

2 Fosforimetria na temperatura ambiente em substrato sólido (FTASS)

A espectrometria de fotoluminescência molecular reúne um conjunto de técnicas analíticas que se fundamenta na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas quando as mesmas retornam do estado excitado para o estado fundamental.⁸²

O processo fotoluminescente pode ser explicado por meio do diagrama de Jablonski, que está representado na Figura 2.1. Neste diagrama, os vários estados energéticos de uma molécula e seus respectivos níveis vibracionais (os níveis rotacionais não são mostrados) são representados, além disso, pode-se observar as várias etapas envolvidas desde a promoção energética de uma população de moléculas após absorção de energia radiativa até o retorno dessa população ao estado fundamental.

Quando uma população de moléculas absorve fótons de energia apropriada, esta passa do seu estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_n). A partir disso, esta população alcançará o nível vibracional de menor energia do primeiro estado excitado singlete $S_{(1)}$ através de processos não-radiativos de desativação de energia chamados de relaxação vibracional (RV), que se caracteriza por perda de energia na forma de calor através de vibrações moleculares e/ou colisões com outras espécies do sistema, e de cruzamentos internos (CI), que são transições não-radiativas entre estados de energia de mesma multiplicidade e que ocorrem através de níveis vibracionais degenerados. Esse processo segue a regra de Kasha e ocorre por causa dos baixos tempos de vida do CI e do RV (da ordem de 10^{-13} e 10^{-14} s).

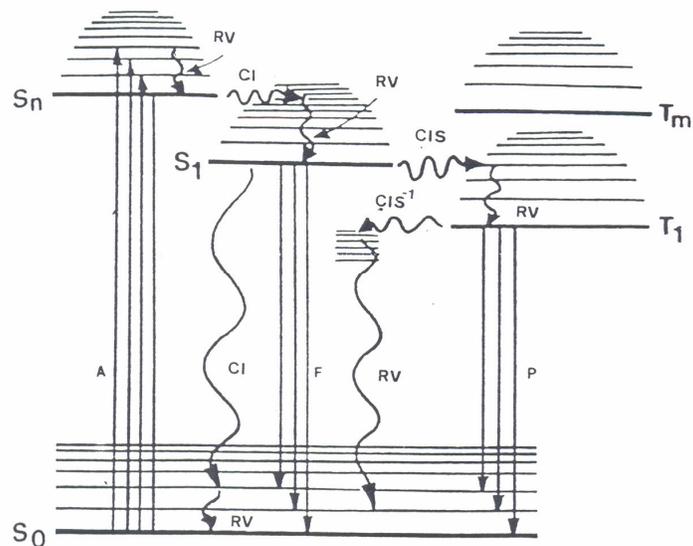


Figura 2.1. Diagrama de Jablonski modificado

Onde:

CI – cruzamento interno

RV – relaxamento vibracional

CIS – cruzamento intersistemas invertido

P – fosforescência

F - fluorescência

A partir de S₁ existem várias rotas possíveis para que essa população de moléculas alcance novamente o estado fundamental, dentre essas, citaremos as duas que envolvem re-emissão de fótons. Na primeira possibilidade, a população sofre transição S₁→S₀ com conseqüente emissão de irradiação eletromagnética com uma freqüência menor que a da radiação absorvida (deslocamento de Stokes). Essa transição radiativa entre estados de mesma multiplicidade ocorre na ordem de 10⁻⁷ a 10⁻⁹ s e recebe o nome de fluorescência, sendo base da técnica analítica conhecida por fluorimetria.⁸² Na segunda possibilidade, ocorre a troca de multiplicidade da população de moléculas do estado singlete S₁ para o estado excitado tripleto T_n por meio de um evento conhecido como cruzamento intersistemas (CIS). O CIS possui tempo de vida de aproximadamente 10⁻⁷ s e compete diretamente com a fluorescência na despopulação de S₁. Esse processo é favorecido em regiões de alta energia vibracional nuclear onde as curvas de potencial dos estados singlete e tripleto se encontram. Embora a

transição entre estados excitados de diferentes multiplicidades, no caso a transição $S_1 \rightarrow T_n$, seja quântomecanicamente proibidas⁸³ o CIS pode ocorrer em casos onde existe acoplamento spin-orbital. Este tipo de fenômeno, que consiste no acoplamento entre os campos magnéticos gerados pelo movimento do spin e pelo movimento angular orbital do elétron promove a mistura quântomecânica de estados excitados.

A população de molécula tendo alcançado o nível vibracional de menor energia de T_1 por meio de CI e de RV, poderá alcançar S_0 com emissão de radiação num processo entre estados com multiplicidades diferentes ($T_1 \rightarrow S_0$), recebendo o nome de fosforescência que é a base da técnica analítica conhecida por fosforimetria.⁸²

Ambos os processos fluorescente e fosforescente sofrem competição direta dos processos não-radiativos, sendo a fosforescência a mais afetada por ter o tempo de vida maior (da ordem de 10^{-4} a 10 s). Conseqüentemente a observação de fosforescência requer o uso de condições experimentais muito especiais, que favoreçam CIS e minimizem dramaticamente RV e CI.

A eficiência quântica luminescente ϕ_L é um parâmetro que avalia a contribuição do processo radiativo no processo geral da desativação da molécula no estado excitado. No caso da fosforescência a eficiência quântica, ϕ_p , é expressa pela razão entre o número total de fótons emitidos pela molécula na forma fosforescente e o número total de fótons absorvidos.⁸² Os valores que ϕ_p pode assumir variam entre zero e um, conseqüentemente, compostos que apresentam ϕ_p próximos da unidade (de fato superior a 0,1), certamente apresentarão alta probabilidade de desativação de T_1 através de emissão fosforescente.⁸⁴

O termo ϕ_p pode ser expressa em função das constantes de velocidade (ou taxas de desativação) dos processos radiativos e não radiativos de acordo com a Equação 1 e Equação 2.

$$\phi_p = \frac{k_{cis}}{k_{cis} + k_f + k_{fq}} \times \frac{k_p}{k_p + k_{pq}} \quad (1)$$

onde

$$\phi_{cis} = \frac{k_{cis}}{k_{cis} + k_f + k_{fq}} \quad (2)$$

onde:

k_{cis} = constante de velocidade do cruzamento intersistemas

k_f = constante de velocidade da fluorescência

k_{fq} = constante de velocidade dos processos não-radiativos $S_1 \rightarrow S_0$

k_p = constante de velocidade da fosforescência

k_{pq} = constante de velocidade dos processos não-radiativos $T_1 \rightarrow S_0$

ϕ_{cis} = eficiência quântica do cruzamento intersistemas

Uma maior probabilidade de observar emissão fosforescente ocorre em sistemas de elétrons π conjugados nas estruturas moleculares dos compostos (moléculas aromáticas com ou sem heteroátomos no sistema conjugado)⁸²⁻⁸⁴. As transições eletrônicas responsáveis pela emissão fosforescente são facilitadas pelo livre movimento de elétrons através dos orbitais moleculares, o que não é observado para compostos com estruturas alifáticas por causa da alta energia necessária para promover uma transição do tipo $\sigma \rightarrow \sigma$ o que geralmente provoca a decomposição desse tipo de molécula⁸²⁻⁸⁴. Analisando a Equação 1 pode-se concluir que o aumento da ϕ_p pode ser induzido pela redução do valor de k_{pq} e/ou pelo aumento de ϕ_{cis} ,

A redução do valor de k_{pq} pode ser conseguido pela redução de liberdade vibracional e de difusão do luminóforo (molécula luminescente) colocando-a em uma matriz rígida ou organizada. Nesse caso, soluções congeladas a 77K, solventes viscosos, meio organizado ou substratos sólidos são artifícios que podem ser aplicados. O uso de matriz rígida ou organizada aumenta a probabilidade de desativação de T_1 sem emissão de radiação.⁸²⁻⁸⁴

No caso do ϕ_{cis} , observou-se que a presença de átomos de elevado número atômico (átomos pesados) nas vizinhanças da molécula de interesse pode provocar um aumento na magnitude desse parâmetro.^{82,83,85} Assim, o aumento de fosforescência por átomos pesados pode ser provocado pela presença destes na forma de ligantes na molécula de interesse (efeito interno do átomo pesado)⁸⁶ ou simplesmente pela proximidade entre a molécula de interesse e átomos pesados na forma, por exemplo de sais inorgânicos (efeito externo do átomo pesado)⁸⁷. Em ambos os casos, um favorecimento das constantes de velocidade dos processos envolvendo troca de spin eletrônico⁸²⁻⁸⁴ é observado. De modo geral, o aumento da fosforescência é acompanhado pela

redução da fluorescência. Concomitantemente, o tempo de vida da emissão fosforescente sofre redução considerável⁸²⁻⁸⁴, aumentando sua eficiência em competir com os processos não-radiativos para desativação do estado excitado.

Os mecanismos pelos quais os átomos pesados são capazes de mudar a multiplicidade do analito não estão devidamente esclarecidos⁸⁸⁻⁹⁰. Alguns autores têm proposto a formação de complexos de transferência de carga entre o átomo pesado e o analito⁸⁸. Outros propõem a reação destas espécies para formar um complexo no estado excitado (exciplex)⁸⁹. Finalmente, existem os que postulam interações puramente eletrostáticas para explicar a perturbação provocada por átomos pesados⁹⁰. De qualquer modo, qualquer um desses mecanismos irá provocar acoplamento spin-orbital com mudança de multiplicidade da população no estado excitado.

Por outro lado, vale salientar que a presença de átomos pesados pode também aumentar as constantes de velocidade dos processos de desativação de T_1 sem emissão de radiação. Nestes casos, a constante ϕ_p será desfavorecida e uma redução do sinal fosforescente será observada.⁸²⁻⁸⁴

O tempo de vida de um fenômeno fosforescente (τ_p) é definido como o tempo necessário para que a intensidade da emissão fosforescente caia para 1/e do seu valor inicial. O τ_p guarda uma relação exponencial com a intensidade do sinal fosforescente, dado por:⁸³

$$I_p = I_0 \times e^{-t/\tau_p} \quad (3)$$

onde:

I_p = Intensidade do sinal luminescente no tempo t

I_0 = Intensidade luminescente inicial

τ_p = Tempo de vida da luminescência

Como vimos anteriormente, a magnitude do tempo de vida dos fenômenos radiativos está diretamente relacionada com a eficiência desses processos. Além da presença de átomos pesados, outros parâmetros experimentais tais como solvente, temperatura e estado físico da matriz influenciam os valores de τ_p .⁸²⁻⁸⁴

2.1 Fosforimetria na temperatura ambiente em substrato sólido

O uso de matrizes que proporcionem à molécula a rigidez em sua estrutura (redução da liberdade vibracional) minimiza os processos de desativação não-radiativos do estado tripleto, além de proteger a molécula contra colisões com outras espécies (pela diminuição da difusão de componentes). Uma das possibilidades de enrijecimento advém da utilização de matrizes em baixas temperaturas (77K), obtendo-se um cristal sólido onde a molécula de interesse estaria inserida⁸². Outra possibilidade é o uso de substrato sólido, que devido às interações físico-químicas, aumentam a rigidez da molécula de interesse. Por fim, pode-se fazer o uso de meio organizado, por exemplo, por micelas.⁸²

É justamente baseado no tipo de matriz utilizada que as técnicas fosforimétricas são classificadas. Nos casos da técnica a 77K e em meio organizado, alguns aspectos limitam a sua utilização de maneira mais ampla. A necessidade de aparato de criogenia e os transtornos observados nos processos de imersão das soluções em nitrogênio líquido vêm historicamente diminuindo a importância e o interesse do uso da técnica a 77K. Além disso, a obtenção de uma matriz homogênea que possa minimizar a reflexão e o espalhamento de radiação está estritamente relacionada com a velocidade de congelamento. Este parâmetro, que é de difícil controle,⁸² é o principal responsável pela baixa repetitividade das análises (15-20%).⁸² Já a fosforimetria em meio aquoso organizado requer o uso de desoxigenação química com sulfito de sódio. Esse procedimento limita a aplicação da maioria dos átomos pesados potenciais amplificadores de fosforescência devido a formação de hidróxidos pouco solúveis. Logo, a amplificação via efeito externo do átomo pesado fica restrito a apenas os sais de tálio e, em menor escala ao iodeto, dependendo do reagente organizador do meio. Isso limita a aplicabilidade da fosforimetria a muitas classes de compostos.

A fosforimetria na temperatura ambiente suportada em substrato sólido (SSRTP) surgiu como uma alternativa viável para o uso rotineiro da fosforescência como base de uma técnica analítica de mais ampla aplicabilidade e de procedimento experimental mais prático. O uso de substratos sólidos, principalmente os de baixo custo e de fácil preparação, proporcionou um modo simples de observação de intensa fosforescência na temperatura ambiente. Graças à sua eficiência na imobilização de moléculas orgânicas, alguns substratos sólidos têm demonstrado uma capacidade impressionante em permitir

a observação de fosforescência de várias classes de analitos. Além disso, substratos sólidos é compatível com o uso de diferentes tipos de sais de átomos pesados, o que permite uma grande versatilidade do ponto de vista da amplificação de fosforescência e da busca de seletividade.

Embora Roth⁹¹ tenha sido o primeiro a comunicar a observação de fosforescência de compostos orgânicos absorvidos em substratos sólidos, foi somente após os trabalhos de Schulman e Walling^{92,93} que a SSRTP adquiriu importância do ponto de vista analítico. Estes autores^{92,93}, detectaram os sinais fosforescentes de vários compostos usando substratos sólidos tais como papel-filtro, sílica, alumina e asbestos. Desde então, alguns grupos de pesquisa dedicam seus esforços à otimização de parâmetros experimentais para desenvolver o potencial analítico da SSRTP. A obtenção de limites de detecção e curvas analíticas comparáveis aos alcançados à 77K tornou um fator extremamente atrativo do ponto de vista analítico⁹⁴.

2.1.1.

Relação entre a intensidade de emissão fosforescente e a concentração do analito no substrato sólido

A relação existente entre a intensidade da radiação fosforescente e a concentração do fósforo (molécula fosforescente) foi inicialmente derivada para um meio homogêneo transparente. Essa relação foi obtida a partir da lei de Beer-Lambert e é dada pela seguinte equação:

$$I_p = I_0 \phi_p (1 - 10^{-\epsilon C x}) \quad (4)$$

Onde:

I_0 = intensidade da radiação incidente

I_p = intensidade do sinal fosforescente

ϕ_p = eficiência quântica fosforescente

ϵ - absorvidade molar do analito

x – espessura do caminho óptico no suporte da amostra

c – concentração do analito

Em soluções de baixa concentração de analito ($c \leq 10^{-3}$ M), a Equação 4, após a expansão da série de Taylor, pode ser simplificada para:

$$I_p = I_0 \phi_p 2,303 \varepsilon C x \quad (5)$$

ou

$$I_p = k' C$$

Onde k é uma constante possível de ser determinada pela curva de calibração.

Para suportes não transparentes, como as matrizes de superfície sólida, a excitação e emissão de luminescência são fenômenos que ocorrem na superfície com caminho óptico mínimo. Para esses casos, Zwedinger e Winefordner⁹⁵ deduziram a seguinte equação:

$$I_p = 2\phi_p \beta I_0 \left[\frac{(1 + \beta) \exp(\alpha \bar{b}) + (1 - \beta) \exp(-\alpha \bar{b}) - 2}{(1 + \beta)^2 \exp(\alpha \bar{b})^2 - (1 - \beta)^2 \exp(-\alpha \bar{b})} \right] \quad (6)$$

Onde:

$$\alpha = (k' / k' + 2S)^{1/2} \quad (7)$$

$$\beta = (k' (k' + 2))^{1/2} \quad (8)$$

$$k' = 2,303 \varepsilon C$$

S = coeficiente de espalhamento por unidade de espessura

\bar{b} = espessura média para reflexão difusa da amostra, em cm.

Para baixas concentrações de amostra a equação 6 pode ser simplificada para:

$$I_p = 2\phi_p I_0 k' \bar{b} \left[\frac{1}{(1 + 2S\bar{b})} \right] = 2\phi_p I_0 \frac{2,303 \varepsilon \bar{b} C}{(1 + 2S\bar{b})} \quad (9)$$

Se considerarmos o espalhamento $S\bar{b}$ desprezível teremos:⁸³

$$I_p = 2\phi_p I_0 k' \bar{b} = 4,6\phi_p I_0 \varepsilon \bar{b} C \quad (10)$$

Em altas concentrações de analito ($\varepsilon \bar{b} \gg 1$), a Equação 6 pode ser simplificada para:

$$I_p = 2\phi_p I_0 \left[\frac{\sqrt{k'}}{\sqrt{k'} + 2S + \sqrt{k'}} \right] \quad (11)$$

E se $k' \gg S$, temos:

$$I_p = \phi_p I_0 \quad (12)$$

Do ponto de vista experimental, a Equação 10 e a Equação 12 são de extrema importância na SSRTP. Geralmente, para concentrações de analito menores do que 10^{-3} ou 10^{-4} mol L⁻¹ o sinal fosforescente mantém uma relação linear com a concentração (Equação 12). Para concentrações de analito maiores do que estes valores, o sinal fosforescente se mostra independente da concentração e obedece a relação mostrada na Equação 12.

2.1.2 A celulose como substrato sólido na FTASS

Dentre os vários tipos de matrizes que já foram testadas como substratos sólidos em SSRTP^{82,83}, a celulose, principalmente na forma de papel filtro ou cromatográfico tem sido o substrato mais conveniente⁸³, sendo suas principais vantagens sobre outros materiais, o seu baixo custo, facilidade de manuseio e a disponibilidade de uma grande variedade de tipos e marcas que permite a escolha do melhor substrato para indução do sinal fosforescente do composto de interesse.⁸² Além disso, o papel é compatível com soluções ácidas e básicas, e podem ter suas características superficiais facilmente alteradas pelo uso de modificadores de superfície.

A emissão fosforescente de compostos adsorvidos em substratos de celulose é favorecida por interações físico-químicas que minimizam as vibrações e colisões moleculares do analito responsáveis pelas desativações não radiativas do estado tripleto.⁸² Com base em evidências experimentais, dois tipos de interação tem sido apontadas como responsáveis pela indução de fosforescência.^{82,83}

Schulmam e Parker⁹⁶ observaram que a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas da celulose e as moléculas do analito aumentavam a rigidez do analito e conseqüentemente um aumento no sinal fosforescente. Esta interação foi constatada através da comparação do sinal

fosforescente do naftoato de sódio em papel de filtro sem tratamento e com tratamento de silanização. Os autores⁹⁶ observaram a redução do sinal fosforescente do naftoato de sódio em aproximadamente 90% no papel silanizado, onde a disponibilidade de formação de ligações de hidrogênio é limitada, quando comparado com o papel sem o tratamento. Estudos envolvendo espectroscopia no infra-vermelho mostraram que bandas características da ligação O-H deslocaram para números de onda maiores em papéis contendo compostos hidroxiaromáticos adsorvidos quando comparado com os espectros obtidos para o papel sem a adsorção dessas substâncias. Os autores⁹⁷ observaram a ruptura das pontes de hidrogênio existentes do papel de filtro para favorecer ligações hidrogeniônicas mais fortes com os compostos aromáticos.

A espectroscopia ultravioleta de reflexão difusa também mostrou deslocamentos batocrômicos das bandas de absorção características desses compostos hidroxiaromáticos que podem ser atribuídos às interações (OH- π) dos grupos hidroxila da celulose e o sistema de elétrons π dos compostos aromáticos. Outros materiais como o acetato de sódio⁹⁸, sílica⁹⁹ e misturas de sais poliacrílicos¹⁰⁰ também evidenciaram a formação de pontes de hidrogênio entre o substrato e a molécula do analito.

A observação experimental de intensa fosforescência de compostos sem possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com o material do substrato¹⁰¹ levou McALeese e Dunlap¹⁰² a proporem um novo mecanismo de interação que consiste no encapsulamento das moléculas do analito nos poros microscópicos da matriz de celulose. Esse encapsulamento se mostrou dependente da polaridade do solvente carreador do analito, indicando uma relação direta entre as características do solvente e a capacidade e abertura dos poros no substrato. O mecanismo de encapsulamento ficou evidenciado por causa das grandes diferenças no sinal fosforescente do ácido 4-bifenilcarboxílico depositado em papéis umedecidos com solventes de diferentes polaridades.¹⁰² Nos casos mais extremos, a fosforescência do composto foi 400 vezes maior em papéis previamente umedecidos com água do que em papéis umedecidos com benzeno. Isso indicou que o aumento da polaridade do solvente favoreceu a abertura de poros nos substratos de celulose^{82,83,102} e o conseqüente encapsulamento dos analitos.

2.2

Aspectos experimentais envolvidos nos métodos baseados na SSRTP com substrato de celulose

Vários fatores experimentais estão relacionados com a indução e com a maximização da fosforescência de substâncias imobilizadas em substrato sólido. A seguir serão apresentados e discutidos os aspectos experimentais mais importantes e que devem ser avaliados quando da otimização de métodos baseados na SSRTP. Quando ajustados adequadamente, esses fatores permitem grande amplificação do sinal fosforescente de analitos. Caso contrário, quando seus efeitos são negligenciados, esses fatores podem minimizar e até mesmo eliminar a emissão do sinal fosforescente.

2.2.1.

Efeito da umidade e do oxigênio

As intensidades das emissões fosforescentes de compostos adsorvidos em papel são diretamente afetadas com a presença do oxigênio e da umidade,^{82,83} portanto para garantir a alta intensidade fosforescente é necessário elimina-los ou pelo menos minimiza-los.

Estudos teóricos mostram que a interação do oxigênio com moléculas no estado tripleto provoca a desativação não-radiativa da molécula para o estado fundamental ($T_1 \rightarrow S_0$), acompanhada pela transição do oxigênio de seu estado tripleto natural para um estado excitado singleto.⁸² Um dos modelos seguidos para descrever esse tipo de interação propõe a transferência de carga por contato sem a formação efetiva de um complexo de transferência de carga entre o oxigênio e o analito.⁸³

A equação de Stern-Volmer⁸³ modela a influencia do oxigênio no processo nessa desativação. Nesse caso, a diminuição de fosforescência está diretamente relacionada com a concentração da espécie desativadora, nesse caso, o oxigênio.

$$\frac{I}{I_q} = 1 + K_q \tau [Q] \quad (13)$$

Onde:

I - intensidade do sinal luminescente na ausência do agente supressor de sinal

I_q - intensidade do sinal luminescente na presença do supressor do sinal (Q)

K_q - constante de velocidade do processo de desativação não radioativa do estado excitado

[Q] - Concentração da espécie supressora de sinal.

É pertinente supor que no caso do efeito do oxigênio, a supressão dinâmica de fosforescência ocorra, isto é, existe contato entre o analito e o agente supressor. Logo, pode-se notar que a influência do oxigênio é drástica para os processos com elevado tempo de vida tal como a fosforescência, e em ambientes onde o oxigênio pode difundir livremente.

A umidade pode facilitar a ação do oxigênio na matriz da amostra^{2,83}. As moléculas de solvente, principalmente a água, transportam as moléculas de O₂ para o interior do substrato propiciando assim a interação com o analito. A presença de umidade no substrato também aumenta os choques colisionais que desativam as moléculas excitadas sem emissão de radiação e/ou rompem as pontes de hidrogênio que se formam entre a celulose e o analito.

Através de estudos realizados por Schulman e Parker⁹⁶, pode-se ter uma noção detalhada das conseqüências da ação do oxigênio no sinal fosforescente de compostos adsorvidos em vários substratos sólidos, entre eles o papel de filtro. Esse estudo⁹⁶ baseou-se no monitoramento do sinal fosforescente do 4-bifenilcarboxilato de sódio em função do tempo de exposição a fluxos de argônio, oxigênio e ar em diversas percentagens de umidade. O sinal fosforescente mais intenso foi adquirido com o uso do argônio, os sinais fosforescentes com o uso de ar seco e oxigênio foram 25 e 75% respectivamente mais baixos que os obtidos com o uso do argônio. Para verificar o efeito da umidade, os autores⁷⁶ utilizaram um fluxo de ar com diferentes percentagens de umidade e observaram que quanto maior a quantidade de umidade menor era o sinal fosforescente do composto. Quando a percentagem de umidade alcançou 80%, o sinal fosforescente do composto já tinha sido totalmente suprimido. Portanto os procedimentos experimentais de secagem do substrato sólido são importantes e incluem a utilização de um fluxo de gás inerte e seco sobre o substrato⁸² durante a medição de sinal fosforescente e a prévia secagem do solvente no substrato por meio de exposição à radiação proveniente de uma lâmpada de infravermelho⁸³, ou pela secagem das amostras em uma estufa à vácuo⁹⁹.

2.2.2.

Amplificação por meio do efeito externo átomo pesado

Como vimos anteriormente, para se garantir um alto sinal fosforescente, as transições entre estados de multiplicidades diferentes ($S_1 \rightarrow T_n$ e $T_1 \rightarrow S_0$) devem ser favorecidas, sendo a abordagem experimental mais comumente empregada o efeito externo do átomo pesado. Mclure⁸⁷ (1949) foi o primeiro a observar o efeito do átomo pesado na luminescência, posteriormente Kasha (1952) percebeu que a presença de átomos pesados no substrato de papel aumentava a constante de velocidade do cruzamento entre sistemas ($S \rightarrow T_n$).

White e Seybold¹⁰³ (1975) foram os primeiros a utilizarem sais de átomos pesados como amplificador do sinal fosforescente. Os autores¹⁰³ testaram o efeito do NaI em diversas substâncias, como 1-sulfonato naftaleno, 1-naftol e 2-naftol, e observaram que a utilização do NaI aumentou 40 vezes a intensidade dos sinais fosforescentes desses compostos.

Vo-Dinh *et al*¹⁰⁴ (1977) descreveram a influência do efeito do nitrato de prata e do iodeto de sódio em SS RTP de alguns hidrocarbonetos aromáticos. White e Seybold¹⁰⁵ (1977) fizeram um estudo da influencia de íons halogenetos e descreveram que a eficiência do efeito do átomo pesado entre esses ânions segue a seguinte ordem: $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$. Essa seqüência de amplificação segue a teoria de que a magnitude desse efeito, por meio do acoplamento spin-orbital, aumenta com a quarta potência do aumento do número de massa do átomo indutor de fosforescência. No entanto, isso nem sempre é observado. Por exemplo, Lue-Yen Bower e Winefordner¹⁰⁶ (1978) compararam o efeito de outros sais de átomos pesados de vários hidrocarbonetos poliaromáticos adsorvidos em papel de filtro e concluíram que a intensidade da SS RTP de hidrocarbonetos poliaromáticos aumentava na seguinte ordem de átomo pesado adicionado: tálio (204,3 uma) > prata (107,9 uma) > chumbo (207,2 uma) > mercúrio (200,6 uma). Desde então, vários estudos têm sido feitos usando o efeito do átomo pesado para melhorar a intensidade do sinal fosforescente em substratos sólidos. Os átomos pesados mais utilizados na literatura têm sido o tálio, prata, chumbo, iodo, bromo, e em menor escala o cádmio, mercúrio, e cério. Neste trabalho, avaliaremos o uso do tório (232 uma) visando o seu potencial na seletividade da fosforescência entre as fluoroquinolonas estudadas.

Conforme dito anteriormente, a presença de átomos pesados também pode aumentar as constantes de velocidade dos processos de desativação de T_1 não-radiativos o que desfavorece a eficiência quântica e conseqüentemente uma

redução no sinal fosforescente será observada.⁸²⁻⁸³ Assim, a seletividade está diretamente relacionada com escolha do átomo pesado. O efeito seletivo do átomo pesado será discutido posteriormente.

2.2.3.

Efeito do surfactante como modificador de superfície do papel

Os surfactantes são moléculas que possuem caráter apolar e polar simultaneamente. Eles podem ser de natureza, aniônica, catiônica ou não-iônica dependendo da molécula. Originalmente, os surfactantes têm sido utilizados para permitir a medição de fosforescência de luminóforos em meio líquido em concentrações que excedem a concentração micelar crítica, pois nessas condições, é observada a agregação espontânea de moléculas de surfactante formando micelas.^{82,83,107} Micelas formadas pelo dodecil sulfato de sódio (SDS), agregam em soluções com a parte iônica (polar) orientada para fora e a porção hidrofóbica (apolar) orientada para dentro, de forma que o analito fique envolvido pela micela e em constante equilíbrio dinâmico.^{82,83}

O uso de surfactantes associados aos substratos sólido também têm sido propostos para a SS RTP.¹⁰⁸ A adição do SDS previamente à adição do átomo pesado e da solução do analito no substrato sólido, pode produzir um grande aumento de sinal fosforescente pois a longa cadeia alquil do ânion do surfactante poder proteger o analito contra fotodecomposição causada pela fonte de irradiação durante as medições espectrais.¹⁰⁹ Além disso o uso do surfactante na superfície do papel pode organizar as moléculas do analito, aumentando assim a quantidade de sítios ativos e a rigidez da molécula, e aproximando-as mais dos sais de átomo pesado. Esse maior contato entre o analito e os sais do átomo pesado aumenta a probabilidade de acoplamento spin-orbital.¹¹⁰ O surfactante também evita que as moléculas do analito e do átomo pesado penetrem muito fundo na matriz celulose, facilitando a exposição destas à radiação de excitação. Entretanto, se a quantidade de SDS for excessivo, o sinal tende a cair por causa da formação de um filtro absorvente da radiação de excitação. Esse efeito de filtro vem sendo mostrado experimentalmente em vários trabalhos.^{111,112}

2.2.4. Influencia do pH

O pH é outro fator muito importante na indução do sinal fosforescente, seja pela formação de espécies iônicas ou por hidrólise. As mudanças de pH podem alterar as propriedades químicas do analito e conseqüentemente influenciar diretamente no sinal fosforescente do mesmo.

De Lima e Nicola¹¹³ mostraram que os sinais fosforescentes dos derivados da 1,8 naftiridina podem ser aumentados quando preparados em soluções de NaOH e que a intensidade máxima do sinal fosforescente para cada derivado foi obtida através de uma concentração ótima de base.

Os sinais fosforescentes de vários ácidos indolecarboxílicos também se mostraram dependentes do pH da solução¹¹⁴. Os sinais fosforescentes desses compostos mostraram intensidades variadas em meio ácido, e básico. Segundo os autores¹¹⁴ os sinais fosforescentes em meio básico foram os que apresentaram intensidades mais baixas, eles atribuíram esse fato à repulsão das espécies aniônicas com os grupos hidroxila da celulose.

Hurtubise¹¹⁴ observou que o sinal fosforescente da benzo(f)quiolina era mais intenso quando adsorvida em sílica gel em solução ácida, devido os grupos carboxila de ácido poliacrílico estabelecerem fortes pontes de hidrogênio com o sistema de elétrons π da quinolina e com os grupos $-NH^+$ formados pela protonação do heteroátomo.

Comportamento semelhante foi observado para os ácidos carboxílicos aromáticos¹¹⁵. Em substratos de ácido poliacrílico-NaCl e sílica gel com poliacrilato geraram sinais fosforescentes mais intensos em meio ácido do que em meio neutro. Entretanto, nenhum sinal fosforescente foi observado quando esses compostos foram adsorvidos em substratos contendo apenas sílica gel. O que confirma mais uma vez a importância dos grupos hidroxila no mecanismo de interação entre o substrato e o analito.¹¹⁵

A produção de derivados fosforescentes com maior eficiência quântica fosforescente também é a explicação para muitos casos onde o ajuste da acidez ou basicidade do meio é fundamental para observação de fosforescência. Um exemplo é o dos alcalóides indólicos reserpina e rescinamina que não apresentam fosforescência quando adicionadas no papel a partir de solução acetona/água, mas apresenta forte fosforescência quando preparadas em meio básico (acetona/NaOH 0,5 mol L⁻¹). Este fenômeno pode ser explicado pela

hidrólise básica da reserpina e da rescinamina, quebrando as mesmas em pedaços menores tornando-as mais facilmente imobilizadas no substrato.^{111,112}

Assim, a escolha do sistema de solventes que serve como carreador de analito ao substrato deve atender três requisitos. O primeiro está relacionado com a solubilidade do analito. O segundo requisito, relacionado à polaridade dos solventes que deve atender a capacidade de abertura de poros no substrato de celulose. O terceiro requisito é o relacionado com o ajuste do pH da solução, sendo que escolha correta desse parâmetro influencia tanto a polaridade do solvente quanto a formação de espécies de analito com maior capacidade de interação com o substrato ou de derivados do analito com eficiência quântica fosforescente mais elevada.

2.3.

Artifícios para o aumento de seletividade na SS RTP

Apesar da fosforescência ser por natureza bastante seletiva, a manipulação de parâmetros experimentais e uso de recursos instrumentais pode aumentar bastante a seletividade das determinações analíticas por SS RTP, a ponto de permitir a discriminação e determinação seletiva de substâncias com estruturas muito semelhantes (como no caso das FQs) sem a necessidade do uso de técnicas de separação. Dos muitos recursos possíveis, nesse trabalho utilizou-se o efeito externo seletivo do átomo pesado e a varredura espectral de modo sincronizado.

2.3.1.

Efeito externo seletivo do átomo pesado

Devido a mudanças nas energias relativas entre os estados fundamental e excitado, o efeito externo do átomo pesado, obtido pela introdução de seus sais no substrato onde se encontra a amostra, pode tanto aumentar a fosforescência da espécie de interesse quanto eliminar a fosforescência de substâncias concomitantes. Esse efeito pode também deslocar as bandas de emissão para regiões diferentes do espectro, aumentando a resolução espectral entre analito e interferentes no momento da determinação.

A partir de estudos feitos por Vo-Dinh e Hooyman¹¹⁶, o efeito do átomo pesado passou também a ser uma ferramenta muito útil nas análises

fosforimétricas de misturas complexas sem a necessidade de prévia separação de componentes. As características fosforescentes de compostos policíclicos aromáticos foram estudadas na presença de cinco sais inorgânicos (AgNO_3 , CsI , NaBr , NaI e $\text{Pb}(\text{OAc})_2$). Após a otimização das concentrações dos sais, a fim de obter um sinal fosforescente máximo, os autores realizaram análises quantitativas e qualitativas de uma mistura dos cinco compostos. Primeiramente, o NaBr ou o NaI foram utilizados, fixando o comprimento de onda de excitação em 330 nm. Nesse caso, três picos de emissão foram observados, os quais correspondiam ao carbazol, dibenzocarbazol e fluoranteno. Ainda neste mesmo comprimento de onda de excitação, mas agora com o uso de $\text{Pb}(\text{OAc})_2$, os picos de emissão observados correspondiam ao dibenzocarbazol, fluoranteno, acridina e benzopireno. Em outro caso, a determinação seletiva de ioimbina foi realizada na presença de reserpina e rescinamina apenas pela seleção apropriada do sal de átomo pesado. Pela utilização de TlNO_3 , obteve-se a amplificação do sinal emitido pela ioimbina e a eliminação da fosforescência dos outros dois alcalóides indólicos concomitantes na amostra.¹¹²

Mais recentemente, da Cunha *et al.* conseguiram a determinação seletiva de criseno em amostras contendo pireno apenas selecionando o AgNO_3 como sal de átomo pesado seletivo. Em presença de maiores proporções de pireno, a seletividade ainda é observada, mas o decréscimo de sinal do criseno, provavelmente devido ao efeito filtro causado pela absorção de radiação pelo pireno, obriga o uso de quantificação pelo método de adição de analito.¹¹⁷

Diferentes átomos pesados podem também provocar distribuições estatísticas de população de átomos ligeiramente diferentes quando estes passam de um estado de energia para outro. Isso pode provocar afinamentos (ou alargamento) de bandas da ordem de alguns nanômetros, o que em muitos casos pode facilitar (ou complicar) a resolução espectral entre analito e substâncias concomitantes.

2.3.2.

Varredura de modo sincronizado

Esta técnica de varredura surgiu para possibilitar o aumento da seletividade da varredura normal. Na varredura normal o espectro de emissão é obtido fixando o comprimento de onda de excitação e vice-versa. Na varredura sincronizada, ambos os monocromadores de excitação e de emissão são variados simultaneamente (ou sincronizadamente), mantendo-se uma diferença

constante de comprimento de onda ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) entre os máximos dos espectros de emissão e excitação do analito de interesse¹¹⁸. Esse processo tende a minimizar o sinal de quaisquer substâncias concomitantes que não possuam o mesmo $\Delta\lambda$ do analito.

A metodologia explora a especificidade das diferenças de energia entre as bandas de emissão fosforescente ($T_1 \rightarrow S_0$) e as bandas de absorção ($S_1 \leftarrow S_0$ ou $S_n \leftarrow S_0$).¹¹⁹

A relação que expressa o sinal fosforescente sincronizado (I_{SP}) é dado pela Equação 14:¹¹⁹

$$I_{SP}(\lambda_{em}, \lambda_{ex}) = k.c.E_{ex}(\lambda_{ex}).E_{em}(\lambda_{em}) \quad (14)$$

Onde:

k = fator experimental

c = concentração do analito

I_{SP} = sinal fosforescente sincronizado

E_{ex} = espectro de excitação fosforescente

E_{em} = espectro de emissão fosforescente

λ_{em} = comprimento de onda de emissão

λ_{ex} = comprimento de onda de excitação

Se considerarmos $\lambda_{ex} = \lambda_{em} - \Delta\lambda$, a Equação 14 pode ser expressa na forma da Equação 15:

$$I_{SP}(\lambda_{em}) = k.c.E_{ex}(\lambda_{em} - \Delta\lambda).E_{em}(\lambda_{em}) \quad (15)$$

Assim, podemos perceber através da Equação 15, que o sinal sincronizado depende diretamente da sobreposição das bandas do $E_{ex}(\lambda_{em} - \Delta\lambda)$ e $E_{em}(\lambda_{em})$ ¹¹⁹.

Vo-Dinh² mostrou a aplicabilidade deste método através da análise de uma mistura de naftaleno, fenantreno, antraceno, perileno e tetraceno, obtendo um espectro com vários picos muito bem resolvidos, no qual cada banda corresponde, inequivocamente, a um componente da mistura. A simplificação da banda do sinal sincronizado obtido minimizou as interferências causadas por sobreposição espectral, facilitando a identificação dos diversos componentes da mistura complexa, sem a necessidade de uma separação prévia.¹¹⁸

Pequenos ajustes no $\Delta\lambda$ selecionado para operação de sincronização podem ser feitos para resolver ainda mais os espectros. Isso pode ser realizado

pela seleção de comprimentos de onda de referência do $\Delta\lambda$ que ficam nas asas das bandas de excitação e de emissão do analito de interesse ao invés de usar os comprimentos de onda máximos. Essa escolha pode sacrificar um pouco a sensibilidade, no entanto, isso pode valer a pena em termos de aumento de seletividade. O espectro de varredura sincronizado é observado como uma única banda (equivalente à banda de excitação no caso do instrumento LS-55 utilizado nesse trabalho) e provoca, em muitos casos, a simplificação da banda espectral, eliminando a observação ombros da distribuição estatística da população de átomos em transição. Esse afinamento das bandas pode facilitar a resolução no espectro de misturas complexas.