4 Características fosforescentes dos indóis

A capacidade fotoluminescente de um composto é função de sua estrutura molecular e das condições do meio que o cerca, assim sendo, o desenvolvimento de uma metodologia baseada em fosforimetria na temperatura ambiente para a determinação dos indóis, começou com o estudo das condições experimentais que afetavam as características fosforescentes dos analitos de interesse no substrato de escolha, no caso desse trabalho, o substrato de celulose⁶⁰. Desse modo, diferentes condições experimentais foram estudadas visando induzir ou amplificar a fosforescência na temperatura ambiente do Indol, do 2 Metil Indol (2MI), do 3 Metil Indol (3MI) e do 7 Metil Indol (7MI). Em todos esses estudos, os parâmetros instrumentais foram fixados como indicado a seguir: tempo de abertura do detector (3 ms), tempo de retardo do detector (0,05 ms), velocidade de varredura (1500 nm min⁻¹) e bandas espectrais de passagem de excitação e emissão (ambas 10 nm). Estudos envolvendo medição de fosforescência nos brancos (substratos de celulose, solventes e outros reagentes coadjuvantes) indicaram ausência de sinal característico dos indóis estudados nesse trabalho. Em todos os casos, foram feitas três medições sendo o valor apresentado igual à média da magnitude dos sinais obtidos.

4.1. Efeito dos diferentes sais de átomos pesados e do SDS nos sinais fosforescentes

O trabalho iniciou com um estudo de avaliação da influência de seis diferentes sais de átomos pesados em substrato de papel onde o indol ou seus derivados foram imobilizados. As massas dos sais de átomos pesados adicionados no centro dos substratos foram: 167µg de KI (5 µL de solução 0,20 mol L⁻¹), 332µg de TINO₃ (5 µL de solução 0,25 mol L⁻¹), 504µg de CdCl₂.H₂O (5 µL de solução 0,5 mol L⁻¹), 403µg de Pb(NO₃)₂ (5 µL de solução 0,25 mol L⁻¹), 271µg de HgCl₂ (5 µL de solução 0,20 mol L⁻¹) e 461µg de Th(NO₃)₄.4H₂O (5 µL de solução 0,25 mol L⁻¹). Os sais de átomos pesados foram usados como

recurso para tentar induzir a fosforescência do indol e dos derivados, pois estes não apresentaram fosforescência quando imobilizadas diretamente nos substratos de papel, conforme apresentado na Tabela 1. Nesse estudo preliminar, o efeito da presença do surfactante SDS na fosforescência dos quatro compostos nitrogenados (indol, 2MI, 3MI,7MI) também foi avaliado. O SDS é usado principalmente para modificar a superfície da celulose implicando, muitas vezes, em melhor condição para imobilização do analito. O SDS também pode promover maior aproximação entre as moléculas do analito com o sal de átomo pesado, implicando em um efeito externo do átomo pesado mais eficiente e conseqüentemente em sinais fosforescência, sendo a sinergia entre o TINO₃ e o SDS muito marcante.⁵⁴ Nos testes com SDS, este foi adicionado no substrato de papel na forma de solução 0,07 mol L⁻¹ (5 μL) no centro do substrato previamente à colocação da solução de átomo pesado e do analito.

Os quatro compostos indólicos estudados: indol (5 µL de solução 9 x10⁻⁴ mol L⁻¹), 2MI (5 µL de solução 1,5 x10⁻⁴ mol L⁻¹), 3MI (5 µL de solução 2,4 x10⁻⁴ mol L⁻¹) e 7MI (5 µL de solução 4,3 x10⁻⁴ mol L⁻¹) somente apresentaram sinal fosforescente relevante na presença dos sais KI e TINO₃. Para substratos contendo os demais sais de átomos pesados, não foi observada fosforescência. Esse tipo de comportamento é comum em luminescência, pois um composto ou grupo de compostos responde positivamente na presença daqueles átomos pesados específicos que promovem as mudanças adequadas nos níveis de energia dos estados excitados de diferente natureza, de tal modo que se cria um corredor por onde a população molecular troca de multiplicidade (cruzamento intersistemas). Adicionalmente, os sais de átomo pesado diminuem o tempo de vida da fosforescência de tal modo a tornar o processo mais eficiente em comparação aos processos não-radiativos de desativação do estado excitado.

Na Tabela 1 e na Tabela 2 encontram-se resumidamente os resultados obtidos nos estudos preliminares. Nelas, os valores de comprimento de onda máximos de luminescência assim como as razões entre os sinais dos analitos em relação aos respectivos brancos (I_A/I_B razão entre o sinal fosforescente de cada um dos analitos e o sinal medido do substrato) foram indicados para cada condição experimental avaliada. No caso do SDS, o efeito no sinal do analito foi avaliado pela razão I_{SDS}/I_A que é a razão entre o sinal do analito na presença e na ausência de SDS no substrato.

Em substratos contendo SDS (101 μ g), a fosforescência do indol teve uma redução de 55 % na presença de KI e um aumento de 50 % na presença de

45

TINO₃. Para o 7MI, o SDS adicionado a substratos contendo TINO₃, promoveu um aumento de 60 % quando comparado com a fosforescência medida na ausência do surfactante.

Os espectros de emissão e de excitação fosfosrescentes na temperatura ambiente de cada um dos analitos tanto na presença do sal de KI quanto na presença do sal de TINO₃ são apresentados nas Figuras 11 a 18. Em particular, na Figura 12 e na Figura 18, o efeito benéfico do uso de SDS pode claramente ser visto para o indol e o 7MI, como relatado mais acima no texto.

Tabela 1: Fosforescência do indol e de seus derivados na presença de diferentes sais de átomos pesado em substrato de celulose

Indol	2 MI	3 MI	7 MI
(104 ng ou 5 µL de	(341 ng ou 5 µL de	(157 ng ou 5 µL de	(282 ng ou 5 µL de
solução 8,9x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	solução 5,2x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	solução 2,4x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	solução 4,3x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)
$I_A/I_B = 6,0$	$I_{A}/I_{B} = 2,1$	$I_A/I_B = 6,4$	$I_{A}/I_{B} = 4,0$
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 275/437 nm	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 240/480 nm	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 275/452 nm	$\lambda_{\text{exc}}\!/\!\lambda_{\text{em}}\!=252\!/\!450~\text{nm}$
$I_{A}/I_{B} = 2,0$	$I_{A}/I_{B} = 2,0$	$I_A/I_B=2,0$	$I_{A}/I_{B} = 2,3$
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 260/500 nm	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}=$ 260/510	$\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/506$	$\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 252/515$
	$\begin{tabular}{ c c c c } & Indol & (104 ng ou 5 \mbox{μL} de & solução 8,9x10^{-4} mol L^{-1}) & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & &$	$\begin{tabular}{ c c c c } & & & & & & & & & & & & & & & & & & &$	$\begin{array}{ c c c c c } Indol & 2 MI & 3 MI \\ (104 ng ou 5 \muL de solução 5,9x10-4 mol L-1) & (341 ng ou 5 \muL de solução 5,2x10-4 mol L-1) & solução 2,4x10-4 mol L-1) \\ \hline \\ \hline \\ \hline \\ I_A/I_B = 6,0 & I_A/I_B = 2,1 & I_A/I_B = 6,4 & \lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/452 nm & \lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/452 nm & I_A/I_B = 2,0 & I_A/I_B = 2,0 & I_A/I_B = 2,0 & I_A/I_B = 2,0 & \lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/510 & \lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/506 & \hline \\ \hline \\ \hline \\ \hline \\ \hline \\ I_A = 2,0 & I_A/I_B = 2,0 & I_A/I_B = 2,0 & I_A/I_B = 2,0 & \lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/506 & \hline \\ \hline$

--- ausência de sinal fosforescente

 $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ – comprimento de onda de excitação\ comprimento de onda de emissão

 I_A/I_B – razão entre a intensidade sinal fosforescente do analito e do branco

Sal	Indol	2 MI	3 MI	7 MI
	(104 ng ou 5 μL de	(341 ng ou 5 μL de solução	(157 ng ou 5 μL de	(282 ng ou 5 µL de
	solução 8,9x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	5,2x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	solução 2,4x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	solução 4,3x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)
Sem átomo				
pesado				
KI	$I_{SDS}/I_A = 0,5$	$I_{SDS}/I_A = 0.8$	$I_{SDS}/I_A = 0,6$	$I_{SDS}/I_A = 1,0$
	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 275/437 nm	$\lambda_{exc}\!/\!\lambda_{em}\!=240\!/\!480$	$\lambda_{exc}\!/\lambda_{em}\!=280\!/452$	$\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 252/450$
TINO ₃	$I_{SDS}/I_A = 1,5$	$I_{SDS}/I_A = 1,4$	$I_{SDS}/I_A = 0,7$	$I_{SDS}/I_A = 1,5$
	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 260/500 nm	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}=$ 260/510	$\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/506$	$\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 252/515$
CdCl ₂				
Pb(NO ₃) ₂				
HgCl ₂				
Th(NO ₃) ₄				

Tabela 2: Fosforescência do indol e de seus derivados na presença de diferentes sais de átomos pesado em substrato de celulose contendo SDS.

--- ausência de sinal fosforescente

 $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ – comprimento de onda de excitação\ comprimento de onda de emissão

 $I_{\text{SDS}}/I_{\text{A}}-$ razão entre a intensidade sinal fosforescente do analito com SDS e AP e do analito com AP



Figura 11: Espectros de fosforescência de 104 ng de indol (9 x 10^{-4} mol L⁻¹) na presença de KI em substrato de papel com e sem uso do SDS.



Comprimento de onda (nm)

Figura 12: Espectros de fosforescência de 104 ng de indol (9 x 10^{-4} mol L⁻¹) na presença de TINO₃ em substrato de papel com e sem uso do SDS.



Figura 13: Espectros de fosforescência de 341 ng de 2MI $(5,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1})$ na presença de KI em substrato de papel com e sem uso do SDS.



Figura 14: Espectros de fosforescência de 341 ng de 2MI (5,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) na presença de TINO $_3$ em substrato de papel com e sem uso do SDS.



Comprimento de onda (nm)

Figura 15: Espectros de fosforescência de 157 ng de 3MI (2,4 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) na presença de KI em substrato de papel com e sem uso do SDS.



Figura 16: Espectros de fosforescência de 157 ng de 3MI (2,4 x 10^{-4} mol L⁻¹) na presença de TINO₃ em substrato de papel com e sem uso do SDS.



Comprimento de onda (nm)

Figura 17: Espectros de fosforescência de 282 ng de 7MI (4,3 x 10^{-4} mol L⁻¹) na presença de KI em substrato de papel com e sem uso do SDS.



Comprimento de onda (nm) Figura 18: Espectros de fosforescência de 282 ng de 7MI (4,3 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) na presença de TINO₃ em substrato de papel com e sem uso do SDS.

O estudo envolvendo os sais de átomos pesados indicou que a quantificação de indol e dos outros três derivados potencialmente pode ser realizada por meio da fosforimetria em substrato sólido. No entanto, a princípio, os sais de átomos pesados (em substrato contendo ou não o SDS) não podem ser utilizados como fator seletivo na discriminação entre estes quatro analitos, como se observa em alguns trabalhos na literatura envolvendo outros grupos de substâncias (por exemplo, os alcalóides indólicos).⁵⁵ Isso se dá por causa da amplificação não seletiva de sinal e na similaridade entre o par $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ dos espectros resultantes, o que também dificulta na discriminação dos compostos mesmo utilizando recursos instrumentais como a varredura espectral de modo sincronizado ou usando espectro de derivada superior. Sendo assim, um novo estudo foi realizado visando verificar a viabilidade da determinação seletiva de um dos compostos na presença dos outros por meio da escolha do tempo de aquisição de sinal fosforescente.

Estudo do decaimento do sinal fosforescente do indol e de seus derivados

As moléculas no estado excitado têm um tempo de vida finito, tendendo a retornar ao estado eletrônico fundamental com a subseqüente liberação de energia. No caso da fosforescência, o tempo em que a população de moléculas permanece no estado excitado é da ordem de microsegundos até alguns segundos, tempo esse necessário para que a população absorva a energia de excitação, atinja S_1 , sofra cruzamento intersistemas para alcançar T_1 e, finalmente, retorne para o estado fundamental emitindo radiação. O efeito externo do átomo pesado, que amplifica a fosforescência, tende a diminuir o tempo de vida para se completar esse processo, sendo isso efetivamente o que faz com que a fosforescência se torne mais eficiente em relação aos processos não-radiativos do estado excitado. O perfil temporal de decaimento da intensidade do sinal luminescente (I) em relação ao sinal luminescente inicial (I_0) é do tipo exponencial ($I_t = I_0 e^{-t/\tau}$) cuja constante τ varia em função do composto e do ambiente que o cerca. Assim sendo, um composto que possua uma taxa de decaimento de sinal mais lenta pode ser detectado seletivamente se o detector for ajustado para adquirir o sinal fosforescente após um tempo crítico, onde o sinal do analito de interesse ainda é detectável e, concomitantemente, os sinais dos outros compostos já decaíram para zero.

Em função dos resultados obtidos no estudo anterior, decidiu-se avaliar a taxa de decaimento do sinal fosforescente do indol e de seus derivados (5 µL de soluções 9,9 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) na presença de KI e na presença de TINO₃ no substrato de celulose. O λ_{exc} e o λ_{em} foram ajustados nos máximos dos perfis espectrais (276 e 400 nm, respectivamente). O decaimento do sinal luminescente foi feito com aquisições sucessivas de sinal em tempos de atraso de detector que variaram entre 0,05 e 7,00 ms como indicado na Figura 19 e na Figura 20.

O decaimento de fosforescência dos compostos na presença de KI (Figura 19) indica perfis relativamente diferentes, porém não permitiram a discriminação através do sinal de espera. O resultado é menos satisfatório ainda na presença de TINO₃ (Figura 20), onde o decaimento de sinal é bem mais rápido que o observado com o KI. Conseqüentemente, os resultados mostraram que o ajuste de tempo de abertura do detector não poderia ser utilizado para discriminação de compostos.



Figura 19: Tempo de decaimento no sinal fosforescente do indol e de seus derivados na presença de 830 µg de KI.



Figura 20: Tempo de decaimento no sinal fosforescente do indol e de seus derivados na presença de 266 μ g de TINO₃.

Um estudo similar aos descritos anteriormente foi realizado em substratos contendo SDS e os perfis de decaimento de fosforescência também não mostraram possibilidade para discriminação entre compostos.

Como os testes preliminares não indicaram a possibilidade de discriminação entre os quatro compostos estudados e, uma vez que é possível encontrar na literatura trabalhos relacionados com as caracteristicas fosforescentes do indol e do 3MI ^{11,61}, foi decidido que os próximos estudos envolvendo otimização de condições para determinação fosforimétrica seriam realizados apenas para o 2MI e 7MI.