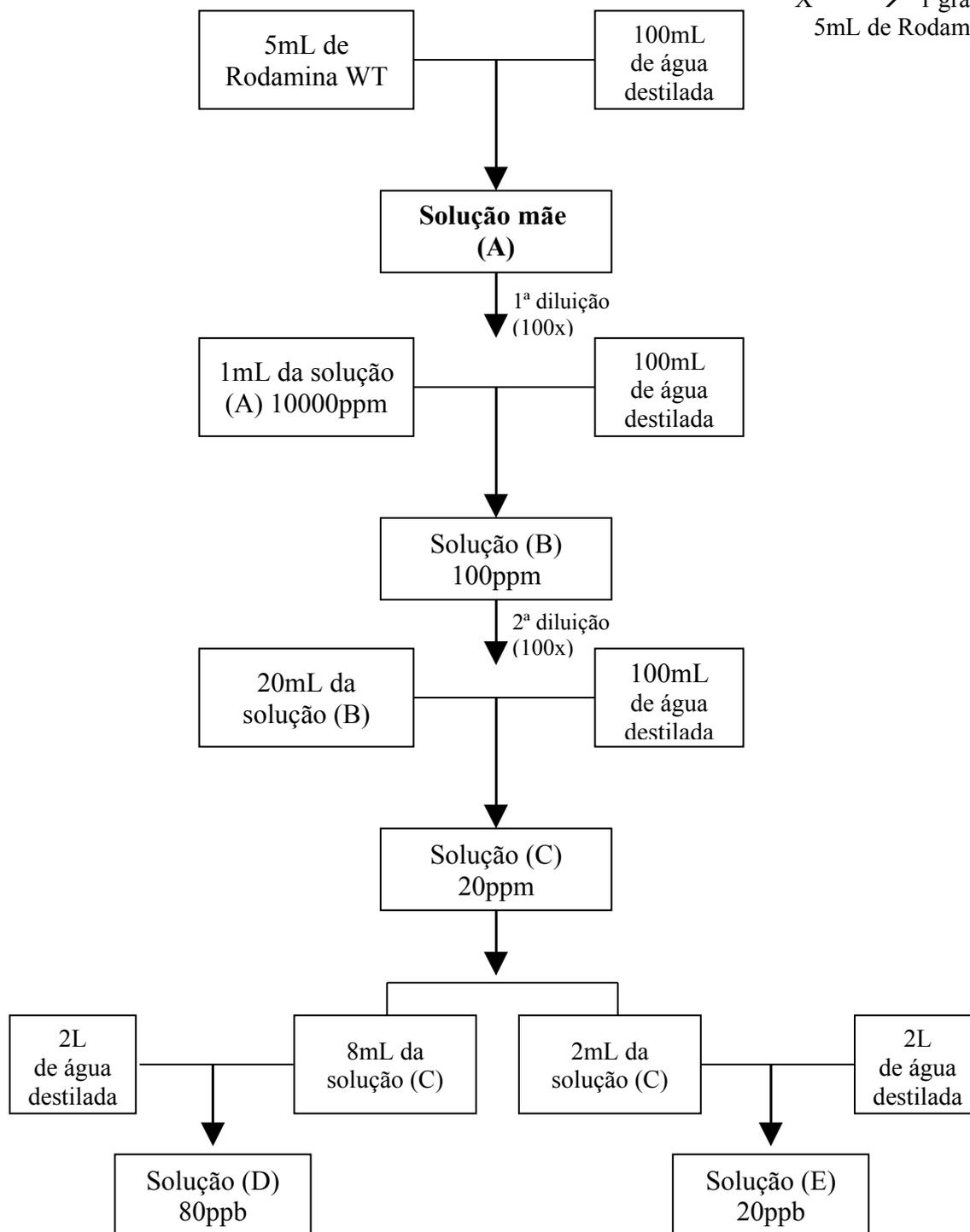


Figura 7: Preparo de soluções padrões

### 3.3 Calibração

De acordo com o manual de instruções do fluorímetro 10-AU a calibração deve ser feita a partir de soluções com concentrações 20 e 80% da faixa que pretende-se ler. Assim foram preparadas soluções padrão em diferentes concentrações, conforme apresentado no diagrama de blocos da Figura 7.

Optou-se pela calibração na faixa *med*. Assim fez-se uso de uma solução de rodamina WT 20% (10ppb), que corresponde a faixa de leitura pretendida.

#### 3.3.1 Procedimento

1- Preparo da solução padrão 10ppb

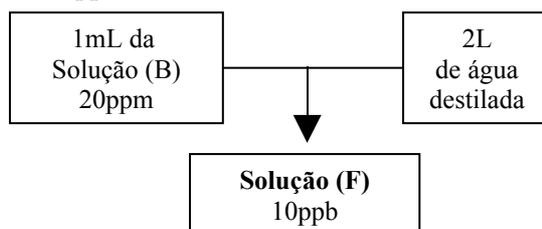


Figura 8: Diagrama de blocos – preparação de solução padrão 10ppb.

2 – Calibrar *med*;

3 – Ajuste da temperatura com coeficiente 0,026;

4 – Exp

5 – *Celsius*

6 – *Sensitivity adjustment knob* – É necessário realizar ajuste da sensibilidade de acordo com a faixa que se deseja ler, porém não foi possível obter esse ajuste. Prosseguiu-se a calibração.

7 – *Run Blank*

8 – *Span 99%*

9 – Ok

10 – *Run* padrão 10ppb

11- Ok

12 – Leitura do padrão. Valor obtido: 9,9ppb

A etapa de calibração foi concluída com sucesso. O resultado obtido para leitura do padrão de concentração igual a 10ppb mostrou-se satisfatório (9,9ppb).

### 3.4 Resultados da validação

Para validação da calibração do fluorímetro realizou-se medidas na faixa *low* para concentrações variando de 12,5ppt a aproximadamente 1ppb. De acordo com o manual de instruções do equipamento a sensibilidade de leitura para a rodamina WT é de 5ppt. Para obtenção dos resultados utilizou-se uma solução padrão de 10ppb (Figura 8) e seguiu o procedimento conforme mostrado a seguir.

#### 3.4.1 Procedimento para validação na faixa low

1 – Preparo da solução padrão 10ppb;

2 – 4L de água destilada (Branco);

3 – *Run Blank*;

4 – Adicionar alíquotas da solução padrão (10ppb) conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Validação da calibração do fluorímetro na faixa *low*.

Volume Inicial (L)	Vol. Adic. Rodamina (10 ppb)/ (mL)	Concentração (ppb) Corrigida	Leitura (ppb)
4	0	0,0000	0
4	5	0,0125	0,018
4	5	0,0249	0,03
4	2	0,0299	0,036
4	2	0,0349	0,04
4	2	0,0398	0,046
4	2	0,0448	0,052
4	2	0,0498	0,055
4	2	0,0547	0,058
4	2	0,0596	0,064
4	2	0,0646	0,069
4	2	0,0695	0,074
4	2	0,0744	0,077
4	2	0,0794	0,084
4	2	0,0843	0,087
4	2	0,0892	0,092
4	2	0,0941	0,097
4	2	0,0990	0,099
4	2	0,1039	0,105
4	2	0,1088	0,111
4	2	0,1137	0,114
4	2	0,1186	0,119
4	2	0,1235	0,124
4	2	0,1283	0,128
4	2	0,1332	0,138
4	2	0,1381	0,136
4	2	0,1429	0,139
4	5	0,1551	0,15
4	6	0,1696	0,16
4	5	0,1816	0,172
4	5	0,1937	0,182
4	5	0,2057	0,195
4	5	0,2177	0,203
4	5	0,2296	0,214
4	5	0,2415	0,224
4	5	0,2534	0,231
4	10	0,2771	0,254
4	10	0,3007	0,272
4	10	0,3241	0,292
4	10	0,3475	0,31
4	10	0,3707	0,33
4	10	0,3939	0,35
4	10	0,4169	0,366
4	10	0,4398	0,383
4	10	0,4626	0,401
4	10	0,4853	0,422
4	100	0,7063	0,604
4	100	0,9173	0,78

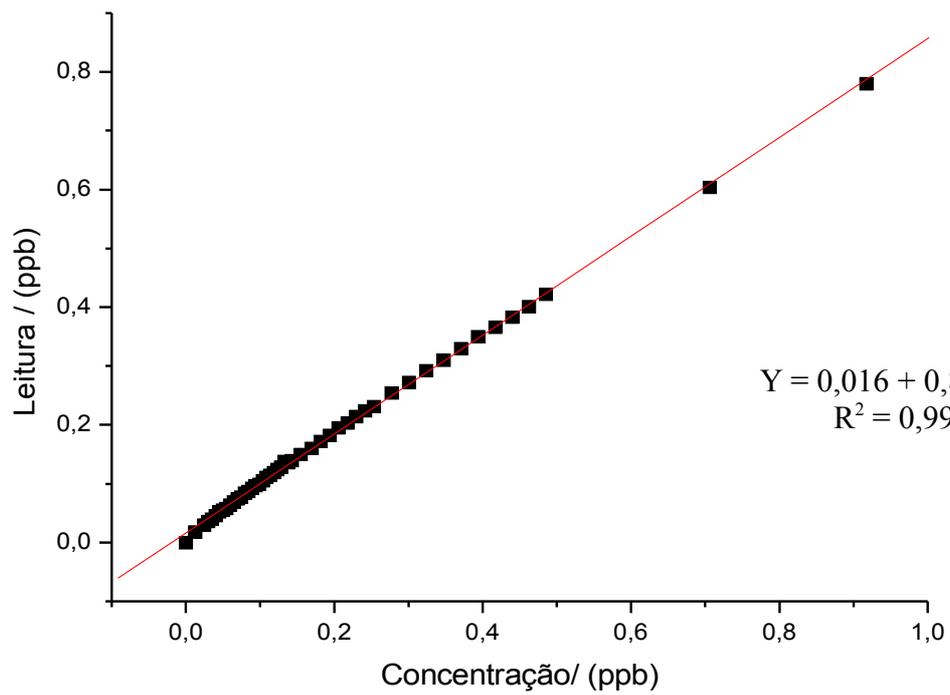


Figura 9: Validação da calibração do fluorímetro na faixa *low* com concentrações variando de (0 a 1)ppb.

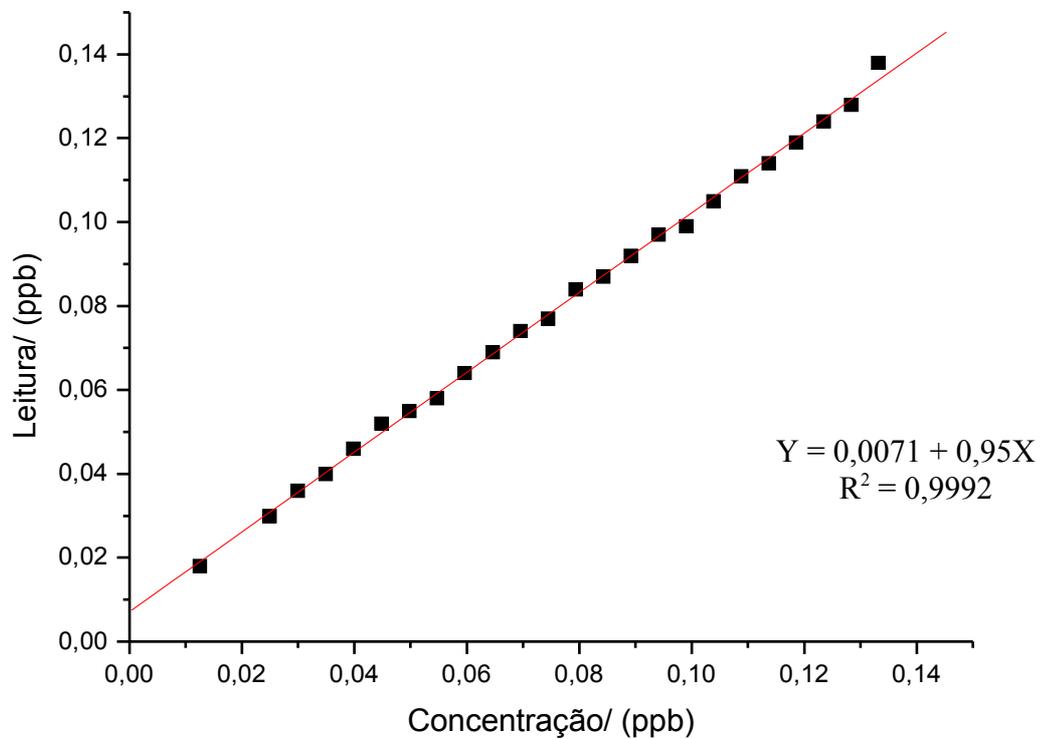


Figura 10: Leituras obtidas na faixa *low* com concentrações variando de (0 a 140)ppt.

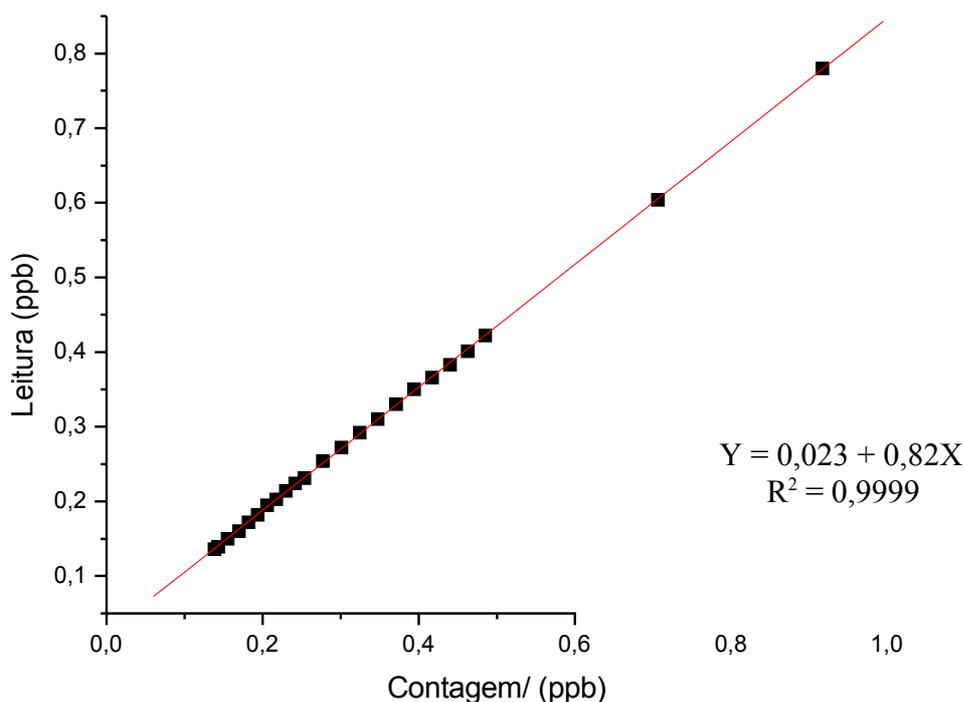


Figura 11: Leituras obtidas na faixa *low* com concentrações variando de 140ppt a 1ppb.

Após leitura das amostras na faixa *low* prosseguiu-se para validação na faixa *med* e *high* usando o modo automático do equipamento. Essa etapa foi feita via adição de padrão de 1000ppb.

### 3.4.2 Procedimento para validação no modo automático

1 – Preparo da solução padrão 1000ppb

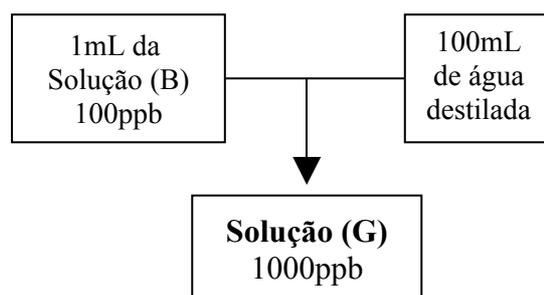


Figura 12: Diagrama de blocos – preparação de solução padrão 1000ppb.

2 – 4L de água destilada (Branco);

3 – *Run Blank*;

4 – Adicionar alíquotas da solução padrão (1000 ppb) conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Adição de padrão 1000ppb com leituras no modo automático.

Volume Inicial (L)	Vol. Adic. Rodamina (1000ppb)/ (mL)	Leitura (ppb)	Concentração Corrigida (ppb)
4	12	2,73	2,99
4	10	5,05	5,47
4	8	6,88	7,44
4	10	9,33	9,90
4	10	11,6	12,35
4	10	13,8	14,78
4	10	16	17,20
4	10	18,3	19,61
4	10	20,5	22,00
4	10	22,6	24,39
4	10	24,6	26,76
4	10	26,8	29,13
4	10	28,9	31,48
4	10	31	33,82
4	10	33,1	36,14
4	10	35,1	38,46
4	10	37,2	40,77
4	10	38,9	43,06
4	50	49	54,37
4	50	58,5	65,42
4	50	66,8	76,21
4	50	75,7	86,76
4	50	86,2	97,07
4	50	94,4	107,14
4	50	103	117,00
4	50	110	126,64
4	50	118	136,07
4	50	125	145,30

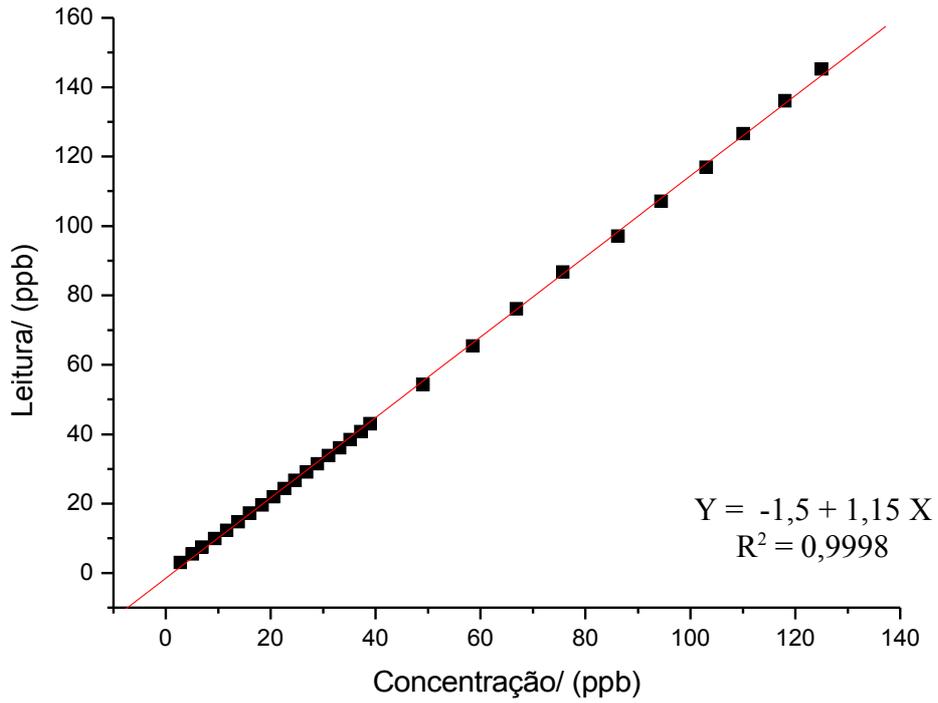


Figura 12: Leituras obtidas no modo automático com concentrações variando de (0 a 145)ppb

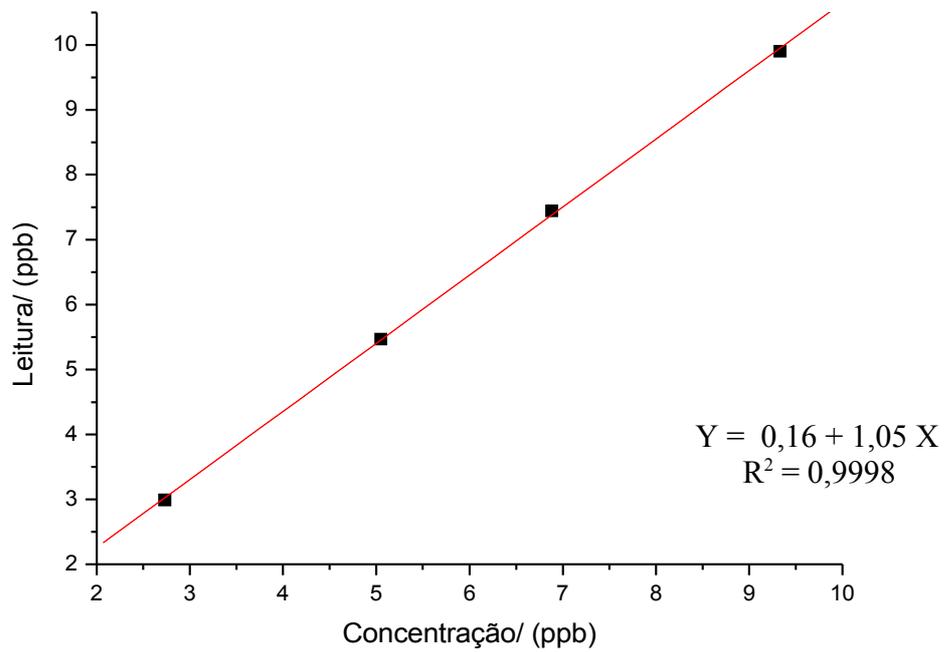


Figura 13: Validação da calibração do fluorímetro na faixa *low* com concentrações variando de (0 a 10)ppb.

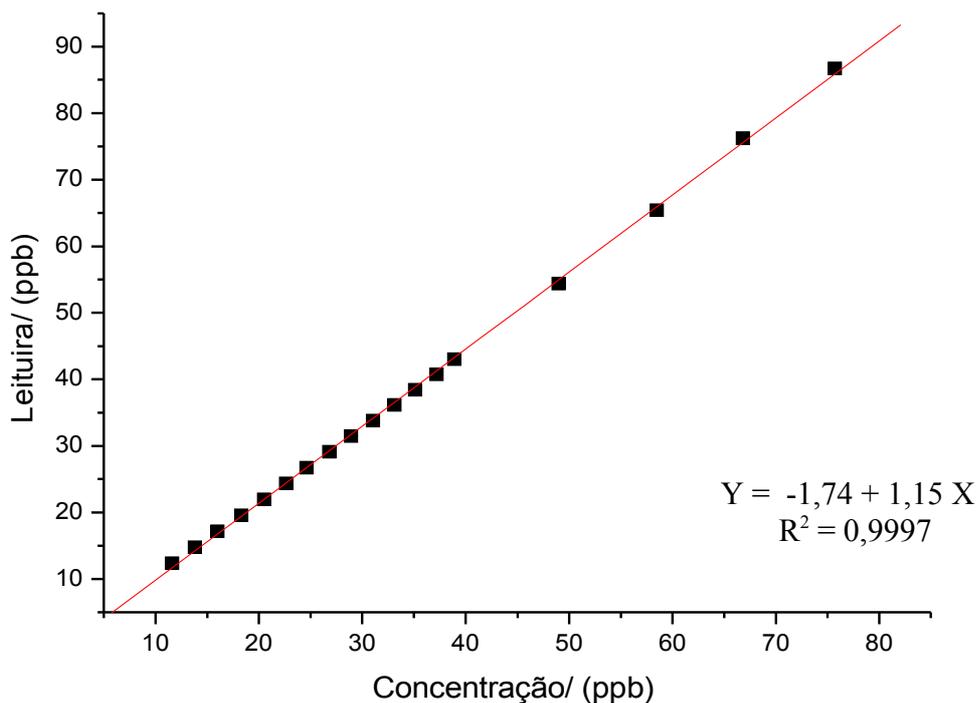


Figura 14: Validação da calibração do fluorímetro na faixa *med* com concentrações variando de (10 a 80)ppb.

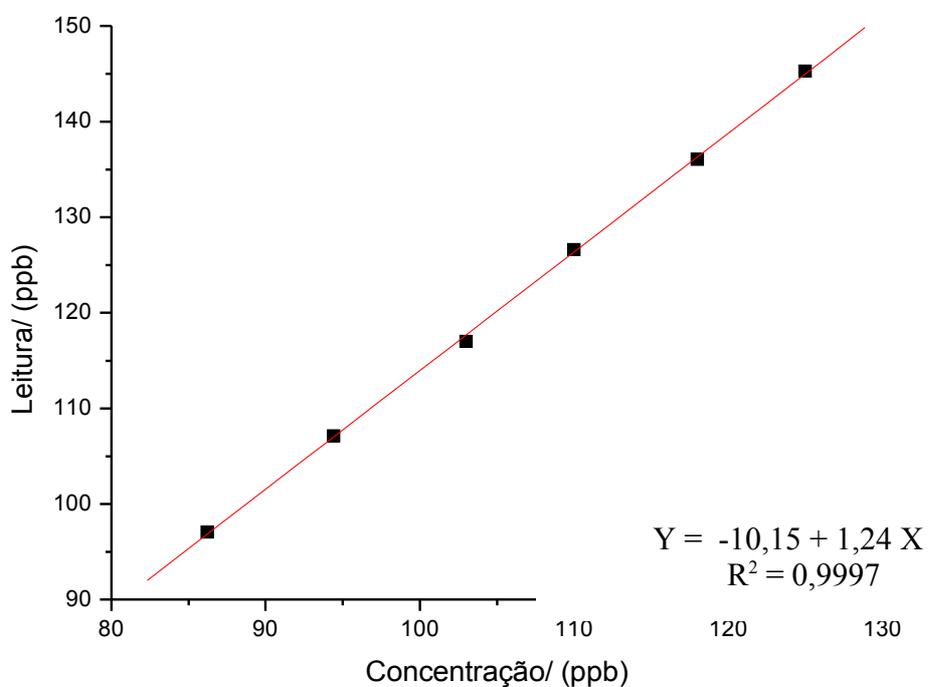


Figura 15: Validação da calibração do fluorímetro na faixa *high* com concentrações variando de (90 a 145)ppb.

### 3.4.3 Validação de medidas no modo automático – Faixa de 25ppt a 500ppb

Para validação das medidas no modo automático foram preparadas soluções de 10ppb, 1000ppb e 100ppm. As leituras foram realizadas em triplicadas adicionando volumes conhecidos de cada uma dessas soluções conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Adição de padrões com leituras no modo automático.

Volume Inicial (mL)	Vol. Adic. Rodamina (mL)	Concentração (ppb) Corrigida	Leitura 1 (ppb) 14/07/06	Leitura 2 (ppb) 17/07/06	Leitura 3 (ppb) 17/07/06	Média	Desvio
4000	10mL de 10ppb	0,025	0,027	0,019	0,026	0,024	0,004
4000	10mL de 10ppb	0,050	0,057	0,038	0,054	0,050	0,010
4000	10mL de 10ppb	0,075	0,082	0,064	0,083	0,076	0,011
4000	3,7mL de 1000ppb	0,924	0,917	1,010	1,000	0,976	0,051
4000	4mL de 1000ppb	1,921	1,980	2,020	2,020	2,007	0,023
4000	4mL de 1000ppb	2,916	2,960	3,030	3,000	2,997	0,035
4000	4mL de 1000ppb	3,910	3,930	4,030	3,990	3,983	0,050
4000	4mL de 1000ppb	4,901	4,930	5,040	4,970	4,980	0,056
4000	4mL de 1000ppb	5,890	5,900	6,010	5,950	5,953	0,055
4000	4mL de 1000ppb	6,877	6,860	7,010	6,900	6,923	0,078
4000	4mL de 1000ppb	7,863	8,020	7,980	7,860	7,953	0,083
4000	4mL de 1000ppb	8,846	8,980	9,230	9,060	9,090	0,128
4000	4mL de 1000ppb	9,827	9,910	10,200	10,000	10,037	0,148
4000	40 mL de 1000ppb	19,536	18,900	19,600	19,400	19,300	0,361
4000	40 mL de 1000ppb	29,056	---	28,800	28,400	19,067	0,283
4000	40 mL de 1000ppb	38,392	36,500	37,700	37,200	37,133	0,603
4000	40 mL de 1000ppb	47,551	44,800	46,400	45,700	45,633	0,802
4000	40 mL de 1000ppb	56,537	52,900	54,700	54,000	53,867	0,907
4000	40 mL de 1000ppb	65,355	60,800	62,900	61,900	61,867	1,050
4000	40 mL de 1000ppb	74,010	68,300	70,900	69,600	69,600	1,300
4000	40 mL de 1000ppb	82,506	75,700	78,400	77,100	77,067	1,350
4000	40 mL de 1000ppb	90,847	85,200	87,700	86,300	86,400	1,253
4000	40 mL de 1000ppb	99,038	91,400	94,800	93,300	93,167	1,704
4000	40 mL de 1000ppb	107,083	98,000	102,000	100,000	100,000	2,000
4000	4 mL de 100ppm	180,277	172,000	179,000	178,000	176,333	3,786
4000	4 mL de 100ppm	242,381	238,000	248,000	245,000	243,667	5,132
4000	4 mL de 100ppm	295,737	298,000	310,000	307,000	305,000	6,245
4000	4 mL de 100ppm	342,073	352,000	367,000	364,000	361,000	7,937
4000	4 mL de 100ppm	382,687	400,000	418,000	414,000	410,667	9,452
4000	4 mL de 100ppm	418,579	444,000	463,000	458,000	455,000	9,849
4000	4 mL de 100ppm	450,527	482,000	504,000	499,000	495,000	11,533
4000	4 mL de 100ppm	479,146	518,000	541,000	536,000	531,667	12,097

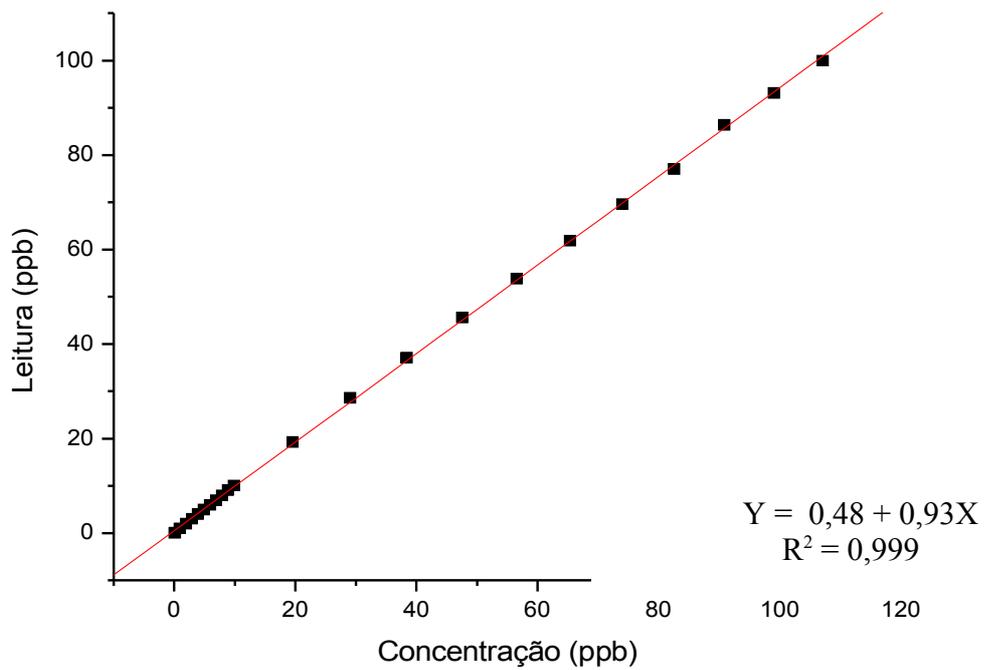


Figura 16: Leituras obtidas no modo automático com concentrações variando de 25ppt a 100ppb.

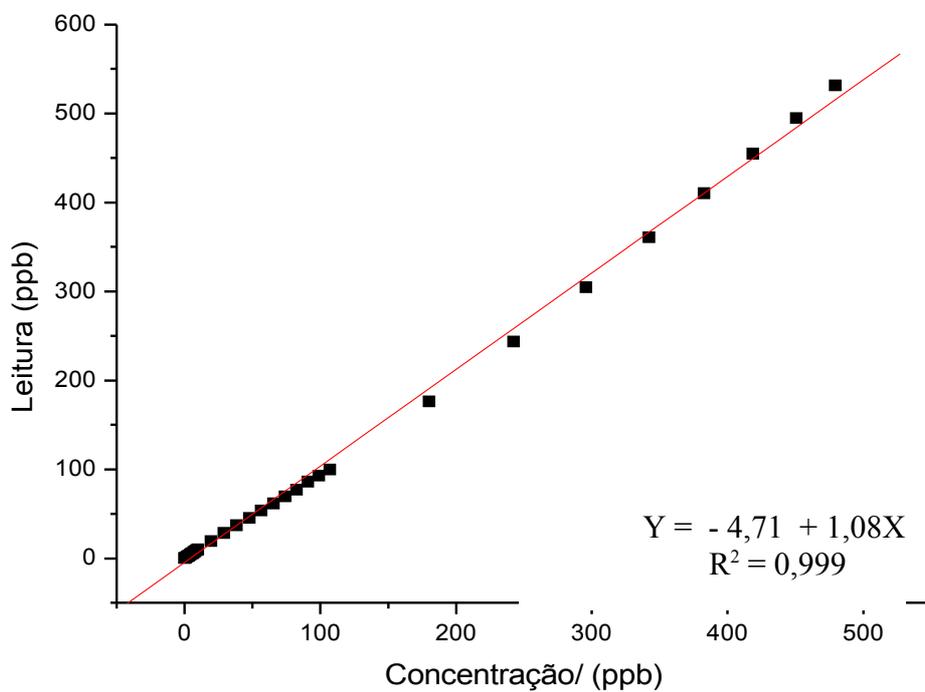


Figura 17: Leituras obtidas no modo automático com concentrações variando de (0 a 500)ppb

#### 4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Após calibração do fluorímetro 10-AU foram feitos diversos testes de validação via adição de padrão.

Inicialmente foram feitos testes no modo manual do equipamento com as leituras realizadas na faixa *low* (concentrações variando de 0 a 1ppb). Os resultados obtidos, conforme apresentado nas Figuras 9 a 11, mostram a concordância entre os valores esperados e medidos.

As medidas de concentrações muito baixas são extremamente importantes para execução de trabalhos de campo. Porém trabalhos recentemente realizados pelo nosso grupo de pesquisa obtiveram leituras médias na faixa de 10ppb, o que equivale à faixa *med* de leitura do equipamento. Assim procedeu-se a validação para essa faixa de leitura.

Todas as faixas de leituras, realizadas via adição de padrão, mostraram eficientes para detecção de rodamina wt. A Figura 17 mostra que um aumento na concentração de soluções de rodamina gera um erro nas leituras realizadas. Porém esse fator não inviabiliza o uso do fluorímetro 10-AU.

#### 5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentaram valores satisfatórios para detecção de rodamina wt em toda a faixa de leitura. Observou-se que o comportamento linear para a rodamina apresenta valores mais satisfatórios na faixa de (0 a 120)ppb.

#### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KALBITZ, K.;GEYER, W.;GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances a reflection of land use in a fen area. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 47, p. 219-238, 1999.

MILORI, D.M.B.P.; MARTIN NETO, L.; BAYER, C. Flluorescência induzida por laser para análise de matéria orgânica de solos intactos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, n.3, p. 1-18, 2002.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA, Rio de Janeiro, RJ. **Certificação digital no. 0212136/CA**. <<http://www.cnpdia.embrapa.br/publicações>>. Acesso em: 10 nov. 2006.

TURNER DESIGNS. **Manual do usuário do fluorímetro de campo modelo 10AU-005**. Nova York, 2003.