

2 Fosforescência

A fosforimetria surgiu como técnica espectroscópica quando Becquerel, em 1858, desenvolveu o primeiro fosforoscópio (aparato mecânico rotativo para rejeição de fluorescência e espalhamento e, conseqüentemente isolamento de fosforescência). Pouco tempo depois, 1861, Becquerel estabeleceu a lei exponencial do decaimento fosforescente²⁵. A emissão fosforescente foi observada no ano de 1888 por Wiedemann, em soluções sólidas de corantes orgânicos²⁶. Em 1935, Jablonski²⁷ propôs um esquema de níveis de energia para explicar o fenômeno da fosforescência e em 1937, Sklar²⁸ identificou uma absorção fraca singleto – tripleto para o benzeno.

Dois importantes marcos relacionados com a fosforimetria devem ainda ser destacados: (i) a identificação, por Lewis e Kasha, de que a fosforescência em moléculas orgânicas são transições radiativas entre o estado excitado tripleto e o estado singleto fundamental e; (ii) a atribuição da fosforescência para algumas transições de multiplicidade proibidas em sistemas atômicos, descritas por Terenin²⁶. O uso da fosforescência como uma ferramenta qualitativa para a identificação de compostos orgânicos, foi proposta por Lewis e Kasha²⁹. McClure, em 1949³⁰, demonstrou a existência de acoplamento spin-orbital no processo de fosforescência, utilizando átomos pesados como substituintes. Já em 1955, Evans³¹ estabeleceu a natureza paramagnética da fosforescência. O uso da fosforescência como ferramenta analítica quantitativa só surgiu após 1957 quando Kiers, Britt e Wentworth³² publicaram o primeiro trabalho onde foram mostradas curvas analíticas fosforescentes para um grande número de compostos orgânicos. Em 1958, Feed e Salmre³³ escreveram a construção de um fosforoscópio que foi usado na determinação analítica de diversas drogas. Logo depois Parker e Hatchard³⁴, em 1962, descreveram um espectrômetro de fosforescência fotoelétrico. Este equipamento permitia a obtenção de espectros fosforescentes de vários compostos assim como o cálculo do tempo de vida (tempo necessário para que a emissão decaia a $1/e$ de seu valor inicial) e da eficiência quântica (razão entre o número total de fótons emitidos pela molécula na forma de fosforescência e o número total de fótons absorvidos) dos mesmos.

Finalmente, em 1963, Latz e Winefordner³⁵ usaram a fosforimetria para quantificar analitos em amostras complexas, no caso, soro sanguíneo.

Na busca de um melhor entendimento do processo fosforescente bem como para mostrar que a fosforimetria podia se tornar uma ferramenta analítica, vários estudos foram realizados.^{25,26} Desde então, muitos grupos de pesquisa se dedicaram à viabilização da fosforimetria como técnica analítica, valorizando sua seletividade e sensibilidade. Os estudos têm demonstrado a aplicabilidade da técnica nas áreas de caracterização de proteínas e polímeros, em aplicações farmacêuticas e clínicas, pesticidas, petróleo e derivados, poluição atmosférica, entre outras.

A fosforimetria não é uma técnica amplamente utilizada como a fluorimetria, sendo isso atribuído à necessidade de condições especiais para aumentar a eficiência da transição radiativa entre estados de diferentes multiplicidades (fosforescência). Os primeiros estudos com fosforimetria foram realizados em baixas temperaturas (usando nitrogênio líquido) e solventes apropriados para a criogenia. No entanto, a evolução da técnica mostrou que os sinais fosforescentes podiam ser obtidos em temperatura ambiente, pela adsorção do fósforo em uma matriz sólida, em solução com meio organizado, ou mesmo diretamente em solução aquosa.²⁵

A espectrofotometria de fosforescência ou fosforimetria é uma técnica analítica que se fundamenta na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas quando as mesmas retornam do estado excitado tripleto para o estado fundamental²⁴. A excitação se dá pela absorção de fótons de energia característica da região do UV-visível, sendo distinguida da fluorescência pelo tipo de transição eletrônica radiativa responsável pela desativação do estado excitado²⁶.

Existe uma nomenclatura apropriada para definir os estados excitados moleculares de onde se originam os fenômenos fotoluminescentes. Quando a direção do spin do elétron promovido para um orbital de maior energia é preservada, tem-se o estado excitado singleto. No estado excitado tripleto o spin do elétron promovido é invertido²⁵, como representado na Figura 2. Como a direção do spin do elétron da espécie molecular no estado excitado sofre uma inversão (mudança de multiplicidade do estado excitado de singleto para tripleto) no processo fosforescente, a emissão de radiação ocorre com um tempo de vida da ordem de 10^{-4} a 10^1 s, significativamente maior que o da fluorescência (10^{-7} - 10^{-9} s). Adicionalmente, as energias dos estados excitados tripletos são relativamente menores que a dos seus equivalentes singletos,

conseqüentemente, a banda de emissão fosforescente ocorre em região espectral de menor energia (comprimento de onda maior)²⁴.

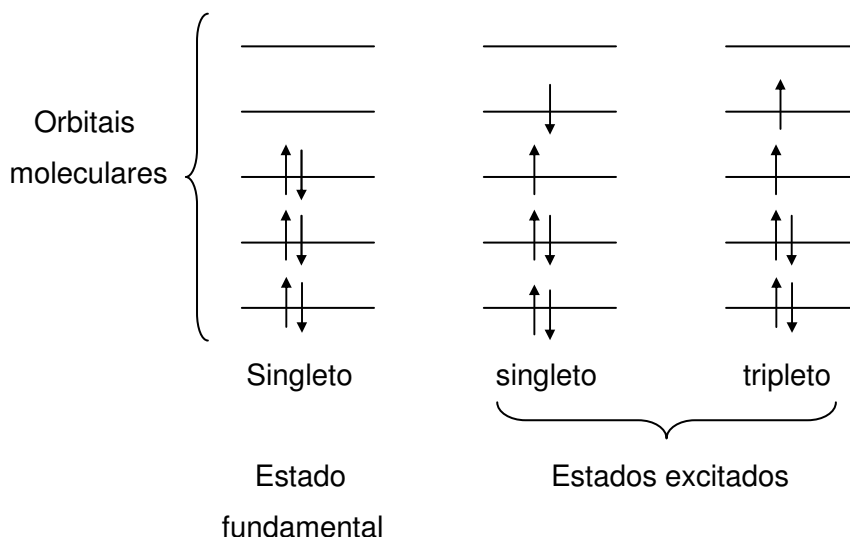


Figura 2: Diagrama esquemático de um arranjo de spin nos orbitais moleculares para o estado fundamental, e para os estados excitados singlete e tripleto.

Os processos fotoluminescentes podem ser compreendidos por meio do diagrama de Jablonski (Figura 3). A partir da absorção fótons de energia apropriada, uma população de moléculas pode passar do estado fundamental (S_0) para qualquer dos estados vibracionais de um estado excitado singlete (S_n). Por meio de uma série de relaxamentos vibracionais, essa população excitada é levada através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade, até atingir o primeiro nível vibracional do primeiro estado excitado singlete (S_1) - regra de Kasha³⁶. Esse processo não-radiativo ocorre com muita rapidez (10^{-13} a 10^{-11} s). A partir de S_1 , a população pode retornar para o S_0 por uma combinação de etapas envolvendo processos radiativos (fluorescência e fosforescência) e/ou não-radiativos (relaxamento vibracional e cruzamento interno). O relaxamento vibracional ocorre se a diferença de energia entre S_1 e S_0 não for muito grande e existir sobreposição de níveis vibracionais. No caso da fluorescência (F), a desativação a S_0 por emissão de fóton ocorre se a diferença energética entre S_1 e S_0 for relativamente grande e as condições do meio favorável. Se houver possibilidade de acoplamento spin-orbital, a transição eletrônica entre estados excitados de diferente multiplicidade ($S_1 \rightarrow T_1$) deve

acontecer no processo denominado de cruzamento intersistemas – CIS. Nesse caso, a molécula pode se desativar, a partir do estado tripleto (T_1), por meio de processo não-radiativo ou por meio de fosforescência (P). O CI e a fluorescência competem muito eficientemente pela desativação do estado excitado, por isso, a fosforescência é observada somente em condições especiais²⁷.

O CIS é um processo não-radiativo fundamental para a observação de fosforescência e que envolve a troca de multiplicidade da população no estado excitado. O CIS tem duração na ordem de 10^{-7} s e compete com a fluorescência e com o CI. Embora a transição de estados excitados de diferentes multiplicidades seja quantomecanicamente proibida, 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 do orbital do elétron, promove a mistura quantomecânica de estados excitados.²⁶

As taxas relativas de CI, relaxamento vibracional, CIS, fluorescência e fosforescência são dependentes da estrutura da molécula, do sistema de solventes ou substrato, da presença de espécies químicas concomitantes e de condições como a temperatura e a pressão. Pode-se observar na Figura 3, que a energia envolvida na fosforescência é menor do que a energia envolvida na fluorescência, de forma que as bandas de emissão fosforescentes aparecem em comprimentos de onda maiores (energias menores) do que as bandas de emissão fluorescentes.³⁶

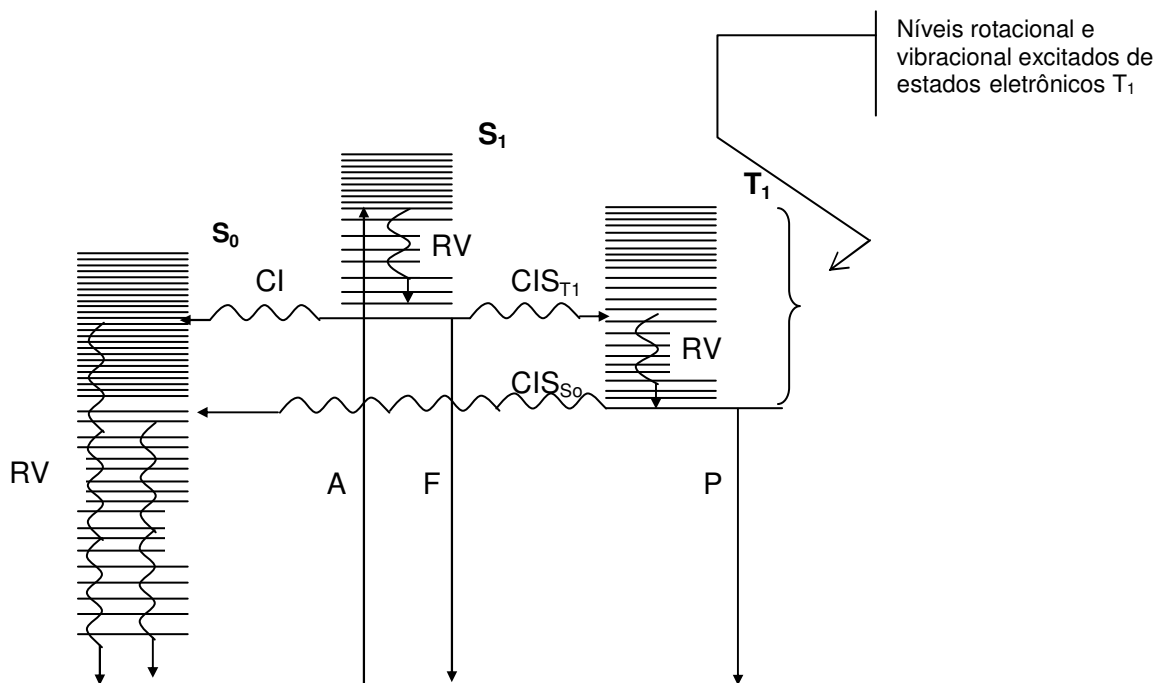


Figura 3: Diagrama modificado de Jablonskii para o sistema de níveis de energia (adaptação da fonte Vo-Dinh, Jonh Wiley & Sons, 1984). Absorção (A), relaxamento vibracional (RV), conversão interna (CI), fluorescência (F), cruzamento intersistemas (CIS), fosforescência (P), estado fundamental (S_0), estado excitado singlete (S_1) e estado excitado tripleto (T_1).

2.1. Fosforimetria de varredura sincronizada

A varredura sincronizada é uma estratégia desenvolvida para melhorar a seletividade da espectrometria de luminescência. Para obter um espectro sincronizado de fosforescência, os monocromadores de excitação e de emissão do instrumento são varridos simultaneamente com uma diferença nominal de comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) e emissão (λ_{em}) constante ($\Delta\lambda = \lambda_{exc.} - \lambda_{em}$)²⁵. Ao se ajustar $\Delta\lambda$ com os valores de λ_{exc} e de λ_{em} característicos da espécie química de interesse, a varredura sincronizada minimiza a contribuição de sinal de quaisquer substâncias concomitantes que não possuam o mesmo valor de $\Delta\lambda$ do analito.

2.2. Fosforimetria na temperatura ambiente

Teoricamente é difícil prever se uma molécula exibirá fotoluminescência, mas é possível observar certas características gerais na sua estrutura que favoreçam um processo de desativação radiativa eficiente. Uma molécula será significativamente luminescente se sua eficiência quântica fluorescente (ϕ_F) ou fosforescente (ϕ_P) tiver magnitude próxima da unidade. A magnitude de ϕ_F e ϕ_P depende tanto da estrutura da molécula quanto do meio onde ela se encontra. Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) ou moléculas enrijecidas com o uso de algum artifício experimental têm os processos de desativação não-radiativa significativamente minimizados, com conseqüente aumento de ϕ_F e ϕ_P (pois, por ser a fosforescência um fenômeno com tempo de vida mais longo, perde em competitividade para os processos não-radiativos de tempo de vida mais curto). Assim, enrijecimento em substratos sólidos, meio criogênico ou meio organizado (meio micelar, por exemplo) têm sido de grande utilidade para a indução ou aumento da magnitude da luminescência.

Durante muitos anos, a fosforimetria se baseou na imobilização da substância fotoluminescente em uma matriz vítrea rígida a baixas temperaturas (em geral 77 K). Apesar das muitas vantagens que esta metodologia oferecia (baixos limites de detecção, ampla faixa linear dinâmica nas curvas analíticas e grande seletividade), existia uma grande resistência ao uso desta abordagem devido à necessidade de criostatos, aos transtornos observados no processo de imersão das soluções em N_2 líquido; às limitações a respeito da escolha do solvente e a dificuldade de se obter uma matriz homogênea que pudesse minimizar a reflexão e o espalhamento de radiação no cristal congelado²⁵.

A fosforimetria na temperatura ambiente suportada em substrato sólido (SSRTP) surgiu como uma alternativa à técnica fosforimétrica em baixa temperatura. Trata-se de uma técnica simples, de baixo custo, de boa seletividade e baixos níveis de detecção (análise de traços). Entretanto, esta técnica também apresenta algumas desvantagens, como, a baixa relação entre o número de amostras analisadas em função do tempo, a dificuldade em termos de automatização e a repetitividade relativamente mais pobre que a observada em técnicas que utilizam solução.

As primeiras pesquisas utilizando substrato sólido surgiram na literatura em 1896. Entretanto somente após as publicações de Roth, Schulman e Walling,

a técnica teve seu completo reconhecimento³⁷⁻³⁹. Entre os diversos materiais pesquisados para servir de substrato sólido (sílica gel, o acetato de sódio, alguns polímeros e papel de filtro), a celulose, na forma de papel de filtro ou papel cromatográfico, é a que tem sido mais utilizada. O papel de filtro, quando tratado apropriadamente, tem baixo custo e é compatível com a utilização dos mais variados sais de átomos pesados, que são utilizados como indutores e amplificadores de fosforescência. Esses indutores viabilizam a ocorrência das prováveis transições tripleto-singlete, por meio de acoplamento spin-orbital. A principal interação, responsável pela imobilização, entre o analito e o grupo hidroxila da celulose foram atribuídos às ligações de hidrogênio⁴⁰. Além disso, os poros da superfície do papel são sítios onde as moléculas do analito podem penetrar e interagir tridimensionalmente com o substrato após a secagem²⁶. Embora o papel de filtro seja o substrato mais utilizado, ele apresenta duas importantes desvantagens: apresenta uma banda de emissão extensa (400 a 600 nm)⁴¹, proveniente das ligninas e das hemiceluloses⁴², na faixa de comprimento de onda onde muitos compostos orgânicos também fosforescem e, apresentam superfície não uniforme (áspera, irregular e repleta de interstícios entre as fibras de celulose)²³. Isso pode afetar a precisão e o LD dos métodos SS RTP. Parte destes problemas pode ser minimizada por meio de uma etapa de lavagem com água fervente seguida de uma etapa de exposição à radiação ultravioleta. Esse procedimento, desenvolvido simultaneamente por Campíglio e de Lima⁴³ e por McLeese e Dunlap⁴⁴ é capaz de reduzir o sinal de fundo em até 98%. Mais recentemente, Cardoso⁴⁵ adaptou esses procedimentos tendo conseguido uma redução no tempo total do tratamento de 16 para apenas 4 h.

Na técnica em substrato sólido, a solução do analito é colocada na matriz sólida e, após a secagem do solvente, a fosforescência é medida em atmosfera inerte²⁶. A indução e maximização da fosforescência em substrato sólido estão relacionadas com vários fatores experimentais, como: oxigênio e umidade no meio; íons de átomo pesado; modificadores de superfície tais como surfactantes; espécies desativadoras; a natureza do solvente e o pH do meio onde o analito é dissolvido. Quando estes fatores são negligenciados pode ocorrer minimização ou até mesmo a eliminação do sinal fosforescente.

A presença de oxigênio molecular é um fator importante, pois este provoca a diminuição e até mesmo a eliminação do sinal fosforescente.^{25,26} A umidade no substrato pode aumentar as colisões (atenuação dinâmica) que desativam as moléculas excitadas sem emissão de radiação e promover a difusão de oxigênio (dissolvido no solvente) no substrato.

Estudos mostraram que a interação do oxigênio com moléculas no estado tripleto provoca a desativação da molécula excitada para o estado fundamental ($T_1 \rightarrow S_0$). Esta desativação da molécula excitada é acompanhada pela transição do oxigênio de seu estado tripleto natural para um estado singleto excitado.²⁶ Um dos modelos seguidos para descrever este tipo de interação propõe a transferência de energia, por contato, entre o oxigênio e o analito.⁴⁵

A presença da umidade e do oxigênio pode ser minimizada por meio de secagem prévia do substrato e de purga com nitrogênio seco sobre a superfície do substrato de celulose, antes e durante o procedimento de medição da fosforescência.

O efeito da presença de elementos de elevada massa atômica (átomos pesados) foi identificado como benéfico no tocante ao aumento da eficiência da emissão fosforescente. Esta melhora é explicada pela teoria do acoplamento spin-orbital no qual o estado tripleto adquire algumas características de singleto e vice-versa. Esta condição aumenta a probabilidade do cruzamento intersistemas (CIS) do estado singleto para o estado excitado tripleto, o que acarreta em diminuição do tempo de vida e no aumento da eficiência do processo fosforescente⁴⁵.

Na luminescência, a existência do acoplamento spin-orbital, usando átomos pesados, foi primeiramente observada por McClure em 1949³⁰, e logo em seguida por Kasha, 1952⁴². O aumento da eficiência do processo fosforescente pelo acoplamento spin-orbital foi, mais tarde, provado por McGlynn, em 1962⁴⁷.

Giachino e Kearns, 1971, mostraram que o efeito externo do átomo pesado (provocado por átomos pesados na matriz e não na estrutura do analito) modifica a estrutura do espectro sendo um fenômeno puramente eletrônico e não envolvendo acoplamento vibracional⁴⁸.

A primeira aplicação de íons de átomo pesado como amplificador do sinal fosforescente foi em 1975, quando White e Seybold testaram o efeito do NaI em diversas substâncias presentes em soluções em condições de criogenia. Intensidades 40 vezes mais fortes foram obtidas quando o NaI foi usado⁴⁹. Embora a presença de átomos pesados possa aumentar o sinal fosforescente, não é possível prever qual tipo irá favorecer a fosforescência para um analito ou classe de analitos. De um modo geral, os átomos pesados mais utilizados são iodo, tálio, chumbo, prata, cádmio e mercúrio.⁵⁰⁻⁵⁵

De Lima⁵⁶ propôs a utilização de um agente surfactante para modificar a superfície da celulose (preenchimento dos interstícios existentes entre as fibras)

e evitar penetração indesejada do analito e do átomo pesado no interior do papel, aumentando assim, o contato entre o átomo pesado e o analito. Além disto, os autores sugeriram que a presença de surfactante formaria novos sítios para interação da molécula de interesse com o substrato e aumentaria a rigidez do analito no suporte sólido.

De um modo geral, os surfactantes têm sido utilizados para permitir a medição de fosforescência em meio aquoso (meio organizado por micelas). Porém, o uso de surfactantes associados aos substratos sólidos também tem sido proposto para a SS RTP.⁵⁶ A adição de um agente surfactante aniônico, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), previamente à adição do átomo pesado e da solução do analito no substrato sólido, pode também proteger o analito da radiação excessiva da fonte de excitação, evitando a fotodecomposição durante a medição do sinal fosforescente⁵⁷. Entretanto, se a quantidade de SDS for excessiva, o sinal tende a cair por causa, por exemplo, da dificuldade de interação com o átomo pesado e a filtragem excessiva da radiação incidente (efeito filtro).⁵⁷

Outro fator muito importante para a obtenção de um bom sinal fosforescente é o controle do pH da solução do analito a ser depositada no papel. Um dos aspectos mais relevantes das reações ácido-base de moléculas potencialmente luminescentes é a produção de derivados com maior eficiência quântica luminescente. Além disso, espécies com cargas têm maior probabilidade de mostrar sinais mais intensos, o que se deve ao fato de espécies ionizadas possuírem maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel, produzindo uma ótima condição para a fosforescência a temperatura ambiente (RTP)²⁵.

Pelo que foi descrito, pode-se constatar que a mudança da natureza de uma espécie química ou do meio que a envolve, pode afetar significativamente o sinal fosforescente produzido por essa espécie. A dependência de um grande número de variáveis faz com que a escolha e o ajuste de condições experimentais sejam importantes do ponto de vista da seletividade, o que de fato tem sido o ponto mais atrativo da fosforimetria.