

3

Fosforimetria na temperatura ambiente em solução (FTAS): Fundamentos, evolução e aplicações analíticas

3.1.

Fundamentos teóricos

A espectrometria 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 fundamental. Os espectros de emissão e de excitação fosforescentes fornecem informações úteis do ponto de vista analítico qualitativo e quantitativo, como por exemplo, intensidade, comprimento de onda e tempo de vida⁴⁶.

A fosforescência e a fluorescência são fenômenos conhecidos como fotoluminescentes. Em ambos, a excitação se dá pela absorção de fótons de energia característica da região do UV-visível, distinguindo-se um do outro pelo tipo de transição eletrônica radiativa responsável pela desativação do estado excitado³⁵.

Existe uma nomenclatura apropriada para definir os estados excitados de onde se originam esses fenômenos. Quando a direção do spin do elétron promovido para o estado excitado é preservada, tem-se o estado excitado singleto. No estado excitado tripleto o spin do elétron promovido é invertido³⁵, como representado na Figura 1.

Na fluorescência não existe mudança na direção do spin do elétron (estado excitado singleto). Como consequência disto, a mesma tem um tempo de vida mais curto, na ordem de 10^{-9} s. Pelo contrário, no caso da fosforescência, existe inversão da direção do spin do elétron (mudança de multiplicidade do estado excitado de singleto para tripleto) fazendo com que a emissão de radiação ocorra com um tempo de vida significativamente maior que o da fluorescência (da ordem de 10^{-6} , 10^{-3} s e até mesmo alguns segundos), com banda de emissão ocorrendo em região espectral de menor energia (comprimento de onda maior)⁴⁶.

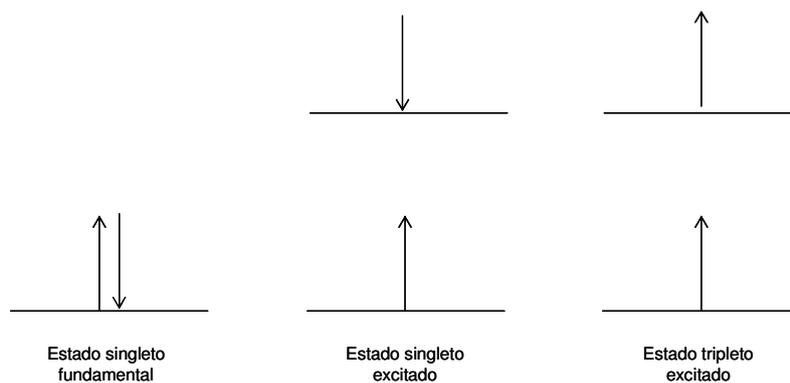


Figura 1. Diagrama simplificado dos estados, fundamental singlete e excitados singlete e tripleto em uma molécula.

O tempo de vida de um fenômeno luminescente (τ) pode ser definido como o tempo necessário para que a intensidade da fluorescência ou fosforescência decaia para $1/e$ do seu valor inicial. Existe uma relação exponencial entre τ e a intensidade do sinal fosforescente dada por⁴⁷:

$$I_L = I_0 \times e^{-t/\tau_L} \quad (1)$$

Onde:

I_L = Intensidade do sinal luminescente no tempo t

I_0 = Intensidade luminescente inicial

τ_L = Tempo de vida da luminescência

Os mecanismos responsáveis pela fluorescência e pela fosforescência, assim como os outros fenômenos que competem pela desativação do estado excitado podem ser visualizados por meio do Diagrama de Jablonski modificado (Figura 2). Neste diagrama se encontram ilustrados alguns dos estados eletrônicos de uma molécula com seus respectivos níveis vibracionais.

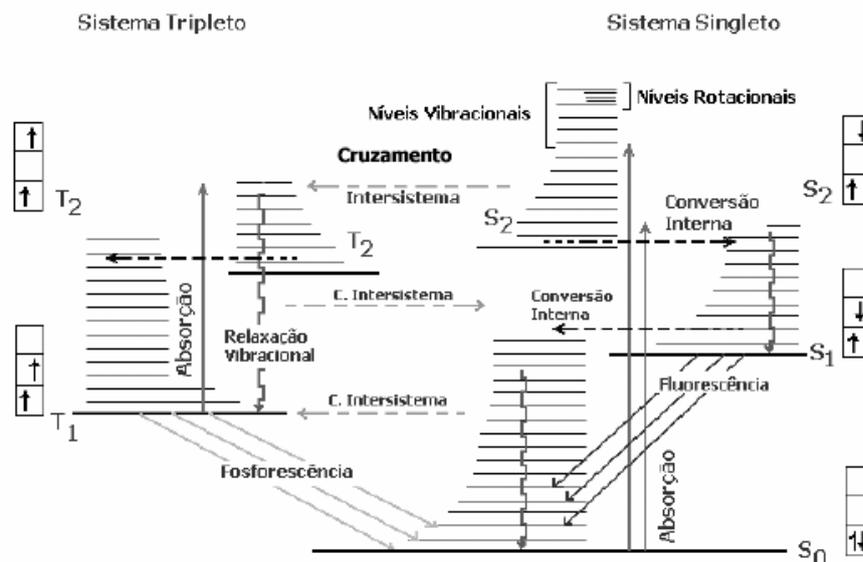


Figura 2. Diagrama de Jablonski modificado⁴⁸.

A partir da absorção de um fóton de energia apropriada, uma molécula pode passar do estado fundamental (S_0) para qualquer dos estados vibracionais do estado excitado singlete (S_1). A mesma pode voltar para o S_0 por uma combinação de etapas envolvendo processos radiativos (fluorescência e fosforescência) e/ou não-radiativos (relaxação vibracional e cruzamento interno).

Segundo a regra de Kasha⁴⁹, por meio de uma série de relaxamentos vibracionais, essa molécula excitada é levada através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade, até atingir o primeiro nível vibracional do estado excitado singlete de menor energia (S_1). Esse processo não-radiativo definido como cruzamento interno (CI), ocorre com muita rapidez (10^{-13} a 10^{-11} s).

A partir de S_1 , a molécula excitada tem três possibilidades distintas para retornar a S_0 . Primeiro, se a diferença de energia entre S_1 e S_0 não for muito grande e existir a probabilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode ser levada a S_0 por relaxamento vibracional. Segundo, se a diferença energética entre S_1 e S_0 for relativamente grande e as condições do meio forem favoráveis, a desativação para S_0 ocorre na forma de fluorescência (F). Terceira, se existe possibilidade de acoplamento spin-orbital, a transição eletrônica entre estados excitados de diferente multiplicidade ($S_1 \rightarrow T_1$) pode acontecer (cruzamento intersistemas – CIS). Nesse caso, a molécula pode se desativar, a partir de T_1 , por meio de relaxamento vibracional ou por meio de

fosforescência (P), com emissão de fótons. A conversão interna e a fluorescência competem muito mais eficientemente pela desativação do estado excitado que a fosforescência. A fosforescência é observada somente em condições especiais⁵⁰. Na Tabela 1, se reúnem os tempos característicos destes fenômenos eletrônicos.

Tabela 1. Tempos característicos dos fenômenos eletrônicos possíveis em moléculas excitadas.

Processo	Tempo, s
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Fluorescência (tempo de vida do estado excitado S_1)	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento entre sistemas	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão Interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Fosforescência (tempo de vida do estado excitado T_1)	$10^{-6} - 1$

Segundo esta escala temporal, pode-se observar que a fosforescência tem um tempo de vida maior, e por tanto, as moléculas excitadas no estado tripleto são mais susceptíveis a serem desativadas através de processos não-radiativos (processos mais rápidos). Isto em parte explica porque a fosforescência de moléculas orgânicas, aromáticas em geral, só pode ser observada em meios rígidos onde a liberdade vibracional da molécula é restringida e a possibilidade de desativação colisional com espécies desativadoras é minimizada⁴⁸.

A contribuição da fosforescência no processo geral de desativação de uma população de moléculas no estado excitado pode ser avaliada através de um parâmetro denominado eficiência quântica fosforescente (ϕ_p)⁴⁷. Este parâmetro é definido como a razão entre o número total de fótons emitidos pela molécula na forma de fosforescência e o número total de fótons absorvidos. O mesmo assume valores que variam entre zero e um, onde valores próximos da unidade indicam alta probabilidade da fosforescência acontecer. Mas ϕ_p também pode ser definida em função das velocidades dos processos radiativos e não-radiativos de desativação de uma molécula excitada a partir da seguinte equação³⁵:

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

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

A equação anterior permite fazer uma interpretação qualitativa dos fatores estruturais e ambientais que influenciam a intensidade da fosforescência. Pode-se perceber que o aumento de ϕ_p é induzido pela redução de k_{pq} e/ou pelo aumento de ϕ_{cis} . Experimentalmente, a redução do valor de k_{pq} pode ser alcançada pelo aumento da rigidez estrutural da própria molécula ou, mais em geral, obtida com a interação entre a molécula e a matriz em que esta se encontra. Assim, o uso de meio criogênico, de um substrato sólido ou de meios organizados geralmente diminui a probabilidade de desativação não-radiativa de T_1 . A ausência de O_2 no meio também reduz consideravelmente a perda de energia por desativação (quenching dinâmico)⁴⁷.

Por outro lado, o aumento de ϕ_{cis} pode ser provocado pela presença de átomos de elevado número atômico, por exemplo, na forma de iodeto ou tálho (I), nas vizinhanças da molécula de interesse. Aparentemente, as interações spin-orbital podem ser amplificadas na presença destes átomos (interação do potencial de Coulomb proporcional à quarta potência do número atômico do átomo usado como perturbador) favorecendo a troca de spin. Esse efeito, denominado de efeito externo do átomo pesado por causa da dependência proporcional a Z^4 , provoca a diminuição do tempo de vida da fosforescência (τ_p) tornando o processo mais competitivo em relação aos demais⁴⁷.

Assim, fica claro que a fosforescência é um fenômeno muito dependente das condições experimentais, e por isso, pode ser seletivamente induzido, amplificado ou suprimido.

3.2. Fatores que afetam a FTAS

Como já indicado na seção anterior, a fosforescência depende criticamente da estrutura molecular e do meio em que a molécula se encontra. No caso do ambiente local, variáveis como temperatura, natureza do solvente, pH da solução, presença de espécies desativadoras, presença de átomos pesados e condições de rigidez do meio ou do analito afetam não só as velocidades dos processos luminescentes envolvidos, mas também a energia relativa entre o estado excitado e o estado fundamental. A seguir estes fatores serão brevemente discutidos.

3.2.1. Estrutura molecular do luminóforo

Teoricamente é difícil prever se uma molécula exibirá fotoluminescência, mas é possível observar certas características gerais na sua estrutura que favoreçam o processo de desativação radiativo eficiente. Essas características são a rigidez física, a abundância de elétrons π deslocalizados e a presença de heteroátomos em sua cadeia principal.

Esse é o caso das moléculas aromáticas. A rigidez na estrutura molecular restringe a liberdade vibracional, minimizando significativamente a CI, com conseqüente decorrente aumento da ϕ_L . No caso da abundância de elétrons π , o livre movimento dos mesmos através dos orbitais moleculares deslocalizados facilita as transições eletrônicas responsáveis pela luminescência. A fosforescência, por sua vez, acontece principalmente a partir de transições $\pi^* \rightarrow n$, e por isso é favorecida pela presença de heteroátomos na estrutura da molécula. Pelo contrário, no caso de substâncias com estruturas alifáticas, raramente a fosforescência é observada. Nesse caso, a alta energia necessária para promover uma transição do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ocasiona a decomposição da molécula⁵¹.

Com relação à presença de heteroátomos na cadeia principal, o efeito é complexo e as generalizações devem ser feitas com cuidado. A presença de átomos pesados como substituintes de moléculas aromáticas (Br^- e I^- , por exemplo) resulta, de uma maneira geral, em um aumento da probabilidade do cruzamento intersistemas. No caso de moléculas aromáticas carbonílicas esse efeito é variado, em particular, muitos aldeídos e cetonas aromáticos possuem

baixas energias associadas às transições $n \rightarrow \pi^*$ (transições preferenciais) e por isso exibem um alto rendimento quântico fosforescente. Nas substâncias aromáticas possuidoras de substituintes nitro ($-\text{NO}_2$) ou hidroxil ($-\text{OH}$) nem a fosforescência nem a fluorescência são detectáveis devido provavelmente a grande velocidade dos processos de conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$. Quando o nitrogênio encontra-se ligado ao anel, como ocorre com o carbazol, indol e pirrol, as transições envolvendo os elétrons não-ligantes têm propriedades semelhantes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Isto devido ao fato que os orbitais não ligantes do nitrogênio são perpendiculares ao plano do anel o que lhes permite interagir com os orbitais π dos carbonos adjacentes (Figura 4). Este fenômeno poderia explicar as eficiências quânticas relativamente altas do carbazol e indol. As propriedades de moléculas heterocíclicas contendo oxigênio e enxofre podem ser interpretadas da mesma forma⁴⁸.

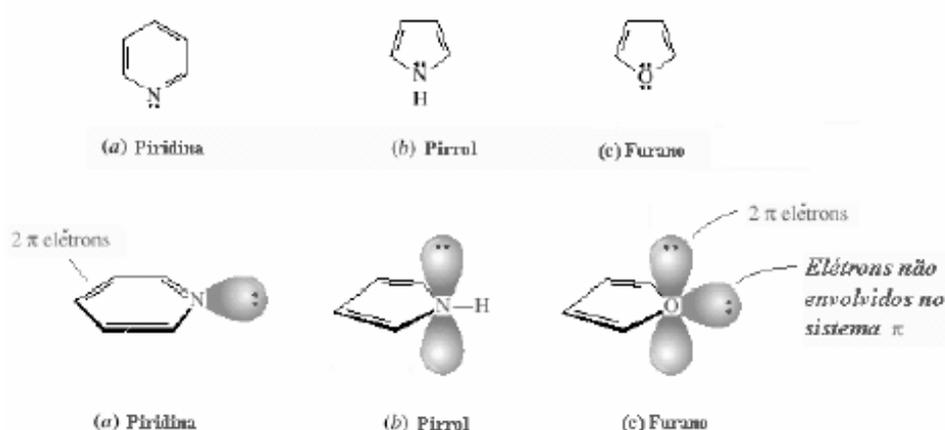


Figura 4. Exemplos de heterocíclicos e seus respectivos orbitais moleculares não ligantes⁴⁸.

Li *et al.*⁵² verificaram, que a estrutura básica destas substâncias, seu núcleo rígido naftalênico e a configuração molecular planar, conduziram a altas eficiências quânticas luminescentes. Além disso, observaram que se o sistema conjugado cresce com a presença de grupos substituintes, facilitando a excitação dos elétrons e favorecendo a observação tanto da fluorescência quanto a fosforescência.

Salinas-Castillo *et al.*¹⁴ observaram que as características espectrais de diferentes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) são consideravelmente influenciadas pela sua estrutura, sendo que a tendência geral

era que HPA's de maior tamanho e número de anéis aromáticos conjugados emitiam fosforescência em comprimentos de onda mais longos e possuíam maiores tempos de vida do estado tripleto. Isso indicou uma relação direta entre um acoplamento eficiente entre orbitais em sistemas contendo um grande número de anéis conjugados.

3.2.2. Temperatura

Geralmente, um aumento da temperatura traz como consequência, o aumento da eficiência dos processos de relaxamento vibracional na desativação do estado excitado com efeitos negativos na fluorescência, e principalmente na fosforescência. Na fluorescência, por ser este um fenômeno de tempo de vida relativamente curto, a alteração da temperatura não é fator crítico. Isso implica na fácil observação de fluorescência na temperatura ambiente. No caso da fosforescência na temperatura ambiente, condições especiais são necessárias. Como a fosforescência é um processo relativamente lento, as numerosas colisões com as moléculas de solvente favorecem o cruzamento intersistemas e a relaxação vibracional até S_0 ^{53,54}. Jin *et al.*⁵⁵ concluíram que com o incremento da temperatura, a movimentação térmica molecular é aumentada, incrementando a probabilidade de transições não-radiativas, com consequente diminuição da eficiência quântica fosforescente. O mesmo efeito foi observado por Segura-Carretero *et al.*⁵⁶ durante a determinação do 1-naftalenoacetamida onde um incremento da temperatura (de 20 °C para 35 °C) provocou uma diminuição da eficiência de um 30 %. Muñoz de la Peña, *et al.*⁵⁷ verificaram que um incremento na temperatura aumenta a taxa de desoxigenação e a frequência de colisão quando o sulfito de sódio é usado como sequestrador de oxigênio trazendo como consequência, um aumento do relaxamento colisional e uma diminuição da eficiência quântica fosforescente.

3.2.3. Sistema de solventes

A viscosidade, polaridade e o caráter prótico, que são características que determinam à natureza do sistema de solventes, podem afetar significativamente a

fotoluminescência. A viscosidade pode diminuir a difusão de espécies desativadoras (oxigênio e algumas impurezas) minimizando a taxa de colisões que promovem a desativação do estado excitado tripleto.

A polaridade e caráter prótico do solvente são características importantes porque afetam a energia relativa do estado excitado⁵⁴. As moléculas de solvente se reorientam rapidamente em torno da molécula fotoluminescente, logo após estas últimas serem promovidas para o estado excitado e antes do retorno para o estado fundamental. As interações entre elas têm um caráter fortemente eletrostático, podendo estabilizar o sistema, diminuindo a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. E justamente essa diferença de energia é que define quais os processos dominantes na desativação do estado excitado. Os processos de desativação radiativos serão favorecidos no caso da estabilização das moléculas do soluto com o estado excitado mais polar na presença de solventes mais polares. No caso de substâncias aromáticas, de acordo com Jablonski⁵⁰, estas são mais polares quando estão no estado excitado, devido às mudanças na distribuição de elétrons π da molécula durante a transição eletrônica, sendo por isso observada maior estabilização do estado excitado em solventes mais polares. Como exemplo pode se destacar o estudo feito por Salinas-Castillo e colaboradores⁵⁸. Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes solventes orgânicos (acetona, acetonitrila, etanol e metanol) na melhoria do sinal fosforescente. Foi observado que a presença de metanol não gerou modificações significativas quando é agregado na solução. Por sua parte, o etanol e a acetona produziram uma atenuação significativa do sinal. Já a acetonitrila, um solvente mais polar, induziu o incremento do sinal fosforescente.

3.2.4. pH

O efeito do pH nos sistemas de solventes próticos é importante na fotoluminescência das moléculas aromáticas contendo grupos funcionais básicos ou ácidos. Um dos aspectos mais relevantes das reações ácido - base de moléculas potencialmente fotoluminescentes é a produção de derivados com maior ϕ_p devido à protonação ou hidrólise ácida ou básica⁵³. A mudança da polaridade do meio é também relevante em muitos casos.

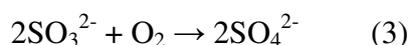
3.2.5. Substâncias desativadoras

Certas substâncias podem causar a desativação não-radiativa de uma molécula no estado excitado por meio da transferência de energia entre estas substâncias desativadoras e o estado excitado do luminóforo (substância luminescente). Este fenômeno é definido como *quenching* dinâmico, e se caracteriza por ser um processo colisional no qual a magnitude da desativação é proporcional à concentração do agente desativador e à sua capacidade de difusão no meio⁵⁹. Por excelência, o atenuador da fosforescência de moléculas orgânicas é o oxigênio devido principalmente ao fato que o estado eletrônico fundamental do oxigênio molecular é um estado tripleto, e por tanto a transferência de energia é permitida por multiplicidade de spín⁴⁸.

Diferentes maneiras têm sido usadas para desoxigenar soluções aquosas (organizadas ou não) que contém os fósforos (moléculas fosforescentes). A purga com gás inerte (em geral N₂) tem sido usada mais efetivamente no caso da fosforimetria baseada em substratos sólidos de celulose ou sílica. Em solução, este procedimento tem sido demorado, pouco prático, e particularmente problemático especificamente em meio micelar por causa da quantidade de espuma gerada durante o processo. Adicionalmente, estudos realizados por Díaz e Sanz-Medel³⁸ constataram que o aumento da concentração do SDS dificulta a remoção do oxigênio dissolvido em solução, e assim diminuindo o sinal fosforescente do naftaleno.

Rollie et al.⁶⁰ propuseram um método de desoxigenação baseado no princípio de difusão do oxigênio através de uma membrana permeável em combinação com um seqüestrador químico de oxigênio. Este método melhorou consideravelmente o desempenho do processo, mais ainda era trabalhoso. Posteriormente, Sanz-Medel *et al.*⁶¹ propuseram o uso do sulfito de sódio como seqüestrador de oxigênio para qualquer meio aquoso (organizado ou não) para viabilizar a observação da fosforescência. Eles se basearam na habilidade mostrada pelo sulfito de sódio para remover o oxigênio dissolvido de soluções de eletrólitos usadas em determinações polarográficas rotineiras. Essencialmente, essa é a maneira mais efetiva de se eliminar o oxigênio do meio aquoso. O sulfito

de sódio atua seqüestrando o oxigênio por meio da reação abaixo (3). No entanto, a concentração do Na_2SO_3 deve ser cuidadosamente otimizada.



Muñoz de la Peña *et al.*⁵⁷ reportaram que o sulfito de sódio, muito comumente usado como seqüestrador de oxigênio, elimina eficientemente o oxigênio do sistema aquoso, mas em altas concentrações pode virar um desativador não-radiativo. A diminuição do sinal fosforescente foi interpretada como o deslocamento do TI^+ pelo Na^+ na superfície da micela de SDS. Este efeito foi também observado por Segura-Carretero *et al.*⁶², os quais concordaram em que efetivamente incrementos na concentração de sulfito favorecem a reação do TI^+ com o Na_2SO_3 , diminuindo a concentração de TI^+ e conseqüentemente seu efeito como átomo pesado.

3.2.6. Efeito externo do átomo pesado

Como brevemente abordado, certos elementos de elevado número atômico favorecem a transição da população para T_1 a partir de S_1 , podendo provocar o aumento da fosforescência. Esse efeito no aumento da fosforescência pode acontecer quando esses átomos de elevado número atômico estão presentes na forma de ligantes (grupos I^- ou Br^-) na estrutura da molécula (efeito interno do átomo pesado) ou a partir da adição de sais inorgânicos desse átomos na matriz onde se encontra o analito (efeito externo do átomo pesado). O aumento do sinal fosforescente é acompanhado pela concomitante diminuição do sinal fluorescente e pela redução do tempo de vida da emissão fosforescente^{48,63}.

Nos dois casos, efeito interno e externo do átomo pesado, o aumento do sinal fosforescente é o resultado do favorecimento das constantes de velocidade dos processos envolvendo a mudança de spin eletrônico. Os mecanismos pelos quais os átomos pesados são capazes de mudar a multiplicidade do analito não estão devidamente esclarecidos. Alguns autores têm proposto a formação de complexos de transferência de carga entre o átomo pesado e o analito. Outros propõem a reação destas espécies para formar um complexo no estado excitado

(exciplex). Finalmente, existem os que postulam interações puramente eletrostáticas para explicar a perturbação provocada por átomos pesados. Essa perturbação pode também provocar a aproximação do estado excitado tripleto em relação ao estado fundamental, e por conseqüência, provocar a sobreposição entre níveis vibracionais desses estados, facilitando a desativação não-radiativa^{47,51,53}.

Na prática, o efeito externo do átomo pesado é o mais utilizado para induzir fosforescência, sendo que a incerteza dos mecanismos que explicam esse fenômeno dificulta a previsão do resultado deste efeito sobre o sinal fosforescente de um determinado analito. Em outras palavras, o sinal fosforescente de certa molécula pode ser induzido ou amplificado pelo efeito externo de um determinado átomo pesado, mas pode ser eliminado na presença de outro tipo de átomo pesado.

Li *et al.*⁶⁴ testaram experimentalmente o potencial de vários átomos pesados com o intuito de escolher o melhor para induzir a FTA do sulfonilcloreto de 5-dimetilaminonaftaleno (DNS-Cl). Neste sistema em solução, a seleção do átomo pesado foi limitada a apenas duas opções: Tl^+ e I^- . Átomos pesados aplicados comumente em substratos sólidos, tais como Pb^{2+} , Ag^+ e Hg^{2+} , precipitam na forma de hidróxidos, pela presença do SO_3^{2-} . Sais como KI, KBr, KNO_3 e $TiHCOO$ não induziram fosforescência do DNS-Cl nas condições investigadas. Só $TiNO_3$ conseguiu-se utilizar como átomo pesado. Esse trabalho dá uma idéia do procedimento empírico de busca do átomo pesado ideal para indução de fosforescência.

3.3. Evolução das técnicas fosforimétricas

Desde a primeira aplicação da fosforimetria como ferramenta analítica, diversos trabalhos foram realizados visando o estabelecimento das técnicas baseadas nesse fenômeno⁵. Por muitos anos, a metodologia se centrou na imobilização da substância fotoluminescente em uma matriz vítrea rígida a baixas temperaturas (em geral 77 K), de forma que a desativação não-radiativa do T_1 fosse minimizada. Apesar das muitas vantagens que esta metodologia oferecia (baixos limites de detecção, ampla faixa linear dinâmica nas curvas analíticas e grande seletividade), existia relutância dos químicos analíticos de usar esta técnica devido ao tedioso procedimento de esfriar as amostras com N_2 líquido (o que vem

sendo minimizado pelo uso dos modernos e práticos criostatos), assim como as limitações respeito da escolha do solvente e problemas de repetitividade dos resultados. Por isso, existiu uma constante procura de técnicas mais simples e precisas baseadas na fosforescência medida na temperatura ambiente.

A FTASS, técnica fosforimétrica suportada em substrato sólido (celulose, sílica gel, PVA e mais recentemente Nylon), ganhou bastante destaque devido a sua capacidade para determinações no nível de ultra-traço (uso de micro volumes de amostra contendo analitos no nível de traço), potencial para determinações seletivas, sensibilidade e operação na temperatura ambiente. No entanto, a baixa relação entre o número de amostras analisadas em função do tempo, a dificuldade em termos de automatização e a repetitividade relativamente pior que a observado em técnicas que utilizam solução, criaram resistências com relação a seu uso.

Até 1980, a fosforescência medida em solução na temperatura ambiente foi observada unicamente em algumas substâncias dissolvidas em solventes orgânicos sob condições especiais e sem fins analíticos. Parker⁶⁵ mostrou pela primeira vez que a fosforescência na temperatura ambiente e em solução da benzofenona podia ser observada na presença de solventes orgânicos fluorados. Por sua parte, Clark e colaboradores⁶⁶ demonstraram a possibilidade de obter emissão fosforescente da benzofenona e acetofenona em benzeno e em iso-octano a 23 °C. Bonner *et al.*⁶⁷ confirmaram a FTA de bifenilos usando etanol ou alcanos como solventes. Estes resultados foram interpretados como consequência da rigidez característica das substâncias analisadas e da existência de um aumento natural na transição proibida $S_n \rightarrow T_n$, considerando-o um fenômeno característico destas substâncias. Estes estudos pioneiros foram conduzidos principalmente por físicos e utilizados com objetivos meramente teóricos e sem nenhuma apreciação de seu valioso potencial em química analítica.

No início da década de 1980, Donkerbroek *et al.*⁶⁸ pesquisaram a FTA de várias substâncias em solução e concluíram que as intensidades eram geralmente muito baixas e, por isso, de pouco interesse analítico. Os grupos de pesquisa de Kalanasundaram⁴ e de Turro⁶ foram os primeiros a reportar que a FTAS poderia ser observada pela adição de detergentes que formam micelas em meio aquoso, previamente desoxigenado pela passagem de gás N_2 , e na presença de íons de átomo pesado. De acordo com seus estudos, os detergentes (principalmente o SDS) formam micelas que mudam o ambiente microscópico aumentando a

estabilização do estado excitado tripleto devido à minimização dos movimentos vibracionais das moléculas do analito que se encontram inseridas dentro das micelas. Assim, a intensidade fosforescente sofre um aumento considerável.

Com base nesse trabalho, Skrillec *et al.*⁴⁰ investigaram a possibilidade de aplicar FTA induzida por micelas como método analítico (FTA-EM). Eles demonstraram que esta técnica era promissora como ferramenta analítica para a determinação de uma grande variedade de substâncias de interesse farmacológico e ambiental. Foram obtidos excelentes parâmetros de mérito, principalmente com o uso de Tl^+ como átomo pesado indutor de fosforescência, com a vantagem do uso de meio aquoso, o que permitiu a automação das metodologias.

Apesar da FTA-EM representar um dos maiores avanços técnicos da fosforimetria, certas desvantagens ainda não podem ser contornadas. Em primeiro lugar, embora o meio micelar seja capaz de fazer dissolver substâncias de caráter apolar em água, o emprego do meio organizado pela adição de detergentes, este provoca a formação de espumas durante a homogeneização das amostras. Além disso, retardos na eliminação do oxigênio dissolvido dentro das micelas de detergentes são observados.

Seguindo ao sucesso da FTA-ME desenvolveu-se a técnica baseada em meio contendo ciclodextrinas (FTA-CD). Nessa técnica, ciclodextrinas são usadas como moléculas hospedeiras. As mesmas contendo uma cavidade na sua estrutura na qual as moléculas de analito penetram, promovem a formação de complexos de inclusão que impõem restrições em sua mobilidade e causam alterações da polaridade local, favorecendo um incremento da intensidade fosforescente. O fenômeno de inclusão tem sua dinâmica similar à observada em meio micelar, com um equilíbrio se estabelecendo entre moléculas de analito inseridos na estrutura organizada (micela ou ciclodextrina) e os livres em solução⁶⁹. Por outro lado, os métodos fosforimétricos baseados em CD's requerem certo tempo de desoxigenação das amostras, oferece limites de detecção relativamente maiores e é dependente de uma cinética favorável de formação do complexo de inclusão⁷⁰.

Esforços também foram realizados com o intuito de possibilitar a obtenção de fosforescência suprimindo o uso de qualquer meio organizado. Dorkenbroek *et al.*⁷¹ desenvolveram uma técnica chamada fosforimetria sensitizada em solução. A mesma consiste na excitação do analito, que transfere a energia do estado excitado para uma espécie aceitadora de alta ϕ_p , de onde a fosforescência é medida. Outro

requisito que deve ser cumprido é o de que esta espécie aceitadora possua seu estado excitado tripleto com menor energia do que a do estado excitado tripleto do analito. Embora estas condições tenham sido alcançadas com sucesso para alguns casos, é difícil achar moléculas que satisfaçam estes requisitos. Esta dificuldade inviabilizou a difusão desta técnica como ferramenta analítica.

Em 1995, Li e Huang⁷² observaram que a FTA do sulfonilclorato de 5-dimetilaminonaftaleno (DNS-Cl) poderia ser induzida em sistemas aquosos só pela adição de nitrato de tálio e sulfito de sódio. Com o intuito de descobrir se este fenômeno ocorreria para outros compostos sem o uso de meio organizado, vinte e seis derivados do naftaleno foram estudados diretamente em solução. Os resultados indicaram que a FTA também foi induzida para muitos desses derivados do naftaleno com intensidades suficientemente altas tornando-os úteis do ponto de vista analítico.

Em 1998, um grupo de pesquisa da Universidade de Granada, confirmou que é possível obter sinal fosforescente intenso de analitos dissolvidos em soluções aquosas contendo apenas os íons de átomo pesado (I^- e Tl^+) e sequestrador de oxigênio (Na_2SO_3)⁷³. Estes trabalhos mostraram o caráter inovador dessa técnica fosforescente e sua potencialidade na aplicação não somente a um grupo de substâncias em particular. Diferentes tipos de substâncias com estruturas moleculares caracteristicamente diferentes foram testadas (três derivados do naftaleno, a naphazolina, o ácido naftoacético e o acenafteno). Os resultados experimentais mostraram sinais fosforescentes relativamente intensos e, por isso, potencialmente úteis analiticamente.

Esta nova técnica em solução aquosa foi denominada de fosforimetria na temperatura ambiente induzida por átomo pesado (FTA-IAP). A mesma está fundamentada no uso de altas concentrações de átomo pesado, meio desoxigenado, e na evolução da instrumentação, mais especificamente com a invenção da lâmpada pulsada e o desenvolvimento da eletrônica moderna que permitiu uma melhor separação do sinal fosforescente dos ruídos (fluorescência e espalhamentos).

Embora a FTA-IAP imponha severas restrições na determinação de substâncias apolares quando comparada com a FTA-CD e a FTA-EM, esta possibilita outras vantagens além da simplificação do procedimento experimental. Devido à ausência de qualquer tipo de meio protetor, a desoxigenação é quase

instantânea. Pequenas variações de temperatura não provocam precipitações e coagulações como as observadas em meio com detergente, e as soluções são claras e estáveis. A FTA-IAP pode ser aplicada diretamente a amostras biológicas que contêm altas concentrações de Na^+ , em contraste com FTA-EM onde os íons Tl^+ seriam deslocados das micelas pelos íons Na^+ presentes na amostra.

3.4. Aplicação da FTAS-IAP usando microemulsões

O uso das microemulsões na indução da fosforescência na temperatura ambiente (FTA-ME) surgiu por evolução natural das técnicas fosforimétricas aplicadas em meios organizados na temperatura ambiente. As mesmas surgiram para contornar principalmente problemas associados ao tempo de preparação das amostras e solubilização de analitos de baixa polaridade. Embora seu uso permita estabelecer métodos analíticos mais rápidos e sensíveis, sua aplicação não tem sido muito difundida. Poucos estudos usando esta abordagem têm sido reportados desde sua introdução por Ramos e colaboradores².

A maioria das aplicações das microemulsões, neste sentido, combina o uso de SDS como agente micelar, com o Tl^+ como átomo pesado e Na_2SO_3 como sequestrador de oxigênio. Segura-Carretero *et al.*³ estudaram a presença de benzopireno (BaP) em partículas de pó atmosférico e em folhas de cedros da cidade de Granada-Espanha. Eles investigaram os efeitos da composição da microemulsão sobre as propriedades fosforescentes do BaP, e estabeleceram o sistema apropriado em função do tempo de aparição do sinal fosforescente do analito. Microemulsões ótimas foram geradas misturando 0,06 % (v/v) de álcool pentílico e 0,2 % (v/v) de n-hexano. De acordo com os resultados alcançados, os autores propõem este método como fácil, rápido e direto na determinação de BaP em amostras ambientais, e sugeriram um estudo posterior usando técnicas de separação com detecção de espectrometria de massas para corroborar os resultados obtidos.

Cruces-Blanco e colaboradores⁹ confirmaram a aplicabilidade deste método na determinação de acenafteno em amostras de água de mar das costas do Mediterrâneo. Eles obtiveram nos testes de validação do método recuperações de 98,5 % e desvios padrão relativos (RSD) de 1,7 %. Esses resultados promoveram

a recomendação por parte dos autores do uso deste método para análise de rotina em solução aquosa, devido a sua rapidez e boa precisão.

Segura-Carretero et al.^{10,29,74} realizaram vários estudos onde combinaram as vantagens da fosforimetria de varredura sincronizada com as oferecidas pelas microemulsões na determinação simultânea de várias substâncias orgânicas presentes em amostras reais. Acenafteno, fluoranteno, pireno, benz[a]pireno e benz[a]antraceno foram determinados em amostras de poeira atmosférica. Reguladores do crescimento de plantas (ácido 2-naftalenoacético e 1-naftalenamida) foram caracterizados em amostras de solo. E uma mistura de HPA's (fenantreno, fluoranteno e benz[a]antraceno) foi determinada em amostras de café. Nos três métodos desenvolvidos foram observados incrementos na seletividade da técnica de varredura sincronizada durante a identificação simultânea dos diferentes analitos. Recuperações entre 87,6 e 103,5 % foram obtidas confirmando a aplicabilidade analítica das microemulsões como meio indutor da fosforescência na temperatura ambiente.

Resultados semelhantes foram reportados pelos grupos de pesquisa de Ramos *et al.*² e Wei-Jun⁵⁵ *et al.*, mas nenhum dos métodos reportados considera o uso de ME's sem surfactante como alternativa analítica na indução da fosforescência de analitos em líquidos orgânicos. Esta abordagem ofereceria a possibilidade de diminuir ainda mais os tempos de preparação de amostras, e possivelmente aumento da sensibilidade e precisão do método.