



**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

**ESTUDO DE SONDAS FLUORESCENTES PARA
DETERMINAÇÃO DE CÁTIOS**

Gizelle Cristina Bedendo

Orientador: Profa. Haidi D. Fiedler

Co-orientador: Prof. Faruk Nome

Florianópolis

2007

Gizelle Cristina Bedendo

**ESTUDO DE SONDAS FLUORESCENTES PARA
DETERMINAÇÃO DE CÁTIOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química (área de concentração: Química Analítica) da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Profa. Haidi D. Fiedler

Co-orientador: Prof. Faruk Nome

Florianópolis

2007

Gizelle Cristina Bedendo

Estudos de sondas fluorescentes para determinação de cátions

Prof. Ademir Neves
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Química

Dissertação aprovada em 22 de fevereiro de 2007 como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. A banca examinadora foi formada pelos professores:

Profª. Dra. Haidi Dálida Lentz Fiedler
Orientadora

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Co-orientador

Prof. Dr. Ivan Gonçalves de Souza
UFSC

Prof. Dr. Bruno Spoganicz
UFSC

Profª. Dra. Vera Lúcia A. Frescura Bascuñan
UFSC

Dedico à ciência e suas contribuições para
melhorias futuras do meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

A professora Haidi Fiedler, meus mais sinceros e verdadeiros agradecimentos, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela transferência de seus conhecimentos, dedicação, carinho e amizade, que sempre me foram caros e que foram primordiais para a concretização deste trabalho.

Ao professor Faruk Nome pela co-orientação, dedicação e atenção, assim como a sabedoria e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Química que contribuíram para minha formação.

A banca examinadora por sua participação.

Aos funcionários Graça e Jadir da secretaria da Pós-Graduação.

Aos meus pais Waltemir e Miguelina Bedendo e aos meus irmãos Willian e Wilson por todos os tipos de ajuda, apoio, carinho, afeto e exemplos que foram essenciais durante todo esse período.

Aos amigos do laboratório 203, Aloísio pelo sempre e incondicional companheirismo, a Renata, Thiago e Janio pela amizade e a todos os amigos do laboratório 210, principalmente ao Tiago Brandão, Jacks e Bruno pelas discussões e ajudas primordiais durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço a todos pela amizade, entusiasmo e pelo tempo que compartilhamos juntos.

Aos amigos mais próximos, Valquiria companheira de festas, longas conversas e risadas, Nilcéia e Josiane colegas de casa que juravam que eu morava mesmo é na UFSC, Rafael meu irmão de coração e Isadora, companheira cativa de El Divino Club no verão, Evandro, o racional e querido Evandro, agradecimento especial pela ajuda e a todos meus demais amigos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

A espectrometria de fluorescência é freqüentemente utilizada em estudos de estruturas, de interações moleculares, na localização de moléculas especialmente em sistemas biológicos e, ainda, em muitos tipos de análises em nível traço. Uma das aplicações refere-se à utilização como método de detecção acoplado a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) na determinação de amostras contendo íons metálicos ou de compostos que apresentam fluorescência. No presente trabalho estudam-se compostos orgânicos com características para serem utilizados como sondas fluorescentes na determinação de íons metálicos e espécies aniônicas. O 8-dimetilamino-1-naftol (DANOL) apresenta elevada sensibilidade para determinação de Be(II) utilizando meio micelar (dodecil sulfato de sódio, SDS). Essa sensibilidade apresentada pelo DANOL, deve-se ao efeito conhecido como “esponja de prótons”. O 1-N,N-dimetilamino Naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida (DNSS) apresenta significativa sensibilidade e seletividade para Be(II) permitindo realizar a análise em presença de íons metálicos como Cd(II), Zn(II), Rb(I), Ca(II), Mg(II), Al(III) e Na(I). A presença do íon Cu(II), provoca uma diminuição na intensidade de fluorescência da sonda. Um efeito semelhante, em todos os aspectos, é observado na presença de Pb(II), Fe(III) and Ni(II), sendo que a supressão observada é consistente com a equação de Stern-Volmer, e o Cu(II) apresenta a maior constante de Stern-Volmer (K_{SV}). As determinações são realizadas em presença de SDS que promove incorporação da sonda na micela, auxiliando no processo de interação da mesma com o íon metálico.

Quando se compara 8-QP (8-quinolinil fosfato), 8-QS (8-quinolinil sulfato) e 8-hidroxiquinolina, pode-se observar o efeito do substituinte do anel com relação à intensidade de fluorescência, assim como a sensibilidade dos mesmos, para serem utilizados como sondas fluorescentes. O 8-QS apresenta a maior intensidade de fluorescência, no entanto, mostra pouca ou nenhuma sensibilidade com relação aos íons metálicos como Pb(II), Be(II) e Rb(I), enquanto que a sonda análoga 8-QP apresenta apreciável sensibilidade ao íon Be(II). A 8-hidroxiquinolina, na presença do íon metálico Cu(II), apresenta uma forte supressão da intensidade de fluorescência.

ABSTRACT

Fluorescence spectroscopy has been used in structural studies, including molecular interaction and molecular localization in biological systems, as well as, in many types of analyses in trace level. A typical application is the use of fluorescence as detection methodology in high-pressure liquid chromatography (HPLC), mainly in analyses of metallic samples containing ions or compounds with fluorescent properties. In this work were studied organic compounds with characteristics to be used as a fluorescent probes for the determination of metallic ions and anionic species. The determinations were carried out in the presence of SDS (sodium dodecylsulfate) that promotes probe incorporation in the micelle and assists the interaction process between the probe and the metallic ion. The compound 8-dimethylamino-naphthalen-1-ol (DANOL) showed high sensitivity for determination of Be(II), such behavior of DANOL could be associated with the so-called "proton sponge effect". The dansyl derivative 5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonic acid dodecylamide (DNSS) showed high sensibility to Be(II), but low to Cd(II), Zn(II), Rb(II), Ca(II), Mg(II), Al(III) and Na(I), allowing the Be(II) determination in the presence of these ions. In the presence of Cu(II), Pb(II), Fe(III) and Ni(II) a strong fluorescence quenching of the DNSS was observed, being consistent with the Stern-Volmer Equation and the Cu(II) presents the strongest effect as a consequence of its Stern-Volmer (K_{SV}) constant to be the highest in these series. Comparison of 8-hydroxyquinoline, 8-QP (8-quinolyl phosphate) and 8-QS (8-quinolyl sulfate) allowed to observe an important substituent effect on the fluorescence intensity, as well as in the sensitivity of such compounds to be used as fluorescence probes. The 8-hydroxyquinoline ligand in the presence of Cu(II) showed a strong fluorescence quenching. While 8-QP showed an appreciable sensitivity to Be(II), 8-QS had a small or none sensitivity to Pb(II), Be(II) and Rb(II), although it presents the higher fluoresce intensity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Absorção e fluorescência do antraceno, que mostra como a banda fluorescente ocorre em comprimentos de onda maiores que a banda de absorção (Barrow, 1967).	17
Figura 2 Diagrama de Jablonski ilustrando os processos envolvidos na criação de um estado eletrônico excitado singlete através da absorção ótica e subsequente emissão de fluorescência.	19
Figura 3. Diagrama ilustrando todos os níveis energéticos de uma molécula diatômica em ambos estados: ativado e eletrônico fundamental e as curvas de energia potencial relacionadas a distância internuclear que pode deduzir-se de cada série de níveis de vibração e que correspondem a cada ordenação eletrônica (Willard <i>et al.</i> , 1974).	21
Figura 4. Excitação de um fluoróforo em três diferentes comprimentos de onda (EX 1, EX 2, EX 3) não muda o perfil de emissão, mas produz variações na intensidade da emissão fluorescente (EM 1, EM 2, EM 3) que corresponde a amplitude do espectro de excitação.	23
Figura 5. Formação do agregado micelar (Fendler & Fendler, 1975; Maniasso, 2001)	31
Figura 6. Representação bidimensional das regiões que formam uma micela iônica normal com estrutura esférica, de acordo com o modelo de Stigter (Fendler & Fendler, 1975; Maniasso, 2001)	32
Figura 7. Sondas fluorescentes utilizadas no presente estudo.	37
Figura 8. Esquema com a metodologia adotada para o estudo do pH ótimo das soluções na presença e ausência do metal Be(II).	53
Figura 9. Intensidade de fluorescência do DANOL (1×10^{-4} mol/L) em função da concentração de SDS; $\lambda_{\text{excitação}} = 330$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 500$ nm em pH de aproximadamente 5 e temperatura ambiente.	58
Figura 10. Fotodegradação do DANOL em pH 2,0 e $\lambda_{\text{excitação}} = 316$ nm, na: (a) ausência de SDS; (b) na presença de 0,05 mol/L SDS; c) na presença de SDS (0,05 mol/L) e Be(II) em pH 2,0; d) intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}} = 500$ nm) em função do tempo, nas condições citadas no gráfico.	60
Figura 11. Espectros de emissão da sonda DANOL (1×10^{-4} mol/L) em presença de SDS (0,05 mol/L), com variação do pH entre 1,0 e 12,0 unidades; $\lambda_{\text{excitação}} = 316$ nm.	61
Figura 12. Fotodegradação do DANOL na presença de SDS (0,05 mol/L) e $2,2 \times 10^{-3}$ mol/L de Be(II) em pH 12,0; $\lambda_{\text{excitação}} = 316$ nm.	61
Figura 13. a) Representação do espectro de emissão do DANOL na presença de Be(II) e SDS 0,05 mol/L e pH 3,0; b) Curva de calibração de Be(II) variando as concentrações de 0 à 0,011 mol/L. Com coeficiente de correlação $R = 0,9998$.	62
Figura 14. Curva de calibração expandida, mostrando a região de [Be(II)] de 0 à $5,57 \times 10^{-4}$ mol/L na presença de 0,05 mol/L de SDS em pH 3,0; Coeficiente de correlação $R = 0,9988$.	63
Figura 15. Gráfico de [Pb(II)] <i>versus</i> intensidade de fluorescência em pH 5,0 na presença de 0,05 mol/L de SDS e 0,02 mol/L de tampão acetato. $\lambda_{\text{emissão}} = 497$ e $\lambda_{\text{excitação}} = 316$ nm.	64

Figura 16. Curva de calibração utilizando 1×10^{-4} mol/L de DANOL, 0,01 mol/L de tampão acetato, com concentração de ClO_2^- variando de 0 a 0,02 mol/L; pH 5,0 $\lambda_{\text{emissão}}$ 346 e $\lambda_{\text{excitação}}$ 495 nm.....	65
Figura 17. Curva de calibração utilizando $1,6 \times 10^{-4}$ mol/L de DANOL, 0,02 mol/L de tampão acetato, com concentrações de BrO_3^- variando de 0 a 0,0021 mol/L; pH 5,0 $\lambda_{\text{emissão}}$ 346 e $\lambda_{\text{excitação}}$ 495 nm.....	65
Figura 18. Espectros de emissão da sonda DNSS (1×10^{-4} mol/L) em função da [SDS], em pH 5,0, tampão ácido acético/acetato 0,02 mol/L, $\lambda_{\text{emissão}} = 507$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm.....	67
Figura 19. Intensidade de fluorescência do DNSS (1×10^{-4} mol/L) em função da [SDS], em pH 5,0, tampão ácido acético/acetato 0,02 mol/L, $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm. O gráfico inserido mostra o deslocamento do comprimento de onda máximo em função da [SDS].....	67
Figura 20. Fotodegradação do DNSS em função do tempo utilizando concentrações de 1×10^{-3} mol/L SDS, [DNSS] = 1×10^{-4} mol/L e $\lambda_{\text{exc}} = 316$ nm.	68
Figura 21. Influência do pH na intensidade de fluorescência da sonda DNSS (1×10^{-4} mol/L) em SDS 0,017 mol/L; $\lambda_{\text{emissão}} = 507,24$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm; em pH 5,0 tampão acetato 0,02 mol/L.....	69
Figura 22. Influência da concentração da sonda na supressão do DNSS pelo íon Cu(II), em pH 5,0 (tampão acetato 0,02 mol/L) com DNSS em concentrações de (!) 1×10^{-4} mol/L e (,) 1×10^{-5} mol/L; $\lambda_{\text{emissão}} = 507,24$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm.....	70
Figura 23. Influência da concentração da sonda no realce da fluorescência do DNSS pelo íon Be(II), em pH 5,0 (tampão acetato 0,02 mol/L) com DNSS em concentrações de (■) 1×10^{-4} mol/L e (●) 1×10^{-5} mol/L; $\lambda_{\text{emissão}} = 507,24$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm.....	71
Figura 24. Efeito de diversos íons metálicos na fluorescência do DNSS. Os experimentos de Be(II) foram realizados em pH 3,0 e os demais em pH 5,0; $\lambda_{\text{excitação}} 346$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} 545$ nm.....	72
Figura 25. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de fluorescência do DNSS por íons metálicos, em pH 5,0; $\lambda_{\text{excitação}} 346$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} 545$ nm.....	73
Figura 26. a) Espectros de emissão em diferentes pHs, com a concentração de sonda constante em 1×10^{-4} mol/L; b) Espectros de emissão em diferentes pHs, com as concentrações de sonda e Be(II) constantes em 1×10^{-4} mol/L. Tampões utilizados: acetato e Tris na concentração 0,02 mol/L; $\lambda_{\text{excitação}} = 300$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 513$ nm.....	74
Figura 27. a) Representação da curva de calibração do Be(II) na presença de 8-QP (1×10^{-4}), em pH 4,0 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 303$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 512$ nm;.b) Representação da curva de calibração de Be(II) em presença de 8-QP em pH 12,0; $\lambda_{\text{excitação}} = 315$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 514$ nm; Coeficiente de correlação R= 0,99692.....	75
Figura 28. a) Representação da curva de calibração do Pb(II) na presença de 8-QP (1×10^{-4} mol/L), em pH 4,0 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 510$ nm; b) Representação da curva de calibração do Rb(I) na presença de 8-QP (1×10^{-4} mol/L), em pH 4,0 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 510$ nm;.....	76
Figura 29. Representação da curva de calibração do Fe(III) na presença de 8-QP, em pH 4,2 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 510$ nm.....	77

Figura 30. a) Espectros de emissão em diferentes pHs, com a concentração de sonda constante em 1×10^{-4} mol/L. Tampões utilizados: acetato e Tris na concentração 0,02 mol/L; $\lambda_{\text{excitação}} = 320$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 502,7$ nm.	78
Figura 31. Representação da curva de calibração do Be(II) na presença de 8-QS, em pH 4,0, com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 501$ nm.	79
Figura 32. Representação da variação de intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de (a) Be(II) e (b) Rb(I) em presença de CTABr/Tris nas concentrações de 0,05 mol/L e, de CTABr e 0,01 mol/L de Tris; tampão acetato em pH 5,0. Para Be(II) $\lambda_{\text{excitação}} = 250$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 414$ nm; Para Be(II) $\lambda_{\text{excitação}} = 315$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 409$ nm.	80
Figura 33. a) Espectros de emissão da 8-HOQ na presença de Cu(II) variando a concentração de 0 a 9×10^{-5} mol/L, em solução contendo CTABr/Tris (0,05/0,01 mol/L) e, em pH 8,0; b) Representação da variação da intensidade de fluorescência com a variação de concentração Cu(II), nas mesmas condições especificadas para os espectros e $\lambda_{\text{emissão}} = 545$ nm.	81
Figura 34. a) Fotodegradação de 1×10^{-4} mol/L de DN na presença de 0,03 mol/L de SDS, 0,02 mol/L de tampão acetato (pH 5,0); b) Fotodegradação de 1×10^{-4} mol/L de DAN na presença de $2,66 \times 10^{-4}$ mol/L de Be(II); 0,03 mol/L de SDS; 0,02 mol/L de tampão acetato (pH 5,0); $\lambda_{\text{emissão}} = 430$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 328$ nm.	82
Figura 35. a) Representação da variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Be(II) em solução aquosa com BDAN em concentração de 1×10^{-4} mol/L; ($\lambda_{\text{emissão}} = 509$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 286$ nm) b) Representação da variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Be(II) em solução aquosa micelar em presença de SDS 0,021 mol/L e, com BDAN em concentração de 1×10^{-4} mol/L; ($\lambda_{\text{emissão}} = 512$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 286$ nm).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Surfactantes de uso comum em Química Analítica.....	30
Tabela 2. Valores experimentais para determinação da constante de equilíbrio de incorporação da sonda à micela de SDS.....	48
Tabela 3. Dados de volume, concentração e intensidade de fluorescência para a curva de calibração do íon Be(II).....	50
Tabela 4. Dados de volume, concentração e intensidade de fluorescência para a curva de calibração do Be(II).....	52

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

8-HOQ	8-hidroxiquinolina
8-QP	8-quinolinil fosfato
8-QS	8-quinolinil sulfato
DANOL	8-dimetilamino naftol
DNSS	1-N,N-dimetilamino Naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida
DAN	1,8-diamino naftaleno
BDAN	1,8-bis(dimetilamino) naftaleno
CTABr	Brometo de cetil trimetil amônio
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
TRITON X-100	Polioxietileno p-tercotil fenol
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CMC	Concentração micelar crítica
N	Número de agregação
Tris	Tris hidroximetil amino metano
nm	Nanômetro
F _o	Fluorescência sem o metal
g	Gramas
mL	Mililitros
L	Litro
Uv/Vis	Ultravioleta visível
λ	Comprimento de onda
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
K _{eq}	Constante de equilíbrio
Abs	Absorvância
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão

SUMÁRIO

I. Introdução	13
I.1. Emissão ou Dissipação de Energia por Moléculas Excitadas	13
I.1.1. Processos não radiantes de transferência de energia no estado líquido	14
I.1.2. Emissão Fluorescente de Radiação	17
I.1.3. Emissão Fosforescente de Radiação	18
I.2. Considerações Gerais sobre a Espectrometria de Fluorescência	19
I.2.1. Espectro Fluorescente	22
I.3. Leis da fotoquímica	23
I.4. Determinações por Espectrometria de Fluorescência	25
I.4.1. Detecção da fluorescência	25
I.4.2. Sinais fluorescentes e a determinação analítica	25
I.4.3. Supressão da Fluorescência por Interações Fluoróforo- fluoróforo	26
I.4.4. Supressão estática da fluorescência	27
I.5. Surfactantes: Emprego de ambientes micelares em Química Analítica	29
I.6. Fluorimetria em meio Micelar	33
I.7. Sondas fluorescentes	33
I.8. Enfoque do Presente Trabalho	34
I.9. Porque o interesse na determinação de cátions metálicos e anions como ClO ₂ ⁻ e BrO ₃ ⁻	37
II – Objetivos	40
II.1. Objetivos específicos	40
III. Parte Experimental	41
III.1. Equipamentos	41
III.2. Limpeza da vidraria	41
III.3. Soluções e reagente utilizados	42
III.4. Procedimentos Analíticos	47
III.4.1. Incorporação da sonda no surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS)	47
III.4.2. Estudo de fotodegradação da sonda na presença e ausência do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS)	48
III.4.3. Procedimentos realizados para a sonda DANOL	49
III.4.4. Procedimentos realizados para a sonda DNSS	51
III.4.5. Procedimentos realizados para a sonda 8-QP e 8-QS	53
III.4.6. Procedimentos realizados para a sonda 8-HOQ	55
IV. Resultados e Discussão	57
IV.1 Resultados obtidos com a sonda 8-dimetilamino-1-naftol (DANOL)	57
IV.1.1. Incorporação da sonda DANOL no interior da micela de SDS	57
IV.1.2. Estudo da fotodegradação da sonda DANOL	59
IV.1.3. Realce da fluorescência da sonda DANOL pelo Be(II)	62
IV.1.4. Limite de Detecção e Quantificação	63
IV.1.5. Testes com outros íons metálicos	64
IV.1.6. Aplicação de DANOL na determinação de ânions	64
IV.2 Resultados obtidos com a sonda 1-N,N-dimetilamino naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida (DNSS)	66

IV.2.1. Incorporação da sonda DNSS em SDS	66
IV.2.2. Efeito da presença de SDS e do pH na fotodegradação da sonda DNSS	68
IV.2.3. Influência da concentração da sonda DNSS nas determinações de espécies pelo realce e supressão da fluorescência	70
IV.2.4. Determinação de íons metálicos por fluorescência utilizando DNSS em meio micelar	71
IV.3. Resultados obtidos com a sonda 8-quinolinil fosfato (8-QP)	73
IV.3.1. Efeito do pH sobre a sonda 8-QP na presença e ausência de Be(II)	73
IV.3.2. Determinação de íons metálicos por fluorescência utilizando 8-QP	74
IV.4. Resultados obtidos com a sonda 8-quinolinil sulfato (8-QS)	77
IV.4.1. Efeito do pH sobre a sonda 8-QS	78
IV.4.2. Determinação de íons metálicos por fluorescência utilizando 8-QS	78
IV.5. Resultados obtidos com a sonda 8-hidroxiquinolina (8-HOQ)	79
IV.5. 1. Efeito de íons metálicos sobre a intensidade de fluorescência da 8-HOQ	80
IV.6. Resultados parciais obtidos para 1,8 – Bis(dimetilamino)naftaleno (BDAN) e 1,8 – diamino naftaleno (DN)	82
V. Conclusões	84
REERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

I. Introdução

A espectrometria de fluorescência tem se tornado popular em muitos ramos das ciências químicas e biológicas. Esta técnica é freqüentemente utilizada em estudos de estruturas e interações moleculares, na localização de moléculas, especialmente em sistemas biológicos e, em muitos tipos de determinações em nível traço. Uma das aplicações mais importantes da fluorescência refere-se à utilização da mesma como método de detecção acoplado a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) na análise de amostras contendo íons metálicos ou de compostos que apresentam significativa fluorescência.

A combinação da técnica de fluorescência com a de cromatografia, devido a sua utilidade, é facilmente encontrada na bibliografia (Prat *et al.*, 1996; Soroka *et al.*, 1987, Beckett, J. R. & Nelson, D. A., 1981). Cita-se como exemplo a determinação de Ga (Gálio) e In (Índio) na presença do ácido 8-quinolinol-5-sulfônico, onde uma maior sensibilidade na detecção destes elementos pode ser obtida usando métodos fluorimétricos (Prat *et al.*, 1996). A combinação da detecção fluorimétrica com uma técnica de separação, como a cromatografia líquida, parece ser promissora no sentido de evitar problemas com a seletividade com relação ao analito em questão.

A seguir apresenta-se uma breve descrição do processo de emissão ou dissipação de energia por moléculas excitadas, visando enfatizar os fundamentos físico-químicos da técnica de fluorescência.

I.1. Emissão ou Dissipação de Energia por Moléculas Excitadas

Na maior parte dos estudos que utilizam o espectro de absorção de moléculas, a quantidade de radiação absorvida em um determinado trajeto, por exemplo, do nível fundamental ao primeiro estado excitado, não é diminuída se a radiação a qual está sendo submetida à molécula, passa continuamente através da amostra. Esta observação indica que as moléculas que sofreram a radiação voltam muito rapidamente ao seu estado inicial depois do processo de ativação. Assim, a população de moléculas no estado inicial não se reduz de forma significativa devido à absorção de radiação. Conclui-se, portanto, que em alguns sistemas, as moléculas que passam a um estado superior de energia devem ter

alguma forma, ou formas, relativamente efetivas de perder o excesso de energia para poder voltar ao seu estado inicial (Barrow, 1967; Lakowicz, 1983; Rohatgi-Mukherjee, 1992).

Existem dois mecanismos principais, através dos quais as moléculas podem desprender-se do excesso de energia, que adquiriram como resultado da absorção de radiação. O primeiro deles depende da transferência de energia entre as moléculas que se chocam, ou ao menos estão muito próximas e se dissipa na forma de calor. Nesta situação não se faz necessário que a energia seja irradiada da molécula excitada. Estes processos são descritos como não radiantes. O segundo mecanismo geral para a dissipação de energia, compreende a emissão de radiação eletromagnética proveniente da molécula excitada, onde são reconhecidos dois tipos: fluorescência, que em geral ocorre muito rapidamente, e fosforescência, que pode persistir muito tempo depois de que é cessada a formação das moléculas excitadas (Barrow, 1967; Lakowicz, 1983; Rohatgi-Mukherjee, 1992).

O conhecimento das formas em que as moléculas podem colocar-se em contato e trocar energia é muito importante para o estudo de vários fenômenos químicos, sendo que para o caso particular dos processos fotoquímicos, a informação sobre o estado excitado produzido pela absorção inicial de luz é fundamental para a compreensão verdadeira dos seus efeitos. Assim, a seguir apresenta-se uma breve revisão dos processos moleculares: não radiantes de transferência de energia e de emissão fluorescente de radiação (Barrow, 1967; Lakowicz, 1983; MacCarthy, 2001).

1.1.1. Processos não radiantes de transferência de energia no estado líquido

No estado líquido o conceito de colisões moleculares é menos direto que no caso de uma molécula de gás. O número de colisões de uma molécula de gás por segundo é obtido a partir da *teoria cinética-molecular dos gases*, onde para moléculas relativamente pequenas se calcula que, a 1 atm de pressão, uma molécula sofre uma colisão aproximadamente cada 10^{-10} s (Barrow, 1967).

Para o caso dos líquidos, a frequência com que uma molécula se choca com outra, encontra-se na ordem de 10^{13} vezes por segundo. Este valor corresponde a um tempo entre colisões de aproximadamente 10^{-13} s, valor que parece razoável, devido a maior aproximação das moléculas em um líquido que em um gás a 1 atm.

Estes valores, 10^{-10} e 10^{-13} s, fornecem uma idéia dos tempos muito curtos em que ocorre a transferência de energia em uma molécula excitada. De fato, não existe razão para esperar que todos os choques sejam efetivos em termos de transferências de energia rotacional, vibracional e/ou eletrônica.

Encontra-se na bibliografia (Barrow, 1967; MacCarthy, 2001; Rohatgi-Mukherjee, 1992) que a energia de rotação é transferida com relativa facilidade, e que a maioria dos choques são de fato efetivos na troca de energia. As frequências associadas às rotações moleculares típicas são da ordem de 10^{11} ou 10^{12} ciclos, ou rotações, por segundo. Portanto, o tempo necessário para que ocorra uma rotação completa de uma molécula, é da ordem de 10^{-11} ou 10^{-12} s. Para o caso dos gases, a pressões inferiores a 1 atm, ocorrem muitas rotações entre as colisões e portanto desativações. No entanto, para o caso dos líquidos as moléculas, em geral, não poderão completar uma rotação em um curto intervalo de tempo médio de 10^{-13} s que existe entre duas colisões. Portanto, concluí-se que nos líquidos as moléculas não possuem liberdade para rotar e, esta conclusão é consistente com as observações de que as bandas de absorção de vibração, em geral, mostram uma estrutura fina de rotação somente quando a amostra é um gás.

Já para o caso da energia de vibração, a transferência de energia ocorre com menos facilidade. O valor médio estimado requerido é de 10^4 colisões, antes que se obtenha uma colisão que consiga transferir a energia de vibração. Em tal transferência o excesso de energia de vibração provavelmente aparece como energia de rotação e translação adicional proveniente das moléculas que se chocam. Assim, uma molécula excitada em seus níveis de vibração no estado líquido pode ter uma vida média da ordem de $10^4 \times 10^{-13} = 10^{-9}$ s. Sendo que este tempo será considerado longo, quando comparado com o período médio da ordem de 10^{-13} s de uma vibração clássica. Assim, uma molécula em um líquido, completaria muitos ciclos de vibração antes de se desativar.

Portanto, considera-se que uma molécula cuja energia eletrônica foi afetada pela absorção de luz visível e ultra-violeta, pode dissipar a energia em excesso e voltar a seu estado eletrônico normal ou fundamental.

Uma molécula em um estado de vibração de alta energia e uma ordenação eletrônica de alta energia, perde todo o excesso de energia. O excesso de energia de vibração pode ser perdido, por repetidas colisões com as moléculas que estão próximas e, no estado líquido, este percurso é de aproximadamente 10^{-9} s, e o processo pode ser completado. A dissipação

de energia dentro de um estado eletrônico excitado de um nível vibracional elevado para um de menor energia, tipicamente terá como resultado uma emissão de energia em forma radiante, isto é, estará acompanhada, em geral, por um processo radiante (calor).

Há muitos casos nos quais as estruturas eletrônicas do estado fundamental e do estado excitado não são simétricas em termos de energias versus distâncias. Portanto, terão curvas de energia potencial que se cortam entre si. Parece que o caminho de desativação que é seguido diminui a energia da molécula originalmente excitada através de níveis de vibração do estado inicial excitado a um nível onde a energia potencial, do primeiro estado excitado, corta a do outro estado. Neste ponto de intersecção ambas ordenações eletrônicas possuem, dentro de uma geometria molecular específica, a mesma energia potencial. Em tal ponto, pode considerar-se como sendo relativamente fácil para uma determinada estrutura eletrônica mudar de uma das curvas para a outra, desde que seja uma mudança entre níveis de energia semelhantes de uma curva de potencial, para aquela que corresponde à outra série de níveis e, portanto, a outra curva de potencial. Este processo, conhecido como conversão interna, parece ser muito mais provável que outras mudanças que devem estar acompanhadas de uma grande transferência de energia. Assim, é por este processo de desativação vibracional e conversão interna pelo qual uma molécula promovida a um estado excitado, pode voltar a seu estado eletrônico de vibração fundamental inicial através de processos não radiantes.

Deve-se mencionar aqui que, mesmo quando as curvas de energia potencial das diferentes estruturas eletrônicas se cortam, não é necessariamente fácil que aconteça uma mudança de estrutura eletrônica. Esta dificuldade é mais óbvia quando o número de elétrons desemparelhados é diferente nas duas estruturas. Por exemplo, a conversão interna entre os estados singlete e triplete pode ocorrer, no entanto, não é tão rápida e fácil quanto à conversão entre estados eletrônicos com igual número de elétrons desemparelhados. O mecanismo pelo qual varia o sentido do spin de um elétron em relação ao outro, aparentemente não é muito efetivo (Barrow, 1967; MacCarthy, 2001).

I.1.2. Emissão Fluorescente de Radiação

Como princípio geral, a energia da radiação emitida tem menos energia que a radiação absorvida. Isto conduz a uma banda de emissão com frequências menores (comprimento de onda maior), que a correspondente banda de absorção. Uma situação similar resulta se a emissão ocorre de um dos estados eletrônicos excitados alcançados por conversão interna (Barrow, 1967; Willart *et al.*, 1974).

As observações experimentais mostradas na **Figura 1** confirmam o esperado considerando os comprimentos de onda relativos a absorção e a emissão.

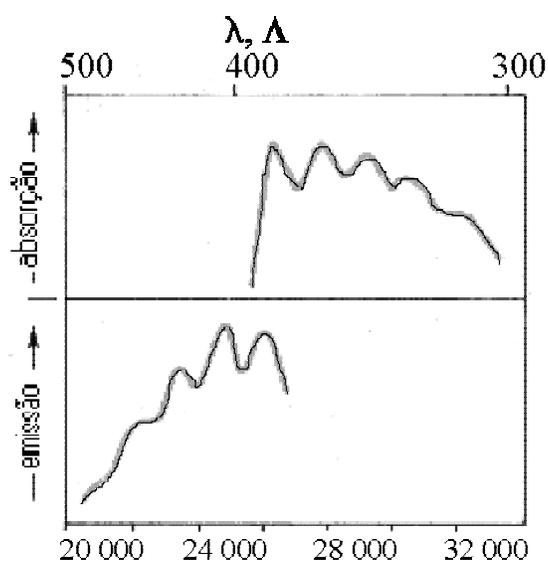


Figura 1. Absorção e fluorescência do antraceno, que mostra como a banda fluorescente ocorre em comprimentos de onda maiores que a banda de absorção (Barrow, 1967).

É necessário que o retorno ao estado fundamental por processos não radiantes seja o suficientemente lento para que o processo fluorescente ou fosforescente consiga ter a possibilidade de ser competitivo. Da mesma forma que para os processos não radiantes, o processo radiante é afetado pelo número de elétrons desemparelhados dos estados que compreendem o processo de emissão. Ainda que não foi feita nenhuma afirmação específica, está sendo suposto que o processo de emissão conecta dois estados com o mesmo número de elétrons desemparelhados, por exemplo, dois estados singletes ou dois estados tripletes. Tal emissão se conhece como emissão fluorescente, ou fluorescência e, esta emissão ocorre de forma corrente com vidas médias relativamente curtas.

Experimentalmente se encontram vidas médias para a fluorescência no intervalo de 10^{-9} até perto de 10^{-4} s. Além deste processo rápido de emissão, existe um lento, mas facilmente observado, que se apresenta a seguir.

I.1.3. Emissão Fosforescente de Radiação

A emissão fosforescente, ou fosforescência, é o nome aplicado a emissão espontânea de radiação quando os estados inicial e final implicados no processo possuem diferente número de elétrons desemparelhados. Neste caso, o emparelhamento ou desemparelhamento de elétrons é um processo difícil e, como isto é um requisito para que ocorra a emissão de radiação, o processo tende a ser bastante lento. As vidas médias para a fosforescência, isto é, o tempo depois de que o raio de luz excitante é interrompido, para que a radiação fosforescente diminua até a metade de sua intensidade, em geral costuma estar entre 10^{-3} s e 1 min (Barrow, 1967; Willart *et al.*, 1974)

Da mesma forma que é difícil para as moléculas emitirem radiação, também é difícil para as moléculas absorverem radiação caso tenha que ocorrer uma variação de spin eletrônico. A questão que aparece então é: como obter moléculas no estado excitado que possuam diferente número de elétrons desemparelhados que no estado fundamental? Quase todas as moléculas em seu estado fundamental possuem seus elétrons emparelhados, isto é, estão em um estado singlete. Qualquer banda de absorção razoavelmente intensa destas moléculas, no estado singlete, corresponderá a um processo pelo qual se alcança um estado singlete excitado. Algumas vezes pode-se detectar absorções que conduzem ao estado excitado triplete, no entanto, a probabilidade que ocorra este tipo de excitação é tão pequena que poucas moléculas excitadas no estado triplete podem ser obtidas através deste mecanismo.

Como existem estados excitados singlete e triplete com curvas de energia potencial diferentes, existe um mecanismo indireto pelo qual as moléculas passam ao estado triplete. A amostra pode ser irradiada com radiação que a leva ao estado singlete de alta energia. Então, as moléculas perderão energia de vibração e o processo de conversão interna pode levar a molécula do estado inicial singlete excitado ao estado triplete excitado.

A fosforescência é pouco observada no caso de moléculas dissolvidas e só pode observar-se com certa intensidade, quando a substância fosforescente é congelada a baixa

temperatura, de modo que se impeça ou se restrinja fortemente o mecanismo de desativação por colisão. Em ambos os casos, fluorescência e fosforescência, há dois tipos de espectros aplicáveis à análise qualitativa: os espectros de excitação e de emissão. Porém, pelo fato de poder medir-se a luz de fluorescência para as mais diversas condições experimentais, do que no caso da fosforescência, justifica-se a mais generalizada aplicação da primeira.

I.2. Considerações Gerais sobre a Espectrometria de Fluorescência

O processo responsável pela fluorescência de sondas fluorescentes ou fluoróforos freqüentemente é ilustrado pelo diagrama de estado eletrônico, denominado diagrama de Jablonski (Willart *et al.*, 1974; Miller, 1981; Lakowicz, 1983; Rohatgi-Mukherjee, 1992) cuja representação pode ser encontrada, em geral, de duas formas. A primeira, como é mostrado na **Figura 2**, onde o diagrama de Jablonski, é apresentado de forma simplificada para explicar o processo de fluorescência, onde são discutidos estágios identificados como 1, 2 e 3 que correspondem a diferentes eventos.

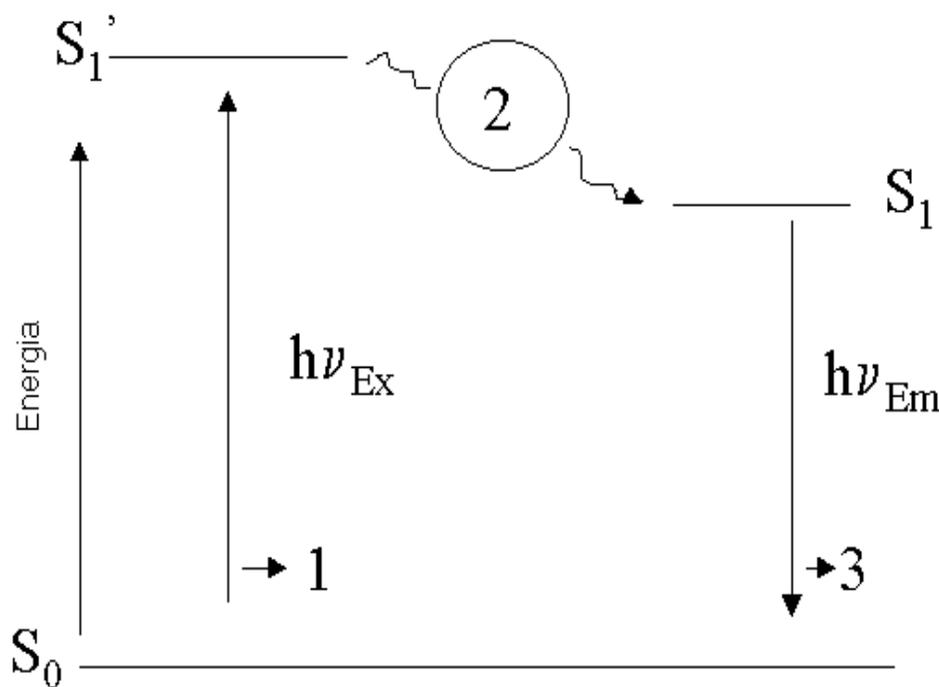


Figura 2 Diagrama de Jablonski ilustrando os processos envolvidos na criação de um estado eletrônico excitado singlete através da absorção óptica e subsequente emissão de fluorescência.

Estágio 1: EXCITAÇÃO

Um fóton com energia $h\nu_{EX}$ é absorvido pelo fluoróforo, criando um estado eletrônico excitado singlete (S_1'). Este processo diferencia fluorescência de quimioluminescência, no qual o estado excitado é provocado por uma reação química.

Estágio 2: TEMPO DE VIDA DO ESTADO EXCITADO (τ_0)

O estado excitado em uma molécula ocorre por um tempo finito (na faixa de picosegundos até microsegundos). Durante este tempo, o fluoróforo é submetido a mudanças conformacionais e a múltiplas interações com o meio molecular. Estes processos possuem duas conseqüências importantes:

1^a) A energia de S_1' é parcialmente dissipada, produzindo um estado excitado singlete relaxado (S_1), do qual é originada a emissão fluorescente.

2^a) Nem todas as moléculas inicialmente excitadas pela absorção (Estágio 1) retornam ao estado fundamental (S_0) pela emissão da fluorescência. Outros processos (mencionados anteriormente), como apagamento por colisão e cruzamento de sistemas internos podem desativar S_1 , assim como a transferência de energia ressonante por fluorescência (FRET) que será apresentada no tópico: “Supressão da fluorescência por interações fluoróforo-fluoróforo”.

Estágio 3: EMISSÃO FLUORESCENTE

Um fóton de energia $h\nu_{EM}$ é emitido, retornando o fluoróforo para o estado fundamental S_0 . Devido à dissipação de energia durante o tempo de vida do estado excitado (τ_0), a energia deste fóton é menor (portanto com um λ maior), do que o fóton excitado $h\nu_{EX}$. Esta diferença de energia ou λ é representada por $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$ e é chamada de *deslocamento de Stokes*.

O *deslocamento de Stokes* é fundamental para a sensibilidade da técnica fluorescente porque permite que a emissão de fótons seja detectada com uma baixa emissão de fundo (background), já que os comprimentos de onda de excitação e emissão são diferentes. Na espectrofotometria de absorção, as medidas de absorvância ocorrem no mesmo comprimento de onda da luz incidente.

O rendimento quântico fluorescente é a relação entre o número de fótons emitidos fluorescentes (estágio 3) pelo número de fótons absorvidos (estágio 1).

$$\Phi_{\text{processo (rendimento quântico)}} = n^{\circ} \text{ de fótons emitidos} / n^{\circ} \text{ de fótons absorvidos}$$

A **Figura 3** corresponde a um diagrama de Jablonski completo, incluindo fluorescência e fosforescência, onde está representado o diagrama esquemático dos níveis energéticos de uma molécula orgânica típica onde, nas ordenadas representa-se a diferença de energia entre os diferentes níveis especificados.

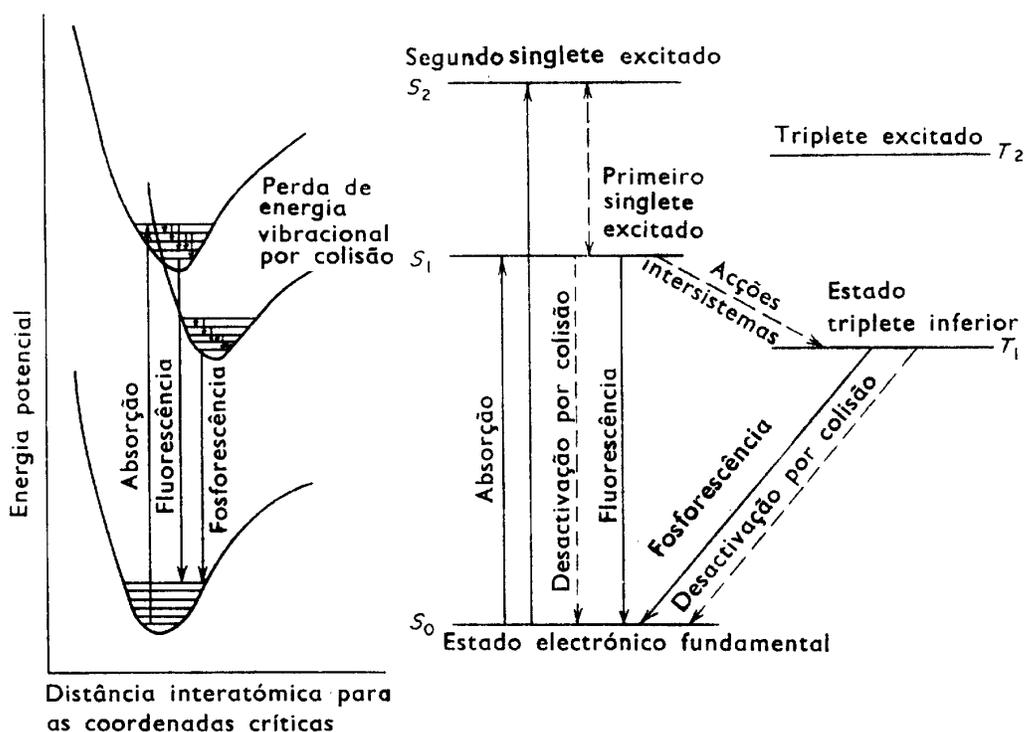


Figura 3. Diagrama ilustrando todos os níveis energéticos de uma molécula diatômica em ambos estados: ativado e eletrônico fundamental e as curvas de energia potencial relacionadas a distância internuclear que pode deduzir-se de cada série de níveis de vibração e que correspondem a cada ordenação eletrônica (Willard *et al.*, 1974).

No diagrama de Jablonski estão representados os estados eletrônicos descritos como fundamental, primeiro e segundo níveis de energia, representados por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. A absorção de energia de comprimento de onda apropriado, por uma molécula, provoca a mudança da mesma de um determinado nível vibracional do estado fundamental, para um dos níveis vibracionais de um dos estados eletrônicos excitados, geralmente o primeiro estado excitado singleto, S_1 . Para cada um destes níveis de energia,

podem existir diversos números de níveis de energia vibracional, descritos por $v = 0, 1, 2,$ etc. O processo de absorção de energia ocorre em um tempo da ordem de 10^{-15} segundos.

Em consequência da absorção, um certo número dos níveis vibracionais do estado excitado é imediatamente ocupado. Porém, as moléculas que se encontram em um estado vibracional superior, do estado excitado singlete, regressam rapidamente ao mais baixo nível vibracional do estado excitado, transferindo o excesso de energia para outras moléculas, através de colisões, ou dividem esse excesso de energia por outros possíveis modos de vibração ou rotação, dentro da molécula excitada. Assim, a fluorescência será o resultado da transição radioativa espontânea que ocorre quando as moléculas regressam ao estado eletrônico fundamental. O processo radiativo ($S_1 \rightarrow S_0$) tem uma curta duração, da ordem de 10^{-15} segundos. A absorção de energia radiante pode excitar a molécula para níveis de energia superior ao nível S_1 , entretanto, os elétrons em um nível de energia superior a S_2 regressam rapidamente ao mais baixo nível do estado eletrônico excitado S_1 .

Este processo é chamado de conversão interna e ocorre em tempos aproximados de 10^{-12} segundos. O tempo de meia vida da fluorescência resulta da transição radiativa espontânea ($S_1 \rightarrow S_0$) que corresponde ao tempo de residência da molécula no estado excitado e, a conversão interna é completada anteriormente a emissão.

O regresso do nível triplete ao estado eletrônico fundamental constitui a emissão da fosforescência, transição que tem baixa probabilidade de ocorrer já que são necessárias duas inversões de spin, uma conversão interna $S_1 \rightarrow T_1$ e logo outra $T_1 \rightarrow S_0$. O acoplamento spin-órbita, que é a perturbação magnética que altera os spins será, provavelmente, a origem mais importante das transições de fosforescência, de retorno ao estado fundamental singlete.

1.2.1. Espectro Fluorescente

O processo completo de fluorescência é cíclico. A não ser que o fluoróforo seja irreversivelmente destruído no estado excitado (um fenômeno importante conhecido como fotodescoloração) o mesmo fluoróforo pode ser repetidamente excitado e detectado. O fato de que um fluoróforo individual poder produzir milhões de fótons detectáveis é fundamental para a alta sensibilidade da técnica de detecção fluorescente.

Para uma molécula poliatômica em solução, para o caso de uma espécie de fluoróforo em solução diluída, o espectro de excitação fluorescente será idêntico ao seu espectro de absorção (ocorrendo poucas exceções). Sob as mesmas condições, o espectro de emissão de fluorescência é independente do λ de excitação, devido a ocorrência da dissipação da energia de excitação durante o tempo de vida do estado excitado. Assim, como é mostrado na **Figura 4**, a intensidade de emissão é apenas proporcional a amplitude do espectro de excitação fluorescente no λ de excitação (Lakowicz, 1983)

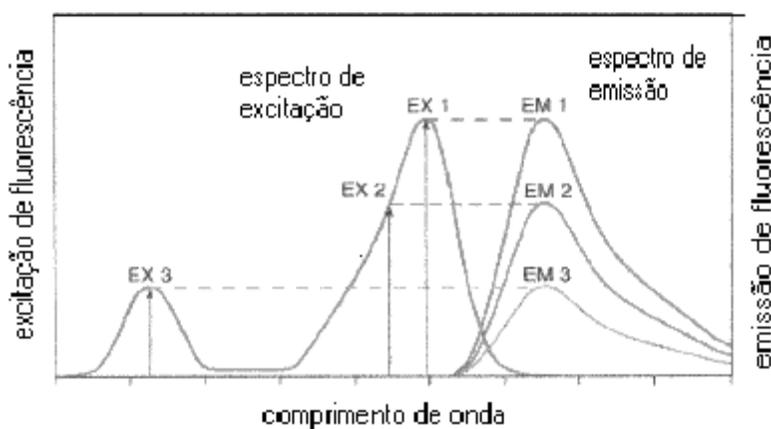


Figura 4. Excitação de um fluoróforo em três diferentes comprimentos de onda (EX 1, EX 2, EX 3) não muda o perfil de emissão, mas produz variações na intensidade da emissão fluorescente (EM 1, EM 2, EM 3) que corresponde a amplitude do espectro de excitação.

I.3. Leis da fotoquímica

Fenômenos fotoquímicos começaram a ser estudados qualitativamente no início do século XIX. Pouco a pouco foram estabelecidos os fundamentos dos estudos quantitativos. Assim, a 1ª lei da fotoquímica foi descrita por Grotthus-Draper:

“Somente a luz que é absorvida por um sistema pode causar mudanças químicas”.

A probabilidade da absorção é descrita na lei de Lambert-Beer.

A lei de Lambert estabelece que a fração de radiação incidente absorvida por um meio transparente é independente da intensidade da radiação incidente e que cada camada sucessiva do meio absorve uma fração igual de radiação incidente (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

A lei de Beer estabelece que a quantidade de luz absorvida é proporcional ao número de moléculas excitadas pela radiação para uma determinada concentração C e pode ser expressa como:

$$\log I_0/I = \epsilon C l \quad (1)$$

Onde:

ϵ é chamado de absorvidade molar e é uma função do comprimento de onda. A concentração é expressa em moles / L e “l” é o comprimento ótico em cm;

I_0 = a intensidade incidente e; I = intensidade transmitida (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

A 2ª lei da fotoquímica foi enunciada por Stark (1908) e mais tarde por Einstein (1912). Então é conhecida como lei de Stark-Einstein: *“Um quantum de luz é absorvido por cada molécula que está absorvendo ou reagindo na substância que desaparece”*.

O trabalho subsequente de Warburg e Bodenstern (1912 –1915) clareou a confusão entre absorção de fóton e mudança química. As moléculas que absorvem um fóton tornam-se “excitadas” fisicamente e, isto deve ser distinguido de tornar-se “quimicamente ativa” (Rohatgi-Mukherjee, 1992)

Moléculas excitadas podem perder a energia delas por caminhos não-químico, ou alternativamente podem desencadear reações térmicas de grande rendimento químico. Para expressar a eficiência de uma reação fotoquímica, a quantidade da eficiência dos quantum absorvidos (rendimento quântico), Φ , é definido como:

$\Phi_{reação} = (n^o \text{ de moléculas decompostas ou formadas por unidade de tempo} / n^o \text{ de quanta absorvido por unidade de tempo})$

Quando são usadas fontes de alta intensidade de luz como lâmpadas de flash ou lasers podem ocorrer efeitos fotoquímicos “bifotônicos”, os quais modificam a lei de Einstein. Para intensidades muito altas, uma molécula pode absorver dois fótons simultaneamente, entretanto, um efeito mais comum é o caso de um segundo fóton, de comprimento de onda maior, é absorvido por uma espécie metaestável (um triplete ou um radical). Assim, a natureza da absorção e produção de fótons e, do rendimento quântico são ambos dependentes da intensidade da luz. O conceito de rendimento quântico pode ser estendido para qualquer ação química ou física seguida da absorção de luz. Então, pode-se encontrar uma forma de quantificar a partição do quanta absorvido dentro de um processo com vários caminhos (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

$\Phi_{\text{processo (rendimento quântico)}} = (\text{n}^\circ \text{ de moléculas submetidas ao processo} / \text{n}^\circ \text{ de quanta absorvido})$

$\Phi_{\text{processo (rendimento quântico)}} = \text{velocidade do processo} / \text{velocidade de absorção} \quad (1)$

I.4. Determinações por Espectrometria de Fluorescência

I.4.1. Detecção da fluorescência

As condições básicas requeridas, para que um sistema de detecção fluorescente seja sensível, incluem quatro elementos essenciais: 1) uma fonte de excitação; 2) um fluoróforo; 3) filtros com comprimentos de onda para isolar os fótons de emissão dos fótons de excitação e 4) um detector que registra os fótons emitidos e produz um rendimento que seja possível de ser gravado. A compatibilidade destes quatro elementos é essencial para a otimização da detecção fluorescente.

I.4.2. Sinais fluorescentes e a determinação analítica

A intensidade da fluorescência é quantitativamente dependente dos mesmos parâmetros da espectrometria de absorvância, então a fluorescência observada dependerá da concentração de moléculas fluorescentes da sonda, da intensidade da origem de excitação e da eficiência do instrumento em coletar a fluorescência. Em soluções diluídas ou em suspensões, a intensidade da fluorescência é linearmente proporcional a estes parâmetros.

Assim, para a determinação de um determinado analíto, como por exemplo, [Metal], observa-se que ocorre uma relação linear direta e, então trata-se os resultados como a equação da reta:

$[M] = \text{Concentração do metal}$

$$F = F_0 + b [M] \quad (2)$$

Onde:

F = Intensidade de fluorescência da amostra;

F₀ = Coeficiente linear da reta;

b = *Coefficiente angular da reta.*

I.4.3. Supressão da Fluorescência por Interações Fluoróforo- fluoróforo

A supressão da fluorescência pode ser definida como um processo bimolecular que reduz o rendimento quântico fluorescente sem mudar o espectro de emissão de fluorescência (Lakowicz, 1983). Este processo de supressão pode ser resultado de interações do estado excitado (supressão colisional) ou da formação de espécies não-fluorescentes no estado fundamental. Assim, o processo de supressão de fluorescência conhecido por fluorescência acoplada com transferência de energia (FRET) é uma interação fortemente dependente da distância existente entre um fluoróforo que é excitado e transfere sua energia para um segundo fluoróforo que procede a realizar a emissão de fluorescência.

Muitos são os fatores relacionados com o meio químico que exercem influência nas propriedades da fluorescência. Os três mais comuns são:

- Polaridade do solvente (pode-se incluir: meio micelar, interior de regiões de uma célula, proteínas, membranas e outras estruturas biomoleculares);
- Proximidade e concentrações das espécies supressoras;
- pH do meio aquoso.

I.4.4. Supressão da Fluorescência: mecanismo de Stern-Volmer

Os dois processos principais que podem resultar na supressão da fluorescência são: a formação de um complexo (supressão estática), e a supressão por colisão entre o supressor e a molécula fluorescente (supressão dinâmica). Supressões aparentes podem ocorrer devido à propriedade óticas da amostra como, por exemplo, alta densidade ótica ou turbidez, fatores estes que podem resultar no decréscimo da fluorescência, sendo que este tipo de supressão não produz informações moleculares. No caso de supressão dinâmica o supressor extingue a fluorescência durante o tempo de vida do estado excitado. Após o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem emissão de um fóton (Lakowicz, 1983).

A supressão dinâmica é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (3)$$

Nesta equação F_0 e F são a intensidade da fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente.

K_q é a constante bimolecular.

τ_0 é o tempo de vida da fluorescência na ausência do supressor.

$[Q]$ é a concentração do supressor.

K_D é a constante de supressão de Stern-Volmer.

Os dados de supressão são freqüentemente apresentados em um gráfico de F_0/F versus $[Q]$, onde se espera uma dependência linear em função da concentração do supressor. O gráfico de F_0/F versus $[Q]$ deve ter um coeficiente linear 1 e um coeficiente angular que corresponde a K_D (Lakowicz, 1983).

I.4.4. Supressão estática da fluorescência

No caso da supressão estática o fluoróforo e o supressor formam um complexo não fluorescente. Em qualquer evento o fluoróforo e o supressor devem estar em contato em um único meio. Este é um pré-requisito, que resulta em numerosas aplicações da supressão da fluorescência. Por exemplo, as medidas de supressão podem prever a acessibilidade do fluoróforo para o supressor. Quando um solvente é muito viscoso a difusão é lenta e a supressão é inibida. Conseqüentemente a supressão pode revelar a razão da difusão dos supressores. Quando um fluoróforo está ligado a uma proteína ou uma membrana que é impermeável ao supressor e, estando o fluoróforo localizado no interior da macromolécula, nem supressão dinâmica nem estática poderão ocorrer. Assim, o estudo da supressão pode ser usado para revelar a localização do fluoróforo na proteína ou a permeabilidade da membrana para com o supressor (Lakowicz, 1983)

As supressões de fluorescência podem ocorrer como um resultado da formação de um complexo não fluorescente entre a molécula fluorescente e o supressor. Quando este complexo absorve luz ele imediatamente retorna ao estado fundamental mais baixo sem emissão de um fóton (Lakowicz, 1983).

A dependência da intensidade da fluorescência em relação à concentração do supressor é facilmente derivada pela consideração da constante de associação para a formação do complexo. Esta constante é dada pela equação:

$$K_s = [F-Q]/[F][Q] \quad (4)$$

Onde [F-Q] é a concentração do complexo e [F] é a concentração da molécula fluorescente não complexada. Quando as espécies complexadas não são fluorescentes, a fração da fluorescência remanescente (F/F_0) é dada então pela fração dos fluoróforos totais que não estão complexados [F]. A concentração total do fluoróforo [F] está representada por:

$$[F]_0 = [F] + [F-Q] \quad (5)$$

Substituindo-se na equação (1) tem-se:

$$K_s = [F]_0 - [F]/[F][Q] = [F]_0/[F][Q] - 1/[Q] \quad (6)$$

Ainda, pode-se substituir as concentrações do fluoróforo com as intensidades e re-arranjando a equação (3) tem-se:

$$F_0/F = 1 + K_s[Q] \quad (7)$$

A dependência do F_0/F em relação à [Q] é idêntica à observada para a supressão dinâmica, exceto que a constante de supressão é agora uma constante de associação.

Os resultados da supressão da fluorescência podem resultar de uma variedade de processos dinâmicos ou estáticos, sendo que os tempos de vida, a dependência da temperatura e a viscosidade do meio, podem ser usados para distinguir entre estes dois tipos de supressão, isto é, estática ou dinâmica. Em geral, a supressão dinâmica depende da difusão e em temperaturas mais elevadas resulta em coeficientes de difusão maiores. Também, as constantes bimoleculares aumentam em temperaturas crescentes e, em contraste, um aumento da temperatura provoca uma diminuição de estabilidade dos

complexos e, desta forma observa-se que para o caso da supressão estática o resultado será apresentar coeficientes de difusão menores (Lakowicz, 1983).

A continuação apresenta-se uma breve introdução descrevendo aspectos da utilização de surfactantes em Química Analítica, especialmente em relação a métodos diretos, evitando extrações.

I.5. Surfactantes: Emprego de ambientes micelares em Química Analítica

Inicialmente define-se surfactante como sendo moléculas anfífilas onde um grupo polar unido a uma cauda não polar longa, agrega-se em solução e proporciona regiões diferenciadas, isto é, hidrofílicas e hidrofóbicas (Hinze *et al.*, 1979, 2005).

Nas últimas décadas, o uso de surfactantes teve um aumento significativo em praticamente todos os campos da Química Analítica devido, principalmente, à sua capacidade em modificar algumas propriedades reacionais com conseqüente melhoria em sensibilidade e/ou seletividade analítica e, os principais efeitos dos surfactantes estão relacionados à formação de ambientes organizados, conhecidos como ambientes micelares.

Os surfactantes são frequentemente empregados para solubilizar espécies de baixa solubilidade ou promover um novo meio que pode modificar a velocidade, posição de equilíbrio ou estereoquímica das reações químicas. Pode-se destacar o emprego de ambientes micelares principalmente sob dois aspectos: i) exploração das características do ambiente micelar, para uma melhoria da sensibilidade e/ou seletividade, com ênfase a reações catalíticas; e ii) etapas de concentração e/ou separação, de compostos inorgânicos e orgânicos, empregando surfactantes em substituição às metodologias como extração líquido-líquido e troca iônica (Pelizzetti & Pramauro, 1985; Quina & Hinze, 1999).

Um surfactante típico possui uma estrutura R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto variando de 8 –18 átomos (normalmente linear) e X é o grupo cabeça, polar (ou iônico). Dependendo de X, os surfactantes podem ser classificados como não-iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros. Um surfactante iônico possui em geral a fórmula $R_nX^+Y^-$, onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento capaz de formar uma estrutura iônica e Y é um contra íon. Dentre os surfactantes aniônicos mais freqüentemente utilizados, estão os sais de ácidos carboxílicos monopróticos com metais alcalinos e, os monoésteres (hidrocarboneto saturado) de ácidos como sulfúrico, sulfônico e

fosfórico. Para os anfóteros (com grupos aniônicos e catiônicos na cabeça), e dependendo do pH da solução e da estrutura, pode prevalecer a espécie aniônica, catiônica ou zwitteriônica. Os surfactantes anfóteros mais comuns incluem N-alquil e C-alquil betaínas e sultaínas como também os fosfolipídeos. Os surfactantes não-iônicos mais comuns são geralmente derivados do polioxietileno e polioxipropileno (com grupos hidrofóbicos como alquil fenol) ainda que derivados de carboidratos estão sendo desenvolvidos. A **Tabela 1** mostra os principais surfactantes empregados para o estabelecimento de métodos analíticos.

Tabela 1. Surfactantes de uso comum em Química Analítica

TIPO	AGENTE SURFACTANTE	FÓRMULA
Catiônico	Brometo de Cetiltrimetil amônio (CTABr)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
Aniônico	Dodecil sulfato de sódio (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
Não Iônico	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100)	$(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_9\text{OH}$

Formação das micelas

As micelas são agregados moleculares de dimensões coloidais, possuindo regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que se associam dinamicamente e espontaneamente em solução aquosa a partir de certa concentração crítica (CMC). Abaixo da CMC, o surfactante está na forma de monômeros, sendo que acima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas (**Figura 5**) (Weest *et al.*, 1992; Porter *et al.*, 1978 e Hinze *et al.*, 1979). Em concentrações acima da CMC, as micelas possuem um diâmetro entre 3-6 nm e são formadas por um número de 30-200 monômeros. O número de moléculas de surfactantes que formam uma micela é denominado como o número de agregação N (Bunton *et al.*, 1991). A CMC depende da estrutura do surfactante (grupo de cabeça e

tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais especialmente força iônica, natureza do contra-íon e temperatura (Hinze *et al.*, 1979; 2005). O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentração, e pode ser detectado pela variação brusca em propriedades físico-químicas da solução (tensão superficial, pressão osmótica e condutividade) em função da concentração do surfactante (Elworthy *et al.*, 1968).

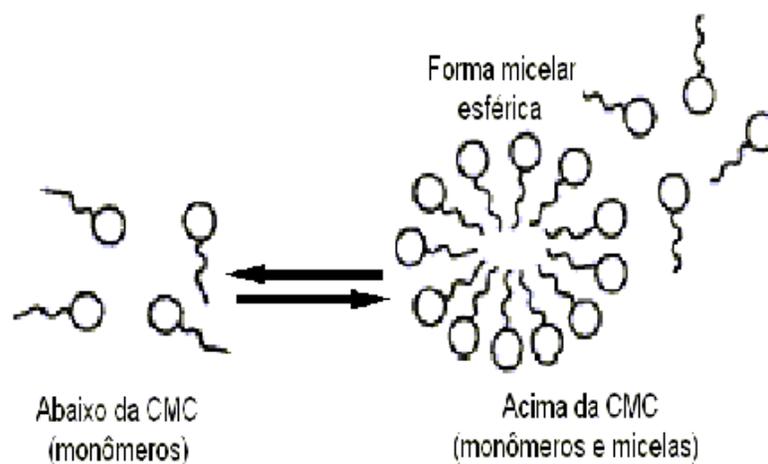


Figura 5. Formação do agregado micelar (Fendler & Fendler, 1975; Maniasso, 2001)

As micelas não são estáticas, elas existem dentro de uma dinâmica de equilíbrio, simplesmente como um agregado dinâmico. Esses agregados podem participar de numerosas reações nas quais a solubilização de um ou mais reagentes na micela leva a uma significativa alteração na cinética reacional. A solubilização introduz duas novas situações que podem influenciar a velocidade reacional, alterar o local de distribuição do soluto e da superfície.

Cada micela possui o número de agregação que rege geralmente o tamanho e a geometria do sistema micelar. O termo “micela normal” é utilizado para se referir a agregados de tensoativos em meio aquoso, o qual é apresentado na **Figura 6**.

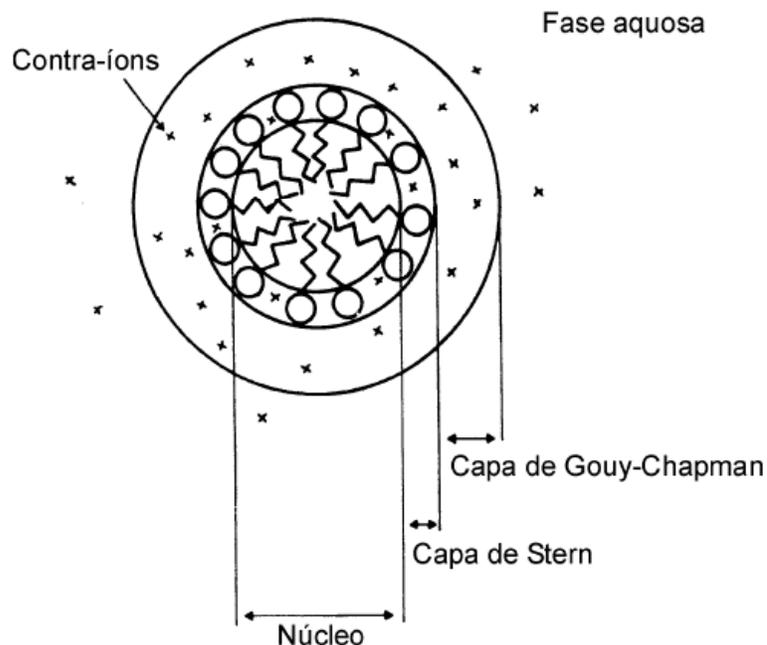


Figura 6. Representação bidimensional das regiões que formam uma micela iônica normal com estrutura esférica, de acordo com o modelo de Stigter (Fendler & Fendler, 1975; Maniasso, 2001)

Na estrutura da micela normal o grupo cabeça hidrofílico está direcionado para o contato com a solução aquosa formando uma superfície polar, enquanto que a cadeia de hidrocarboneto (cauda) está em sentido inverso ao da água, formando um núcleo central não polar (Rosen *et al.*, 1978). A formação do agregado micelar pode também ocorrer em vários solventes não-polares; neste caso, os agregados dos surfactantes são denominados “micelas reversas” ou “micelas invertidas”. Nos sistemas de micelas reversas, as cabeças polares dos anfifílicos estão concentradas no interior do agregado e por essa razão formam um núcleo central hidrofílico (Maniasso, 2000).

Moléculas fluorescentes têm sido muito empregadas no estudo de micro-ambientes micelares. Os resultados encontrados demonstram que a intensidade da fluorescência é drasticamente afetada na presença de micelas, fato que indica fortemente sua aplicação em Química Analítica, a qual será apresentada a continuação (Turro *et al.*, 1980; Fendler *et al.*, 1982; Bunton *et al.*, 1991, Hinze *et al.*, 1979; 2005).

I.6. Fluorimetria em meio Micelar

Um fator crucial em todas as aplicações bem sucedidas de micelas encontra-se na habilidade dos solutos em associar-se e ligar-se com o conjunto micelar. A natureza e comprimento da cadeia carbônica do soluto e a carga do surfactante determinam as interações eletrostáticas possíveis entre o soluto e o meio micelar (Hinze *et al.*, 1979). Conseqüentemente, as micelas exibem propriedades que permitem a solubilização e compartimentalização de reagentes e solutos, o que deve facilitar medidas analíticas usando a fluorescência. As principais vantagens potenciais das micelas aplicadas a fluorimetria que devem ser destacadas são: maior sensibilidade; diminuição de interferências; as micelas são opticamente transparentes, estáveis, fotoquimicamente inativas, baratas e relativamente não tóxicas.

Assim, pela escolha adequada do surfactante, pode-se utilizar uma propriedade micelar particular a fim de realçar as medidas da fluorescência (Fendler *et al.*, 1982).

Em muitos exemplos atribuídos (Turro *et al.*, 1980; Fendler *et al.*, 1982; Bunton *et al.*, 1991), a intensidade da fluorescência é drasticamente aumentada quando a sonda se encontra compartimentalizada em um conjunto de micelas. Os fatores responsáveis por este aumento da fluorescência são:

- A proteção da supressão vibracional de hidrogênios ligados a estrutura da água;
- Ao aumento da viscosidade local;
- A diminuição da supressão pelo oxigênio e;
- A redução da acessibilidade de supressores presentes no solvente.

O efeito resultante é que as micelas possuem recursos para a proteção do estado excitado singlete, de modo que, o processo radiativo pode, desta forma competir favoravelmente com os processos de desativação da fluorescência

I.7. Sondas fluorescentes

Todos os compostos orgânicos absorvem radiação em alguma extensão, porém a maioria absorve na região do UV, abaixo de 350 nm e então, não possuem cor. Determinadas moléculas como hidrocarbonetos poliaromáticos ou heterocíclicos, são

denominados fluoróforos ou corantes fluorescentes. Estas substâncias, as quais possuem em geral sistemas conjugados e/ou aromáticos, em geral, possuem uma significativa fluorescência.

Uma sonda fluorescente é um fluoróforo que está preparado para responder a um estímulo específico ou localizar uma determinada região em uma espécie biológica. De fato, as sondas fluorescentes permitem detectar componentes particulares de arranjos biomoleculares complexos, incluindo células vivas, com requintada sensibilidade e seletividade. As principais vantagens do emprego de sondas conjugadas à técnica de fluorescência são: (a) a sensibilidade, quantidade de picogramas em materiais fluorescentes pode ser freqüentemente estudada, (b) seletividade, derivada em parte dos dois comprimentos de onda característicos (excitação e emissão de fluorescência) de cada composto e, (c) da variedade de possibilidades em que as amostras podem ser rapidamente estudadas, ou seja, em soluções diluídas ou concentradas, em suspensões (meio micelar) ou em superfícies de sólidos.

Uma das principais características de alguns dos compostos utilizados como sondas é que o espectro fluorescente pode ser fortemente dependente do solvente. Esta característica é a mais freqüentemente observada com fluoróforos que possuem um momento de dipolo elevado no estado excitado, resultando em um espectro de fluorescência que é deslocado para comprimentos de onda maiores em solventes polares. Fluoróforos representativos incluem os aminonaftalenos tais como: prodan, badan e o dansil, as quais são sondas efetivas em um meio polar, por exemplo, um interior de uma proteína (Lakowicz, 1983).

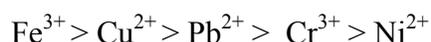
A partir do descrito acima, o presente estudo, aplica-se em pesquisar compostos orgânicos com possibilidades de virem a ser empregados como sondas para determinação de metais e ânions de interesse no estudo de sistemas aquosos naturais, mas que também possam ser de aplicação geral.

1.8. Enfoque do Presente Trabalho

Com relação ao enfoque do presente trabalho, cabe informar que, o mesmo se enquadra dentro dos estudos realizados pelo grupo LACFI-203 que vem trabalhando na determinação de íons metálicos de interesse da química de sistemas naturais. Recentemente

foi descrito que vários íons metálicos podem ser quantificados utilizando a supressão da fluorescência do naftaleno em soluções aquosas na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) (Vargas *et al.*, 2005). Observa-se que o fenômeno de supressão de fluorescência é adequadamente descrito pela equação de Stern-Volmer e na presença de micelas, as constantes aparentes de Stern-Volmer em meio micelar são geralmente duas ou três ordens de magnitude superiores que aquelas quantificadas na ausência de surfactantes.

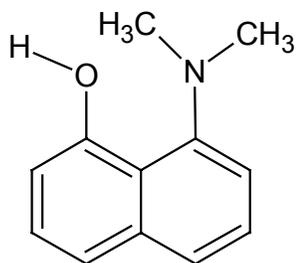
Cabe destacar que, o trabalho apresentado por Vargas *et al.* (2005) descreve o efeito de uma variedade de íons metálicos e paramagnéticos (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} e Ni^{2+}) como supressores da fluorescência do naftaleno em soluções aquosas na presença de SDS, sendo que este efeito não foi observado para o caso dos íons diamagnéticos estudados (Sr^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}). Este fato pode ser atribuído a maior eficiência dos mesmos em realizarem o acoplamento spin-órbita ($S \rightarrow T$) suprimindo a fluorescência do naftaleno e chegando desta forma ao estado fundamental. Também neste trabalho foi proposto uma ordem de decréscimo das constantes aparentes de Stern-Volmer como:



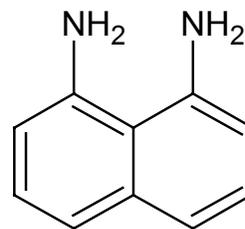
O grupo LACFI-203 também tem trabalhado para descrever a determinação dos elementos metálicos Zn^{2+} e Cd^{2+} e terras raras, utilizando surfactantes e a 8-hidroxiquinolina (8-HOQ). O efeito do realce da fluorescência apresentado pelos íons Zn^{2+} e Cd^{2+} mostra uma relação linear que pode ser utilizada adequadamente para a quantificação destes íons metálicos (Sapelli, 2006). No caso do espectro da luminescência do Er^{3+} , a incorporação do lantanídeo na b-ciclodextrina, provoca o realce da fluorescência que pode ser utilizado para fins analíticos e para o espectro da luminescência do Tb^{3+} , a incorporação do lantanídeo na β -ciclodextrina, provoca o apagamento da fluorescência (Vargas *et al.*, 2005).

Dando continuidade a estes estudos, testa-se uma variedade de sondas que podem ser utilizadas como uma metodologia analítica de aplicação geral. Entre os compostos selecionados para estudo estão o naftaleno e derivados comumente utilizados como sondas fluorescentes, assim como a 8-hidroxiquinolina (8-QOH) e alguns dos seus derivados (8-quinolinil fosfato, 8-QP e 8-quinolinil sulfato, 8-QS). Cabe salientar que, durante a síntese destes derivados da 8-HOQ, a precipitação na forma cristalina deve-se a formação do sal zwitteriônico onde, no caso do 8-quinolinil fosfato, o nitrogênio encontra-se protonado e o

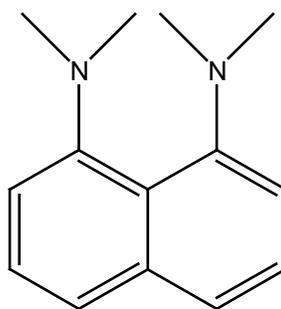
grupo fosfato como monoânion. Um efeito semelhante é observado para o 8-quinolinil sulfato. Na **Figura 7** estão representadas as estruturas dos mesmos, bem como de outros fluoróforos que foram estudados no presente trabalho.



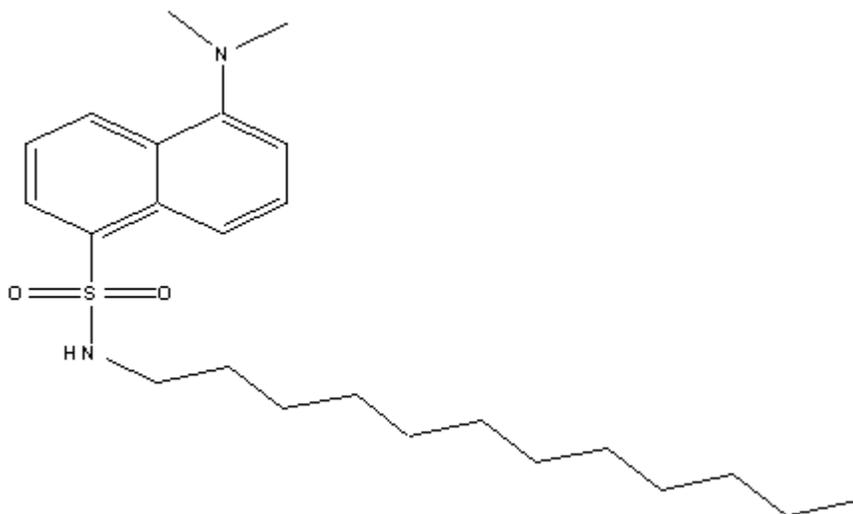
8-dimetilamino-1-naftol (DANOL)



1,8-diaminonaphthaleno (DN)



1,8-bis(dimetilamino)-naftaleno (BDAN)



1-N,N-dimetilamino Naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida (DNSS)

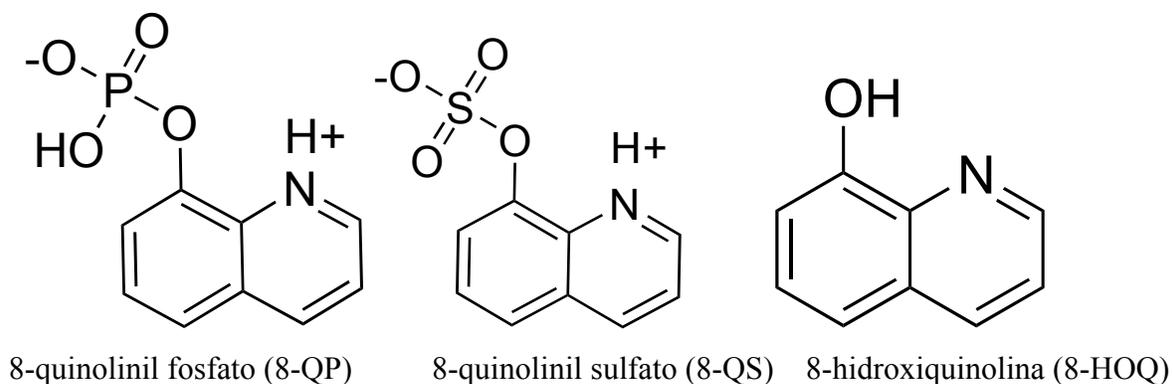


Figura 7. Sondas fluorescentes utilizadas no presente estudo.

Para o caso particular das sondas 8-dimetilamino-1-naftol (DANOL), 1-N,N-dimetilamino Naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida (DNSS) e 1,8-diaminonaftaleno (DN) observa-se que oferecem em sua estrutura (**Figura 7**) a possibilidade de ocorrer o efeito conhecido como “esponja de prótons”, esse efeito é propiciado pela estrutura da molécula que permite que os lóbulos onde encontram-se pares de elétrons livres fiquem voltados um para o outro funcionando como uma espécie de garra. No presente estudo observa-se que este efeito pode ser bastante interessante na determinação de elementos como o Be(II) considerando o seu raio iônico e a similaridade como o íon hidrogênio.

I.9. Porque o interesse na determinação de cátions metálicos e anions como ClO₂⁻ e BrO₃⁻

O crescimento demográfico e as atividades econômicas desenvolvidas vêm progressivamente aumentando a diversidade e quantidade de substâncias tóxicas de origem antropogênica liberadas ao meio ambiente. Destacam-se esgotos domésticos e industriais, despejados à rede pluvial sem tratamento prévio, depósitos de lixo, queimadas sem controle, assim como a emissão à atmosfera de gases nocivos e materiais particulados. Em particular, a difusão rápida dos metais contaminantes exige uma especial atenção à determinação desses para mantermos o controle sobre a contaminação (Locatelli et al., 2000).

Outra fonte de metais está nos minérios, que são levados pela corrente dos rios até o oceano, contribuindo para a elevação dos níveis destes no ambiente. Em alguns ecossistemas de água doce a poluição se caracteriza unicamente por precipitações atmosféricas e é naturalmente redistribuído para todo o sistema aquático. A distribuição de metais entre água, biota e sedimento nos sistemas aquáticos revela o estado de contaminação do sistema. (Nimis et al., 2002)

Não é difícil reconhecer a importância dos metais na atividade humana e no processo de evolução e crescimento das civilizações nos diferentes períodos históricos. Um grande número de objetos de uso diário são elaborados a partir de metais, tais como, ferro, chumbo, zinco, níquel e outros. Estes fazem parte da história da humanidade há milhares de anos, e apesar dos esforços nas últimas décadas na produção de materiais sintéticos que possam substituí-los, tais como os plásticos, os metais continuam imprescindíveis para a manufatura de produtos em geral (Castro et al., 2000).

Os metais pesados apresentam-se como poluentes bastante devastadores. São introduzidos na água a partir de resíduos de atividades industriais provenientes de diversas indústrias que envolvem produtos e atividades tais como: papel, petroquímica, cloro e potássio, fertilizantes, siderurgias, metais não-ferrosos, veículos automotores e aviões, vidro, cerâmica, cimento, têxtil, curtumes, termoelétricas e outras. (Arana et al., 1997)

Elevados níveis de íons metálicos no ambiente aquático, tendem a se concentrar em todas as matrizes (matéria suspensa, sedimento e biota), resultando em uma presença definitiva na cadeia alimentar, envolvendo os seres humanos, como consequência do consumo dos produtos marinhos. (Locatelli et al., 2001)

Quando o interesse é avaliar o potencial tóxico de uma determinada substância perigosa para a saúde humana ou para o meio ambiente, uma das primeiras informações necessárias é avaliar como e quando estas substâncias, que no presente caso seriam as espécies metálicas, estariam bio-disponíveis.

Muitos elementos metálicos são essenciais às funções bioquímicas e fisiológicas. Estes elementos participam em funções necessárias para a vida e são compartimentalizados dentro das células vivas. Essa compartimentalização pode ser em nível sub-celular ou macromolecular, podendo os organismos vivos selecionar, transportar e compartimentalizar aqueles elementos que atuam decisivamente nos processos de oxidação, redução, catálise e

estruturação, enquanto se protegem das interações biologicamente tóxicas (Santos et al., 1992).

Os metais considerados essenciais ao homem, embora possam também ser considerados tóxicos quando presentes em grandes quantidades são regulados por processos metabólicos que os mantêm em níveis adequados de equilíbrio nos animais e no homem. Como exemplo, o ferro presente na hemoglobina do sangue é responsável pelo transporte de oxigênio. Ressaltando, um determinado elemento pode ser essencial, terapêutico, tóxico e/ou carcinogênico dependendo da sua concentração e da sua forma química (Castro et al., 2000 e Santos et al., 1992).

O mecanismo de toxicidade dos metais envolve freqüentemente a competição destes metais por sítios ativos normalmente ocupados por outros metais, que por sua vez fazem parte de moléculas de função essencial, como exemplo as enzimas (Larini et al., 1987 e Klaassen et al., 1987). Muitos desses metais são cumulativos, pelo fato dos organismos vivos não eliminá-los com facilidade depois de absorvidos, provocando assim, uma serie de complicações (Claudino et al., 2003).

Especificamente com relação ao Be(II), este apresenta características peculiares devido ao seu tamanho bastante pequeno, o que acaba por facilitar que o mesmo percorra os canais de sódio e potássio atravessando a membrana celular e uma vez dentro da célula poderá causar danos irreversíveis, como por exemplo mutações genéticas. Os principais problemas conhecidos por contaminação de berílio estão relacionados a problemas cutâneos e do trato respiratório.

As principais fontes de contaminação devem-se ao seu emprego na área nuclear, aeroespacial e em industrias eletrônicas, que produzem uma quantidade considerável de resíduos provenientes dos processos aos quais o berílio foi aplicado.

Os ânions clorito e bromato são encontrados como resíduos em águas, devido aos compostos que são utilizados para o tratamento da mesma. São eles, na verdade, subprodutos das reações que acontecem durante o tratamento da água. A vigilância sanitária que controla a qualidade das águas possui normas específicas que ditam a quantidade máxima que tais anions podem ser tolerados na água. A concentração máxima permitida fica em torno de 0,025 mg/L para o bromato e 0,2 mg/L para o caso do clorito.

A presença destes ânions no organismo humano torna-se prejudicial devido ao grande poder oxidativo dos mesmos, acarretando uma serie de dificuldades ao organismo.

II – Objetivos

No presente trabalho, o objetivo principal é verificar a possibilidade de desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas na fluorescência que possam vir a ser utilizadas acopladas a cromatografia líquida e análise em fluxo, sendo a última utilizada como técnica de separação enquanto a primeira é utilizada como técnica de detecção para espécies metálicas de interesse biológico ou ambiental.

Esse trabalho está inserido dentro do objetivo geral do grupo de trabalho, que é desenvolver metodologias analíticas para determinar elementos metálicos, não-metálicos e ânions de interesse ambiental, bem como caracterizar de forma cinética e termodinâmica os processos químicos de equilíbrio de adsorção de metais e não-metais normalmente detectados em amostras de diferentes fases geoquímicas dos sedimentos. Com base no conhecimento adquirido, pretende-se aprimorar o modelo teórico desenvolvido pelo grupo do laboratório de catálise e fenômenos interfaciais (Nome *et al.*, 2001; Fritzen *et al.*, 2005; Westrup *et al.*, 2005).

II.1. Objetivos específicos

Os objetivos principais deste trabalho são:

- Estudar compostos orgânicos como: 8-dimetilamino-1-naftol (DANOL), 1-N,N-dimetilamino Naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida (DNSS), 8-quinolinil sulfato (8-QS), 8-quinolinil fosfato (8-QP) e a 8-hidroxiquinolina que apresentam possibilidades de serem utilizados como sondas fluorescentes na determinação de íons metálicos, principalmente Be(II).
- Verificar os parâmetros físico-químicos tais como aumento do rendimento quântico, oferecidos pela utilização do ambiente micelar em prol da otimização de metodologia analítica de fluorescência em presença de íons como Be(II), Cu(II), Pb(II) e Fe(III) .
- Desenvolver metodologia analítica para estudos relacionados principalmente com os íons Be(II), Cu(II), Pb(II) e Fe(III), estabelecendo uma metodologia de análise de soluções de composição conhecida, utilizando a espectroscopia de fluorescência.

III. Parte Experimental

III.1. Equipamentos

Para realização das medidas de fluorescência foi utilizado um espectrofluorímetro modelo SLM Aminco[®] SPF- 500 C, conectado a um espectrômetro USB2000 ligado a um PC com o programa Ocean Optics OOI Base 32. As cubetas usadas são de quartzo ou de acrílico, de 1,0 cm. Os experimentos realizados para a 8-hidroquinolina foram efetuados no aparelho, Cary Eclipse, Varian[®] equipado com o software correspondente. As medidas espectrofotométricas foram realizadas usando um espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu[®] modelo UV-210-A e um espectrofotômetro Cary 50, Varian[®], equipado com o software correspondente.

Um pHmetro Metrohm modelo 713 foi utilizado para as determinações de pH das soluções-tampão. Um sistema desionizador Milli-Q NANOpure, modelo D 4744 (Millipore[®]) com condutividade máxima de $17 \mu\Omega \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para obtenção da água necessária para a preparação das soluções, reagentes e para lavagem final de todas as vidrarias utilizadas.

Uma capela de fluxo laminar, marca TROX[®], foi utilizada para preparar todas as soluções-padrão e reagentes utilizados neste trabalho. O ambiente controlado foi classificado como classe 100 (100 partículas por pé cúbico). Esta classificação foi realizada pelo Núcleo de Manutenção da UFSC, credenciado pelo IMETRO, com aparelho de contagem de partículas tipo: MEI-ONE 277-B calibrado pela Instrutécnica, S.P. Foram utilizadas micropipetas Gilson[®] com capacidade de 1,0, 0,25 e 0,1 mL.

III.2. Limpeza da vidraria

O método utilizado para limpeza das vidrarias é conhecido como lavagem de arraste e, consiste primeiramente na lavagem da vidraria com forte corrente de água, deixando a água da torneira transbordar ao encher os recipientes. Tal procedimento é repetido no mínimo cinco vezes. Em seguida, a vidraria é imersa em ácido nítrico 40% por 24 horas e

após este tempo, é novamente enxaguada com água destilada e desionizada até retirar todo o ácido (no mínimo quatro vezes deixando transbordar).

III.3. Soluções e reagente utilizados

Os reagentes utilizados foram: 1-N,N-dimetilamino Naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida, 8-quinolinil sulfato, 8-quinolinil fosfato, 8-dimetilamino-1-naftol, todos sintetizados no laboratório LACFI-210 e, 8-Hidroxiquinolina (Fluka), tris hidroximetil amino metano p.a. (Vetec), etanol (F. MAIA), ácido clorídrico p.a. (Carlos Erba), hidróxido de sódio p.a. (Vetec), cádmio em pó (Vetec), padrão de zinco (Fluka), ácido nítrico (Suprapur-Merck). Os surfactantes utilizados foram: dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) e brometo de cetil trimetil amônio (CTABr, Aldrich). Padrões de: berílio (Acros Organics), chumbo (Tritisol-Merck), ferro (Vetec), cobre (Fluka), magnésio (Vetec), sódio (Vetec), rubídio (Aldrich), cálcio (Vetec), alumínio (Vetec) e níquel (Vetec).

Síntese de 1-N,N-dimetilamino Naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida (DNSS): Uma solução de cloreto de dansila (0,4 g, $1,48 \times 10^{-3}$ mols) em 15 mL de diclorometano foi adicionada gota a gota por 45 min sobre uma solução refrigerada (banho de gelo) de dodecilamina (0,252 mL, $1,2 \times 10^{-3}$ mols) com trietilamina (0,300 mL, $4,41 \times 10^{-3}$ mols). A mistura foi deixada reagir sob agitação por 2 horas, em temperatura ambiente.

Após, foi misturado 20 mL de água e o pH foi acertado para 5,00 com HCl. A fase orgânica foi separada em funil de separação e rota evaporada. O óleo amarelado obtido apresentou duas manchas em Cromatografia de Camada Delgada, CCD, quando eluídas com diclorometano, uma com $R_f = 0,66$ correspondente ao cloreto de dansila e outra que apresenta fluorescência mais intensa com $R_f = 0,48$. Então foram separados os dois compostos por coluna de sílica gel, utilizando o solvente hexano/diclorometano (85:15) se elimina o cloreto de dansila e com hexano/diclorometano (10:90) se retira o produto. Após, foi adicionado HCl para levar a pH 0, o solvente foi evaporado e a amostra seca numa pistola de secagem. O ponto de fusão determinado foi 132,5-135,0 ° C. O rendimento obtido foi de 0,424 g ou seja 82,75 %. O RMN 400 MHz não permite detectar nenhuma impureza. $^1\text{H NMR}$ 400Hz (CDCl_3) δ 0,87 (t, 3 H), δ 1,21 (m, 14 H), δ 1,52 (m, 2H), δ 2,99

(m, 2H), δ 3,42 (s, 6H), δ 5,92 (m, 1H), δ 7,63 (m, 1H), δ 7,71-7,75 (m, 2H), δ 8,22 (d, 1H), δ 8,71 (d, 1H) e δ 9,21 (d, 1H).

Síntese do 8-quinolinil fosfato (8-QP): Uma solução de 8-quinolinol (500 mg, $3,45 \times 10^{-3}$ mols) em CHCl_3 (15 mL) foi gotejada lentamente sobre uma solução de PCl_5 (718 mg, 3,45 mmols) em CHCl_3 (15 mL) sob banho de gelo. A mistura foi agitada por uma hora, em seguida foi adicionado excesso de água (0,25 mL) e deixado reagir por mais 12 horas à temperatura ambiente. Então, o solvente foi removido utilizando um evaporador rotatório obtendo-se um óleo levemente amarelo, o qual com adição de acetona (20 mL) e água (5 mL) levou à formação de cristais esbranquiçados que foram lavados com acetona para render diretamente o produto puro (rendimento de 40 %): ^{31}P NMR (D_2O , pH 2,15) δ 0,63 ppm; ^1H NMR (D_2O , pH 2,15) δ 7,86 (dd, $J_{56} = 6,7$ Hz e $J_{67} = 7,8$ Hz, H-6), δ 7,96 (d, H-5 e H-7), δ 8,08 (dd, $J_{23} = 7,1$ Hz e $J_{34} = 5,6$ Hz, H-3), δ 9,09 (d, $J_{34} = 5,6$ Hz, H-4) e δ 9,12 ppm (d, $J_{23} = 7,1$ Hz, H-2).

Síntese do 8-quinolinil sulfato (8-QS): Uma solução de CHCl_3 (12 mL) com N,N-dimetilanilina (2,9 mL, 23 mmol) foi misturada com uma solução de ClSO_3H (0,62 mL, 9,2 mmol) em CHCl_3 (2 mL) com agitação e abaixo de 5°C . Para a mistura, uma solução de 8-hidroxiquinolinolona (1,00g, 6,9 mmol) em CHCl_3 (6 mL) foi adicionada e a mistura foi agitada por mais uma hora a 0°C . Após permanecer “overnight” a temperatura ambiente, um precipitado cristalino formou-se, o qual foi coletado e recristalizado em água que resultou num sólido levemente amarelo. O ponto de fusão determinado foi de $159\text{-}162^\circ\text{C}$. O cristal foi seco em um chemdry sob vácuo e 60°C por 2 horas. O rendimento foi de 1,15g (74%). O método foi descrito por Nagasawa & Yoshidome (1974). O espectro de ^1H NMR (D_2O) fornece δ 9,15 (d, 1H), δ 9,10 (d, 1H), δ 8,10 (m, 3H), δ 7,93 (t, 1H).

Síntese do 8-dimetilamino naftol (DANOL): O reagente fluorescente DANOL foi preparado a partir de 8-lítio-1-N,N-dimetilaminonaftaleno, segundo a síntese descrita por Kirby & Percy em 1988.

Solução Estoque de Sonda DNSS (1×10^{-3} mol/L): Uma massa de DNSS correspondente a 0,0240 g foi dissolvida em 45 mL de SDS na concentração de 1×10^{-2} mol/L sob forte aquecimento e em constante agitação magnética. Para auxiliar a total dissolução foi adicionada a esta solução, 0,06 mol/L de HCL. O volume foi levado a 50 mL, completado com a solução de SDS (1×10^{-2} mol/L).

Solução Estoque de sonda DANOL (1×10^{-3} mol/L): Uma massa de DANOL correspondente a 0,0058g foi dissolvida em 25 mL de etanol (álcool etílico padrão espectroscópico) sob agitação.

Solução Estoque de sonda 8-QP (1×10^{-3} mol/L): Uma massa de 8-QP correspondente a 0,0056g foi dissolvida em 25 mL de água destilada / desionizada e foi deixada durante 30 minutos no banho ultrassônico.

Solução Estoque de sonda 8-QS (1×10^{-3} mol/L): Uma massa de 8-QS correspondente a 0,0023g foi dissolvida em 10 mL de água desionizada e foi deixada durante 30 minutos no banho ultrassônico.

Solução Estoque de sonda 8-HOQ (1×10^{-2} mol/L): Uma massa de 8-HOQ correspondente a 0,0772g foi dissolvida em 50 mL de álcool etílico espectroscópico e foi deixada solubilizar sob agitação.

Solução estoque de tampão Tris $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹/CTABr(0,01mol/L): Foi dissolvido 0,242g de tris hidroximetil amino metano e 3,6446g de CTABr em um béquer de 100 mL com água desionizada até total dissolução, na seqüência foi transferido para um balão de 100 mL onde foi completado o volume com água destilada / desionizada.

Solução estoque de Be(II): Padrão para absorção atômica em 2% de HCl, 1 mg/mL (100mL, Acros Organics).

Solução estoque de Rb(I): Padrão para absorção atômica contendo 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Rb em 1% de HCl, destilada / densidade 1,000 (Aldrich Chemical).

Solução estoque de Cu(II): Padrão para absorção atômica contendo 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Cu em 1% de HCl (Fluka).

Solução estoque de Pb(II): Foi transferido 20 mL de ácido nítrico (Suprapur-Merck/65%) para um balão de 1000 mL. Foi adicionado o conteúdo de uma ampola com o padrão 1000 mg/L de Pb(II) (Tritisol-Merck) e completado o volume com água destilada / desionizada.

Solução estoque de Cd(II), Al(III), Fe(III), Ni(II), Ca(II): Foi pesada a massa correspondente a cada metal (pureza 99,99 %) para uma concentração de 1000 mg. L^{-1} . Após foi adicionado 20 mL de ácido nítrico 65% (Suprapur-Merck) e foi aquecido levemente até a dissolução do metal. Após, foi transferido para um balão de 1000 mL e completado o volume com água destilada / desionizada.

Solução estoque de Zn(II): Foi transferido 20 mL de ácido nítrico (Suprapur-Merck) para um balão de 1000 mL. Foi adicionado o conteúdo de uma ampola com o padrão 1000 mg/L de Zn(II) (Tritisol-Merck) e completado o volume com água destilada / desionizada.

SDS 4×10^{-2} mol/L: Foi dissolvido 1,153 g de Dodecil Sulfato de Sódio em 250 mL de água destilada / desionizada.

TRITON X-100: Foi dissolvido 0,647g de polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100) em um béquer de 100 mL com água desionizada até total dissolução, na seqüência foi transferido para um balão de 100 mL onde foi completado o volume com água destilada / desionizada.

Solução estoque de tampão Tris $2,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} : Foi dissolvido 0,6057g de tris hidroximetil amino metano em um béquer de 100 mL com água desionizada até total dissolução, na seqüência foi transferido para um balão de 250 mL onde foi completado o volume com água destilada / desionizada.

Hidróxido de sódio 3 mol/L: Foi pesado, em uma balança analítica, cerca de 12 g de hidróxido de sódio p.a. em um béquer de 250 mL. Foi dissolvido na capela e em um banho de gelo. Após a solução esfriar foi completado o volume para 100 mL com água destilada/desionizada em um balão volumétrico e, foi guardado em frasco de polietileno.

Tampão de acetato: Foi pipetado, aproximadamente 280 mL de ácido acético glacial, e colocado em um béquer de 100 mL (este já deve conter um pouco de água desionizada ao fundo). Foi completado o volume para cerca de 90% do volume final. Sob agitação foi ajustado o pH com a adição de hidróxido de sódio até o valor de 5,00 unidades de pH. Foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e completado com água destilada / desionizada até o menisco.

Solução de NaClO_2 (1×10^{-1} mol/L): Foi dissolvido 0,0913 g de clorito de sódio (Acros Organic) em 10 mL de água destilada / desionizada.

Solução de NaBrO_3 (1×10^{-1} mol/L): Foi dissolvido 0,1509 g de bromato de sódio (Acros Organic) em 10 mL de água destilada / desionizada.

III.4. Procedimentos Analíticos

III.4.1. Incorporação da sonda no surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS)

Os procedimentos realizados para os estudos de incorporação dos compostos utilizados como sondas DANOL e DNSS, são muito semelhantes, portanto a seguir será descrito apenas o procedimento para o caso da sonda DANOL.

A incorporação do composto 8-dimetilamino naftol (DANOL) em SDS foi realizada fazendo-se variar a concentração de surfactante e mantendo-se constante a concentração de DANOL, segundo o procedimento descrito a seguir.

Etapa 01: foram transferidas alíquotas de 1 mL de DANOL $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L (utilizando uma micropipeta) para os balões de 10 mL.

Etapa 02: foram adicionadas alíquotas de 0 a 7,5 mL (utilizando micropipeta e pipeta volumétrica) de SDS $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$.

Etapa 03: foi completado o volume dos balões com água desionizada, na seqüência foi transferida uma alíquota de aproximadamente 3 mL da solução para uma cubeta.

Etapa 04: no espectrofotômetro Shimadzu 210-A foi feita uma varredura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 320 até 600 nm.

A **Tabela 02** apresenta a sistemática que foi seguida para a realização do experimento.

Tabela 2. Valores experimentais para determinação da constante de equilíbrio de incorporação da sonda à micela de SDS.

Balões de 10 mL	DANOL 1×10^{-3} mol/L	SDS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$	Intensidade de fluorescência
01	1 mL	0,050 mL	1330,3
02	1 mL	0,150 mL	1395,1
03	1 mL	0,250 mL	2413,8
04	1 mL	0,350 mL	2612,5
05	1 mL	0,450 mL	3037,3
06	1 mL	0,500 mL	3769,1
07	1 mL	1,5 mL	3751,3
08	1 mL	2,5 mL	3988,1
09	1 mL	3,5 mL	3844,3
10	1 mL	4,5 mL	3851,3
11	1 mL	5,0 mL	1330,3
12	1 mL	7,5 mL	1395,1

III.4.2. Estudo de fotodegradação da sonda na presença e ausência do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS)

O estudo do efeito da incidência direta de fótons sobre a amostra foi realizado fazendo-se espectros de emissão em diferentes tempos (programação oferecida pelo programa Ocean Optics OOI Base 32).

Para o estudo da sonda DANOL, em um balão de 10 mL foi adicionado tampão ácido acético/hidróxido de sódio na concentração de $0,02 \text{ mol/L}$ à sonda DANOL na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ e ajustado o pH para 2,0. O mesmo procedimento descrito foi realizado para pH 12. Utilizando as mesmas concentrações de tampão e sonda DANOL foram realizados também experimentos na presença de $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ de Be(II) e ainda na presença ou na ausência de $0,05 \text{ mol/L}$ de surfactante SDS, nos pH 2 e 12,0.

Para a sonda DNSS o procedimento foi semelhante, no entanto, cabe ressaltar que foi mantida constante a concentração de sonda DNSS (1×10^{-4} mol/L) e foram utilizadas concentrações de SDS de 1×10^{-3} mol/L e 0,017 mol/L. Para a concentração de SDS 1×10^{-4} mol/L o pH foi ajustado para 5,0. Enquanto que para a concentração de SDS 0,017 mol/L foram ajustados para valores de pH de 5,0; 7,0 e 11,0 unidades.

III.4.3. Procedimentos realizados para a sonda DANOL

III.4.3.1. Determinação do realce da fluorescência na presença de DANOL

Para a determinação do realce da fluorescência do DANOL foi selecionado o metal Be(II), o qual apresenta boa eficiência no realce da fluorescência, o que permite sua quantificação. Também foram testados outros metais como Pb(II), Ca(II) e Mg(II).

A curva de calibração de Be(II) foi preparada a partir de soluções estoques de 1000 ppm ou seja 0,1109 mol/L. Foram preparadas soluções na faixa de concentração de 0 a $5,0 \times 10^{-4}$ e de 0 a 0,01 mol/L de Be(II), para as curva de calibração em concentrações mais elevadas.

Observação 1: como os procedimentos utilizados no estabelecimento das curvas de calibrações foram semelhantes, para todos os procedimentos experimentais dos metais estudados, então apenas será descrito o caso do Be(II).

Inicialmente foram preparadas duas soluções A e B, sendo que a solução A continha a sonda DANOL na concentração de 1×10^{-4} mol/L, tampão ácido acético/hidróxido de sódio na concentração de 0,02 mol/L e, o pH foi ajustado para 2,0. A solução B contém a sonda DANOL na concentração de 1×10^{-4} mol/L, tampão ácido acético/hidróxido de sódio na concentração de 0,02 mol/L e Be(II) na concentração de $2,22 \times 10^{-3}$ mol/L. Para uma outra curva de calibração, com concentrações mais elevadas, foi utilizado 0,022 mol/L de Be(II).

Em uma primeira etapa, foi feita uma varredura no espectrofotômetro Shimadzu 210 A (280 a 700 nm), para verificar o comprimento de onda máximo de absorção, esse dado no espectrofluorimetro é utilizado como o $\lambda_{\text{excitação}}$. Através do espectro obtido com o

programa do fluorímetro tem-se o $\lambda_{\text{emissão}}$, onde foi determinada a intensidade máxima de fluorescência.

A curva de calibração foi obtida a partir de 1mL da solução A (na cubeta) e de acordo com a descrição da **Tabela 3**, apresentada a seguir. Com uma correção do volume pode-se calcular a concentração da espécie que está sendo determinada. A **Tabela 3** mostra, como exemplo o caso do Be(II), porém, a mesma sistemática foi adotada para os casos do Ca(II) e do Pb(II).

Tabela 3. Dados de volume, concentração e intensidade de fluorescência para a curva de calibração do íon Be(II).

Solução B (μL)	Correção do volume	Concentração (ppm)	Concentração em mol/L	Intensidade de fluorescência
0	0	0	0	1548,3
50	1,050	9,52	0,00106	1700,2
150	1,150	18,18	0,00202	1944,1
250	1,250	33,33	0,0037	2078,9
350	1,350	46,15	0,00512	2319,9
450	1,450	57,14	0,00634	2445,5
550	1,550	66,66	0,0074	2403,6
650	1,650	75,00	0,00832	2575,6
750	1,750	82,35	0,00914	2748,1
850	1,850	88,88	0,00986	2770,6
950	1,950	94,73	0,01051	2882,1

N.B. Para que exista uma padronização nas medidas, parâmetros que fazem parte da configuração do programa utilizado pelo espectrofluorímetro, devem ser ajustados antes de serem efetuadas, a saber: “integration time” (It) e o “average”, tendo-se o cuidado de, em todas as amostras, mantê-los constantes durante a realização das determinações.

III.4.4. Procedimentos realizados para a sonda DNSS

III.4.4.1. Determinação do pH ótimo na presença de surfactante SDS

O estudo do pH foi realizado com o surfactante SDS. O experimento foi realizado, variando-se o pH das soluções e mantendo-se constante a concentração de DNSS em 1×10^{-4} mol/L e a concentração de SDS em 0,017 mol/L. As determinações dos espectros de emissão foram realizadas diretamente no espectrofluorímetro, com comprimento de onda de excitação fixo em 316 nm.

III.4.4.2. Determinação do realce e supressão da fluorescência na presença de DNSS

Para a determinação do realce da fluorescência do DNSS foi selecionado o metal Be(II), o qual apresenta boa eficiência no realce da fluorescência, o que permite sua quantificação. Outros metais testados: Pb(II), Ca(II), Mg(II), Zn(II), Rb(I), Cd(II), Al(III), Na(I), Cu(II), Fe(III) e Ni(II), para verificação quanto a eficiência com relação a supressão ou realce da fluorescência do DNSS.

Observação 2: o procedimento a seguir descreve a determinação do realce da fluorescência do DNSS em presença de Be(II), porém, a mesma metodologia foi empregada para os outros íons metálicas listados acima.

Etapa 01: na preparação da solução A, foi adicionado a um balão volumétrico de 25 mL, um volume de 2,5 mL da solução estoque de DNDS (1×10^{-3} mol/L), 10mL da solução de SDS (4×10^{-2} mol/L) e 5 mL de tampão ácido acético/acetato (0,1 mol/L). O pH foi ajustado para 5,0. Posteriormente foi preenchido o volume restante com água deionizada.

Etapa 02: na preparação da solução B, foi adicionado a um balão volumétrico de 25 mL, um volume de 2,5 mL da solução estoque de DNSS (1×10^{-3} mol/L), 10mL da solução de SDS (4×10^{-2} mol/L), 2 mL de padrão de Be(II) (1000 ppm) e 5 mL de tampão ácido acético/acetato (0,1 mol/L), Ajuste de pH para 2,0 unidades (este procedimento foi realizado dentro da capela TROX).

Após o preparo das soluções, foi feita uma varredura no espectrofotômetro Shimadzu 210 A (280 a 700 nm), para verificar o comprimento de onda máximo de absorção e, para o espectrofluorímetro, este dado foi utilizado como o $\lambda_{\text{excitação}}$. Através do espectro obtido com programa do fluorímetro, tem-se o $\lambda_{\text{emissão}}$, onde foi determinada a intensidade máxima de fluorescência.

A curva de calibração foi obtida a partir de 1 mL da solução A (na cubeta) e de acordo com a com a descrição da **Tabela 4**, apresentada a seguir. Com uma correção do volume pode-se calcular a concentração da espécie que está sendo determinada. A **Tabela 4** mostra como exemplo o Be(II), porém, a mesma sistemática foi adotada para todas as outras espécies metálicas em estudo.

Tabela 4. Dados de volume, concentração e intensidade de fluorescência para a curva de calibração do Be(II).

Solução B (μL)	Correção do volume	Concentração (ppm)	Concentração em mol/L	Intensidade de fluorescência
0	0	0	0	544,9
50	1,050	9,52	0,00106	649,9
150	1,150	18,18	0,00202	923,4
250	1,250	33,33	0,0037	1235,5
350	1,350	46,15	0,00512	1507,9
450	1,450	57,14	0,00634	1668,8
550	1,550	66,66	0,0074	1814,3
650	1,650	75,00	0,00832	2073
750	1,750	82,35	0,00914	2143,6
850	1,850	88,88	0,00986	2289,8
950	1,950	94,73	0,01051	2432,1

N.B. Para que exista uma padronização nas medidas, parâmetros que fazem parte da configuração do programa utilizado pelo espectrofluorímetro, devem ser ajustados antes de serem efetuadas, a saber: “integration time” (It) e o “average”, tendo-se o cuidado de mantê-los constantes durante a realização das determinações, em todas as amostras.

III.4.5. Procedimentos realizados para as sonda 8-QP e 8-QS

III.4.5.1. Determinação do pH ótimo

O estudo do pH foi realizado apenas para soluções aquosas, sendo que as soluções foram preparadas em dois balões volumétricos de 10 mL.

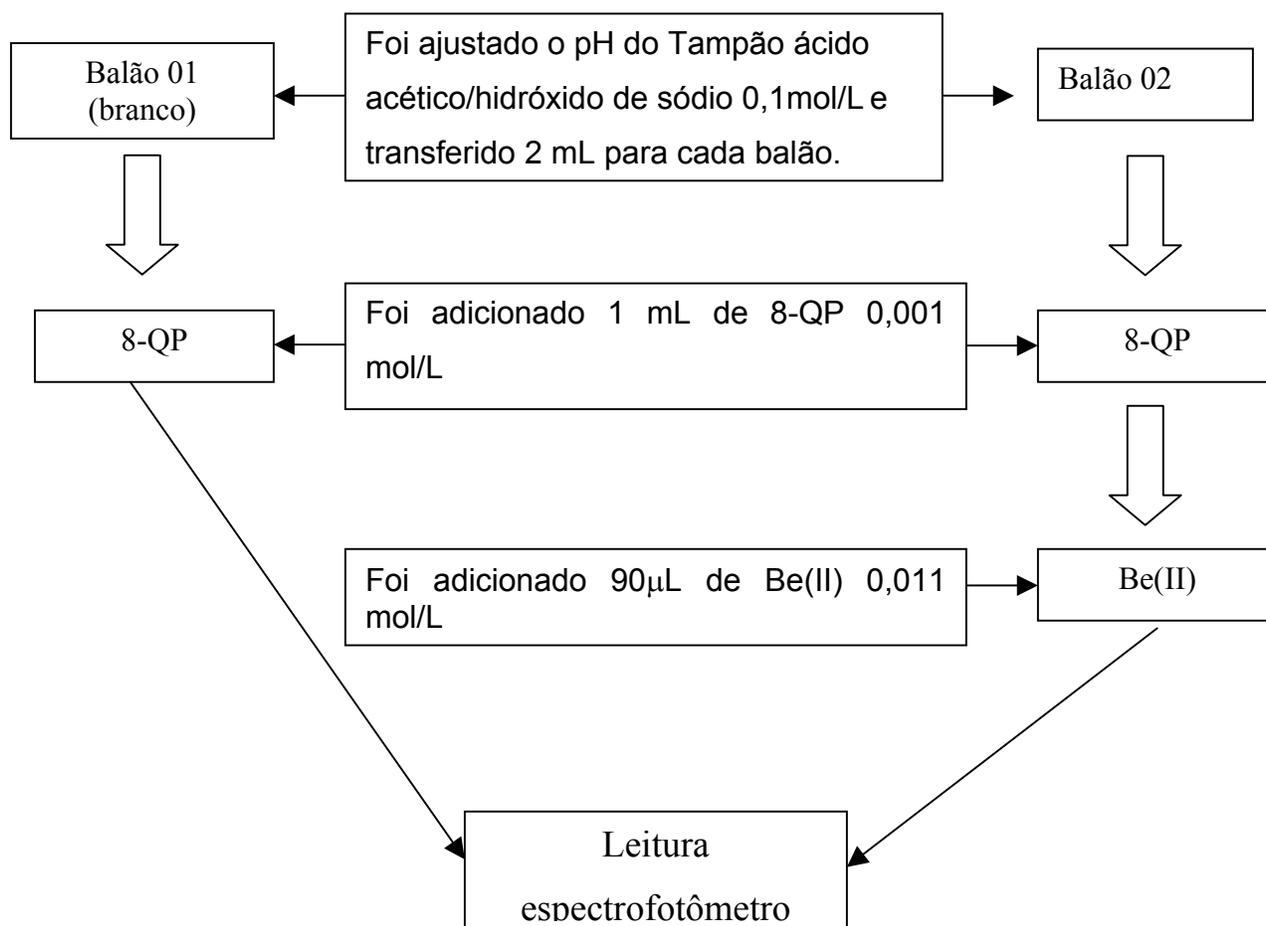


Figura 8. Esquema com a metodologia adotada para o estudo do pH ótimo das soluções na presença e ausência do metal Be(II).

Para determinar o pH ótimo foi utilizado o tampão ácido acético/hidróxido de sódio nos pHs 3,0 e 5,0. O tampão Tris nos seguintes valores de pH: 7,5, 8,0, 9,0 e para pH = 12 o pH é controlado pela base adicionada.

III.4.5.2. Determinação do realce da fluorescência das 8-QP e 8-QS

Para a determinação do realce da fluorescência do 8-QP foi selecionado o metal Be(II), o qual apresenta boa eficiência no realce da fluorescência, o que permite sua quantificação. Também foram testados outros metais como Pb(II), Rb(I) e Fe(III).

O procedimento a seguir descreve a determinação do realce da fluorescência do 8-QP em presença de Be(II), porém a mesma metodologia foi empregada para os outros íons metálicos listados acima.

Etapa 01: na preparação da solução A, foi adicionado a um balão volumétrico de 10 mL, um volume de 1,0 mL da solução estoque de 8-QP (1×10^{-3} mol/L) e 2 mL de tampão ácido acético/acetato (0,1 mol/L). O pH foi ajustado para 4,0.

Etapa 02: na preparação da solução B foi adicionado a um balão volumétrico de 10 mL, um volume de 1,0 mL da solução estoque de 8-QP (1×10^{-3} mol/L), 3 mL de padrão de Be(II) (100 ppm) e 2 mL de tampão ácido acético/acetato (0,1 mol/L), O pH foi ajustado para 4,0. Procedimento realizado dentro da capela TROX.

Após o preparo das soluções, foi feita uma varredura no espectrofotômetro Shimadzu 210 A (280 a 700 nm) para verificar o comprimento de onda máximo de absorção, esse dado é utilizado como o $\lambda_{\text{excitação}}$ no espectrofluorímetro. Através do espectro obtido com programa do fluorímetro foi obtido o $\lambda_{\text{emissão}}$, onde foi determinada a intensidade máxima de fluorescência.

A curva de calibração foi obtida a partir de 1 mL da solução A (na cubeta) e de acordo com a com a descrição da **Tabela 3**, apresentada anteriormente. Com uma correção do volume pode-se calcular a concentração da espécie que está sendo determinada. A **Tabela 3** mostra como exemplo o Be(II), porém, a mesma sistemática foi adotada para todas as outros íons metálicos em estudo. Sendo, no entanto, obtidos diferentes valores de intensidade de fluorescência para o caso do 8-QP em presença de Be(II).

N.B. Para que exista uma padronização nas medidas, parâmetros que fazem parte da configuração do programa utilizado pelo espectrofluorímetro, devem ser ajustados antes de serem efetuados, a saber: “integration time” (It) e o “average”, tendo-se o cuidado de mantê-los constantes durante a realização das determinações, em todas as amostras.

III.4.6. Procedimentos realizados para a sonda 8-HOQ

III.4.6.1. Determinação do pH ótimo

Para determinação do pH ótimo da 8-HOQ, a concentração da mesma foi mantida constante e o Tris / CTABr foi variado o pH em uma faixa de 2 a 12 unidades de pH. A partir destas soluções foram realizados os espectros de emissão e excitação.

III.4.6.2. Efeito da presença de metais sobre a fluorescência do 8-HOQ

Para o estudo do efeito na fluorescência do 8-HOQ em presença de metais foram utilizados Be(II), Pb(II), Rb(I), e Fe(III) em presença de CTABr/Tris e o tampão ácido acético / hidróxido de sódio em pH 5,0.

O procedimento a seguir descreve a determinação do efeito do Be(II) sob a fluorescência do 8-HOQ, porém a mesma metodologia foi empregada para os outros íons metálicos listados acima.

Etapa 01: na preparação da solução A, foi adicionado à um balão volumétrico de 10 mL, um volume de 200 μ L da solução estoque de 8-HOQ (1×10^{-2} mol/L) e 2 mL de tampão ácido acético/acetato (0,1 mol/L). O pH foi ajustado para 5,0.

Etapa 02: na preparação da solução B, foi adicionado a um balão volumétrico de 10 mL, um volume de 200 μ L da solução estoque de 8-HOQ (1×10^{-2} mol/L), 1 mL de padrão de Be(II) (100 ppm) e 2 mL de tampão ácido acético/acetato (0,1 mol/L). O pH foi ajustado para 5,0 unidades. Procedimento realizado dentro da capela TROX.

Após o preparo das soluções, foram realizadas varreduras no espectrofluorímetro, onde foram obtidos os respectivos espectros de excitação e de emissão.

Através do espectro obtido com programa do fluorímetro tem-se o $\lambda_{\text{emissão}}$ onde se pode determinar a intensidade máxima de fluorescência.

A curva de calibração foi obtida a partir de 2 mL da solução A (na cubeta) e de acordo com a descrição feita para o procedimento e dados mostrados na **Tabela 3**, salvo os valores apresentados de intensidade de fluorescência da 8-hidroxiquinolina em presença de Be(II)

N.B. Para que exista uma padronização nas medidas, parâmetros que fazem parte da configuração do programa utilizado pelo espectrofluorímetro, devem ser ajustados antes de serem efetuados, tendo-se o cuidado de mantê-los constantes, em todas as amostras, durante a realização das determinações.

IV. Resultados e Discussão

IV.1 Resultados obtidos com a sonda 8-dimetilamino-1-naftol (DANOL)

A estrutura da sonda DANOL (8-dimetilamino-1-naftol, ver **Fig. 7**) faz com que esta permaneça no interior da micela e ainda oferece a possibilidade de formar complexos com vários íons metálicos bivalentes. A maioria dos complexos formados são insolúveis em água e, na presença de micelas podem ser solubilizados eficientemente. Devido à posição em que se encontram os grupos --OH e --N(CH₃)₂ estes proporcionam a formação de uma espécie de garra que acaba por fazer o papel de uma “esponja de prótons”, essa característica particular é auxiliada pelo raio iônico do Be(II) que assemelha-se ao próton, resultando numa efetiva interação.

IV.1.1. Incorporação da sonda DANOL no interior da micela de SDS

O meio micelar permite a compartimentalização dos reagentes, diminuindo as interferências e o acesso de substâncias supressoras que não são de interesse. Uma das mais importantes características é a oferta de um microambiente de baixa polaridade porque devido a hidrofobicidade do DANOL este é incorporado ao interior da micela fazendo com que a interação dos elétrons da sonda e do solvente seja muito menor, isso acaba por resultar num aumento do rendimento quântico, ou seja, o processo de fluorescência torna-se mais efetivo, como está representado na **Figura 9** a seguir.

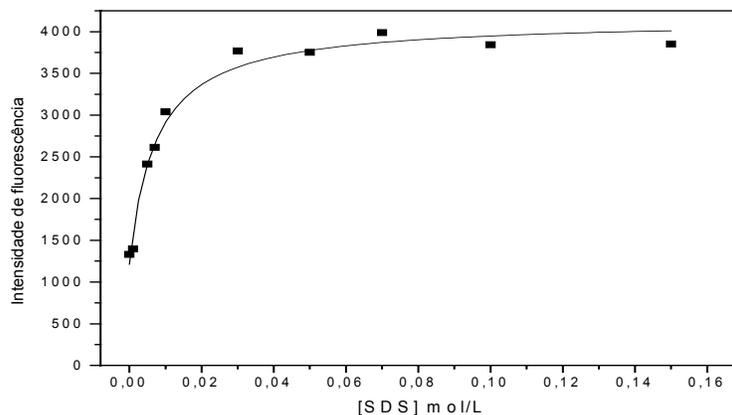


Figura 9. Intensidade de fluorescência do DANOL (1×10^{-4} mol/L) em função da concentração de SDS; $\lambda_{\text{excitação}} = 330$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 500$ nm em pH de aproximadamente 5 e temperatura ambiente.

Observa-se que o aumento da concentração do surfactante SDS promove um aumento na intensidade de fluorescência do DANOL, sendo que a partir de uma concentração de aproximadamente 0,03 ou 0,04 começa a ficar constante, o que caracteriza que toda a sonda está incorporada no interior da micela. A concentração selecionada para o restante dos experimentos foi de 0,05 mol/L.

A partir dos dados experimentais é possível calcular a constante de incorporação da sonda à micela, através das equações abaixo:



$$I_{\text{obs}} = I_{\text{aq}} x_{\text{aq}} + I_{\text{m}} x_{\text{m}} \quad (9)$$

$$I_{\text{obs}} = I_{\text{aq}} \left(\frac{1}{1 + K_s D} \right) + I_{\text{m}} \left(\frac{K_s D}{1 + K_s D} \right) \quad (10)$$

Onde I_{obs} é a soma das contribuições da intensidade de fluorescência da fração molar da sonda em meio aquoso (x_{aq}) e da fração molar da sonda em meio micelar (x_{m}), como mostra a **Eq 9**, K_s é a constante de incorporação, D é quantidade de surfactante adicionado à solução e I_{aq} é a intensidade de fluorescência no meio aquoso.

O valor encontrado para a constante de incorporação K_s foi de 132,63 L/mol indicando que a possibilidade da sonda DANOL encontrar-se incorporada na micela é

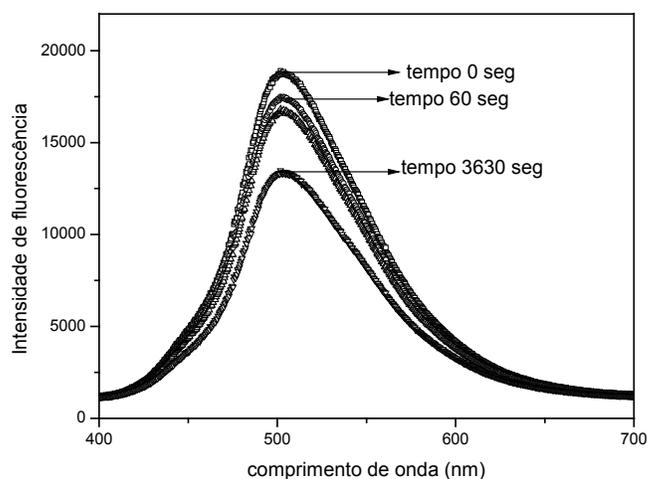
bastante elevada, ou seja, o sonda encontra-se majoritariamente incorporada à micela de SDS. O meio micelar aqui utilizado foi um surfactante aniônico, que favorece ainda a atração eletrostática da espécie metálica para a superfície da micela, auxiliando assim na interação entre o composto e o íon metálico em estudo.

IV.1.2. Estudo da fotodegradação da sonda DANOL

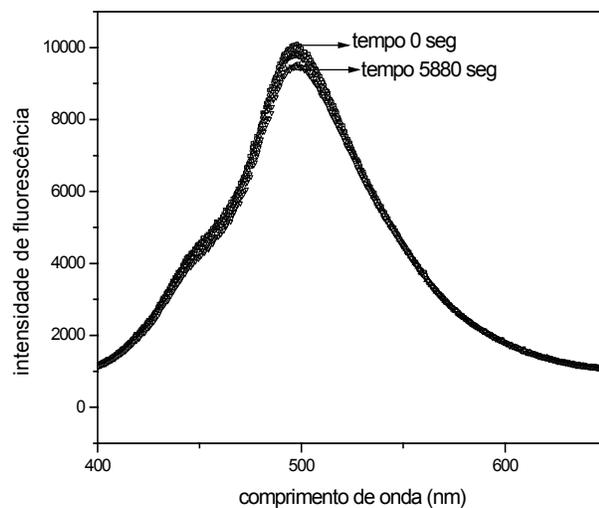
IV.1.2.1. Influência da presença do surfactante SDS

Durante as determinações, o composto permanece sob incidência direta da radiação proveniente da lâmpada, logo, é necessário saber quão suscetível é esse composto a uma reação de fotólise. Os estudos foram realizados na presença e na ausência de surfactantes. Observa-se que na ausência do surfactante ocorre uma considerável diminuição na intensidade de fluorescência, enquanto que na presença do surfactante essa diminuição é bem menos considerável, como pode ser observado na **Figura 10a**.

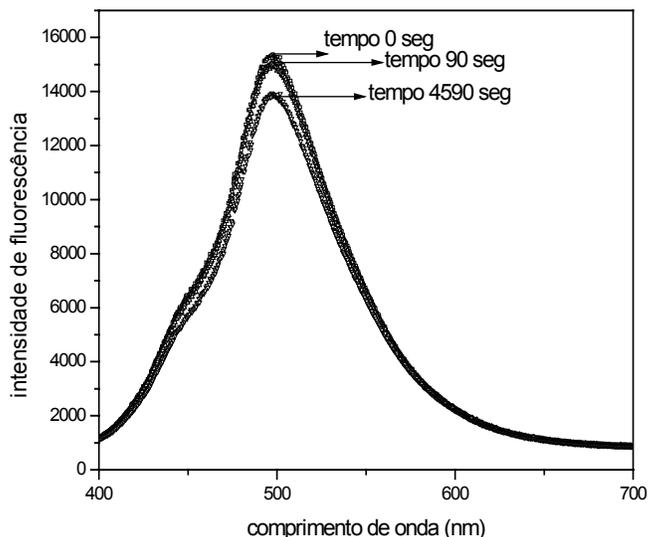
Os resultados permitem de imediato concluir que o microambiente criado pelo surfactante protege a sonda da fotodegradação. As condições do experimento são de pH 2,0, concentração de SDS em 0,05 mol/L e o comprimento de onda de excitação em 316 nm.



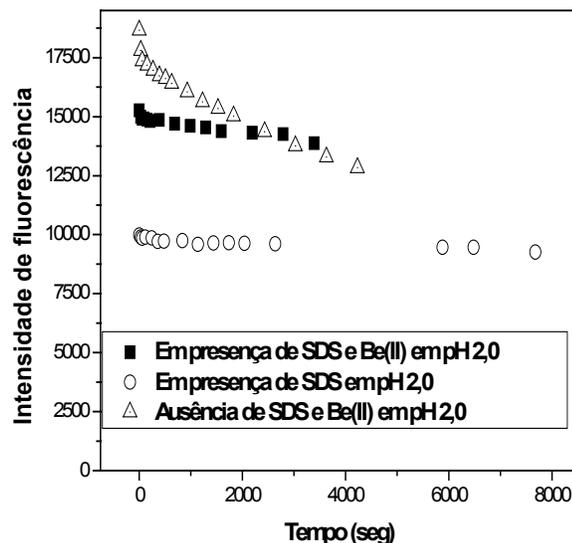
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 10. Fotodegradação do DANOL em pH 2,0 e $\lambda_{\text{excitação}} = 316 \text{ nm}$, na: (a) ausência de SDS; (b) na presença de 0,05 mol/L SDS; (c) na presença de SDS (0,05 mol/L) e Be(II) em pH 2,0; (d) intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}} = 500 \text{ nm}$) em função do tempo, nas condições citadas no gráfico.

Na presença do surfactante SDS e Be(II), observa-se que não ocorre grande variação na intensidade de fluorescência por um tempo considerável. Tendo em vista que, o tempo necessário para que se realize uma determinação, varia entre 30 s à 1 min, a fotodegradação do DANOL pode ser desconsiderada do ponto de vista da determinação analítica, já que a reação de complexação é muito mais rápida que a fotodegradação. No entanto, na presença do Be(II) e ausência do surfactante, após 24 horas, não há mais fluorescência da sonda.

IV.1.2.2. Efeito do pH sobre a fotodegradação e intensidade de fluorescência da sonda DANOL

A sonda DANOL apresenta variação da intensidade de fluorescência em função do pH ao qual está submetida, devido a possibilidade de encontrar-se tanto protonada como desprotonada. O aumento do pH promove um aumento na intensidade de fluorescência,

pois com o aumento do mesmo ocorre a desprotonação e por conseqüência favorecendo assim o processo de fluorescência.

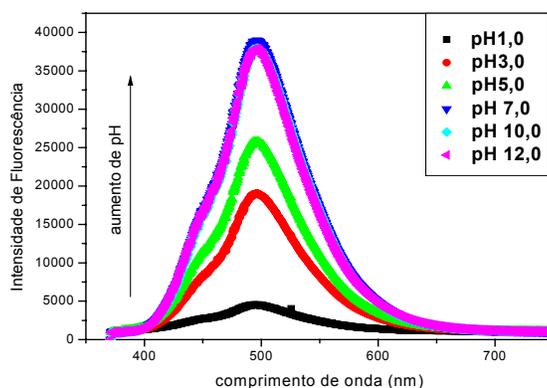


Figura 11. Espectros de emissão da sonda DANOL (1×10^{-4} mol/L) em presença de SDS (0,05 mol/L), com variação do pH entre 1,0 e 12,0 unidades; $\lambda_{\text{excitação}} = 316$ nm.

Inicialmente, uma das hipóteses seria que a sonda poderia apresentar-se ainda mais efetiva em pH mais alcalino, assim fez-se o estudo da fotodegradação a pH 12. Nesse pH, mesmo na presença de SDS e de Be(II), observa-se uma considerável diminuição na intensidade de fluorescência em uma variação relativamente pequena de tempo.

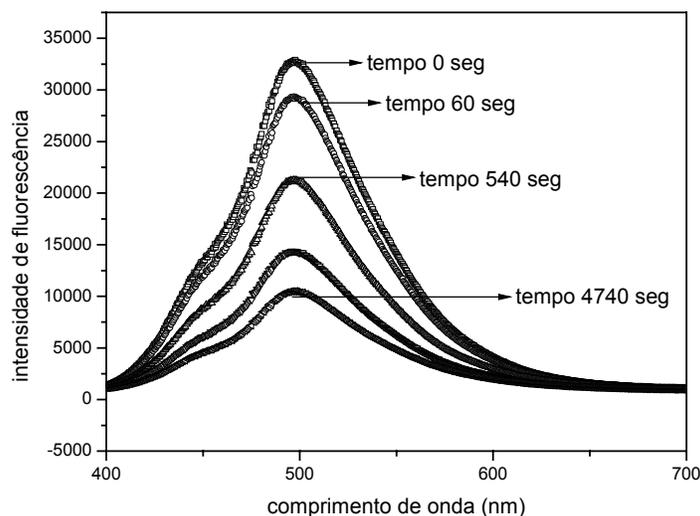


Figura 12. Fotodegradação do DANOL na presença de SDS (0,05 mol/L) e $2,2 \times 10^{-3}$ mol/L de Be(II) em pH 12,0; $\lambda_{\text{excitação}} = 316$ nm.

IV.1.3. Realce da fluorescência da sonda DANOL pelo Be(II)

Na presença de Be(II) ocorre um realce na intensidade de fluorescência da sonda DANOL, esta alteração deve-se, provavelmente, à ocorrência do efeito de “esponja de prótons” oferecido pela sonda. O aumento na intensidade de fluorescência mostra um comportamento linear com o aumento da concentração de Be(II), assim pode-se determinar o mesmo pelo método espectrofluorimétrico. A concentração ótima de SDS foi de 0,05 mol/L e o pH ótimo foi em torno de 2,0. Em pH mais alcalinos se observa uma maior intensidade da sonda, porém, há dois fatores que impedem a determinação em tal pH. Primeiro porque o processo de fotodegradação neste pH apresenta-se bastante efetivo e, segundo porque se observa a precipitação do Be(II) em pH acima de 3,0 na solução.

Inicialmente, optou-se por trabalhar com concentrações maiores, podendo depois da otimização chegar-se a determinação em nível de nanomoles de Be(II).

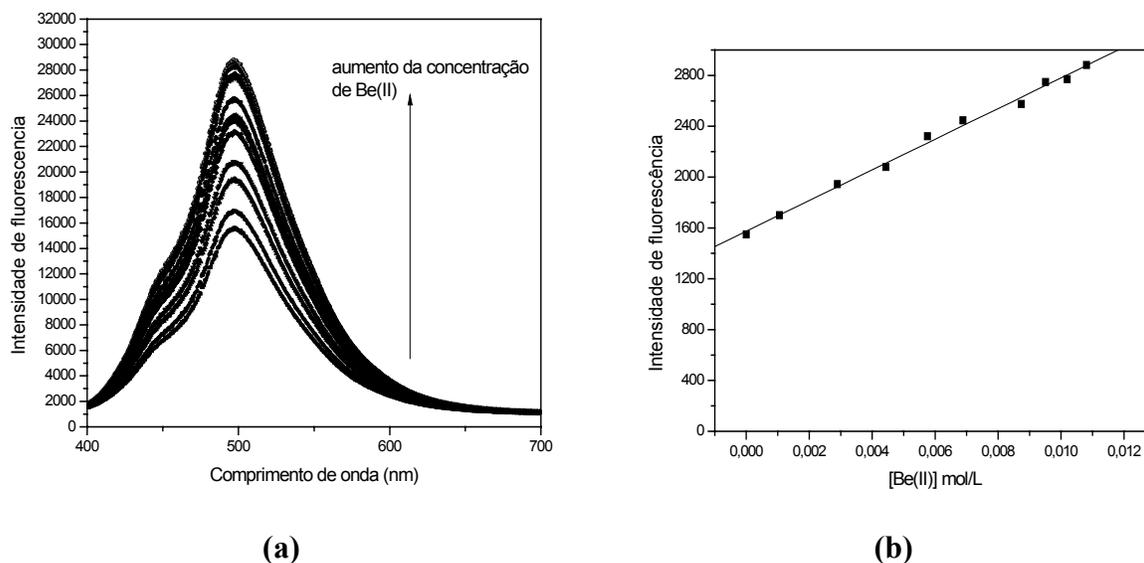


Figura 13. a) Representação do espectro de emissão do DANOL na presença de Be(II) e SDS 0,05 mol/L e pH 3,0; b) Curva de calibração de Be(II) variando as concentrações de 0 à 0,011 mol/L. Com coeficiente de correlação $R = 0,9998$.

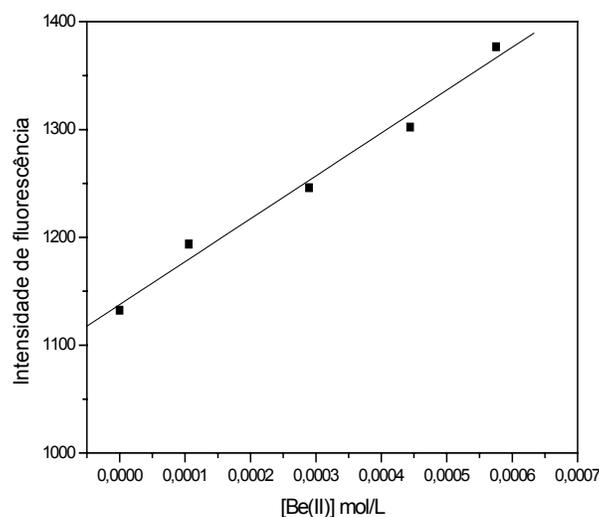


Figura 14. Curva de calibração expandida, mostrando a região de [Be(II)] de 0 à $5,57 \times 10^{-4}$ mol/L na presença de 0,05 mol/L de SDS em pH 3,0; Coeficiente de correlação $R = 0,9988$.

IV.1.4. Limite de Detecção e Quantificação

Ambos foram calculados a partir de uma fórmula empregada para a espectrofluorimetria que usa parâmetros da regressão linear a partir das curvas de calibração obtidas. Outra possibilidade para cálculo do limite de detecção e quantificação é aplicação das fórmulas empregadas pela IUPAC, onde o limite de detecção (L_D) é obtido a partir de 3 vezes o desvio do sinal da linha de base ou ruído do detector. Enquanto que o limite de quantificação do método (L_Q) são calculados como 10 vezes o desvio do sinal produzido pela linha de base ou ruído, obtido a partir das respectivas curvas de calibração de cada um dos padrões (MILLER e MILLER, 1993).

Assim, obteve-se $L_D = 2,4 \times 10^{-7}$ mol/L e como $L_Q = 7,9 \times 10^{-7}$ mol/L. Esses limites encontrados podem ser comparados com os limites apresentados por outras técnicas como colorimétricas e absorção atômica. De acordo com o Standard Methods, o limite de detecção para técnicas como absorção atômica para o elemento Be encontra-se em cerca de 0,005 mg/L, sendo assim o limite apresentado pela detecção espectrofluorimétrica de Be(II) em presença de DANOL encontra-se no mesmo nível da técnica de absorção atômica que é considerada uma técnica com elevada sensibilidade.

IV.1.5. Testes com outros íons metálicos

Para verificar se o mesmo efeito poderia ser provocado por outros íons foram feitos testes com as seguintes espécies: Pb(II), Mg(II) e Ca(II). Tais íons não promovem alteração significativa na intensidade de fluorescência do DANOL. Como exemplo do que ocorre apresenta-se a seguir o caso do Pb(II).

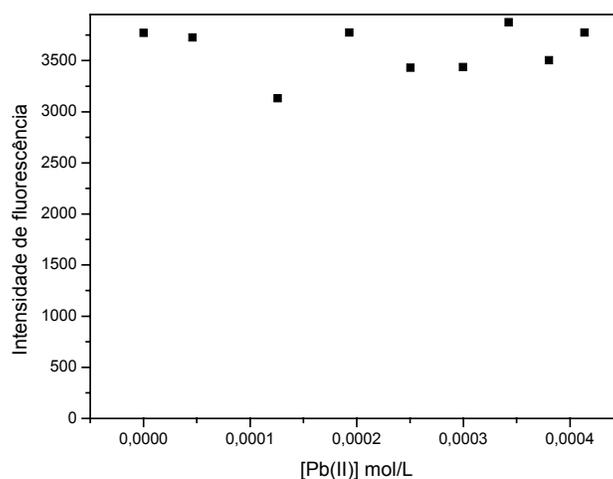


Figura 15. Gráfico de [Pb(II)] *versus* intensidade de fluorescência em pH 5,0 na presença de 0,05 mol/L de SDS e 0,02 mol/L de tampão acetato. $\lambda_{\text{emissão}}$ 497 e $\lambda_{\text{excitação}}$ 316 nm.

Provavelmente o efeito está relacionado com o tamanho do raio iônico do elemento que está sendo determinado. Comparando-se com o Be(II), o Pb(II) é muito maior, o que dificultaria a ocorrência do efeito de “esponja de prótons”. O mesmo ocorre para os íons Mg(II) e Ca(II).

IV.1.6. Aplicação de DANOL na determinação de ânions

Utilizando a sonda DANOL verificou-se o efeito provocado por espécies aniônicas. Foram estudados os ânions ClO_3^- e BrO_3^- em meio micelar, utilizando 0,05 mol/L do surfactante Triton X-100, na presença ou não de tampão acetato de sódio (0,01 mol/L).

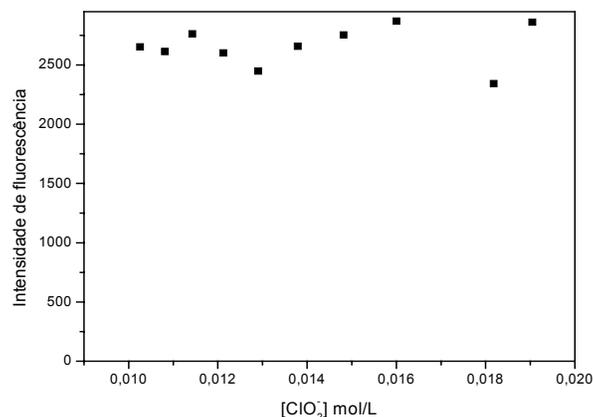


Figura 16. Curva de calibração utilizando 1×10^{-4} mol/L de DANOL, 0,01 mol/L de tampão acetato, com concentração de ClO_2^- variando de 0 a 0,02 mol/L; pH 5,0 $\lambda_{\text{emissão}}$ 346 e $\lambda_{\text{excitação}}$ 495 nm

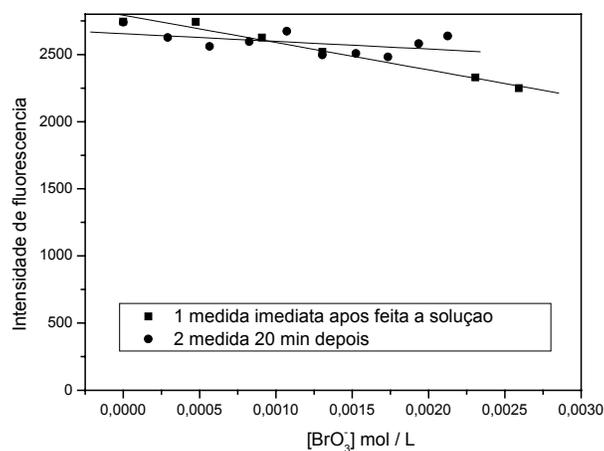


Figura 17. Curva de calibração utilizando $1,6 \times 10^{-4}$ mol/L de DANOL, 0,02 mol/L de tampão acetato, com concentrações de BrO_3^- variando de 0 a 0,0021 mol/L; pH 5,0 $\lambda_{\text{emissão}}$ 346 e $\lambda_{\text{excitação}}$ 495 nm.

De acordo com os resultados observados, os ânions ClO_2^- e BrO_3^- não apresentam efeito significativo na intensidade de fluorescência do DANOL, logo, é inviável a utilização desta sonda na determinação dos mesmos.

IV.2 Resultados obtidos com a sonda 1-N,N-dimetilamino naftaleno-5-N-dodecil sulfonamida (DNSS)

A estrutura do DNSS (**Figura 7**) permite, dependendo do pH, complexar o íon Be(II) através do par de elétrons livre do nitrogênio do grupo dimetilamino, ou entre os átomos de nitrogênio e oxigênio do grupo sulfonamida. O estudo foi realizado em meio micelar utilizando o surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS), o que facilita a solubilização do DNSS, a redução de interferências e o aumento de sensibilidade, além de propiciar a formação de microambientes dentro de uma mesma solução. Devido a sua estrutura, o DNSS permanece com o grupo hidrofóbico no interior da micela e o grupo dimetilamônio na camada mais superficial da mesma.

IV.2.1. Incorporação da sonda DNSS em SDS

A adição do SDS na solução contendo a sonda DNSS, provoca um deslocamento no $\lambda_{\text{emissão}}$ provavelmente devido à formação de uma micela mista entre DNSS e o SDS (**Figura 18**), o que permite a incorporação do DNSS na fase micelar, auxiliando no aumento do rendimento quântico. Na **Figura 19** observa-se a diminuição da fluorescência observada para concentrações de SDS menores que a concentração micelar crítica (CMC = 0,0058 mol/L), mostrando a importância do meio micelar para a determinação analítica. A CMC experimental é inferior daquela do SDS na ausência de aditivos (0,0081 mol/L). A cmc do SDS sem adição de DNSS foi obtida a partir

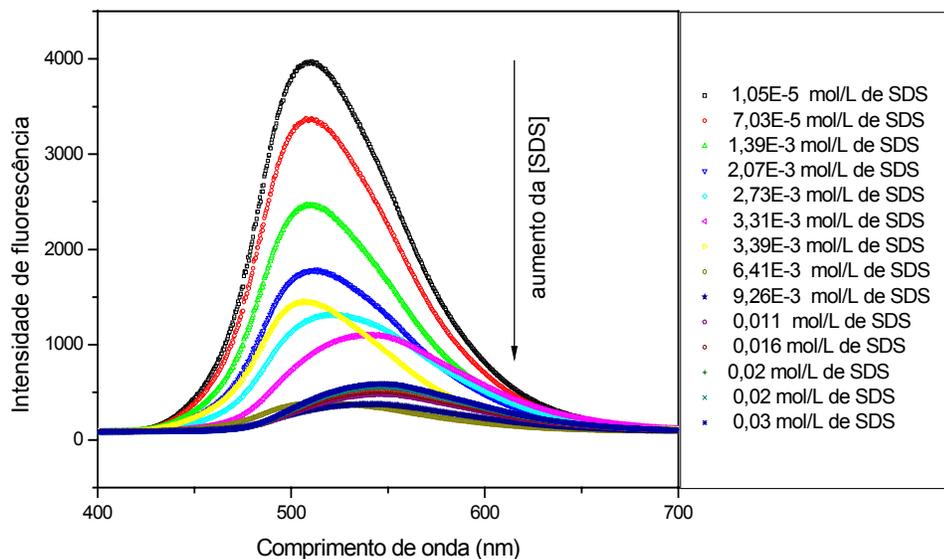


Figura 18. Espectros de emissão da sonda DNSS (1×10^{-4} mol/L) em função da [SDS], em pH 5,0, tampão ácido acético/acetato 0,02 mol/L, $\lambda_{\text{emissão}} = 507$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm.

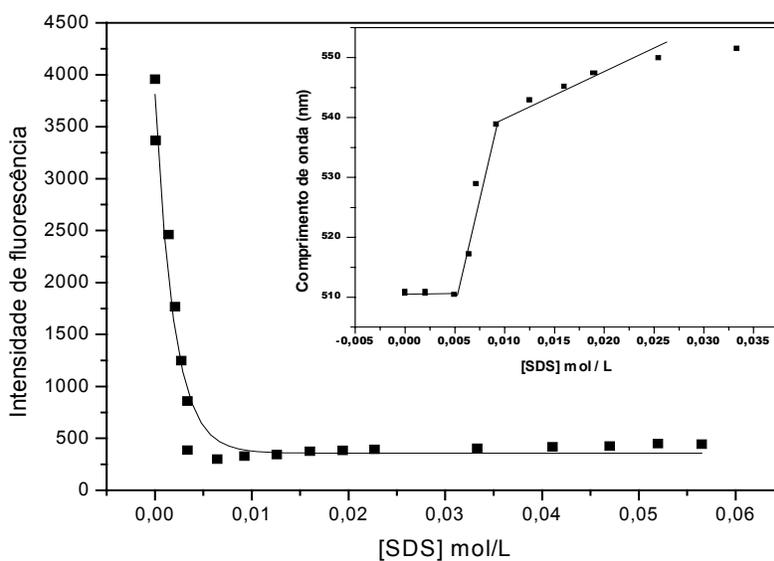


Figura 19. Intensidade de fluorescência do DNSS (1×10^{-4} mol/L) em função da [SDS], em pH 5,0, tampão ácido acético/acetato 0,02 mol/L, $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm. O gráfico inserido mostra o deslocamento do comprimento de onda máximo em função da [SDS].

IV.2.2. Efeito da presença de SDS e do pH na fotodegradação da sonda DNSS

Na obtenção dos espectros de fluorescência do DNSS, observou-se que a incidência da luz sob a amostra, provoca uma reação de fotodegradação do composto. Esta reação foi examinada em função da concentração do surfactante SDS e do pH. Na **Figura 20** pode-se verificar que a fotodegradação ocorre mais rapidamente quando a concentração de SDS encontra-se em 1×10^{-3} mol/L a pH 5,0, ou seja, para concentrações de SDS inferiores à CMC. Quando a concentração de SDS é de 0,017 mol/L, em pH 5,7 e 11,0 a reação de fotodegradação pode ser desconsiderada do ponto de vista da determinação analítica, já que a reação ocorre muito lentamente.

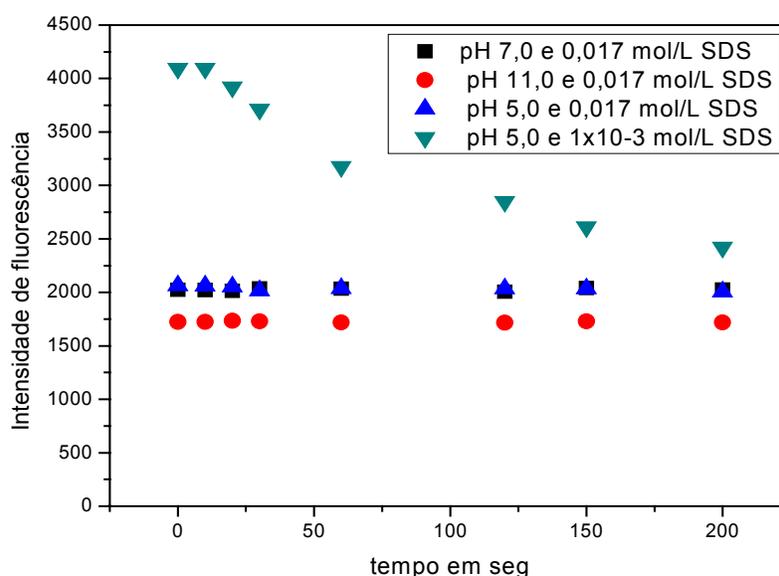


Figura 20. Fotodegradação do DNSS em função do tempo utilizando concentrações de 1×10^{-3} mol/L SDS, $[\text{DNSS}] = 1 \times 10^{-4}$ mol/L e $\lambda_{\text{exc}} = 316$ nm.

A **Figura 21** mostra o efeito da variação de pH, em presença de SDS, e observa-se que existe uma alteração na intensidade de fluorescência com o aumento do pH. Provavelmente, o aumento do valor de pH provoca a desprotonação do grupo dimetilamônio, que deve ter uma reação de dissociação ácida na região próxima a pH 5,0.

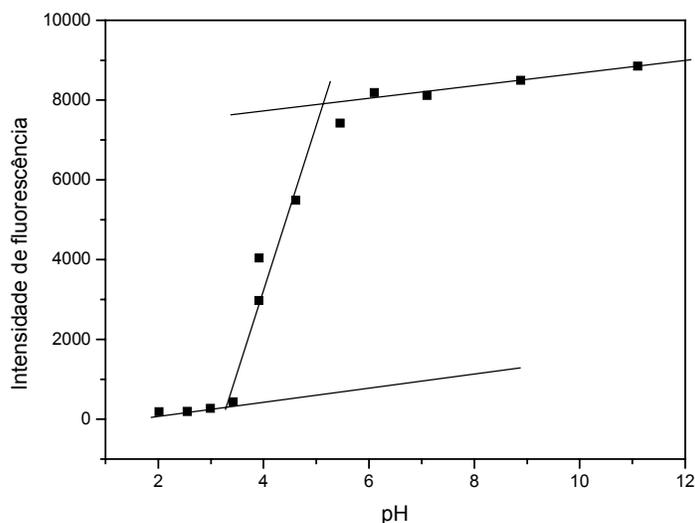


Figura 21. Influência do pH na intensidade de fluorescência da sonda DNSS (1×10^{-4} mol/L) em SDS 0,017 mol/L; $\lambda_{\text{emissão}} = 507,24$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm; em pH 5,0 tampão acetato 0,02 mol/L.

A partir dos dados experimentais, se observa uma curva sigmoide semelhante a curva que seria esperado para uma titulação potenciométrica, assim é possível calcular o valor da constante de dissociação ácida da sonda, na presença de SDS, através das equações abaixo e obtém-se um valor de $\text{pK}_a = 4,1$. Esse pK_a é chamado de pK_a aparente considerando que tem-se em solução a presença do surfactante SDS, sendo o pK_a determinado provavelmente referente a perda do próton do grupo do nitrogênio dimetilado que se encontra diretamente ligado ao anel.



(12)

$$I_{\text{obs}} = I_{\text{DNSS}_m} x_{\text{DNSS}_m} + I_{\text{DNSS}_m^-} x_{\text{DNSS}_m^-}$$

$$I_{\text{obs}} = I_{\text{DNSS}_m} \left(\frac{\text{H}^+}{\text{K}_a + \text{H}^+} \right) + I_{\text{DNSS}_m^-} \left(\frac{\text{K}_a}{\text{K}_a + \text{H}^+} \right) \quad (13)$$

IV.2.3. Influência da concentração da sonda DNSS nas determinações de espécies pelo realce e supressão da fluorescência

Para verificar se ocorria uma influência da concentração da sonda foram feitas curvas de calibração com as diferentes espécies utilizando concentrações distintas de DNSS, porém, ao contrário do que eventualmente poderia esperar-se, a sensibilidade permanece relativamente constante com uma diminuição de 10 vezes na concentração da sonda DNSS no caso do Cu(II) e diminui significativamente no caso do Be(II) (Figuras 22 e 23).

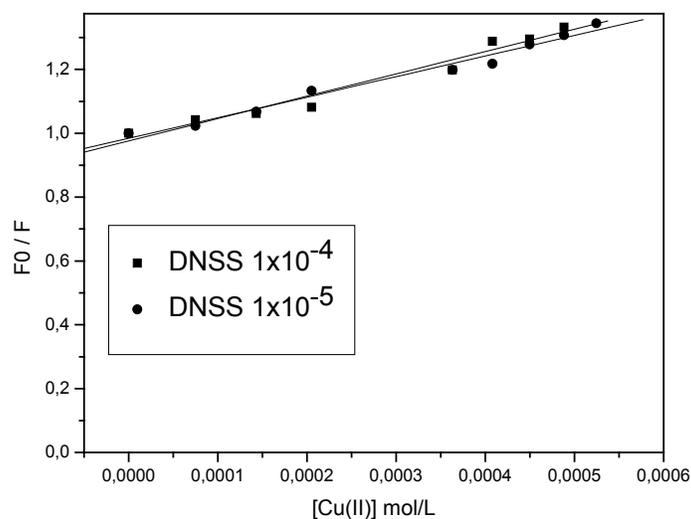


Figura 22. Influência da concentração da sonda na supressão do DNSS pelo íon Cu(II), em pH 5,0 (tampão acetato 0,02 mol/L) com DNSS em concentrações de (!) 1×10^{-4} mol/L e (,) 1×10^{-5} mol/L; $\lambda_{\text{emissão}} = 507,24$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm.

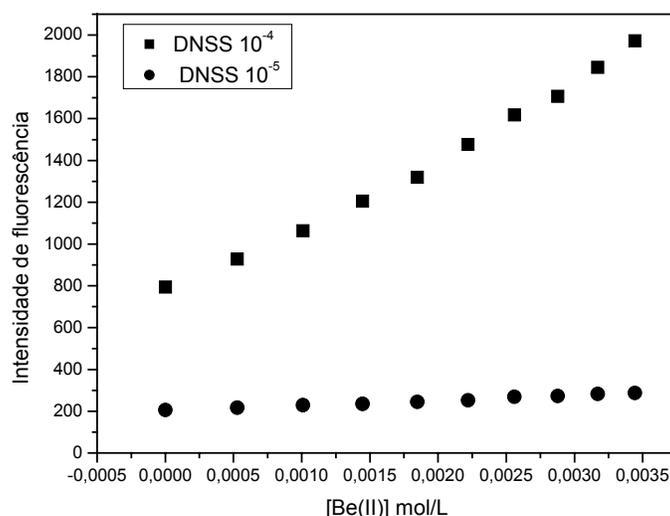


Figura 23. Influência da concentração da sonda no realce da fluorescência do DNSS pelo íon Be(II), em pH 5,0 (tampão acetato 0,02 mol/L) com DNSS em concentrações de (■) 1×10^{-4} mol/L e (●) 1×10^{-5} mol/L; $\lambda_{\text{emissão}} = 507,24$ nm e $\lambda_{\text{excitação}} = 346$ nm.

IV.2.4. Determinação de íons metálicos por fluorescência utilizando DNSS em meio micelar

Tendo em vista a habilidade de alguns íons em interagir modificando a intensidade da fluorescência do DNSS, foram realizados estudos para verificar para quais destes a sonda mostrava maior sensibilidade, assim como para estudar a sua seletividade. Dentro do método espectrofluorimétrico empregado foi considerado como parâmetro um mínimo de 20% de alteração na intensidade de fluorescência para ser considerada a possibilidade de determinação de tal íon. Foram estudados os cátions listados a seguir: Be(II), Cu(II), Pb(II), Zn(II), Rb(I), Ni(II), Cd(II), Ca(II), Mg(II), Fe(III), Al(III) e Na(I), e dentre tais íons pode observar-se interações que provocam o realce ou a supressão da intensidade de fluorescência.

Adição de íons metálicos produzem efeitos diferenciados, por exemplo, o Pb(II) e o Cu(II) promovem a supressão da fluorescência e o Be(II), o realce da mesma em amostras de DNSS em micelas de SDS. Metais como: Cd(II), Zn(II), Rb(I), Ca(II), Mg(II), Al(III) e Na(I) também mostram um aumento de fluorescência, este aumento, porém, é pouco

significativo, como pode ser observado na **Figura 24**. Devido as características da sonda DNSS a interação com o Be(II) é mais efetiva o que pode indicar a possibilidade de quantificar Be(II) em presença de outros metais.

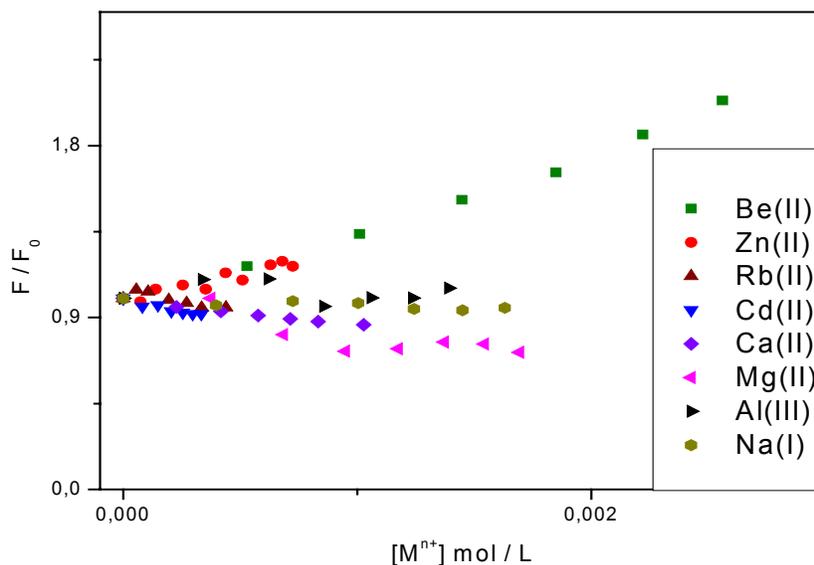


Figura 24. Efeito de diversos íons metálicos na fluorescência do DNSS. Os experimentos de Be(II) foram realizados em pH 3,0 e os demais em pH 5,0; $\lambda_{\text{excitação}}$ 346 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 545 nm.

A presença do íon Cu(II), provoca uma diminuição na intensidade de fluorescência da sonda. Um efeito semelhante, em todos os aspectos, foi observado na presença de Pb(II), Fe(III), Ni(II) (**Figura 25**). A supressão observada foi consistente com a equação de Stern-Volmer, sendo que a ordem das constantes de Stern-Volmer é a seguinte Cu(II) ($K_{\text{SV}} = 1240 \text{ M}^{-1}$) > Pb(II) ($K_{\text{SV}} = 730 \text{ M}^{-1}$) > Ni(II) \approx Fe(III) ($K_{\text{SV}} = 170 \text{ M}^{-1}$).

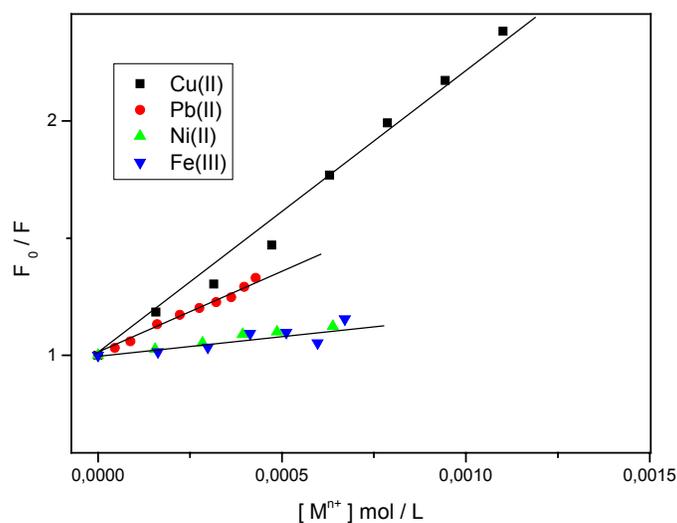


Figura 25. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de fluorescência do DNSS por íons metálicos, em pH 5,0; $\lambda_{\text{excitação}}$ 346 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 545 nm.

IV.3. Resultados obtidos com a sonda 8-quinolinil fosfato (8-QP)

A precipitação na forma cristalina do composto 8-quinolinil fosfato deve-se a formação do sal zwitterionico, onde o nitrogênio pertencente ao anel encontra-se protonado e, o grupo fosfato encontra-se como monoânion (ver **Figura 7**). O composto 8-quinolinil fosfato, além de apresentar apreciável fluorescência apresenta ainda a vantagem de ser solúvel em água, o que acaba por facilitar as determinações dos íons metálicos de interesse, já que o mesmo também mostra-se bastante estável com relação a hidrólise em água.

IV.3.1. Efeito do pH sobre a sonda 8-QP na presença e ausência de Be(II)

A sonda 8-QP apresenta variação da intensidade de fluorescência em função do pH ao qual esta submetida, devido a possibilidade de encontrar-se tanto protonada como desprotonada. O aumento do pH promove uma diminuição na intensidade de fluorescência, isto possivelmente ocorre porque com o aumento do pH há uma mudança nas espécies presentes em solução, o que promove mudanças espectrais.

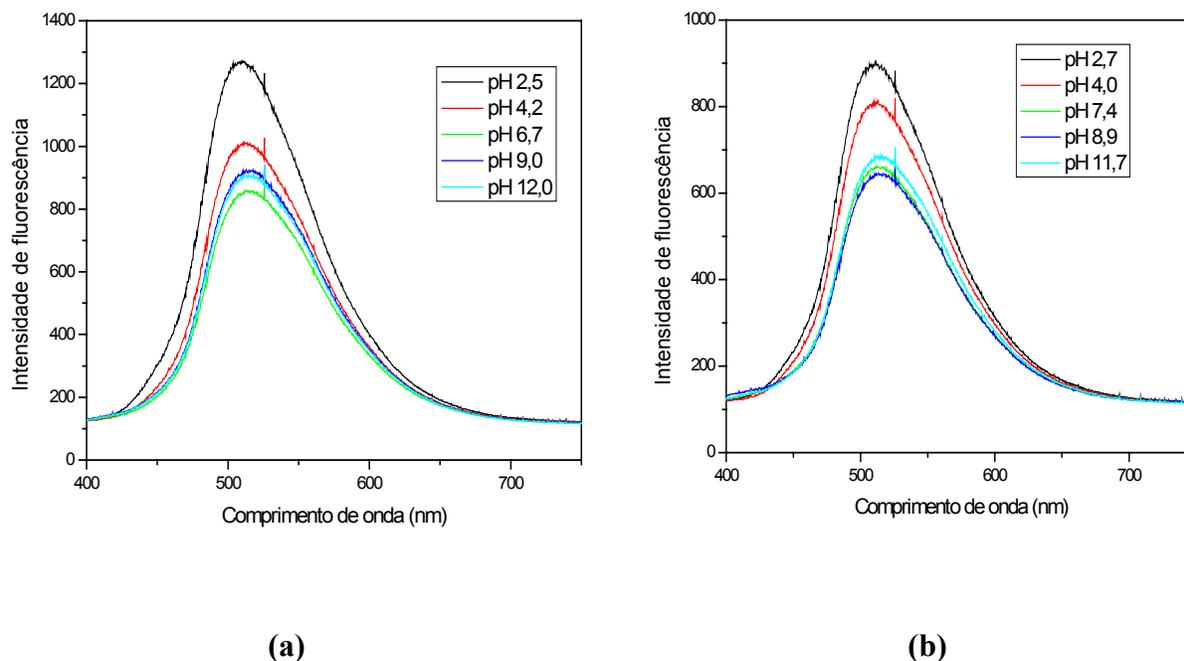
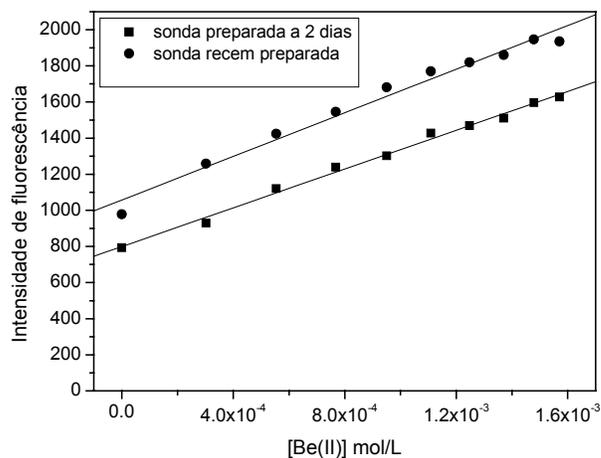


Figura 26. a) Espectros de emissão em diferentes pHs, com a concentração de sonda constante em 1×10^{-4} mol/L; b) Espectros de emissão em diferentes pHs, com as concentrações de sonda e Be(II) constantes em 1×10^{-4} mol/L. Tampões utilizados: acetato e Tris na concentração 0,02 mol/L; $\lambda_{\text{excitação}} = 300$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 513$ nm.

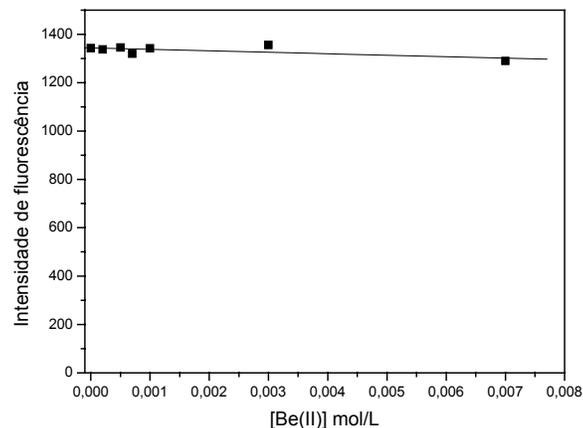
IV.3.2. Determinação de íons metálicos por fluorescência utilizando 8-QP

A estrutura espacial na qual o composto 8-quinolinil fosfato (**8-QP**) é estabilizada em água permite que este composto interaja com íons metálicos, sobretudo aqueles os quais apresentam menor raio iônico, como é caso do Be(II).

Na presença de Be(II) observa-se um realce na fluorescência do 8-QP devido possivelmente a complexação do Be(II) com a sonda, como mostra a **Figura 27**.



(a)



(b)

Figura 27. a) Representação da curva de calibração do Be(II) na presença de 8-QP (1×10^{-4}), em pH 4,0 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 303$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 512$ nm; **b)** Representação da curva de calibração de Be(II) em presença de 8-QP em pH 12,0; $\lambda_{\text{excitação}} = 315$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 514$ nm; Coeficiente de correlação $R = 0,99692$.

Como pode ser observado na **Figura 27** em pH ácido há um aumento considerável da fluorescência e, em pH alcalino, não é observado nenhum efeito. Os estudos foram realizados em meio aquoso e optou-se por trabalhar com concentrações de Be(II) relativamente altas, e o pH ótimo selecionado para realizar as determinações foi 4,0. Neste pH tanto a sonda apresenta uma boa intensidade de fluorescência assim como não ocorre a precipitação do Be(II) até o nível de concentração empregada para construção da curva de calibração. O mesmo pH também foi utilizado nas determinações com os outros íons metálicos, tais como Pb(II), Rb(I) e Fe(III).

Diferentemente do efeito ocorrido na presença de Be(II) sob a intensidade de fluorescência do 8-QP, os íons metálicos Pb(II) e Rb(I) não apresentam uma modificação significativa, como pode ser observado na **Figura 28**.

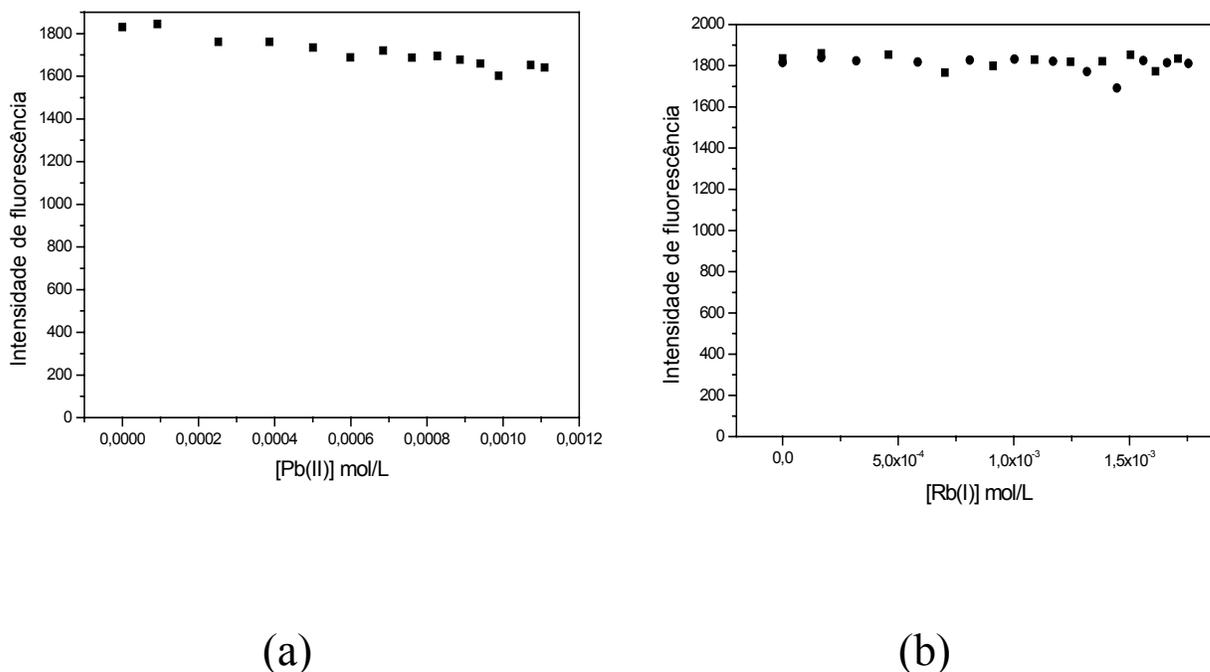


Figura 28. a) Representação da curva de calibração do Pb(II) na presença de 8-QP (1×10^{-4} mol/L), em pH 4,0 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 510\text{ nm}$; **b)** Representação da curva de calibração do Rb(I) na presença de 8-QP (1×10^{-4} mol/L), em pH 4,0 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 510\text{ nm}$;

Observa-se, no entanto, que o primeiro pKa do composto 8-quinolinil fosfato é 4,7 e o segundo pKa 6,5, assim, teoricamente, em pH 4,0 uma parte significativa do composto permanece protonada. Isto indica, que o Be(II) pode competir favoravelmente com o próton pelo sítio de coordenação no nitrogênio. Cabe salientar que, quando o 8-QP se encontra na presença de íons metálicos com raios iônicos de maior porte como no caso do Pb(II), na presença dos mesmos não observa-se mudança na intensidade de fluorescência do 8-QP.

Na presença do íon metálico Fe(III) observa-se uma diminuição na intensidade de fluorescência do 8-QP. Este efeito pode ser simplesmente uma supressão via mecanismo Stern-Volmer dinâmica, ou até a possibilidade de formação de complexos (supressão estática). O valor da constante de Stern-Volmer calculado na região linear foi de 890 M^{-1} , que é maior daquele observado para Fe(III) com DNSS.

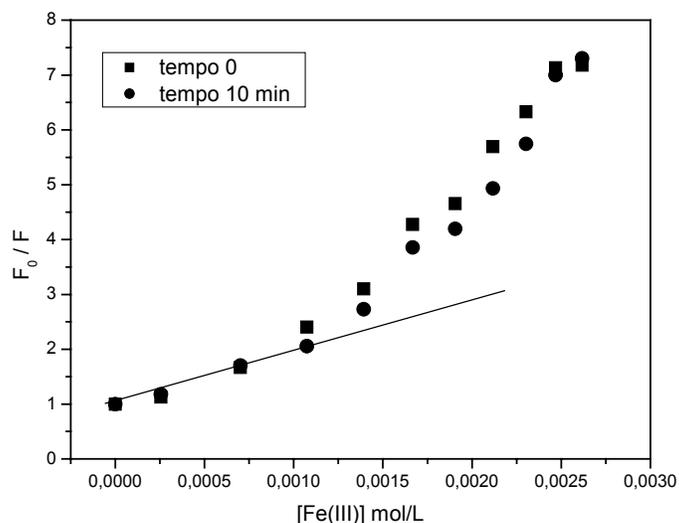


Figura 29. Representação da curva de calibração do Fe(III) na presença de 8-QP, em pH 4,2 com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 510\text{ nm}$.

Para o caso do 8-QP, em pH 4,0, foi realizado um estudo para verificar a interferência de outros elementos na determinação de Be(II). Os resultados confirmaram a possibilidade de determinação de Be(II) pelo realce da intensidade de fluorescência do 8-QP na presença de metais como Pb(II) e Rb(I). Entretanto, Fe(III) demonstrou ser um forte interferente na determinação de Be(II). Uma opção bastante utilizada para minimizar interferências, como nesse caso da presença do Fe(III) é a adição a solução de um complexante que tenha habilidade para complexar preferencialmente com o íon metálico interferente.

IV.4. Resultados obtidos com a sonda 8-quinolinil sulfato (8-QS)

A estrutura do 8-quinolinil sulfato é semelhante ao 8-quinolinil fosfato, sendo que o mesmo precipita na forma de um sal zwitteriônico formado pelo monoânion do grupo sulfato e o nitrogênio do anel protonado. Assim, as características esperadas para este composto seriam semelhantes ao 8-quinolinil fosfato, porém, se observa que este apresenta uma estabilidade ainda maior que o observado para o 8-QP. Isto se deve provavelmente a diferença de comportamento entre os átomos de enxofre e fósforo. Para o caso do fósforo, o

mesmo apresenta a possibilidade de expansão de sua camada de valência, fato que pode vir a favorecer o processo de complexação.

O composto 8-quinolinil fosfato oferece a possibilidade de complexação com o Be(II) entre dois átomos de oxigênio ligado ao fósforo, aumentando a efetividade de complexação com o Be(II).

IV.4.1. Efeito do pH sobre a sonda 8-QS

A sonda 8-QS apresenta variação da intensidade de fluorescência em função do pH ao qual está submetida, da mesma forma que foi observado para o caso do 8-QP. O aumento do pH promove uma diminuição na intensidade de fluorescência, possivelmente, devido às mudanças nas espécies presentes em solução (**Figura 30**).

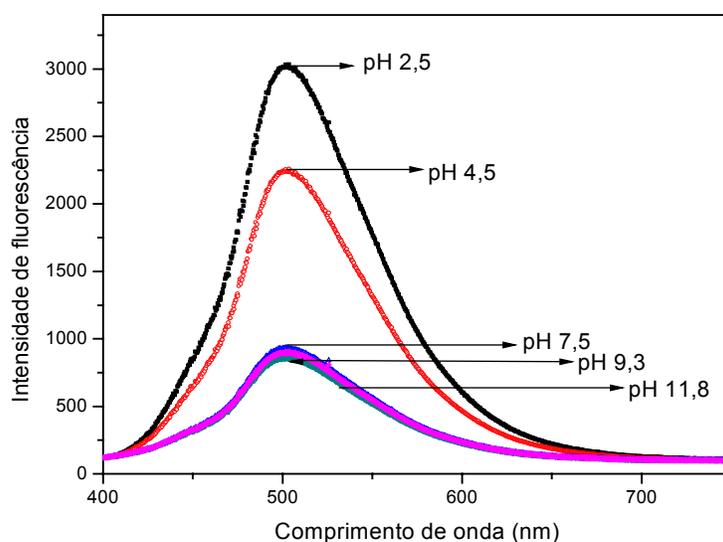


Figura 30. a) Espectros de emissão em diferentes pHs, com a concentração de sonda constante em 1×10^{-4} mol/L. Tampões utilizados: acetato e Tris na concentração 0,02 mol/L; $\lambda_{\text{excitação}} = 320$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 502,7$ nm.

IV.4.2. Determinação de íons metálicos por fluorescência utilizando 8-QS

Diferentemente do observado para o 8-QP, não ocorre nenhuma alteração na intensidade de fluorescência do composto 8-quinolinil sulfato na presença de Be(II) (**Figura 30**), e nenhum efeito é observado na presença dos íons Pb(II) e Rb(I) na mesma

faixa de concentrações. Provavelmente este efeito esteja relacionado com pequenas diferenças na estrutura tridimensional deste composto, já que o S é um pouco mais eletronegativo que o P, o que desfavorece a reação de complexação com Be(II). Outro fator importante que diferencia ambos os compostos é a basicidade, sendo que o composto 8-quinolinil fosfato (8-QP) apresenta uma basicidade muito maior comparado ou 8-QS, fato que poderia vir a contribuir para uma maior efetividade na complexação do 8-QP com o Be(II).

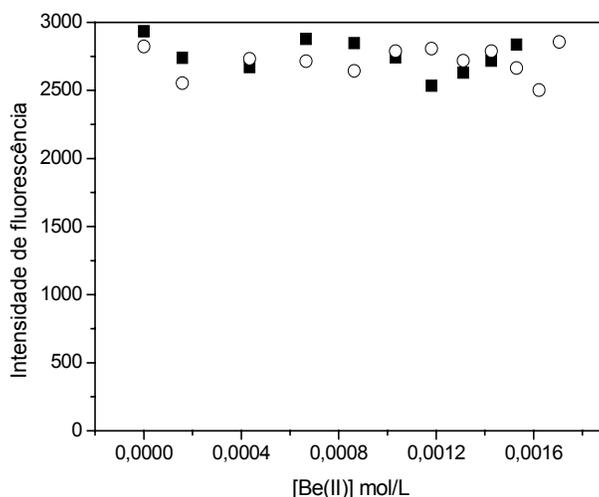


Figura 31. Representação da curva de calibração do Be(II) na presença de 8-QS, em pH 4,0, com 0,02 mol/L de tampão acetato; $\lambda_{\text{excitação}} = 320 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 501 \text{ nm}$.

IV.5. Resultados obtidos com a sonda 8-hidroxiquinolina (8-HOQ)

O composto 8-hidroxiquinolina é bastante conhecido como complexante dentro da química analítica, assim sendo, este é utilizado no presente estudo também como sonda fluorescente e para efeito comparativo, já que as sondas 8-QS e 8-QP apresentadas anteriormente são derivadas diretamente do mesmo.

IV.5. 1. Efeito de íons metálicos sobre a intensidade de fluorescência da 8-HOQ

Os íons estudados na presença de 8-QS e 8-QP foram estudados com 8-HOQ. Tanto para Be(II), quanto para Rb(I) não se observou nenhum efeito significativo na faixa de 0 até 0.005 mol/L destes íons (**Figura 32**).

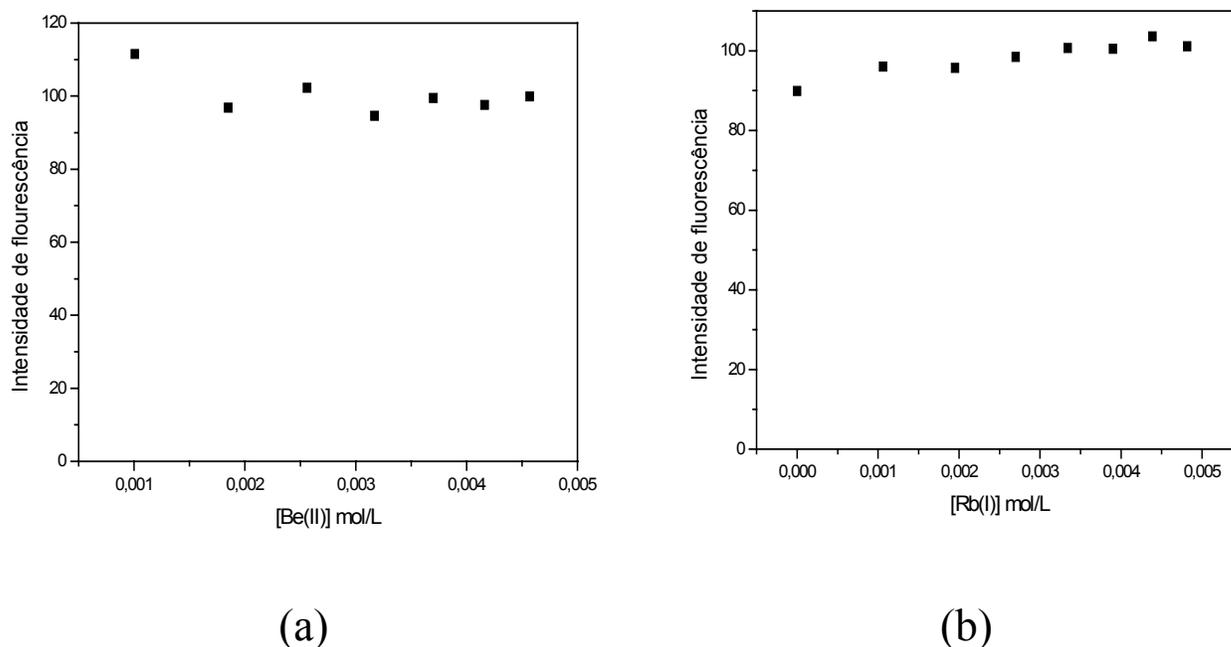


Figura 32. Representação da variação de intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **(a)** Be(II) e **(b)** Rb(I) em presença de CTABr/Tris nas concentrações de 0,05 mol/L e, de CTABr e 0,01 mol/L de Tris; tampão acetato em pH 5,0. Para Be(II) $\lambda_{\text{excitação}}=250\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}=414\text{nm}$; Para Be(II) $\lambda_{\text{excitação}}=315\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}=409\text{nm}$.

Além das espécies citadas anteriormente, também foi verificado o efeito do íon metálico Cu(II) sobre a intensidade de fluorescência da 8-hidroxiquinolina. Verifica-se que o mesmo apresenta grandes modificações e, nestas condições, é observado um gráfico de Stern-Volmer com um valor de $K_{SV} = 108.000\text{ M}^{-1}$ que é o maior valor encontrado neste trabalho e permite determinar Cu(II) em concentrações muito baixas, provavelmente menores que nanomoles deste íon.

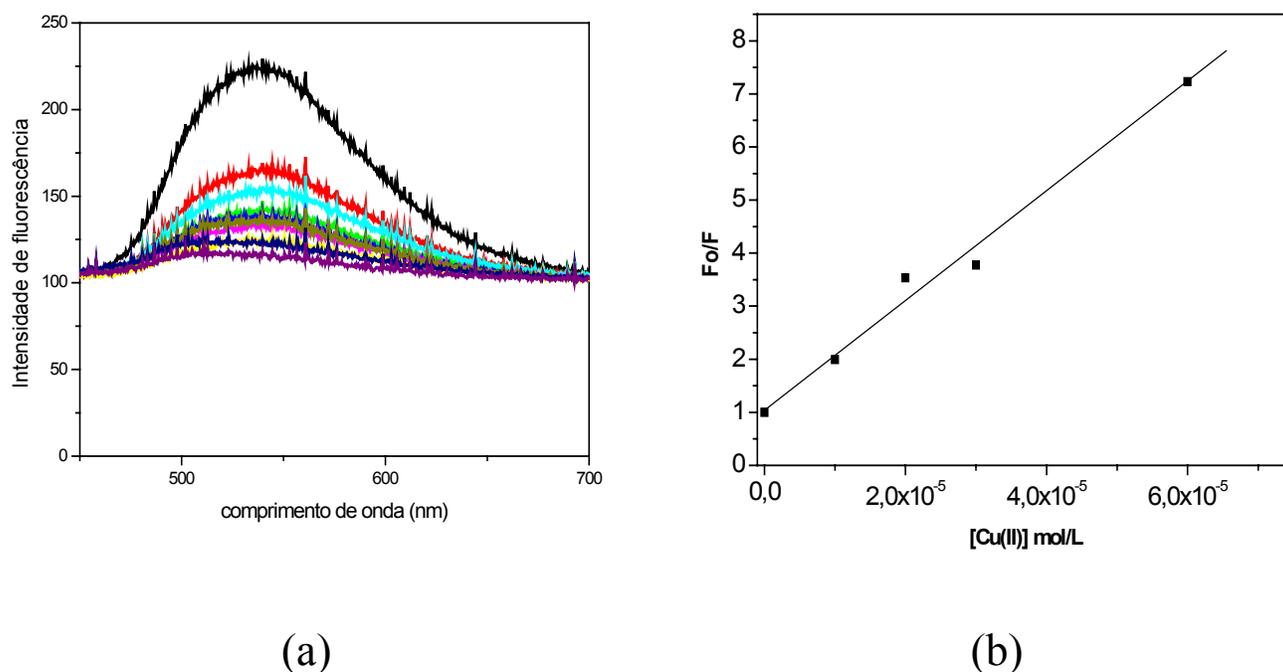


Figura 33. **a)** Espectros de emissão da 8-HOQ na presença de Cu(II) variando a concentração de 0 a 9×10^{-5} mol/L, em solução contendo CTABr/Tris (0,05/0,01 mol/L) e, em pH 8,0; **b)** Representação da variação da intensidade de fluorescência com a variação de concentração Cu(II), nas mesmas condições especificadas para os espectros e $\lambda_{\text{emissão}} = 545\text{nm}$.

Em um estudo realizado anteriormente no mesmo laboratório (Sapelli, 2006), concluiu-se que a 8-hidroxiquinolina é bastante eficiente para ser utilizada na determinação de Zn(II) e Cd(II), por realce da fluorescência em meio micelar. No presente trabalho, observa-se que é possível determinar Cu(II) acompanhando a supressão da fluorescência.

Quando compara-se os compostos estudados 8-QP e 8-QS e 8-HOQ, pode-se observar o efeito do substituinte do anel com relação a intensidade de fluorescência, assim como, a acentuada sensibilidade dos mesmos quando utilizados como sondas fluorescentes. No entanto, esta maior intensidade de fluorescência, principalmente do 8-QS, mostra pouca ou nenhuma sensibilidade com relação os íons metálicos adicionados. A sonda 8-QP mostra efetiva sensibilidade ao íon Be(II) e de acordo com o efeito observado para as outras espécies testadas, sugere-se que possa apresentar seletividade para o íon Be(II) além de mostrar-se bastante estável com relação a hidrólise em água.

IV.6. Resultados parciais obtidos para 1,8 – Bis(dimetilamino)naftaleno (BDAN) e 1,8 – diamino naftaleno (DN)

O composto 1,8-diamino naftaleno, inicialmente foi testado como sonda fluorescente na determinação de Be(II), porém, observou-se que a presença deste íon catalisa a fotodegradação do composto (**Figura 34**), ocorrendo uma diminuição significativa na fluorescência do mesmo. Não foram realizados mais experimentos com tal composto, porém pode-se sugerir que há a possibilidade do estabelecimento de um protocolo analítico baseado na reação que ocorre entre o 1,8-diamino naftaleno e Be(II).

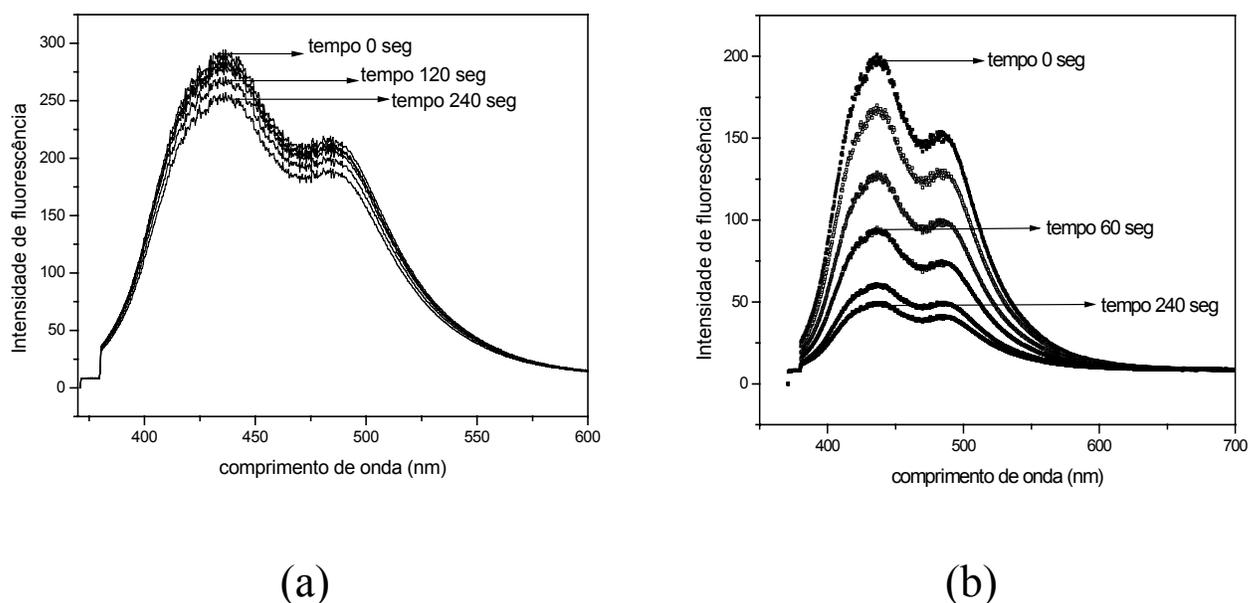


Figura 34. a) Fotodegradação de 1×10^{-4} mol/L de DN na presença de 0,03 mol/L de SDS, 0,02 mol/L de tampão acetato (pH 5,0); b) Fotodegradação de 1×10^{-4} mol/L de DAN na presença de $2,66 \times 10^{-4}$ mol/L de Be(II); 0,03 mol/L de SDS; 0,02 mol/L de tampão acetato (pH 5,0); $\lambda_{\text{emissão}}$ 430 nm e $\lambda_{\text{excitação}}$ 328 nm.

A princípio o composto 1,8– bis(dimetilamino)naftaleno (**BDAN**) foi de interesse para este estudo, por apresentar uma estrutura que esperava-se ser ainda mais eficiente que o 1,8-diamino naftol. No entanto, diferentemente do DANOL, a presença de Be(II) não

alterou de forma significativa a intensidade de fluorescência, tanto em solução aquosa quanto em solução micelar (**Figura 35**).

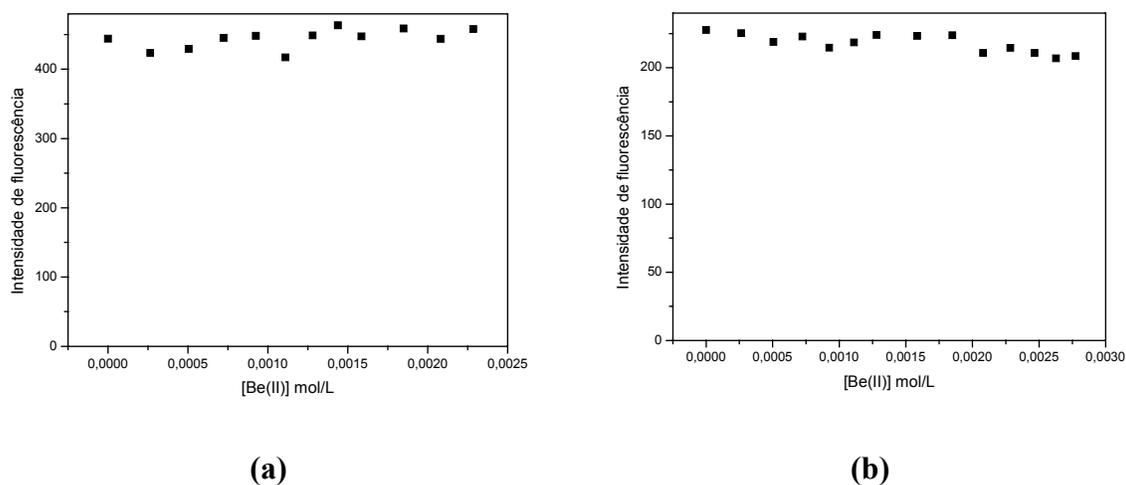


Figura 35. a) Representação da variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Be(II) em solução aquosa com BDAN em concentração de 1×10^{-4} mol/L; ($\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm e $\lambda_{\text{excitação}}$ 286 nm) b) Representação da variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Be(II) em solução aquosa micelar em presença de SDS 0,021 mol/L e, com BDAN em concentração de 1×10^{-4} mol/L; ($\lambda_{\text{emissão}}$ 512 nm e $\lambda_{\text{excitação}}$ 286 nm).

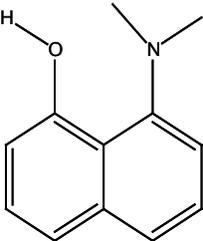
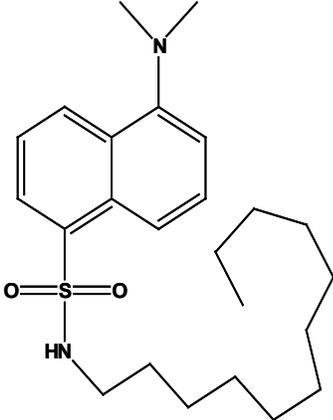
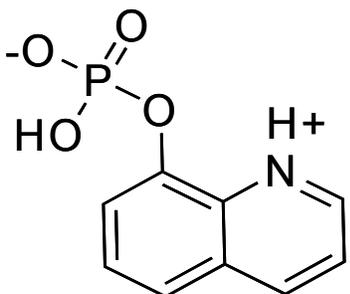
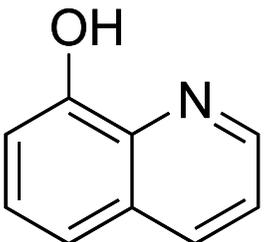
O 1,8-bis(dimetilamino) naftaleno apresenta ambos nitrogênios dimetilados, o que faz com que o “efeito esponja de prótons” seja mais efetivo, pelo observado sugere-se a hipótese de que devido ao tamanho e disposição no espaço estes grupos metilas provocam distorção no anel que, além de diminuir a fluorescência do composto, não permite uma complexão com o íon Be(II).

V. Conclusões

Verificou-se que a técnica de espectroscopia de fluorescência, tanto em meio micelar quanto em meio aquoso, mostra-se eficiente e de fácil aplicabilidade e, pode-se chegar as seguintes conclusões específicas:

1. A incorporação do 8-dimetilamino-1-naftol em micelas de dodecilsulfato de sódio promove um aumento do rendimento quântico da fluorescência;
2. O DANOL através de um provável “efeito esponja de prótons”, complexa efetivamente o Be(II), provocando um aumento significativo da fluorescência. Que mostra uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e o aumento da concentração de Be(II);
3. A adição de dodecilsulfato de sódio numa solução contendo DNSS promove a formação de uma micela mista, o que provoca uma forte inibição da reação de fotodegradação;
4. A interação do Be(II) com DNSS resulta em um aumento significativo da fluorescência, sendo que há uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de Be(II). Outros metais provocam o mesmo efeito, porém, muito menos efetivo, fato que pode permitir uma boa seletividade na determinação de Be(II);
5. A constante de Stern-Volmer, para a supressão da fluorescência do DNSS, permite estabelecer que esta sonda apresenta uma maior sensibilidade para detectar o íon Cu(II) do que para os íons Pb(II), Ni(II) e Fe(III);
6. A interação do Be(II) com 8-QP resulta em um aumento significativo da fluorescência, que depende linearmente da concentração de Be(II). Outros metais provocam o mesmo efeito, porém, muito menos efetivo, o que pode permitir uma boa seletividade na análise de Be(II);
7. Quando compara-se 8-QP, 8-QS e a 8-hidroxiquinolina pode-se observar o efeito do substituinte do anel com relação a intensidade de fluorescência, assim como a sensibilidade dos mesmos quando utilizados como sondas fluorescentes. O 8-QS apresenta uma maior intensidade de fluorescência, no entanto, mostra pouca ou nenhuma sensibilidade com relação aos íons metálicos Pb(II), Be(II) e Rb(I);
8. A 8-hidroxiquinolina apresenta uma supressão significativa de intensidade de fluorescência quando a mesma encontra-se em presença Cu(II).

9. Resumo das sondas e suas respectivas sensibilidade e seletividade com relação aos íons metálicos estudados.

Sonda fluorescente	Íon em análise	Sensibilidade/seletividade
 <p>DANOL</p>	<p>Be(II)</p> <hr/> <p>Ca(II) Pb(II) Mg(II)</p>	<p>Alta/Boa</p> <hr/> <p>Muito baixa</p>
 <p>DNSS</p>	<p>Be(II)</p> <hr/> <p>Ca(II) Mg(II) Zn(II) Rb(I) Al(III) Na(I) Cd(II)</p> <hr/> <p>Cu(II) Pb(II) Ni(II) Fe(III)</p>	<p>Alta/Boa</p> <hr/> <p>Muito baixa</p> <hr/> <p>Boa/Boa</p>
 <p>8-QP</p>	<p>Be(II)</p> <hr/> <p>Pb(II) Rb(I) Fe(III)</p>	<p>Boa/Boa</p> <hr/> <p>Muito baixa</p> <hr/> <p>Boa/Boa</p>
 <p>8-HOQ</p>	<p>Be(II) Rb(I)</p> <hr/> <p>Cu(II)</p>	<p>Muito baixa</p> <hr/> <p>Alta/Boa</p>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANASTAS, P.T.; WAENER.C. **Green Chemistry. Theory and Practice** Oxford University Press. U.K.; 135, 1998.
- BARROW, G. M.; **Estructuras de las moléculas**. Editora Reverté-SA, USA, 1967.
- BEBER, ROSANE C., **Incorporação e reatividade diferencial de ânions em micelas zwitteriônicas de sulfobetáinas**, Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2005.
- BERTOCINI, CÉLIA R.A., **Efeito de aditivos em micelas catiônicas**, Dissertação, UFSC, Florianópolis SC, 1989.
- BRINCHI, L.; DIONIGI, C.; PROFIO, P.; GERMANI, R.; SAVELLI, G. E BUNTON, C. **A. Effects of amine oxide surfactants on reactions of bromide and hydroxide ions methylnaphthalene-2-sulfonate**. J. Colloid Interface Sci., v. 211, p. 179-184, 1999.
- BUNTON;C.A; NOME, F; QUINA, F.H E ROMSTED, L.S. **Ion Binding and Reactivity at Charged Aqueous Interfaces Aqueous**. Research, 24, 357, 1991.
- CASTRO, E., N., F., **Química na Sociedade**. 2ª ed., Ed. Universidade de Brasília, 2000.
- CLAUDINO, A., **Determinação de íons de metais traço (Cu²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺) por Voltametria de Redissolução em Água do Mar da Baía Norte da Grande Florianópolis**, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2003.

DEVOL, I., BARDEZ, E. **Complexation of Al(III) by 8-Hydroxyquinoline and Drastic Fluorescence Enhancement in Reverse Micelles.** J. of colloid and Interface science, 200, p 240-248, 1998.

DYE B. W.; BRETTHAUER ERICH, SEIM.; *et al.* **Fluorometric Determination of Selenium in Plants and animals whit 3,3`-Diaminobenzidine.** Analytical Chemistry University of Nevada, University Station, Reno, Nev. V. 35, N. 11, p.1687-1692, October, 1963.

ELWORTHY, P.H.; FLORENCE, T.A. MACFARLANE,C.B.; **Solubilization by surface active agentes and its applications in chemistry and the biological sciences,** London, Ed. Chapman & Hall, 1968.

ESCABIPEREZ, J.R.; NOME, F.; FENDLER, J.H. **Energy-Transfer In Micellar Systems - Steady-State And Time Resolved Luminescence Of Aqueous Micelle Solubilized Naphthalene And Terbium Chloride.** J. of the American Chemical Society, 99, 7749, 1977.

FENDLER, E. J.; FENDLER, J. H.; **Catalysis in micellar and macromoléculas systems,** Academic Press, , 516p, 1975.

FENDLER J. H. **Membrane Mimetic Chemistry,** Willey New YorK 1982.

FIEDLER, H.D.; WESTRUP, J.L.; SOUZA, A.J.; PAVEI, A.D.; CHAGAS, C.U.; NOME, F. **Cd(II) determination in the presence of aqueous micellar solution.** TALANTA., 64, 190, 2004.

FRITZEN, M. B.; SOUZA, A. J.; SILVA, T. A. G. SOUZA, I.; NOME, R. A.; FIEDLER, H. D.; NOME F. **Distribution of Hexavalent Cr species between the Clay Mineral Surface-Water Interface.** J. of Colloid and Interface Science, 1-7, 2006

- GEER, R. D.; EYLAR, E. H.; ANACKER, E. W.; **Dependence of micelle aggregation number on polar head structure. 1. Light scattering by aqueous solutions of decylammonium salts and related surfactants.** *J. Physical Chemistry*.75, 369; 1971.
- HINZE, W.L.; MITTA K.L. **Solution Chemistry of Surfactants**, vol.1, Plenum Press, New York. 1979. 79-127.
- HINZE, W.L. ACS Colloid and Surface Science Symposium. **Nanoparticles and Colloids in Analysis**. 12-15 de Junho, 2005. Potsdam, NY.
- KIRBY, A.; PERCY, M. J.; **Synthesis of 8-substituted 1-naphthylamine derivatives. Exceptional reactivity of the substituents.** *Tetrahedron*, vol 44, No 22, UK, 1988.
- LAKOWICZ J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy** Plenum Press New York 1983.
- LOCATELLI, C., TORSI, G., **Determination of Se, As, Cu, Pb, Cd, Zn and Mn by anodic and cathodic stripping voltammetry in marine environmental matrices in the presence of reciprocal interference. Proposal of a new analytical procedure.** *J. Microchemical* , v. 65, p.293-303, 2000.
- MACCARTHY, A.; **Methods of Analysis and Detection**. Cambridge University Press, Inglaterra, 2001.
- MANIASSO, N., **Ambientes micelares em química analítica.** *Química Nova*, v. 24, n. 01, p. 87-93, 2000.
- MILLER, J. N.; **Standards in Fluorescence Spectrometry – Ultraviolet Spectrometry group**. Londres, 1981.

- MUKERJEE, P.; MYSELS, K. J.; **Critical micelles concentration of aqueous surfactant systems**, Washington: U.S. Gov. Printing Office, Superintendent of Documents, 1971. (NSRDS-NBS 36.)
- NAGASAWA, K.; YOSHIDOME, H.; **Metal-catalyzed reaction of 8-quinolyl sulfate and its application to preparation of biochemically related sulfate esters**; J. of Organic Chemistry; 39; 1681-1685; 1974.
- NEVES, MARIA F. S., **Propriedades físico-químicas de detergentes catiônicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Florianópolis, SC, 1987.
- NIMIS, P. L., et all, **Bryophytes as indicators of trace metals pollution in the River Brenta (NE Italy)**, The Science of the Total Environment, v. 286, p.233-242, 2002.
- NOME, R. A.; MENDIGUCHÍA-MARTINEZ, C.; NOME, F.; FIEDLER, H. D.; **Theoretical framework for the distribution of trace metals among the operationally defined speciation phases of a sediment**. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 20, 693-697, 2001.
- PELIZZETTI, E.; PRAMAURO, E.; **Analytical applications of organized molecular assemblies**, Analytical Chimica Acta, 169, 1985 .
- PORTER, M. R.; **Recent developments in the analysis of surfactants. Critical reports on applied chemistry**, N.Y., vol. 32 Ed. Elsevier Science Ltde, 1978.
- PRAT, M.D.; COMPAÑÓ, R.; GRANADOS, M.; MIRALLES, E.; **Liquid chromatographic determination of gallium and indium with fluorimetric detection**; J. of Chromatography A, 746, 239-245, 1996.
- QUINA, F. H.; HINZE, W. L.; **Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach**, Ind. Eng. Chem. Res. 38,4150-4168; 1999.

- ROSEN, M. J.; **Surfactants and interfacial phenomena**, N.Y., Ed. Wiley-Interscience, 1978. Acta 1989, 219, 295.
- ROHATGI-MUKHERJEE, K.K. **Fundamentals of Photochemistry**, New Delhi. New Age International Limited, Publishers. 1992.
- SANTOS, E., **Contribuição ao estudo de poluição ambiental por metais pesados: a área do banhado da Estiva dos Pregos**, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 1992.
- SAPPELLI, E.; FIEDLER, H.D., e NOME, F., **Efeito de Surfactantes na Complexação de 8-Hidroxiquinolina e Zn(II)**. 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2005.
- SAPPELLI, E. **Parâmetros físico-químicos da reação de Zn(II) e Cd(II) com 8-hidroquinolina acompanhado por espectrofluorimetria em meio micelar**. Dissertação de Mestrado Curso de Pós-Graduação em Química, UFSC, Florianópolis, SC, 2006.
- SOROKA, K., VITHANAGE, R. S., PHILLIPS, D.A., WALKER and DASGUPTA, P.K., **Fluorescence properties of metal complexes of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid and chromatography applications**, Analytical Chemistry, 59, 629-636, 1987.
- TESSIER A., D.R. TURNER (EDS), **Metal Speciation and Bioavailability in aquatic Systems**, IUPAC, Wiley, Oxford, UK, 1995.
- TURRO, N.J., GRATZEL, M., BRAUN, A. M.; **Photophysical and photochemical processes in micellar systems**. Angewandte chemie-international, editon in english, 19(9): 675-696, 1980.

VARGAS, L. V. **Determinação Fluorimétrica de Pb(II) em Sistemas Aquáticos. Aplicação do método para análise de outros metais e estudos de biodisponibilidade.** Dissertação de Mestrado Curso de Pós-Graduação em Química, UFSC, Florianópolis, SC, 2004.

VARGAS, L.V.; SAND, J.; BRANDÃO, T.A.S.; FIEDLER, H.D.; QUINA, F.H.; NOME, F. **Determination of environmentally important metal ions by fluorescence quenching in anionic micellar solution.** The Analyst, 130, 242, 2005.

VARGAS, L. V.; MELLO, R. S.; BEDENDO, G.C.; SAPELLI, E.; FIEDLER, H. D.; NOME, F.; **Determination of Environmentally Important Metal Ions by Fluorescence Quenching in Micellar Solutions.** ACS Colloid and Surface Science Symposium, Nova York, USA, 2005.

WEEST, C. C.; HARWELL, J. H.; **Environmental Science and Technology**, 26, 2324, . 1992.

WESTRUP, J.L., FRITZEN, M.B., SOUZA, A.J., BEDENDO, G.C., NOME, F., FIEDLER, H.D. **Sorption and Desorption of Cd(II) at the Clay Particle-Water Interface and its Relevance to the Distribution of Metal Ions in Natural Systems.** J. Braz. Chem. Soc. V. 16 No.5, 982-987, 2005.

WEERS, J. G.; RATHMAN, J. F.; AXE, F. U.; CRICHLLOW, C. A.; FOLAND, L. D.; SCHEUING, D. R.; WIERSEMA, R. J. E ZIELSKE, A. **Effects of intramolecular charges separation distance on the solutions properties of betaines and sulfobetaines.** Langmuir, v. 7, n. 5, p. 854-867, 1991.

WILLARD, H.L.; MERRIT, JR.; DEAN J. **Análise Instrumental** ^a 2 ed. Fundação Colouste Gulbenkian. Lisboa, 986 p, 1974.