

5 Otimização da fosforescência

5.1. Metil Indol (2MI)

Com o objetivo de maximizar o sinal fosforescente do 2MI, primeiramente foi usado um procedimento de otimização univariado dos fatores mais relevantes que poderiam afetar o sinal fosforescente. Os seguintes fatores foram estudados: influência da acidez ou basicidade da solução de analito, influência da quantidade do sal de átomo pesado no substrato sólido e a quantidade do surfactante (SDS) no substrato sólido. Em seguida, um planejamento experimental com análise de superfície de resposta foi realizado para investigar interações relevantes entre fatores. A partir desta avaliação foi possível fazer um ajuste fino das condições experimentais e ter uma avaliação preliminar da robustez da resposta analítica em relação a cada um dos fatores.

5.1.1. Estudo da influência da acidez ou basicidade da solução de analito

Um fator importante para a obtenção de sinal fosforescente intenso é a concentração hidrogeniônica da solução usada para depositar o analito no substrato (solução do analito). Reações químicas envolvendo quebra de molécula de analito podem produzir novas espécies de estrutura molecular mais compacta e por isso, com maior eficiência quântica fosforescente. A protonação ou desprotonação de espécies químicas em solução pode também proporcionar criação de sítios com carga elétrica e uma melhor adsorção do analito quando depositado no substrato de celulose. Tal fato implica em maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel. Para tal, soluções do analito $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas nos meios ácido (etanol/solução aquosa de HNO_3) e básico (etanol/ solução aquosa de NaOH) sendo os sinais observados comparados com o obtido a partir de soluções preparadas somente em etanol. As concentrações finais de HNO_3 e NaOH foram variadas de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e os experimentos foram realizados em substratos contendo um dos sais indutores de

sinal fosforescente (830 μg de KI ou 266 μg de TINO_3) com e sem SDS (360 μg de SDS).

Os resultados obtidos, Figura 21, mostraram que a variação da acidez ou basicidade do meio causou efeito na intensidade do sinal fosforescente. O 2MI na presença de KI apresentou o melhor sinal fosforescente em meio básico. A adição do modificador de superfície, SDS, não favoreceu o sinal fosforescente do analito provenientes de soluções de meios (básico e ácido). Na presença do TINO_3 , o favorecimento da fosforescência do analito se deu apenas na presença de SDS, em soluções ácidas e básicas ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), quando se observou aumento de sinal.

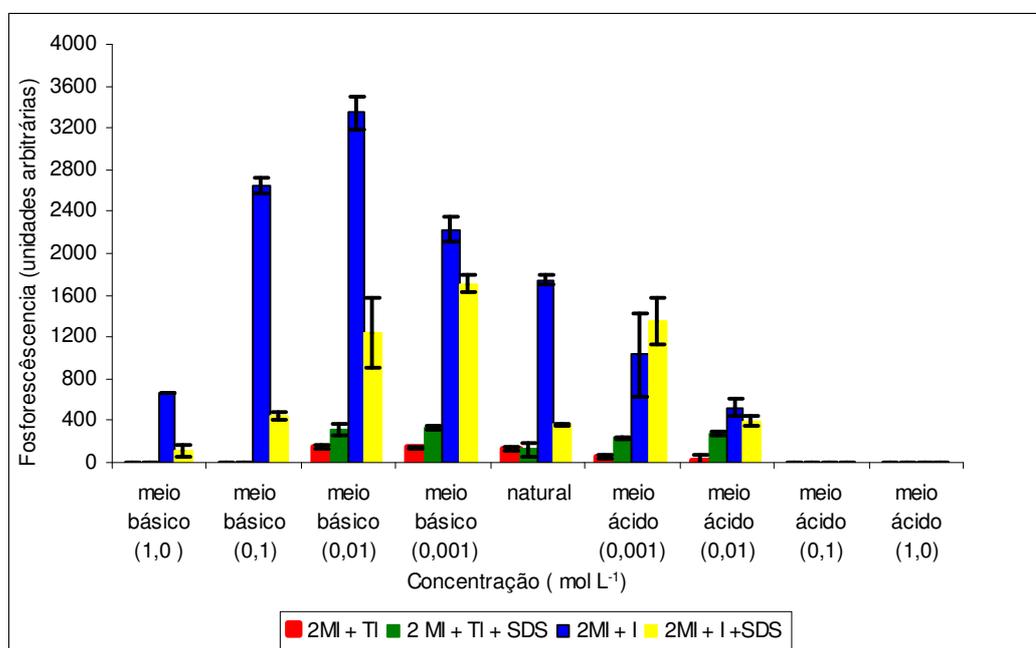


Figura 21: Influência da acidez e basicidade da solução de 2MI (656 ng)

5.1.2.

Estudo detalhado em função do pH da solução de 2MI

Conforme apresentado, o sinal fosforescente do 2MI na presença de TINO_3 e de SDS foi intensificado nos meios ácidos e básicos. Assim sendo, decidiu-se realizar um estudo mais detalhado usando soluções tamponadas com pH ajustado entre 2 e 12. O meio tamponado, ao contrário da simples adição de base ou de ácido, permitiria a fixação da concentração hidrogeniônica da solução, evitando variações causadas pela influência da matriz, caso o sinal do analito fosse medido em uma amostra mais complexa. O pH medido da solução original, em etanol/ H_2O , foi igual a 7,5. Os resultados mostraram, Figura 22, que

a intensidade do sinal fosforescente foi praticamente constante entre os valores de pH 2 a 10, ficando as variações do sinal fosforescente de acordo com a variação de sinal analítico da técnica.⁵⁰

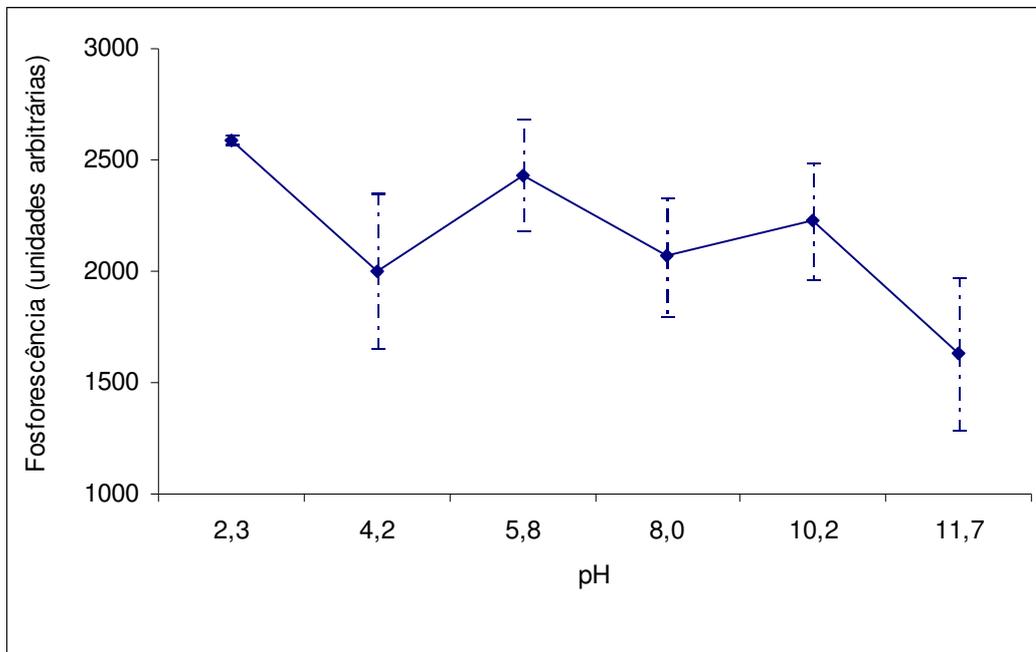


Figura 22: Variação do sinal fosforescente do 2MI, induzido por TINO_3 na presença de SDS, em função do pH da solução de preparação do analito.

Embora o 2MI na presença de KI tenha mostrado um aumento do sinal fosforescente em meio básico, decidiu-se confirmar essa tendência variando o pH da solução, de 2 a 12, por meio do tamponamento da mesma. Os resultados mostraram, Figura 23, que a intensidade do sinal fosforescente cresce do pH 2 até atingir valor constante entre os valores de pH 6,5 e 10.

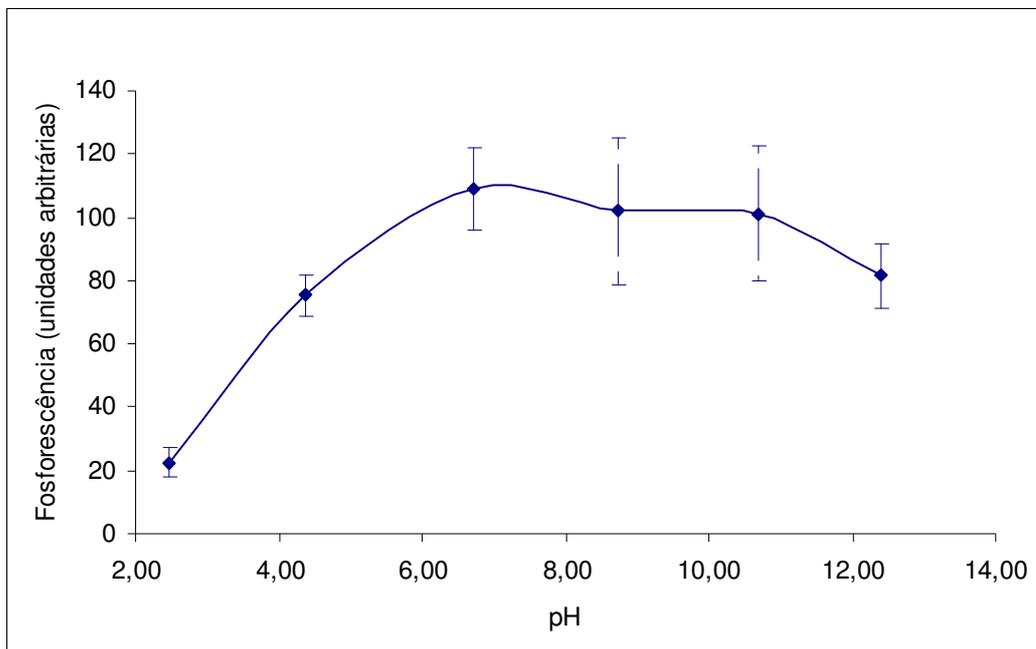


Figura 23: Variação do sinal fosforescente do 2MI, induzido por KI na presença de SDS, em função do pH da solução de preparação do analito.

5.1.3.

Estudo da influência da quantidade dos sais de átomos pesados e do SDS

Conforme mencionado, o efeito externo do átomo pesado tem um papel muito importante na indução ou amplificação da fosforescência de substâncias orgânicas. A magnitude do efeito externo do átomo pesado é influenciada pela quantidade do indutor presente no substrato onde se encontra o analito. Por esta razão, se torna necessário o ajuste da quantidade do sal inorgânico (KI ou $TiNO_3$) que se adiciona no centro do substrato de celulose. Este estudo deve ser realizado de modo cuidadoso, pois se a quantidade do sal de átomo pesado estiver abaixo da quantidade ideal, poderá não haver observação de sinal fosforescente do analito de interesse ou a amplificação da fosforescência do mesmo poderá ser aquém do que potencialmente poderia ser obtido. Por outro lado, elevadas quantidades de sal podem acarretar em decréscimo do sinal fosforescente, provocando efeito pré-filtro que atenua a radiância do feixe de excitação incidente.⁶²

Para realizar tal estudo com iodeto, volumes de 5 μl de soluções de KI em diversas concentrações (de 0,25 a 2,00 mol L⁻¹) foram depositados no substrato de papel. Em termos de massa do sal, a faixa estudada foi entre 208 a 1664 μg . O resultado do experimento mostrou que o sinal fosforescente de maior intensidade foi obtido para a concentração de 1,5 mol L⁻¹ de KI (1245 μg), conforme apresentado na Figura 24. A partir desta concentração, o decréscimo do sinal fosforescente foi observado, o que foi provavelmente provocado pelo efeito pré-filtro. Nesse caso, não foram observadas variações significativas no λ_{exc} e no λ_{em} do 2MI em função das diferentes massas de KI presentes no substrato.

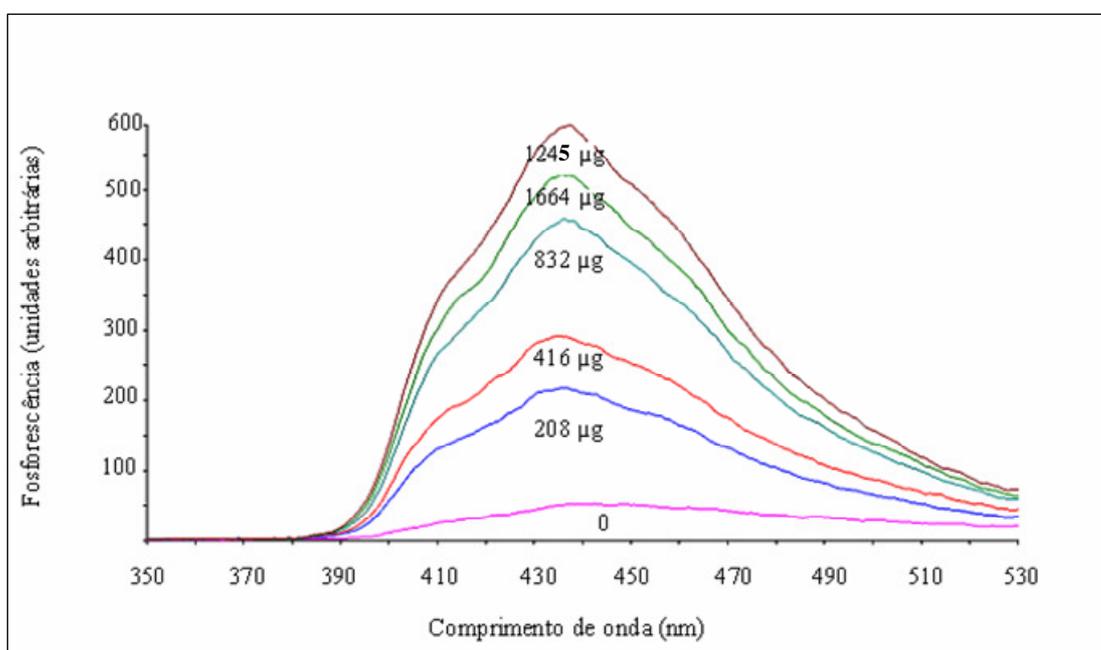


Figura 24: Espectros de emissão de fosforescência de 141 μg de 2MI em função da quantidade de KI depositada no substrato de celulose.

A variação de massa depositada do sal de KI também foi avaliada na presença de 360 μg de SDS. Os resultados, Figura 25, mostraram que a interação KI/SDS reduziu a intensidade do sinal fosforescente do 2MI, conforme apontado no estudo preliminar, sendo nessas circunstâncias, desfavorável à presença do SDS.

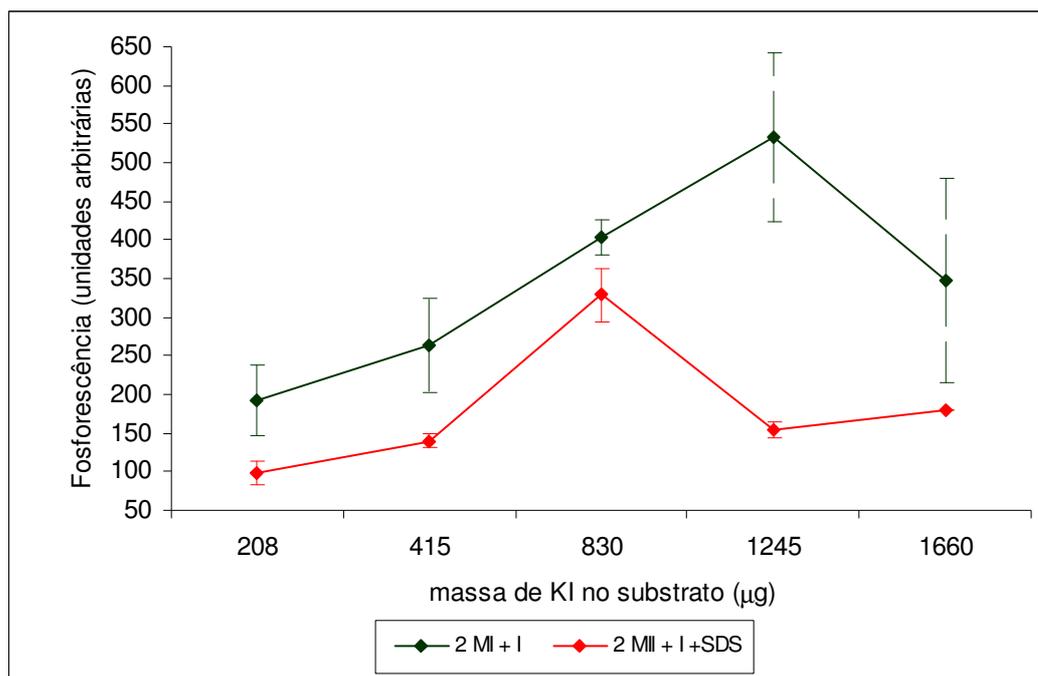


Figura 25: Estudo do sinal fosforescente do 2MI em função da variação da massa de KI depositada no substrato de celulose com e sem SDS.

Um estudo similar foi realizado usando TINO_3 como átomo pesado. Neste caso, a massa depositada (5 μL de solução do sal) foi variada até 1332 μg . Devido à baixa solubilidade do sal em água, massas maiores que 133 μg foram depositadas por meio de adições sucessivas de 5 μL de solução de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de TINO_3 . Para o teste com adição de SDS, a massa depositada foi de 360 μg (5 μL solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$).

Os resultados, Figura 26, mostraram que a interação TINO_3/SDS intensificou significativamente o sinal fosforescente, conforme já descrito na literatura para outras classes de compostos orgânicos. Neste caso, o uso SDS tornou-se recomendado. É possível observar que os sinais fosforescentes máximos do 2MI ocorrem na presença de 133 μg de TINO_3 decrescendo até atingir sinal praticamente constante a partir de 333 μg do sal no substrato.

Nos dois casos, o sinal do 2MI se mostrou bastante dependente da quantidade de sal de átomo pesado (TINO_3 ou KI) no substrato, indicando a necessidade de cuidado nessa otimização. Mais experimentos envolvendo variação de massa do sal de átomo pesado foram realizados nos estudos multivariados.

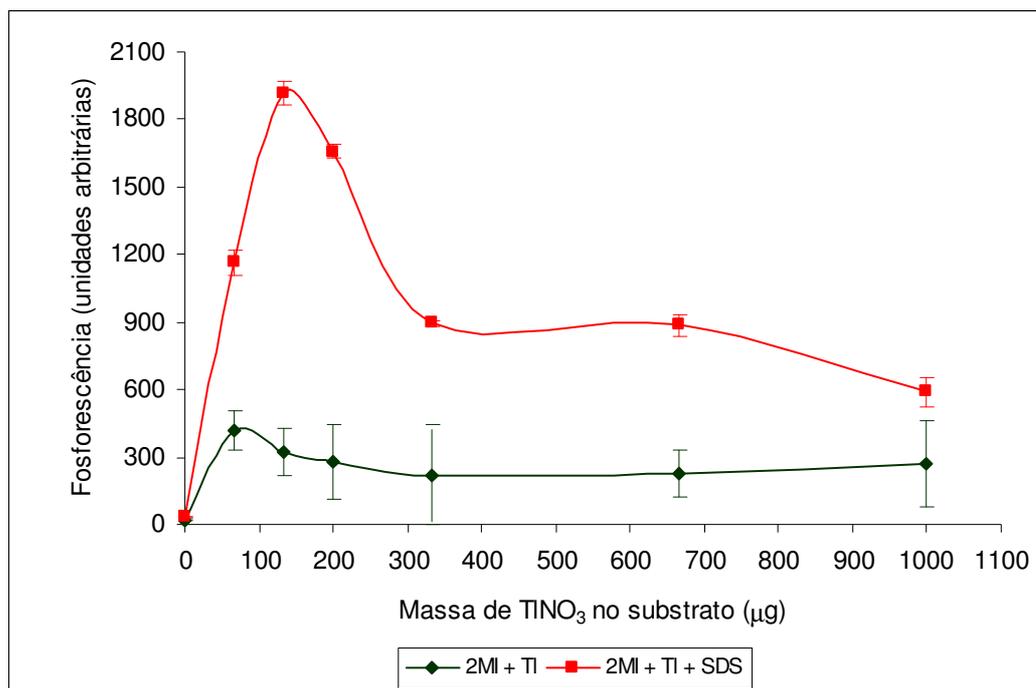


Figura 26: Estudo do sinal fosforescente do 2MI em função da variação de massa de TINO₃ depositado no substrato de papel com e sem SDS.

5.1.4. Estudo da influência da concentração SDS na presença de TINO₃

Como foi verificada uma importante ação sinérgica entre o sal de TINO₃ e o SDS, decidiu-se estudar univariadamente o efeito da variação da quantidade de SDS na superfície da celulose no sinal fosforescente do 2MI induzido pelo TINO₃. Para tal, a massa de SDS no substrato foi variada de 14 a 1442 µg de SDS na presença de 133 µg de TINO₃ (5 µL de solução 0,10 mol L⁻¹). Para adicionar massas de SDS maiores que 360 µg, foram realizadas adições múltiplas de solução de SDS no substrato.

Os resultados obtidos na Figura 27 mostraram que a massa de 720 µg de SDS (duas adições de 5 µL de solução de 0,25 mol L⁻¹) foi a que apresentou sinal fosforescente mais intenso.

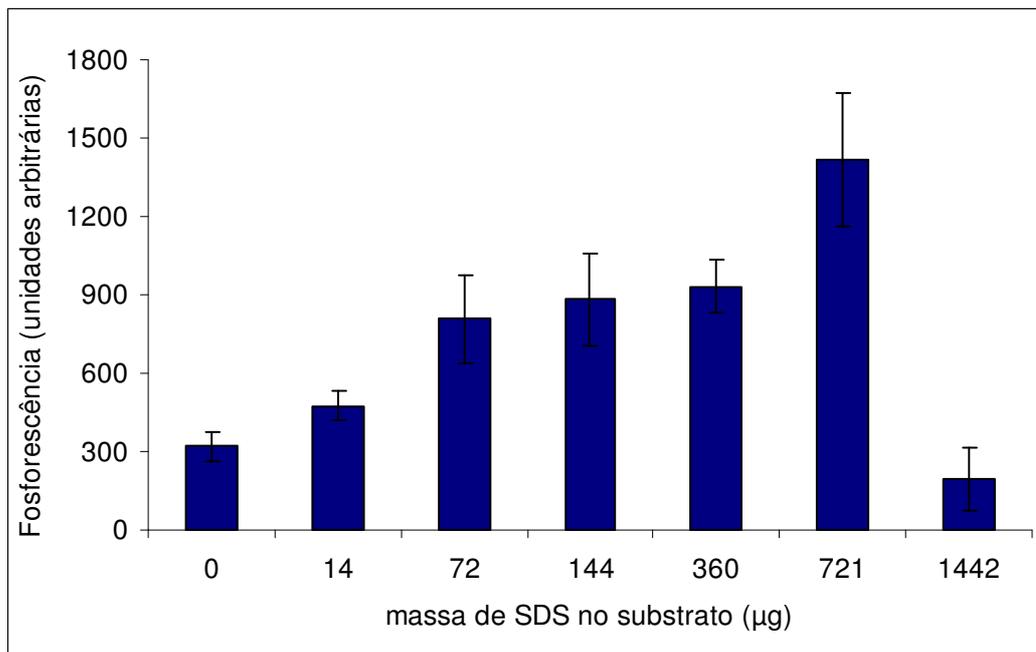


Figura 27: Estudo do sinal fosforescente do 2MI em função da variação da massa de SDS depositado no substrato de papel na presença de 133 µg de TI.

5.1.5. Estudo multivariado

A análise multivariada vem sendo amplamente utilizada para identificar as variáveis que exercem maiores influências no desempenho de um determinado processo. O planejamento fatorial (PF) é uma técnica bastante utilizada quando se deseja estudar os efeitos principais e efeitos de interação dos fatores de resposta. O planejamento experimental composto central permite amostrar um conjunto de pontos (nove no caso do planejamento 2^2) que ao serem analisados em conjunto, permitem a construção de uma superfície de resposta em função da variação dos fatores experimentais. A partir da associação do planejamento fatorial com a técnica de superfície de resposta é possível propor um modelo matemático que relacione a resposta em função das variáveis estudadas, determinando assim a faixa ótima para a obtenção da melhor resposta analítica. Esse tipo de avaliação permite também verificar se a contribuição do efeito na resposta é linear ou de ordem superior (mais especificamente a quadrática).

O planejamento fatorial é mais efetivo quando se têm informações prévias do sistema a ser estudado, pois isso permite a escolha direta das regiões de resposta mais relevantes para cada fator. No caso desse trabalho, os resultados

do estudo univariado permitem fazer a seleção efetiva dos níveis de cada um dos fatores em estudo.

5.1.5.1. Fosforescência do 2MI na presença de KI

Com base nos resultados obtidos no capítulo anterior optou-se por realizar um planejamento fatorial composto central com 2 fatores (2^2). Os níveis (-1), (+1) e (0) para cada fator foram selecionados com base nas tendências indicadas nos estudos univariados, já os níveis $+\sqrt{2}$ e $-\sqrt{2}$ foram obtidos de acordo com o indicado pelo *design* característico desse planejamento. Em geral, recomenda-se para o planejamento composto central, o uso de cinco replicatas das medições no ponto central (0,0), cuja variância seria característica para todo o sistema. Assim sendo, para os outros oito pontos do planejamento $\{(+1,-1); (-1,+1), (+1,+1); (-1,-1); (0,+\sqrt{2}); (0,-\sqrt{2}); (+\sqrt{2},0)$ e $(-\sqrt{2},0)\}$ apenas uma medição bastaria. No entanto, no caso da fosforimetria, decidiu-se por utilizar seis replicatas no ponto central e três replicatas para cada um dos outros pontos. Essa decisão foi baseada na potencial não uniformidade da variância associada às medições usando essa técnica e, para se identificar variações não-aleatórias de sinal características da medição fosforescente em substrato sólido.

As variáveis foram selecionadas com base nos resultados univariados, sendo as mesmas: (i) quantidade de KI depositado no substrato e (ii) pH da solução de analito. No caso da massa de KI, os valores para os níveis -1; $-\sqrt{2}$; 0, +1 e $+\sqrt{2}$ foram respectivamente 954; 1038; 1245; 1452 e 1535 μg . Já os valores de pH foram variados na mesma seqüência de níveis, sendo os valores numéricos respectivamente 4,2; 5,0; 7,0; 9,0 e 9,8.

A matriz do planejamento bem como a análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa *Statistica 6.0* utilizando um nível de 95% de confiança. A ordem de realização dos 30 experimentos foi gerada pelo programa estatístico de forma a ser aleatória. Os resultados dos experimentos são indicados na Tabela 3. A massa do analito depositada no substrato de papel foi de 65 ng (5 μL da solução 1×10^{-4} mol L^{-1}).

Tabela 3: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial composto central 2^2 usando KI como sal indutor de sinal fosforescente.

Experimento	Replicata	KI, μg	pH	Sinal fosforescente
30 (C)	3	1245	7,0	122
1	1	1038	5,0	164
13	2	1452	5,0	196
24	3	1452	9,0	168
6	1	1535	7,0	179
17	2	1245	4,2	180
8	1	1245	9,8	149
12	2	1038	9,0	181
4	1	1452	9,0	181
3	1	1452	5,0	156
20 (C)	2	1245	7,0	121
16	2	1535	7,0	136
22	3	1038	9,0	111
23	3	1452	5,0	134
9 (C)	1	1245	7,0	118
14	2	1452	9,0	102
7	1	1245	4,2	160
15	2	954	7,0	123
26	3	1535	7,0	112
25	3	954	7,0	126
19 (C)	6	1245	7,0	106
11	2	1038	5,0	112
28	3	1245	9,8	93
29 (C)	5	1245	7,0	117
21	3	1038	5,0	105
10 (C)	4	1245	7,0	147
5	1	954	7,0	125
27	3	1245	4,2	140
18	2	1245	9,8	110
2	1	1038	9,0	161

(C) - ponto central do planejamento.

A partir dos resultados obtidos no planejamento foi possível fazer uma análise das variáveis e interações relevantes. Neste estudo, os efeitos que são estatisticamente importantes foram avaliados através do diagrama de Pareto, Figura 28. Os efeitos cujas barras estavam à direita da linha divisória ($p=0,05$) devem ser considerados significativos. Os valores ao lado dos retângulos

representam os valores da estatística *t-Student* obtidos por meio das estimativas dos efeitos.

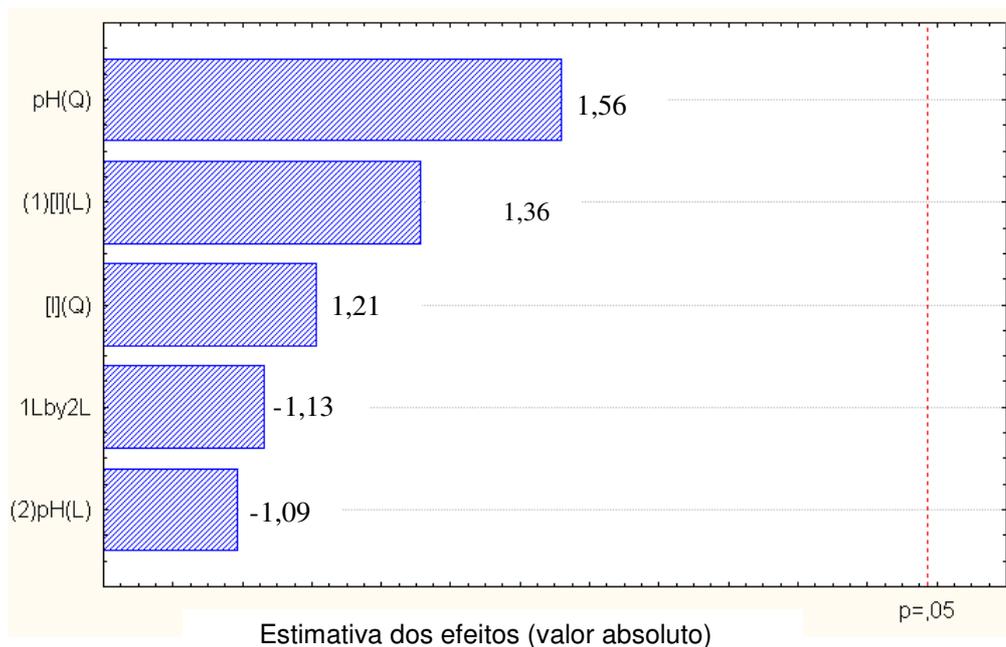


Figura 28. Diagrama de Pareto para o 2 MI onde L e Q são as contribuições lineares e quadráticas respectivamente e pH e [] são as variáveis pH e massa de KI no substrato.

O diagrama de Pareto mostrou que, na faixa escolhida, nenhum dos fatores foi relevante, seja para as contribuições lineares ou quadráticas. Também não foram observadas interações significativas entre os fatores. As condições avaliadas mostraram que não existem diferenças significativas entre os sinais analíticos obtidos entre os valores pH 4,2 a 9,8 quando as massas depositadas de KI estiverem entre 954 e 1535 μg .

A Figura 29 e a Figura 30 mostraram as superfícies de resposta e a curva de nível que foram geradas a partir do planejamento experimental. A superfície de resposta mostrou regiões de sinal analítico fora da região de valores experimentais e para os quais o programa estatístico estimou respostas baseadas na tendência de crescimento de sinal. Por causa disso, essa superfície pode sugerir um resultado errôneo na escolha de condições experimentais para o 2MI. Assim, a curva de nível (Figura 28), que inclui apenas a região dentro dos pontos experimentais selecionados, foi usada para melhor entender os resultados do experimento de otimização.

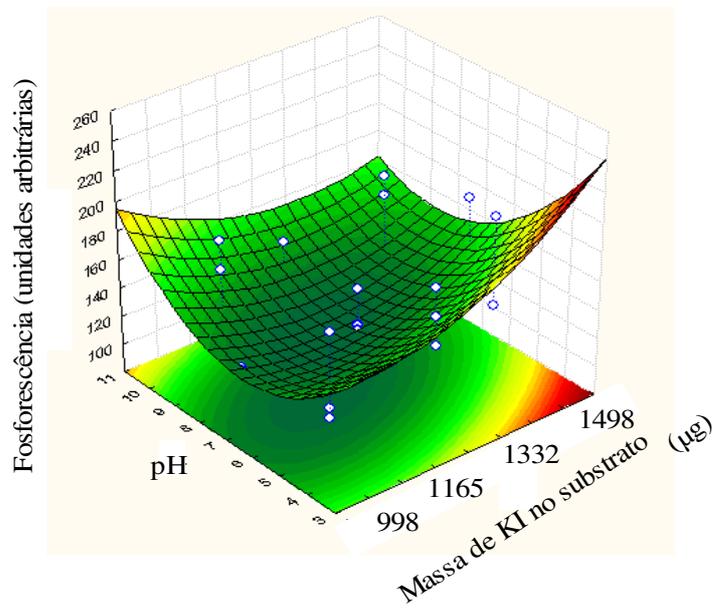


Figura 29: Superfície de resposta obtida no planejamento fatorial do 2 MI na presença de KI.

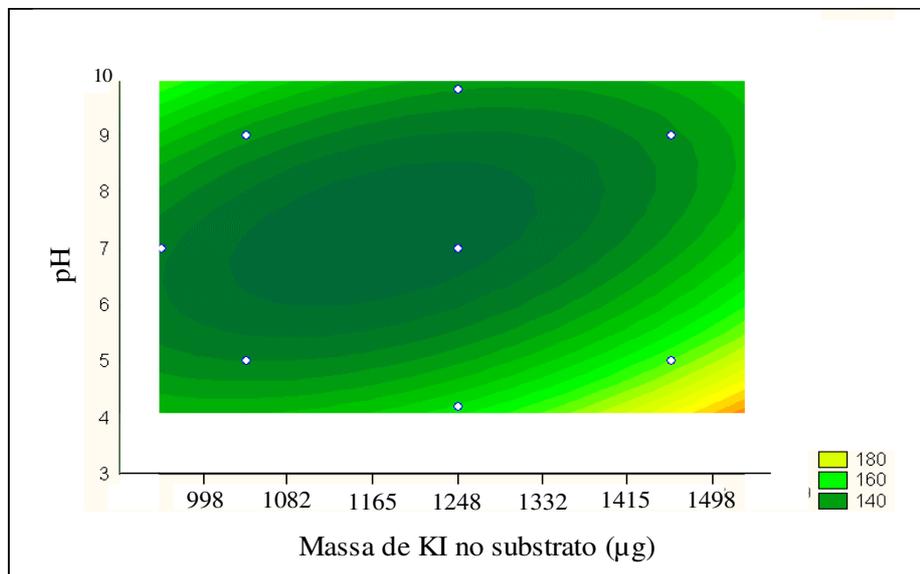


Figura 30: Curva de nível obtida no planejamento fatorial do 2 MI na presença de KI.

Uma vez identificadas as regiões que contêm o ponto de máximo e ponto de mínimo, a próxima etapa da análise da superfície de resposta seria a de determinar quais valores das variáveis independentes nos levam ao máximo ou ao mínimo de resposta. Esta avaliação é feita através da derivação do modelo de 2ª ordem em relação a cada variável independente e igualando-se a zero. Então, a resolução do sistema matemático de duas equações e duas incógnitas foram feitos, determinando-se assim os níveis desejados. No entanto, a curva de nível e as variâncias da superfície de resposta indicam que o sinal analítico foi semelhante ao longo de toda a região, mostrando a larga faixa de robustez dos parâmetros pH e massa de KI. Assim, a partir destas Informações, foram escolhidas as condições experimentais para o 2MI na região próxima ao centro do planejamento, isto é, escolheu-se 1245 µg de KI (5 µL da solução 1,5 mol L⁻¹) e pH original da solução em etanol.

5.1.5.2. Fosforescência do 2MI na presença de TINO₃ e SDS

Um estudo multivariado similar ao descrito na seção anterior foi realizado para verificar a influência combinada do TINO₃ e do surfactante (SDS) no sinal fosforescente do 2MI. Novamente, a escolha dos fatores e dos seus níveis foi baseada nos resultados dos estudos univariados (massa de TINO₃ e massa de SDS depositados no substrato). Com base nos resultados obtidos no planejamento anterior (com sal de KI), decidiu-se não avaliar a influência do pH. Nesse caso, o pH foi descartado como fator, pois este provavelmente não seria relevante no sinal do 2MI, quando usado dentro da faixa de resposta analítica robusta (pH entre 6,5 e 12). O pH utilizado foi o original da solução de 2MI (pH 7,5). No planejamento fatorial composto central 2², os valores para os níveis -1; -√2; 0, +1 e +√2 foram respectivamente: 40; 67; 133; 200 e 226 µg de TINO₃ e 519; 577; 721; 865; 923 µg de SDS. A quantidade de massa depositada do analito no substrato de papel foi de 656 ng (5 µL da solução 1x 10⁻³ mol L⁻¹).

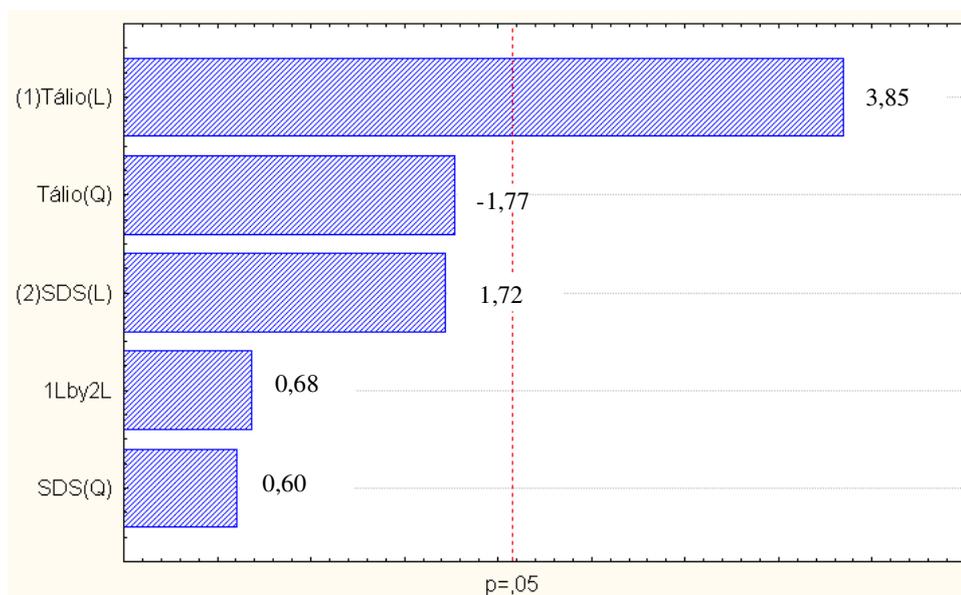
A ordem de realização dos 30 experimentos foi gerada pelo programa estatístico de forma a serem realizados aleatoriamente. Os resultados dos experimentos são indicados na Tabela 4. Para cada ponto do planejamento, os experimentos foram realizados em triplicatas autênticas, com exceção do ponto central para o qual foram feitas seis replicas.

Tabela 4: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial: 2² usando TINO₃ como sal indutor de sinal fosforescente

Experimento	Replicatas	TINO ₃ , µg	SDS, µg	Sinal fosforescente
16	2	226	721	3133
23	3	200	577	2459
20 (C)	2	133	721	2794
25	3	40	721	2666
10 (C)	1	133	721	2290
7	1	133	519	3028
8	1	133	923	2828
27	3	133	519	3415
18	2	133	923	3200
29 (C)	3	133	721	3304
1	1	67	577	1840
9 (C)	1	133	721	2395
21	3	133	577	2233
17	2	133	519	3465
11	2	67	577	2119
30 (C)	3	133	721	3817
15	2	40	721	1507
24	3	200	865	2664
14	2	200	865	4032
4	1	200	865	3812
3	1	200	577	2711
26	3	226	721	3276
19 (C)	2	133	721	2842
6	1	226	721	2989
22	3	66	865	2494
5	1	40	721	1790
2	1	67	865	2977
12	2	67	865	2816
13	2	200	577	2206
28	3	133	923	2793

(C) - ponto central do planejamento.

O diagrama de Pareto (Figura 31) resultante desse planejamento indicou a não relevância da interação entre os fatores TINO_3 e SDS, dentro da faixa estudada. Para a massa de TINO_3 depositada no substrato, o resultado indicou a relevância da contribuição linear desse fator, como indicada pela barra acima do limite da linha divisória ($p=0,05$). O valor positivo da estatística *t-Student*, apresentado ao lado do retângulo, indicou a necessidade de ajuste da quantidade de TINO_3 , aumentando a massa para valores superiores a $226 \mu\text{g}$. Fato este confirmado pela superfície de resposta que aponta crescimento do sinal em função do crescimento da massa de TINO_3 na região de maior quantidade de SDS. Pela superfície de resposta (Figura 32) e curva de nível (Figura 33), o aumento de sinal fosforescente para massas mais elevadas de TINO_3 está aparentemente relacionado com o aumento da quantidade de SDS.



Estimativa dos efeitos (valor absoluto)

Figura 31: Gráfico de Pareto para o 2 MI onde L e Q são as contribuições lineares e quadráticas respectivamente e TINO_3 e SDS são as variáveis massa de TINO_3 e massa de SDS no substrato.

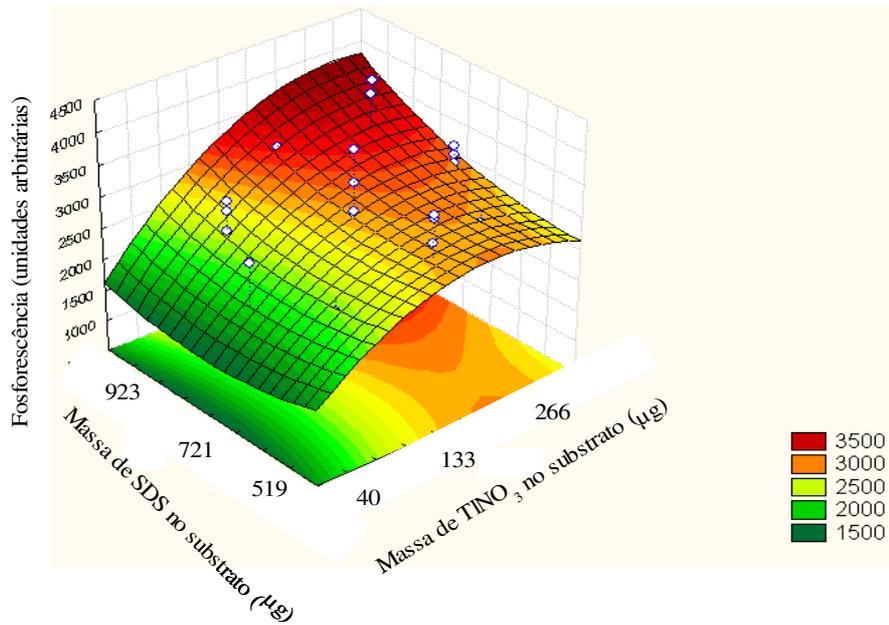


Figura 32: Superfície de resposta obtida no planejamento fatorial composto central do 2MI na presença de TINO₃ e SDS.

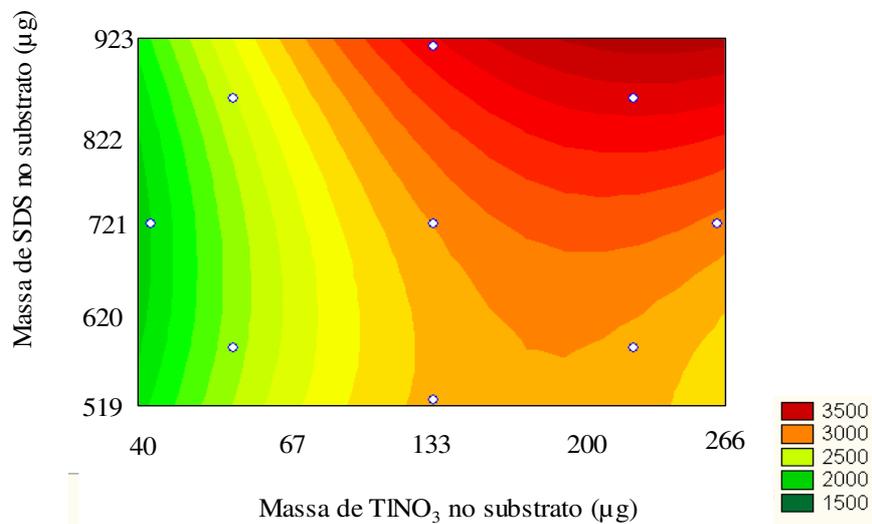


Figura 33: Curva de nível obtida no planejamento fatorial composto central do 2 MI na presença de TINO₃ e SDS.

Uma vez que o diagrama de Pareto indicou a não interação entre massa de SDS e massa de TINO_3 sendo esse último à única variável a ser ajustada, um novo estudo univariado foi realizado, onde a massa de sal de TINO_3 depositada no substrato variou de 66 μg a 999 μg . A adição no substrato foi realizada após a deposição de 721 μg (2 adições de 5 μL da solução 0,25 mol L^{-1}) de SDS. A massa de SDS foi escolhida por se tratar do ponto central do planejamento e por ter sido indicado no estudo univariado. Esse teste foi realizado com um maior número de pontos (concentrações) e com medição de branco para cada massa de TINO_3 utilizada. O teste univariado (Figura 34) mostrou que a melhor massa de TINO_3 está próxima de 133 μg (5 μL da solução 0,10 mol L^{-1}), confirmando assim a condição obtida no planejamento univariado feito anteriormente. Um novo teste (Figura 35) foi realizado comparando-se os sinais medidos em substratos contendo pequenas variações de massa TINO_3 (106, 120, 133, 146 e 160 μg). Embora o estudo multivariado indicasse que a massa de TINO_3 fosse superior a 226 μg , os resultados dos estudos univariados indicaram que as massas entre 120 a 146 μg (5 μL da solução 0,09 a 0,11 mol L^{-1}), são estatisticamente semelhantes. A razão para a discrepância entre o resultado do planejamento experimental e o resultado do estudo univariado na escolha da melhor massa de TINO_3 pode estar na correção indevida do sinal do branco durante o planejamento experimental. O sinal de fundo do substrato de celulose é afetado pelo sal de TINO_3 , podendo crescer proporcionalmente com o aumento da quantidade do átomo pesado, dependendo do lote e da qualidade do substrato. Esse tipo de efeito pode não ter sido corrigido apropriadamente no planejamento experimental, assumindo uma pretensa uniformidade da resposta do branco. Já o estudo univariado foi realizado com a correção dos sinais dos brancos em cada ponto e por isso a distorção apontada pela superfície de resposta é corrigida.

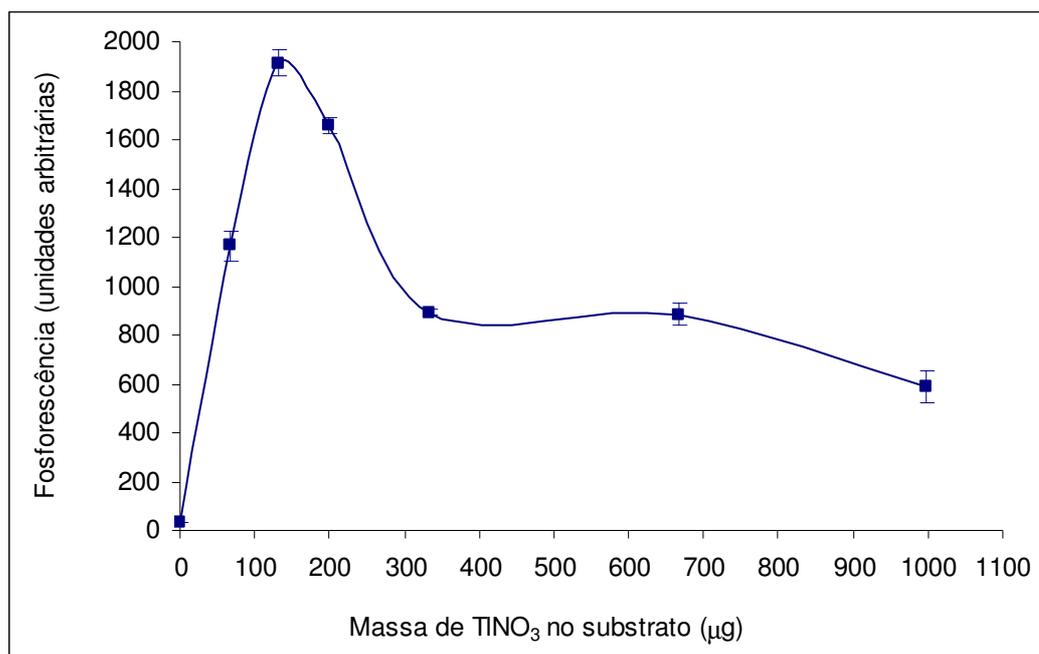


Figura 34: Estudo do sinal fosforescente do 2MI em função da variação da massa de TiNO_3 depositado no substrato de papel na presença de 721 μg de SDS.

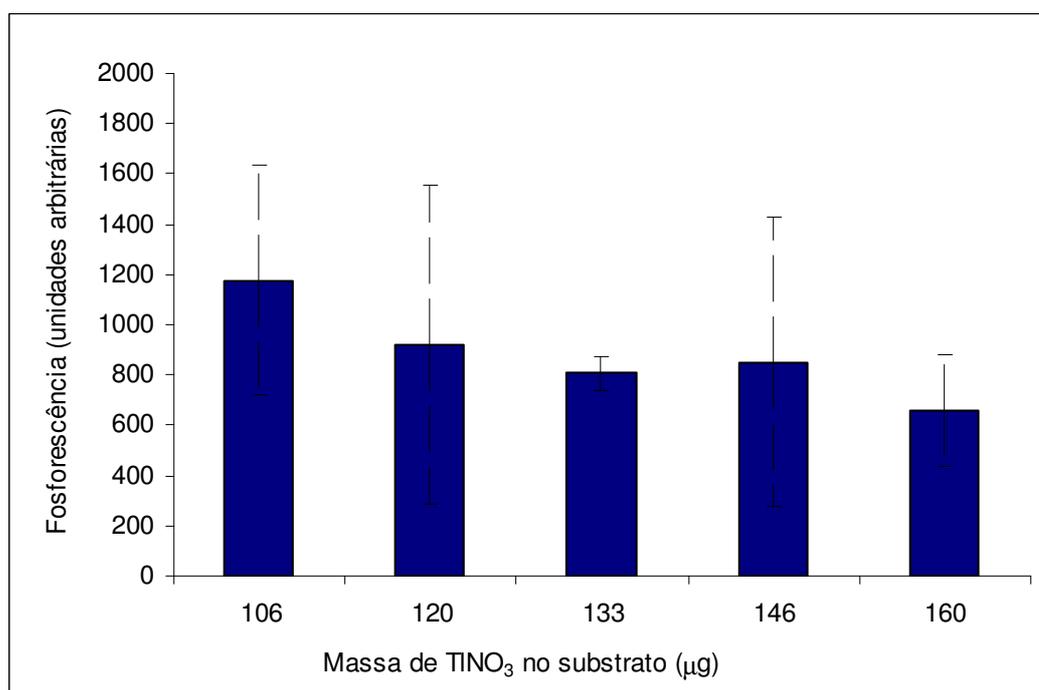


Figura 35: Estudo do sinal fosforescente do 2MI em função da variação da massa de TiNO_3 depositado no substrato de papel na presença de 721 μg de SDS.

As condições experimentais escolhidas para a determinação fosforimétrica do 2MI estão indicadas na Tabela 5, e os espectros de varredura sincronizada e os respectivos brancos característicos indicados na Figura 36 e na Figura 37.

Tabela 5: Condições escolhidas para o melhor sinal fosforescente do 2MI.

Parâmetros	Sal de atomo pesado	
	KI	TINO ₃
Tempo de atraso do detector, ms	0,05	
Tempo de abertura do detector, ms	3,0	
Velocidade de varredura, nm min ⁻¹	1500	
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$, nm	285/442	277/444
$\Delta\lambda$, nm	157	167
Sistema de solventes	etanol/H ₂ O - 50/50%, v/v	
pH	Original da solução	
Massa de sal no substrato, μg	1245	133
Massa de SDS no substrato, μg	---	721

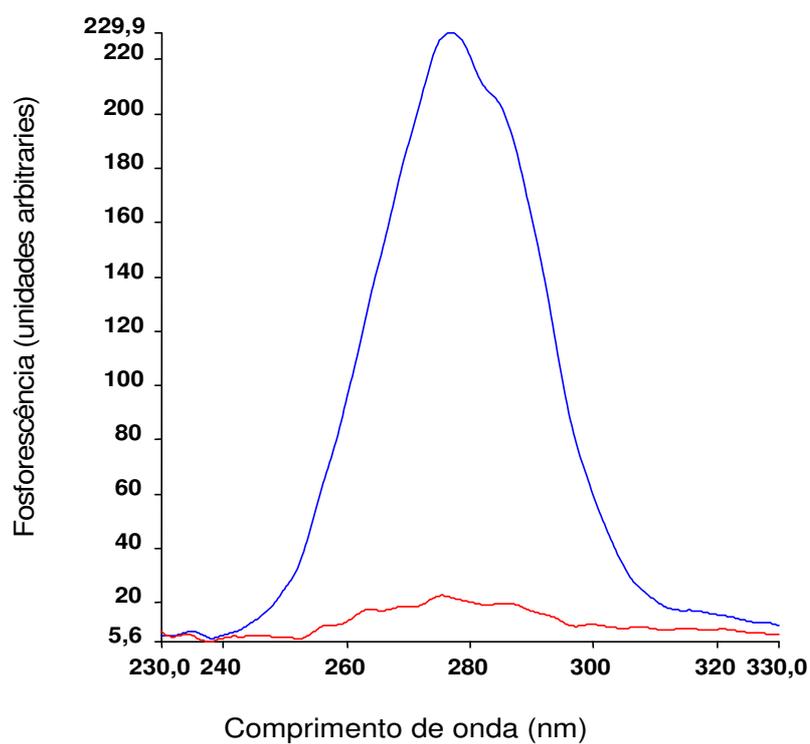


Figura 36: Espectros de fosforescência de varredura sincronizada de 199 ng de 2MI ($3,04 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de 1245 μg de KI

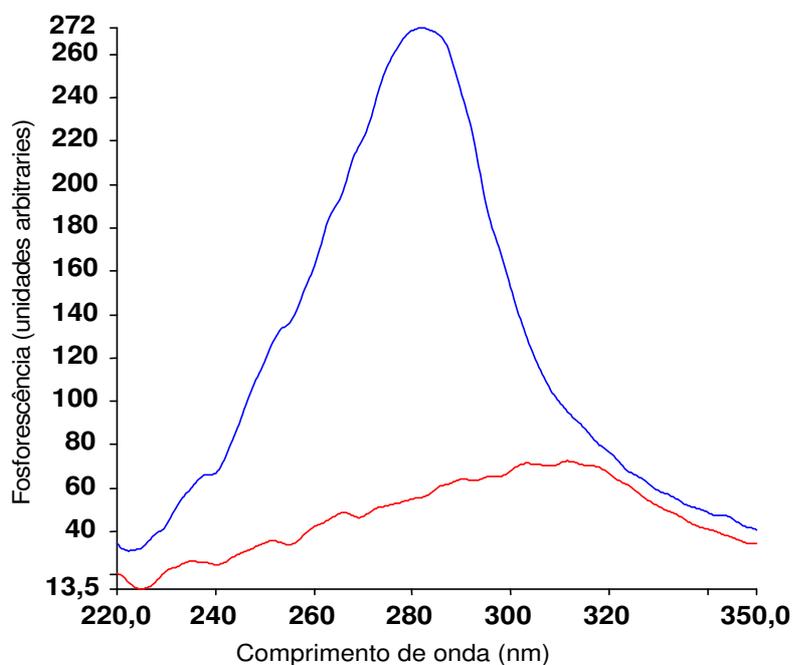


Figura 37: Espectros de fosforescência de varredura sincronizada de 199 ng de 2MI ($3,04 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de 133 μg de TINO_3 e 721 μg de SDS

5.2. 7 Metil Indol (7MI)

Para o 7MI, foi adotada a mesma estratégia de otimização feita para o 2MI. Inicialmente um estudo univariado dos fatores mais relevantes foi realizado, sendo os fatores escolhidos indicados a seguir: (i) influência da acidez e basicidade da solução de analito, (ii) influência da quantidade do sal de átomo pesado no substrato sólido e (iii) a quantidade do surfactante (SDS) no substrato sólido. Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial com análise de superfície de resposta. Todos os estudos foram realizados com 656 ng do 7MI (5 μL de solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

5.2.1. Estudo da influência da acidez e basicidade

Para avaliar o efeito da concentração hidrogeniônica do meio, soluções de 7 MI foram preparadas em 3 meios: ácido (etanol/solução aquosa de HNO_3), básico (etanol/solução aquosa de NaOH) e em etanol/ H_2O 50/50, v/v. As concentrações finais de HNO_3 e NaOH foram variadas de 1,0 a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em substratos contendo um dos sais indutores de sinal fosforescente (830 μg KI de potássio ou 266 μg de TINO_3) com ou sem SDS (360 μg de SDS).

Os resultados obtidos, Figura 38, mostraram que a variação da acidez ou basicidade do meio causou efeito na intensidade do sinal fosforescente. O 7MI, na presença de KI, apresentou o melhor sinal fosforescente em etanol/água. A adição do modificador de SDS não melhorou o sinal fosforescente do analito. Na presença do sal de TINO_3 , o favorecimento da fosforescência do analito se deu apenas na presença de SDS, em soluções básicas ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), quando se observou aumento de sinal. Nas soluções excessivamente básicas ou ácidas (mol L^{-1}), o substrato de papel ficou amarelado, não apresentando sinal fosforescente característico do 7 MI.

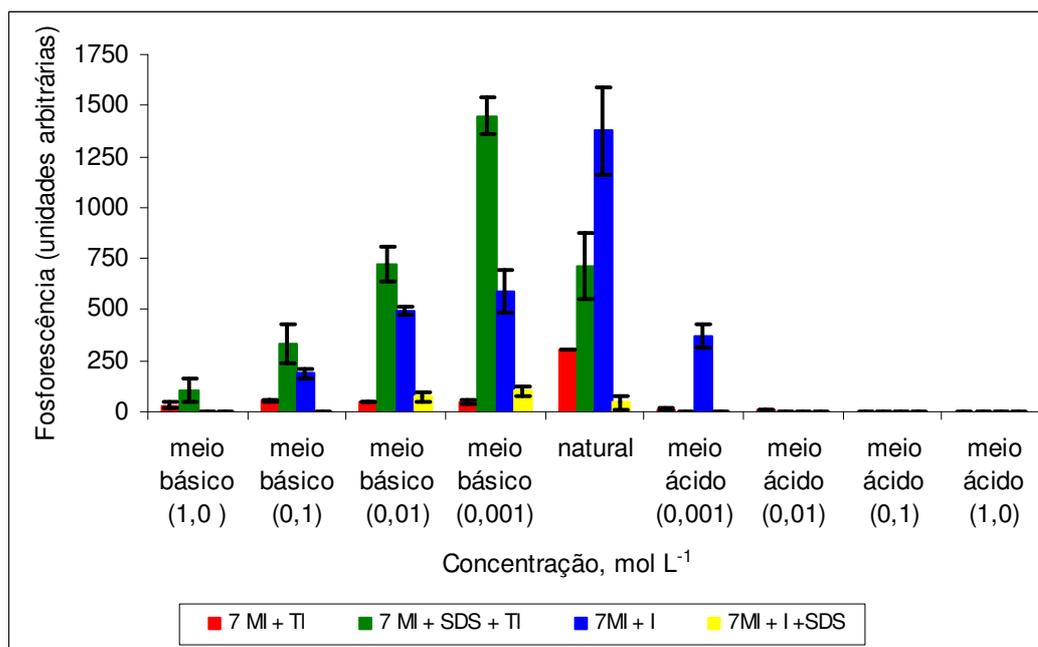


Figura 38: Influência da acidez e basicidade da solução na fosforescência do 7 MI (656 ng)

5.2.2.

Estudo detalhado em função do pH da solução de 7MI

Conforme apresentado no estudo anterior, o sinal fosforescente do 7MI foi intensificado em duas condições: na presença de KI, a partir de soluções em etanol e na presença de TINO_3 e de SDS a partir de soluções básicas. Assim sendo, se decidiu realizar um estudo detalhado usando soluções tamponadas cujo pH foi variado de 2 a 12. O pH medido da solução original, em etanol/ H_2O , foi igual a 7,5.

Os resultados, Figura 39, mostraram que o sinal fosforescente do 7MI induzido por KI são similares em todos os valores de pH estudados como indica a linha de tendência e os desvios-padrão obtidos.

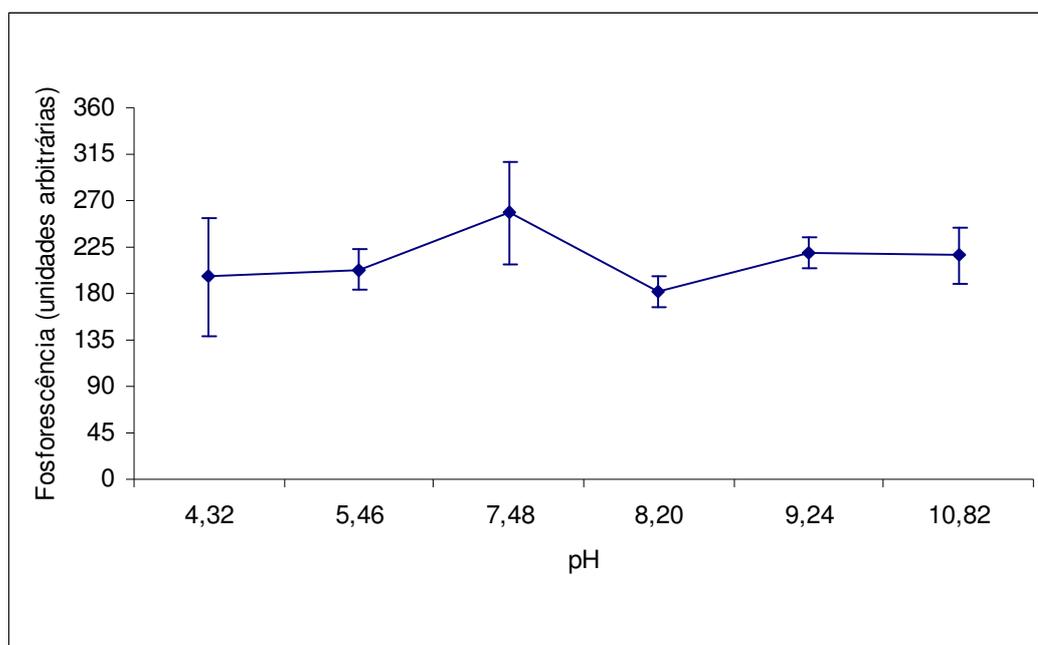


Figura 39: Variação do sinal fosforescente do 7MI (656 ng), induzido por KI, em função do pH da solução.

Para o 7MI na presença de TINO_3 e de SDS, os resultados mostraram (Figura 40) que o sinal fosforescente foi praticamente constante entre os pH 2 e 10, ficando as variações do sinal fosforescente de acordo com a variação de sinal analítico da técnica em substrato sólido.

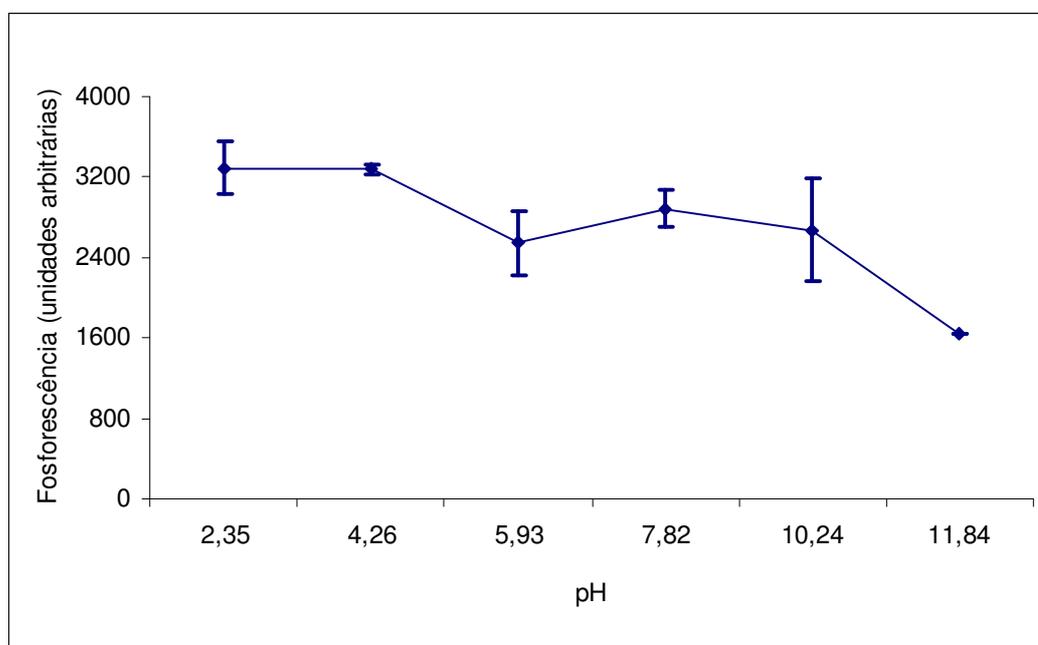


Figura 40: Variação do sinal fosforescente do 7MI, induzido por TINO_3 na presença de SDS, em função do pH.

5.2.3. Estudo da influência da quantidade dos sais de átomos pesados e do SDS

Na avaliação da influência da concentração do KI, massas do sal na faixa de 208 a 1660 μg (5 μl de soluções cujas concentrações variaram entre 0,25 a 2,0 mol L^{-1}) foram depositadas no substrato de papel.

O resultado do experimento mostrou que o sinal fosforescente de maior intensidade foi obtido para a massa depositada de 1245 μg de KI (5 μL de solução 1,5 mol L^{-1}), conforme apresentado na Figura 42. A partir desta concentração, foi observado o decréscimo do sinal fosforescente provocado provavelmente pelo efeito pré-filtro. As diferentes massas depositadas de KI não acarretaram em variações significativas nos λ_{exc} e o λ_{em} do 7MI, ficando em 286 e 441 nm, respectivamente.

A variação de massa depositada do sal de KI também foi avaliada na presença de 360 μg de SDS, Figura 41. Embora não tenha havido melhora na intensidade do sinal fosforescente, pode-se observar que o SDS reduziu de 1245 para 830 (5 μL de solução 1,0 mol L^{-1}) a massa de KI necessária para indução de fosforescência máxima. Possivelmente esta redução ocorreu devido a uma aproximação mais eficiente entre as moléculas do analito e do átomo pesado.

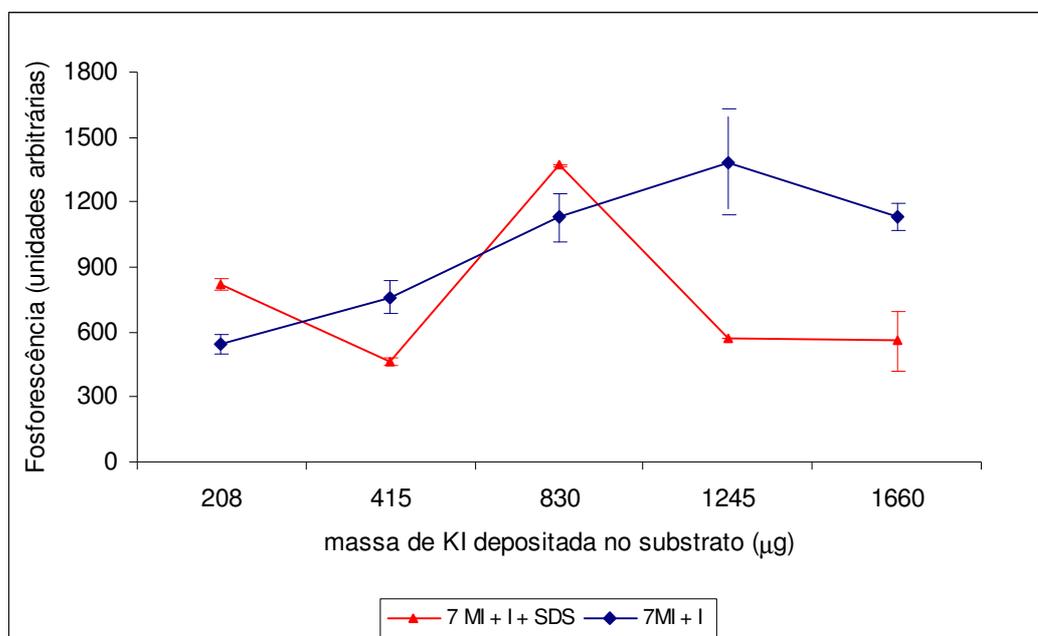


Figura 41: Estudo do sinal fosforescente do 7MI em função da variação da massa de KI depositada no substrato de substrato de celulose.

Um estudo similar foi realizado com o TINO_3 , Figura 42. A massa depositada (5 μL de solução do sal) foi variada até 1332 μg . Devido à limitação de solubilidade do sal em água, as massas superiores a 333 μg , foram depositadas no substrato, por meio de adições sucessivas de 5 μL de solução de TINO_3 0,25 mol L^{-1} . O 7MI, na presença de TINO_3 , apresentou o sinal fosforescente mais intenso para massa depositada de 133 μg de TINO_3 (5 μL de solução 0,10 mol L^{-1}). A variação de massa depositada do sal de TINO_3 na presença de SDS não foi estudada neste momento. As diferentes massas depositadas de TINO_3 não acarretaram em variações significativas nos λ_{exc} e o λ_{em} do 7MI, ficando em 274 e 441 nm, respectivamente.

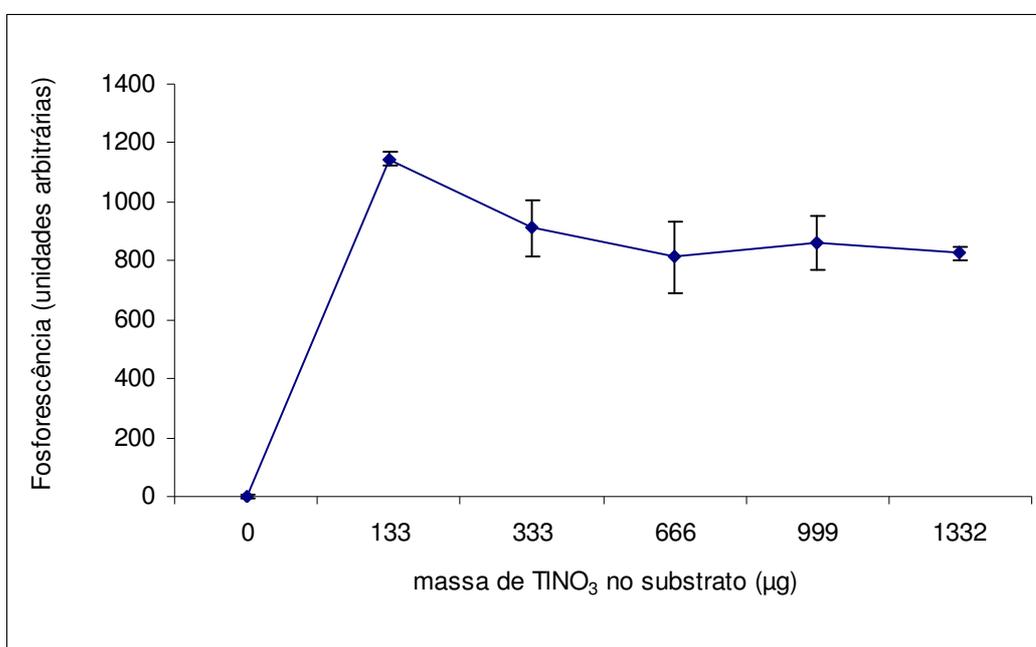


Figura 42: Estudo do sinal fosforescente do 7MI em função da variação da massa de TINO_3 depositada no substrato de substrato de celulose.

5.2.3.1.

Estudo da influência da concentração SDS na presença de TINO_3

Como já mencionado, o TINO_3 e o SDS podem apresentar uma sinergia muito importante, provocando uma amplificação adicional de sinal para muitas classes de fósforos. Então, uma vez definida a melhor massa do TINO_3 , decidiu-se avaliar o efeito da quantidade de SDS no substrato de papel. Para tal, a quantidade de massa de SDS depositada foi variada até 1442 μg (5 μL de solução de SDS entre 0 e 1,00 mol L^{-1}) na presença de 133 μg de TINO_3 . Para

massas de SDS maiores que 360 μg foram realizadas adições múltiplas de solução de SDS.

Os resultados obtidos na Figura 43 mostraram que a massa de 721 μg de SDS (duas adições de 5 μL de solução de 0,25 mol L^{-1}) foi a que produziu sinal fosforescente mais intenso.

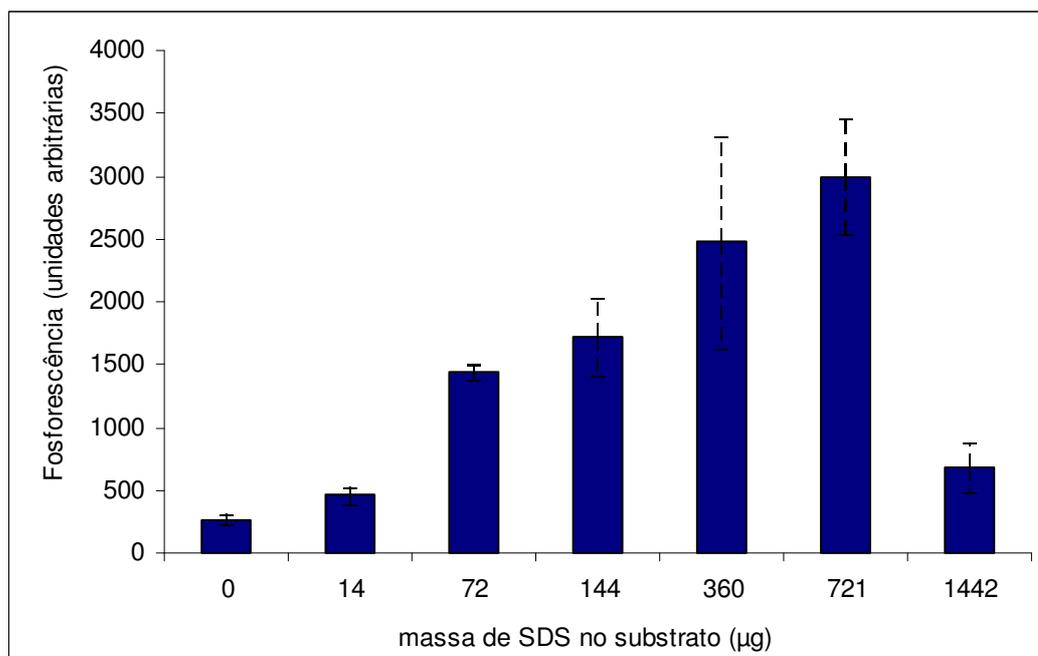


Figura 43: Estudo do sinal fosforescente do 7MI em função da variação da massa de SDS depositado no substrato de papel na presença de 133 μg de TI.

Os estudos univariados mostraram que o sinal fosforescente mais intenso foi obtido na presença de 133 μg do sal de TINO_3 (5 μL de solução 0,10 mol L^{-1}) e 721 μg de SDS (duas adições de 5 μL de solução de 0,25 mol L^{-1}). Em princípio, o pH não parece ser um fator relevante na emissão fosforescente.

5.2.4. Estudo multivariado

Assim como foi feito para o 2MI, o estudo multivariado do 7MI foi realizado para as duas condições estudadas, ou seja, na presença do sal indutor de KI e na presença do TINO_3 .

5.2.4.1. Fosforescência do 7MI na presença de KI

Com base nos resultados obtidos até então, optou-se por realizar um planejamento fatorial composto central com 2 fatores (2^2). As variáveis foram selecionadas com base nos resultados dos estudos univariados, sendo: (i) quantidade de KI depositado no substrato e (ii) pH da solução de analito. Os níveis (-1), (+1) e (0) para cada fator foram selecionados com base nas condições de contorno e pela indicação de tendências dos estudos univariados, já os níveis $+\sqrt{2}$ e $-\sqrt{2}$ foram obtidos de acordo com o indicado pelo *design* característico desse planejamento. No caso da massa de KI, os valores foram respectivamente 954; 1038; 1245; 1452 e 1535 μg . Já os valores de pH foram variados na mesma seqüência de níveis, sendo os valores numéricos respectivamente 6,2; 6,5; 7,2; 7,9 e 8,2. A ordem de realização dos experimentos foi gerada pelo programa estatístico de forma a ser aleatória. Os resultados dos experimentos são indicados na Tabela 6.

O diagrama de Pareto (Figura 44) indica que nenhum dos fatores foi relevante (contribuição linear ou quadrática) dentro da faixa de valores de estudo. Também não foram observadas interações significativas entre os fatores avaliados. A partir dos resultados do planejamento verificou-se que não há diferença significativa entre as massas depositadas de KI de 954 a 1535 μg e entre os valores de pH de 6,2 e 8,2. Pelo gráfico de superfície de resposta (Figura 45), percebe-se apenas uma leve curvatura, indicando também a não relevância da interação entre as variáveis, fato este também mostrado no diagrama de Pareto. Vale salientar que na análise dos resultados da superfície de resposta, levou-se em consideração o detalhe na figura da dispersão dos resultados em cada ponto do planejamento.

Tabela 6: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial composto central 2^2 usando KI como sal indutor de sinal fosforescente.

Experimento	Replicatas	KI, μg	pH	Sinal fosforescente
20 (C)	2	1245	7,2	538
19 (C)	2	1245	7,2	373
9 (C)	1	1245	7,2	335
12	2	1038	7,9	393
1	1	1038	6,5	362
30 (C)	3	1245	7,2	429
14	2	1452	7,9	272
17	2	1245	6,2	547
4	1	1452	7,9	228
7	1	1245	6,2	502
2	1	1038	7,9	305
16	2	1535	7,2	466
3	1	1452	6,5	318
23	3	1452	6,5	446
26	3	1535	7,2	444
24	3	1452	7,9	423
6	1	1535	7,2	401
21	3	1038	6,5	296
10 (C)	1	1245	7,2	229
5	1	954	7,2	513
27	3	1245	6,2	511
22	3	1038	7,9	523
25	3	954	7,2	515
11	2	1038	6,5	669
15	2	954	7,2	623
13	2	1452	6,5	615
8	1	1245	8,2	473
18	2	1245	8,2	550
28	3	1245	8,2	576
29 (C)	3	1245	7,2	610

(C) - ponto central do planejamento.

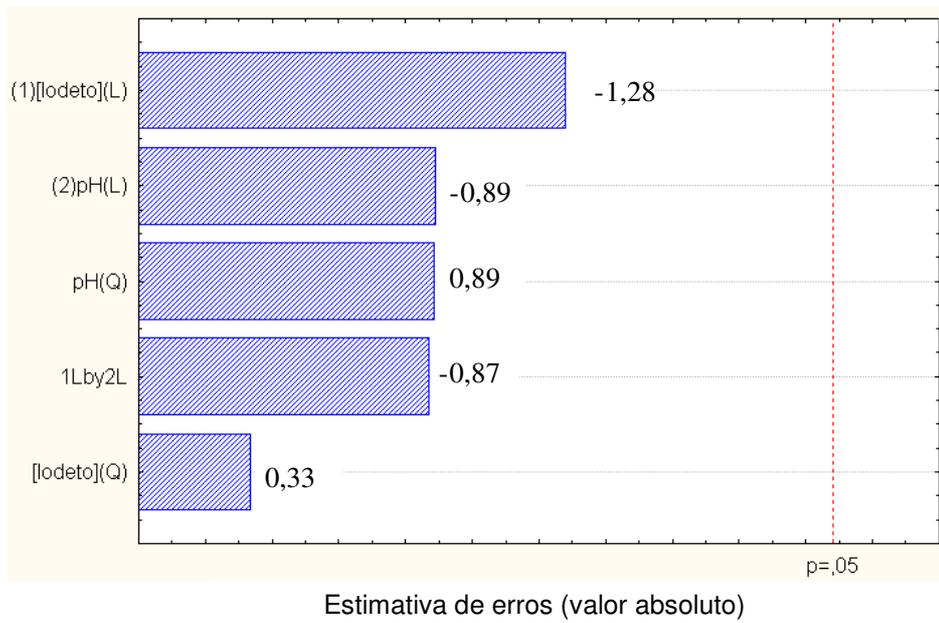


Figura 44: Diagrama de Pareto para o 7 MI onde L e Q são as contribuições lineares e quadráticas respectivamente e pH e [KI] são as variáveis pH e massa de KI no substrato.

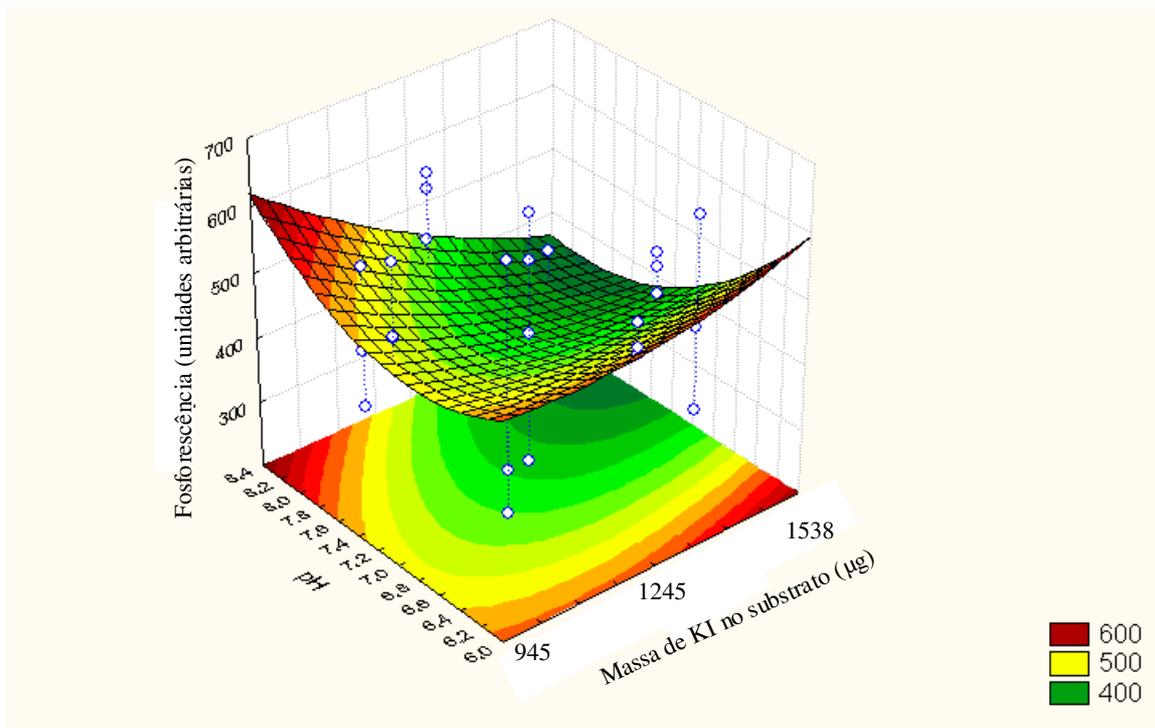


Figura 45: Superfície de resposta obtida no planejamento fatorial do 7MI na presença KI.

Os resultados apontaram robustez dentro da faixa estudada, sendo essa conclusão baseada na magnitude dos desvios-padrão (mostrada com mais detalhes na superfície de resposta) e no comportamento observado anteriormente para o composto 7MI. Sendo assim, foi escolhido para os próximos estudos o meio etanol/água (pH 7,5) e massa de KI igual a 1245 µg.

5.2.4.2.

Fosforescência do 7MI na presença de TINO₃ e SDS

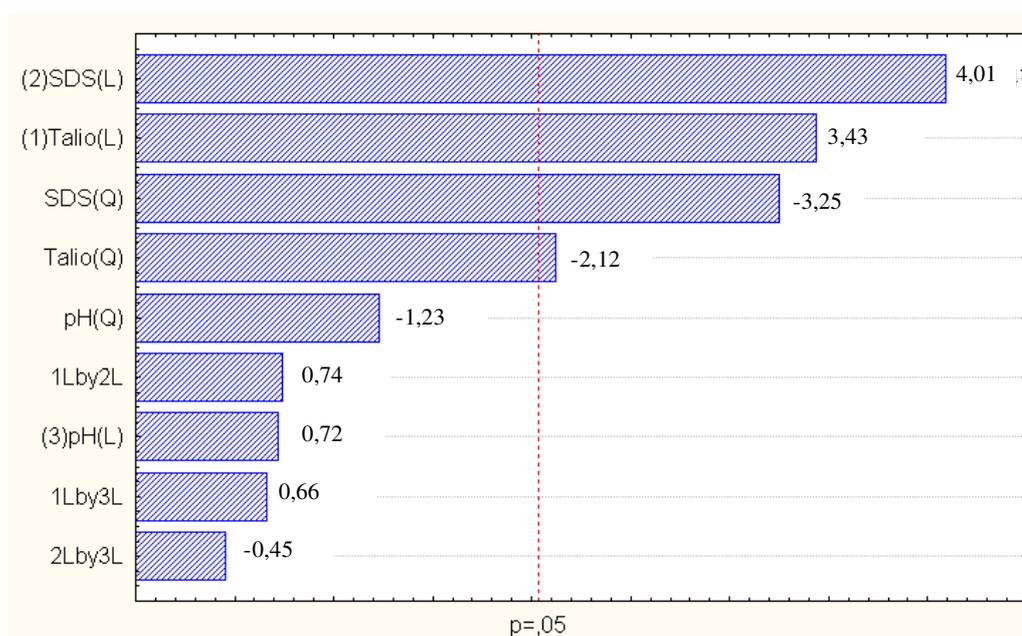
No caso do 7 MI na presença de TINO₃ e SDS, a partir dos resultados obtidos nos estudos univariados, optou-se por realizar um planejamento fatorial com composto central com 3 fatores (2^3) para se verificar a validade da exclusão do pH no planejamento do 7 MI na presença de TINO₃, realizado anteriormente. As variáveis selecionadas foram: (i) quantidade de TINO₃ depositado no substrato, (ii) quantidade de SDS depositado no substrato e (iii) pH da solução de analito. Os valores de massa de TINO₃ para os níveis -1; $-\sqrt{2}$; 0, +1 e $+\sqrt{2}$ foram respectivamente 66; 93; 133; 173 e 200 µg. Na caso do SDS as massas foram 476; 577; 721; 865 e 966 µg, respectivamente. Os valores de pH foram variados na mesma seqüência de níveis, sendo os valores numéricos respectivamente 6,7, 7,0; 7,5; 8,0 e 8,3. A ordem de realização dos 48 experimentos foi gerada pelo programa estatístico de forma a ser aleatória. Os resultados dos experimentos são indicados na Tabela 7.

A partir dos resultados do planejamento (diagrama de Pareto na Figura 46) foi possível verificar que definitivamente o efeito do pH não foi relevante na faixa quando as massas depositadas de TINO₃ estão entre 66 e 200 µg e se as massas de SDS estiverem entre 476 e 966 µg. Já para o SDS e para o TINO₃, verificou-se que suas contribuições lineares eram relevantes na emissão fosforescente do 7MI. A contribuição quadrática do SDS também foi estatisticamente relevante. Entretanto, o diagrama não apontou interações significativas entre os fatores avaliados. A partir dos resultados obtidos no planejamento, o programa estatístico apontou os valores de massas de TINO₃ e de SDS que podem nos levar ao máximo sinal fosforescente do 7MI. Neste caso, estas condições foram 173 µg para massa TINO₃ e 807 µg para massa de SDS. No entanto, ao se avaliar a superfície de resposta (Figura 47) e a curva de nível (Figura 48), que consideraram o sinal em função das massas de SDS e TINO₃, percebeu-se que existe uma ampla faixa para a escolha desses parâmetros.

Tabela 7: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial composto central 2^3 usando TINO_3 como sal indutor de sinal fosforescente.

Experimento	Replicatas	Talio, μg	SDS, μg	pH	Sinal fosforescente
26	2	200	721	7,5	550
13	1	133	721	6,7	370
3	1	93	865	7,0	460
20	2	93	865	8,0	325
41	3	66	721	7,5	245
45	3	133	721	6,7	452
24	2	173	865	8,0	356
39	3	173	865	7,0	505
35	3	93	865	7,0	300
27	2	133	476	7,5	245
44	3	133	966	7,5	362
33	3	93	577	7,0	144
21	2	173	577	7,0	365
10	1	200	721	7,5	436
4	1	93	865	8,0	458
6	1	173	577	8,0	247
32	2	133	721	7,5	523
43	3	133	476	7,5	213
37	3	173	577	7,0	393
34	3	93	577	8,0	315
36	3	93	865	8,0	504
16	1	133	721	7,5	697
9	1	66	721	7,5	424
5	1	173	577	7,0	432
12	1	133	966	7,5	416
23	2	173	865	7,0	864
30	2	133	721	8,3	633
8	1	173	865	8,0	942
46	3	133	721	8,3	595
2	1	93	577	8,0	203
29	2	133	721	6,7	467
14	1	133	721	8,3	462
42	3	200	721	7,5	511
11	1	133	476	7,5	334
18	2	93	577	8,0	293
1	1	93	577	7,0	368
48	3	133	721	7,5	679
22	2	173	577	8,0	607
28	2	133	966	7,5	582
25	2	66	721	7,5	455
47	3	133	721	7,5	616
19	2	93	865	7,0	665

Experimento	Replicatas	Talio, μg	SDS, μg	pH	Sinal fosforescente
31	2	133	721	7,5	606
38	3	173	577	8,0	554
40	3	173	865	8,0	713
17	2	93	577	7,0	400
7	1	173	865	7,0	678
15	1	133	721	7,5	566



Estimativa de erros (valor absoluto)

Figura 46: Diagrama de Pareto para o 7 MI onde L e Q são as contribuições lineares e quadráticas respectivamente e os termos pH, TINO₃ e SDS são respectivamente as variáveis pH e massa de TINO₃ e massa de SDS no substrato.

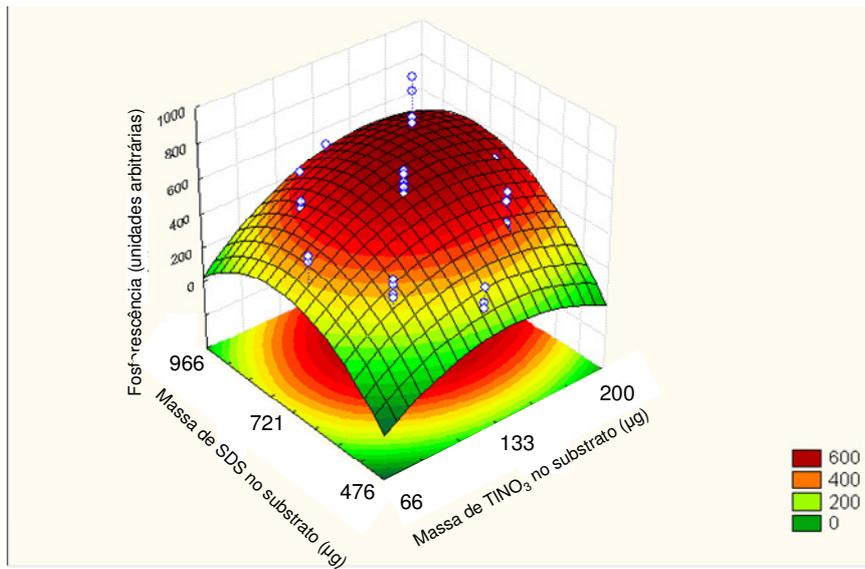


Figura 47: Superfície de resposta obtida no planejamento fatorial 2^3 do 7MI em função das variáveis TINO_3 e SDS.

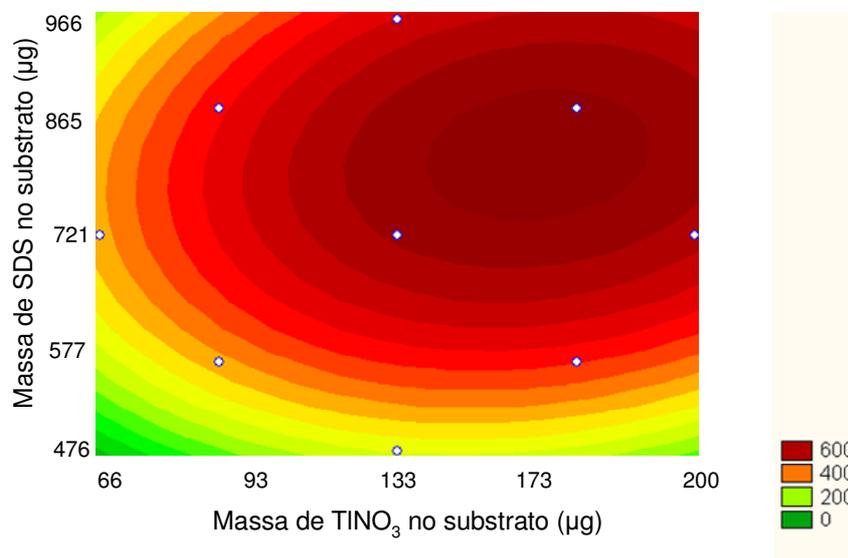


Figura 48: Curva de nível obtida no planejamento fatorial 2^3 do 7MI em função das variáveis TINO_3 e SDS.

Embora o teste multivariado indicasse que a melhor massa de TINO_3 era 173 μg , pode-se verificar pelo teste univariado (Figura 49) que as massas entre 67 e 335 μg apresentaram sinais fosforescentes da mesma magnitude, indicando a robustez do parâmetro. Devido às limitações de solubilidade do SDS, a massa escolhida foi de 721 μg (2 adições sucessivas de 5 μL de solução 0,25 mol L^{-1}).

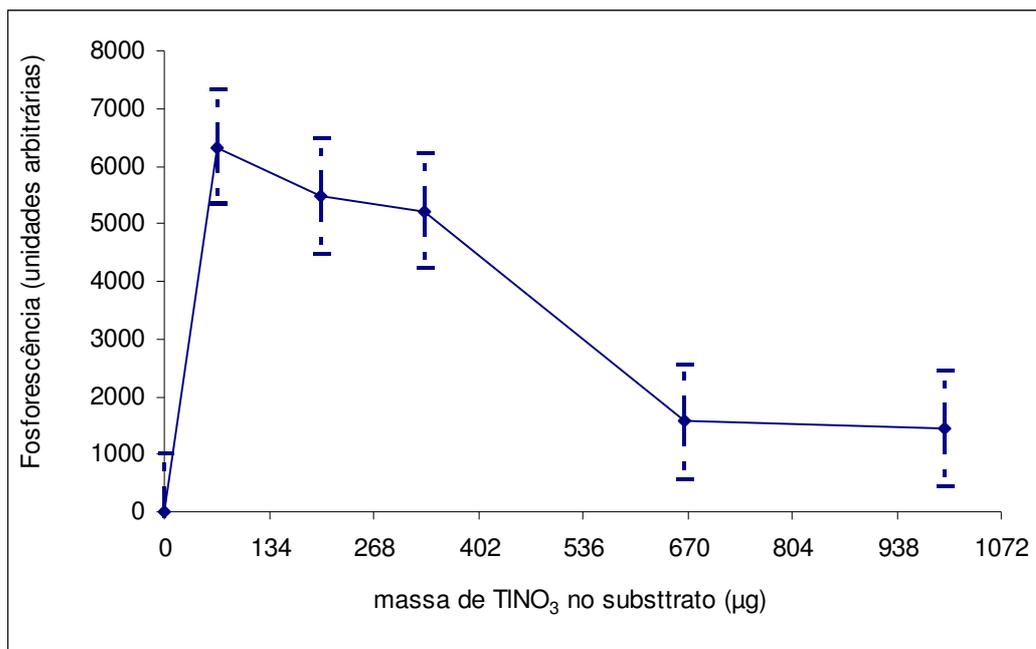


Figura 49: Estudo do sinal fosforescente do 7MI em função da variação da massa de TINO_3 depositado no substrato de papel na presença de SDS.

Após este estudo sistemático das características fosforescentes do 7MI concluiu-se que a presença dos sais de KI e TINO_3 são fundamentais para a amplificação de sinal fosforescente. O uso do SDS na presença do sal de TINO_3 foi um fator importante para amplificação do sinal fosforescente. As condições experimentais escolhidas para a determinação fosforimétrica do 7MI estão relacionadas na Tabela 8 e os espectros sincronizados característicos do 7MI e seus brancos em substrato de celulose são indicados na Figura 50 e Figura 51.

Tabela 8: Condições escolhidas para o melhor sinal fosforescente do 7MI.

Parâmetros	Sal de átomo pesado	
	KI de potássio	Nitrato de TINO ₃
Tempo de atraso do detector, ms	0,05	
Tempo de abertura do detector, ms	3,0	
Velocidade de varredura, nm min ⁻¹	1500	
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$, nm	286/442	274/441
$\Delta\lambda$, nm	156	167
Sistema de solventes	etanol/H ₂ O - 50/50%, v/v	etanol/H ₂ O - 50/50%, v/v
pH	Original da solução	
Massa de sal no substrato, μg	1245	133
Massa de SDS no substrato, μg	---	721

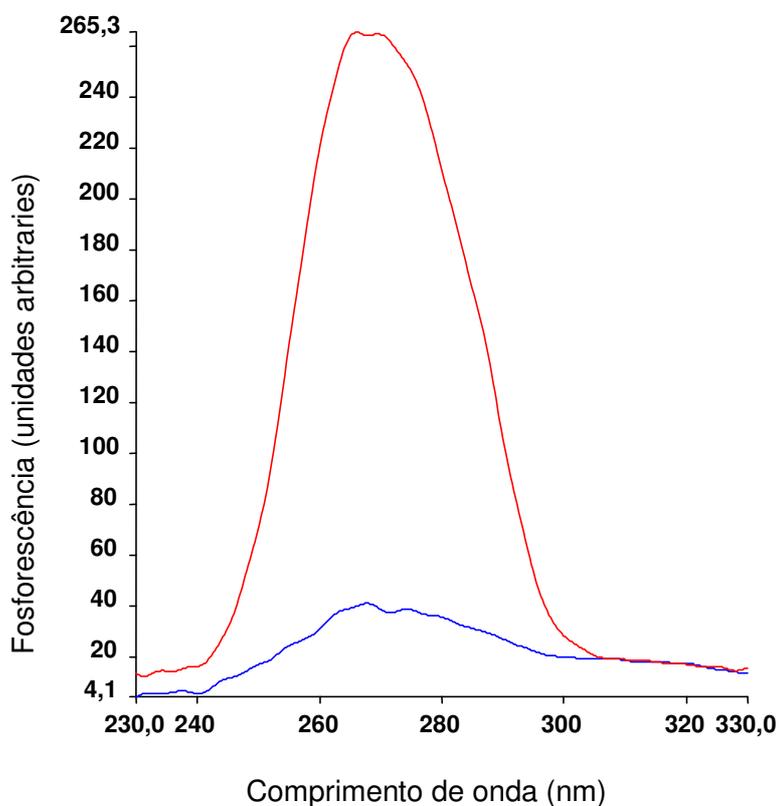


Figura 50: Espectros de fosforescência de varredura sincronizada de 269 ng de 7MI ($4,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de 1245 μg de KI

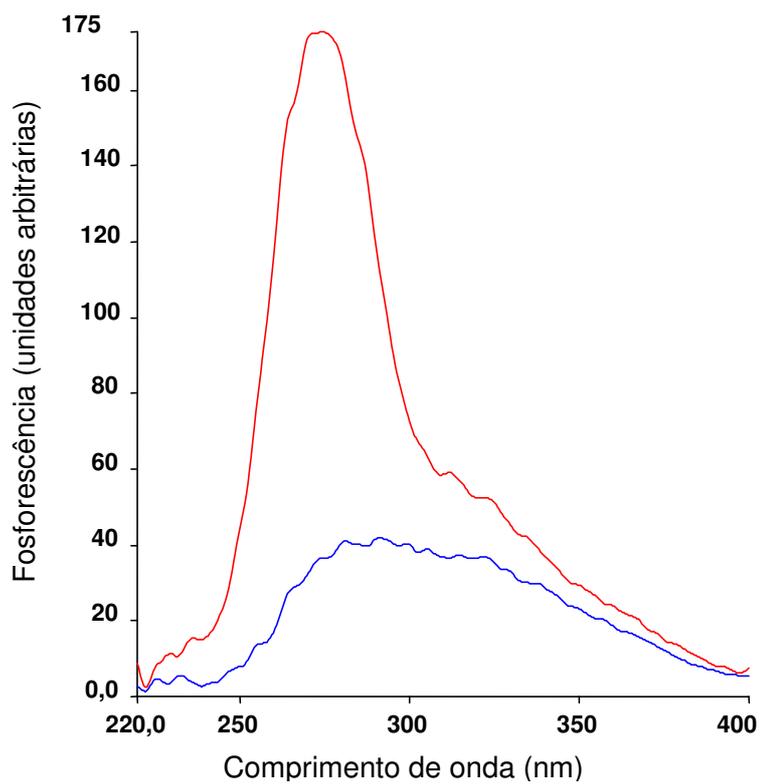


Figura 51: Espectros de fosforescência de varredura sincronizada de 203 ng de 7MI ($3,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de 133 μg de TINO_3 e 721 μg de SDS