

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Mestrado de Lauro Camargo Dias Júnior defendida e aprovada em 04/10/1991 pela comissão julgadora composta pelos seguintes professores doutores: Francisco B. T. Pessine (Unicamp), Pedro L. O. Volpe (Unicamp) e Laerte Miola (Unesp)


Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Cidade Universitária Zeferino Vaz
Caixa Postal 6154
13081 - Campinas/SP - Brasil

"IMPLEMENTAÇÃO DE TÉCNICAS DE
LUMINESCÊNCIA EM QUÍMICA ANALÍTICA"

LAURO CAMARGO DIAS JÚNIOR

TESE DE MESTRADO

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO B. T. PESSINE

OUTUBRO DE 1991



*Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Lauro e Luiza*

Agradecimento especial
ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine
pela amizade, apoio e dedicação constante

AGRADECIMENTOS

Às seguintes pessoas, pela amizade e contribuição para a elaboração deste trabalho:

Aos amigos do grupo:

Prof Edvaldo Sabadini

João Batista Marques Novo

Idelazil Cristina do Nascimento

Ana Marta F. Tucci, Deborah D. Brunelli, Claudia A.

Bortolato, José Jair V. Cirino, João Luiz M. da Silva,

Leda Coltro, Reinaldo Aparecido Baricatti e Sandra M.

M. Franchetti.

Prof. Marcelo G. Oliveira, Prof. Dr. Celso A. Bertran e

Profª. Dra. Tereza D. Z. Atvars.

Ao Estevam V. Spinacé

Ao Miguel Zoca

Ao Watson Loh

À Maria Claudia C. Costa

Às funcionárias e amigas:

Claudia Martelli,

Hercília P. Oliveira,

Maria Helena A. Silva e

Cássia R. Rigoletto.

Ao grupo do Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe, pelo empréstimo de reagentes.

Aos demais funcionários e à direção do Instituto de Química.

Aos Laboratórios Cristália, pela doação dos fármacos.

à FAPESP, ao CNPq, ao FAEP e ao FINEP - QUÍMICA PARA MATERIAIS ELETRÔNICOS, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2

INTRODUÇÃO TEÓRICA

CAPÍTULO 1) FOSFORESCÊNCIA À TEMPERATURA AMBIENTE. - (FTA).....	3
1.1) Processos Fotofísicos em Moléculas Orgânicas.....	3
1.1.1) <u>Absorção (A)</u>	3
1.1.2) <u>Relaxação Vibracional (RV)</u>	4
1.1.3) <u>Conversão Interna (CI)</u>	4
1.1.4) <u>Fluorescência (f)</u>	4
1.1.5) <u>Cruzamento Inter-Sistema (CIS)</u>	4
1.1.6) <u>Fosforescência (F)</u>	5
1.1.7) <u>Fluorescência Térmica Atrasada (FA)</u>	6
1.2) Fluorescência e Fosforescência em Química Analítica.....	6
1.3) Fosforescência à Temperatura Ambiente.....	7
1.3.1) <u>Introdução</u>	7
1.3.1.a) <u>Suportes Celulósicos</u>	8
1.3.1.b) <u>Sílica-gel</u>	11
1.3.1.c) <u>Acetato de Sódio</u>	12
1.3.1.d) <u>Soluções Micelares</u>	13
1.3.1.e) <u>Sumário das Características Analíticas</u> <u>dos Métodos</u>	14
1.3.2) <u>Processos que Afetam a FTA</u>	14
1.3.2.a) <u>Efeito do Átomo Pesado</u>	14
1.3.2.b) <u>Efeitos do Oxigênio e da Umidade</u>	15
1.3.2.c) <u>Efeito da Matriz</u>	16
1.3.3) <u>Instrumentação para a Obtenção de FTA</u>	16
1.3.3.a) <u>Fosforoscópio</u>	16
1.3.3.b) <u>Integrador Síncrono Tipo</u> <u>"Box-Car Averagers"</u>	17

CAPÍTULO 2) MICELAS EM QUÍMICA ANALÍTICA.....	19
2.1) Surfatantes e Micelas.....	19
2.2) Interação de Solutos com Micelas.....	23
2.3) Emprego de Fluorimetria em Meio Micelar.....	24
CAPÍTULO 3) SUBSTÂNCIAS ESTUDADAS.....	27
3.1) Fenotiazinas (Maleato de Levomepromazina e Cloridrato de Clorpromazina.....	27
3.2) Alaranjado de Acridina.....	28
3.3) Merbromin (Mercúrio-Cromo).....	29
3.4) Cristal Violeta.....	30
OBJETIVOS.....	32

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 4.....	33
4.1) Reagentes.....	33
4.2) Instrumentação.....	34
4.2.1) <u>Espectrofluorímetro Convencional</u>	34
4.2.2) <u>Espectrofluorímetro com Laser</u>	34
4.3) Preparo das Amostras para FTA.....	37
4.3.1) <u>Papel de Filtro</u>	37
4.3.2) <u>Sílica-gel</u>	38
4.3.3) <u>Soluções Micelares</u>	39
4.4) Preparo das Amostras para Fluorimetria em Meio Micelar.....	40
4.4.1) <u>Determinação da c.m.c. do SDS e CTAB</u>	39
4.4.2) <u>Maleato de Levomepromazina</u>	40
4.4.3) <u>Cloridrato de Clorpromazina</u>	41
4.4.4) <u>Alaranjado de Acridina</u>	41
4.4.5) <u>Merbromin. (Mercúrio-cromo)</u>	41
4.4.6) <u>Cristal Violeta</u>	42

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 5) FOSFORESCÊNCIA À TEMPERATURA AMBIENTE.....	43
5.1) Substrato: Papel de Filtro.....	43
5.2) Sílica-gel.....	47
5.3) FTA Estabilizada por Micelas.....	48
 CAPÍTULO 6) FENOTIAZINAS.....	 50
 CAPÍTULO 7) ALARANJADO DE ACRIDINA.....	 59
 CAPÍTULO 8) MERBROMIN (MERCÚRIO-CROMO).....	 65
 CAPÍTULO 9) CRISTAL VIOLETA.....	 71
 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	 76
 APÊNDICE.....	 77
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 78

RESUMO

Implementação de Técnicas de Luminescência em Química Analítica
Lauro Camargo Dias Júnior
Tese de Mestrado - IQ/Unicamp - Brasil - 1991

Este trabalho se divide em duas partes. A primeira, consistiu na implementação da técnica de fosforescência à temperatura ambiente, onde a amostra a ser analisada é depositada sobre uma superfície sólida (papel de filtro ou sílica gel) ou em meio micelar.

Para isto foi utilizado um fluorímetro cuja fonte de excitação compreendia um laser de nitrogênio, a qual não se mostrou adequada pelo fato de emitir luz em um único comprimento de onda (337,1nm) e provocar intensa emissão do substrato em virtude da potência da radiação emitida. Os tratamentos realizados (extrações com diversos solventes e fotodegradação com radiação UV de lâmpada de Hg) nestes papéis com o objetivo de reduzir esta emissão não foram satisfatórios.

A sílica-gel, embora mostre emissão menos intensa que o papel, não apresenta boa aderência à superfície da placa de vidro enquanto que as soluções micelares requerem vigorosa remoção de oxigênio através do borbulhamento de gás inerte. Ambos são, sob o aspecto analítico, impraticáveis.

A segunda parte do trabalho consistiu na obtenção de espectros de fluorescência e construção de curvas analíticas para compostos de interesse clínico, em meio micelar. As substâncias estudadas foram: maleato de levomepromazina (I), cloridrato de clorpromazina (II), alaranjado de acridina (III), mercúrio cromo (IV) e cristal violeta (V), enquanto que os surfatantes empregados foram SDS, CTAB e Brij-35.

Os espectros foram obtidos através de um espectrofluorímetro convencional. Para as substâncias I e II foram determinadas concentrações, respectivamente, de até 10^{-7} e 10^{-5} M em solução de SDS. Pudemos verificar o efeito da formação de agregados nos espectros de excitação para estas soluções. Para a substância III foi possível determinar até concentrações da ordem de 10^{-10} M em SDS, além de verificarmos o efeito da formação de pares-iônicos e agregados pré-micelares na região abaixo da c.m.c.. Para IV, verificamos a variação dos espectros de absorção e emissão em função do pH da solução, concluindo pela existência de espécies em equilíbrio ácido-base. As concentrações de IV que puderam ser determinadas chegaram a cerca de 10^{-10} M, quando em solução de Brij-35 em meio tamponado (pH 11,5). Para a substância V, foram feitos estudos semelhantes de variação de pH, mas não foram observadas a presença de diferentes espécies em equilíbrio ácido-base, entre pH 3 e 7. Os limites determinados foram 10^{-8} M, sendo que o Brij-35 foi o surfatante que proporcionou os sinais de emissão mais intensos.

ABSTRACT

Implementation of Luminescence Techniques in Analytical Chemistry
Lauro Camargo Dias Júnior
M. Sc. Thesis - IQ/Unicamp - Brazil - 1991

This work involves two parts. The first one is related to the development of the Room-Temperature Phosphorescence as an analytical technique. In this case, the sample to be analysed is adsorbed on the surface of a solid material (filter paper or silica-gel) or dissolved in a micellar medium.

In the beginning a nitrogen laser spectrofluorimeter was used for sample analysis. However, this showed to be inadequate because: 1) the only wavelength available from the laser is 337,1 nm and 2) there is an intense substrate emission due to the strong radiation. The treatments carried out (extractions with several solvents and photodegradation with UV-radiation from a Hg lamp) on these papers to reduce this emission were unsuccessful.

Silica-gel, shows less intense emission but does not have enough adherence to the glass surface while micellar solutions demands vigorous oxygen remotion. Therefore, from an analytical viewpoint, both are impracticable.

The second part of this work consisted in the use of fluorimetry to get the spectra and analytical curves for some pharmaceutical drugs in micellar media. These were: levomepromazine maleate (I), chlorpromazine hydrochloride (II), acridine orange (III), merbromin (IV) and crystal violet (V) and the followings surfactants: SDS, CTAB and Brij-35.

The spectra were obtained through a conventional spectrofluorimeter. The lowest concentrations determined for compounds I and II were about 10^{-7} and 10^{-5} M, respectively. For these solutions, we could see the effect of aggregates formation on the spectra. Compound III was determined until concentrations c.a. 10^{-10} M; further on, we investigated the ionic-pair and pre-micellar aggregate formation on the spectra for concentrations below c.m.c.. For IV, it was studied the influence of pH on the absorption and emission spectra from which it was concluded that exists different acid-base equilibrium species. The smallest concentrations obtained for IV was 10^{-10} M for the Brij-35 solution in buffered medium (pH 11,5). Finally V did not show the same behavior in the pH range of 3 to 7. The lower limit concentration was 10^{-8} M and Brij-35 was the one responsible for that highest emission signals.

CAPÍTULO 1

FOSFORESCÊNCIA À TEMPERATURA AMBIENTE INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1) Processos Fotofísicos em Moléculas Orgânicas

Os principais processos fotofísicos envolvidos em transições eletrônicas podem ser visualizados no diagrama de Jablonskii, (Fig. 1.1), e são descritos logo a seguir (Vo-Dinh, 1984).

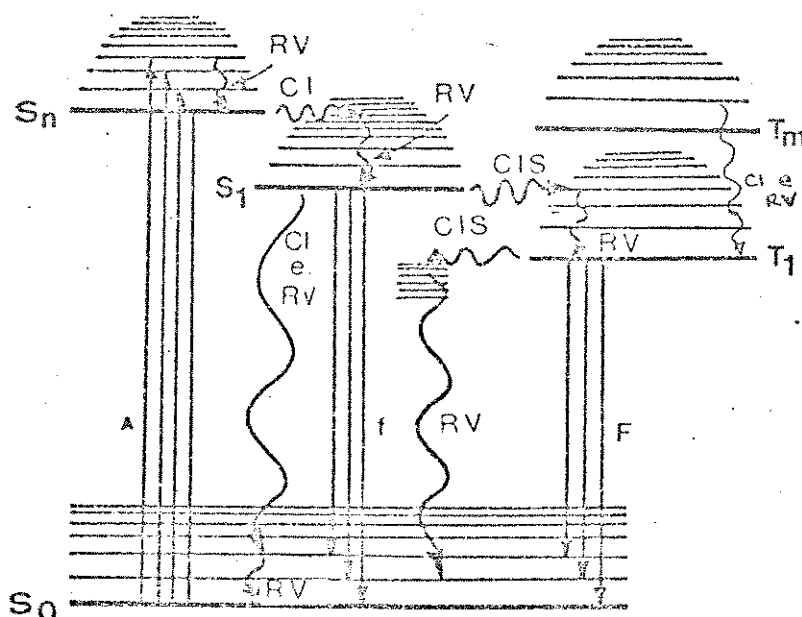


Figura 1.1: Processos fotofísicos típicos de moléculas orgânicas. A = absorção; f = fluorescência; F = fosforescência; RV = relaxação vibracional; CI = conversão interna; CIS = cruzamento inter-sistema; S_n = n-ésimo estado singlete e, T_m = m-ésimo estado tripleto.

1.1.1) Absorção (A)

A maioria das moléculas orgânicas encontram-se no estado eletrônico singlete fundamental S_0 ocupando, em temperaturas ambientes, os níveis vibracionais de menor energia, de acordo com a distribuição de Boltzmann. Através da absorção de um fóton a molécula é excitada a um determinado nível vibracional de algum estado eletrônico singlete excitado (S_n). O tempo característico deste

processo é de 10^{-15} segundos.

1.1.2) Relaxação Vibracional (RV)

No estado S_n a espécie sofre desativação não radiativa liberando calor ao meio, passando a ocupar os níveis vibracionais mais baixos do estado eletrônico em que ela se encontra. Este processo tem duração entre 10^{-13} a 10^{-11} segundos.

1.1.3) Conversão Interna (CI)

Uma vez no estado S_n , a molécula rapidamente sofre conversão a um nível vibracional isoenergético do estado eletrônico S_{n-1} . A seguir, ela passa a sofrer sucessivos processos de relaxação vibracional e conversão interna até chegar ao primeiro estado singlete excitado (S_1).

1.1.4) Fluorescência (f)

A partir de S_1 , o sistema pode retornar ao estado fundamental S_0 através de uma nova conversão interna ou via radiativa, pela emissão de um fóton. Este processo é chamado de fluorescência, ocorrendo apenas entre estados de mesma multiplicidade de spin, e a partir do primeiro estado eletrônico excitado ($S_0 + S_1$), embora haja algumas exceções como o azuleno e o anuleno para os quais a transição observada ocorre entre S_2 e S_0 . O tempo de vida para a fluorescência varia de 10^{-9} a 10^{-7} segundos.

1.1.5) Cruzamento Inter-Sistema (CIS)

Este processo não radiativo ocorre entre dois estados com diferentes multiplicidades de spin. A molécula pode passar de S_1 para um estado tripleto (T_m) e sofrer sucessivos processos de RV e CI até chegar a (T_1).

1.1.6) Fosforescência (F)

Uma vez no estado T_1 o sistema pode retornar a S_0 por desativação não radiativa (via RV e CI) ou, ainda, pela emissão de um fóton num processo chamado de fosforescência ($S_0 + T_1$). Este termo é utilizado para transições entre estados de diferentes multiplicidades de spin, as quais são proibidas pelas regras de seleção. Portanto, a duração da fosforescência é maior, podendo variar de micro-segundos até alguns segundos.

A observação de fosforescência é possível graças ao acoplamento spin-órbita. O movimento dos elétrons induz um campo magnético que interage com o seu momento magnético de spin, alterando a sua direção. Disto resulta uma mistura entre estados de diferentes multiplicidades fazendo com que os estados singletes passem a ter certo caráter de tripleto e vice-versa, removendo assim a proibição mencionada para a transição.

O acoplamento spin-órbita pode ser tratado quanticamente pela teoria de perturbações onde o novo Hamiltoniano (H_1) para o sistema será acrescido de um termo correspondente à perturbação (H_{so}):

$$H_1 = H + H_{so} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

A função de onda do primeiro estado tripleto será dada por:

$$\psi_1(T_1) = \psi(T_1) + \sum_n [\alpha_n \psi(S_n)] \quad (\text{Eq. 1.2})$$

onde a soma é conduzida sobre os estados singletes puros com funções de onda $\psi(S_n)$ e α_n são os coeficientes de perturbação spin-órbita, que também podem ser obtidos por:

$$\alpha_n = \frac{\langle \psi(T_1) | H_{so} | \psi(S_n) \rangle}{| E(T_1) - E(S_n) |}$$

onde $E(T_1)$ e $E(S_n)$ são as energias dos estados tripleto e dos singletes, respectivamente. Portanto, quanto menores as diferenças de energia entre estes estados, mais eficiente será o referido

acoplamento.

1.1.7) Fluorescência Térmica Atrasada (FA)

É um processo menos comum onde a molécula no estado T_1 retorna ao estado S_1 pela ativação térmica, já que estados tripletes têm energias menores que os correspondentes singletes. Um exemplo típico ocorre com a eosina, que apresenta o espectro de emissão idêntico ao observado na fluorescência, mas com tempo de vida maior, devido ao maior tempo de permanência da molécula no estado excitado (T_1). O pireno apresenta outro tipo de fluorescência atrasada, onde a ativação se dá pela formação de dímeros de moléculas no estado triplete. O espectro, neste caso, corresponderá à emissão do dímero.

1.2) Fluorescência e Fosforescência em Química Analítica

O uso da fluorescência em química analítica tem sido muito importante, conforme relatado na literatura por Udenfriend (1969) e Wehry (1976). Esta técnica se destaca devido à sensibilidade e seletividade.

A sensibilidade da técnica é muito maior que a de espectroscopia de absorção sendo que o ruído de fundo é muito pequeno. Devido à alta seletividade, permite analisar misturas com dois ou mais compostos, pois, excitando-as em um determinado comprimento de onda, elas podem ter emissão em diferentes regiões do espectro. Além disto, cada composto possui tempo de vida característico, pelo qual pode ser identificado. Outros métodos envolvem reações químicas da substância a ser analisada com grupos cromóforos que as tornam mais fluorescentes.

Já a fosforescência sofre grande competição com processos de desativação não radiativos envolvendo o estado triplete. Isto ocorre devido a vários fatores tais como ao fato da transição ser proibida por multiplicidade de spin; à menor diferença de energia envolvida na transição comparando-se com a fluorescência e, finalmente, à elevada probabilidade de desativação por colisões devido ao maior tempo de vida da espécie excitada.

Desta maneira, a detecção de fosforescência em soluções

líquidas à temperatura ambiente faz com que a intensidade da mesma seja extremamente pequena ou até não detectável. A presença de oxigênio molecular, que é um excelente supressor deste fenômeno (pois ele se encontra no estado fundamental triplete), também contribui para a desativação não radiativa. Portanto, é necessário a "imobilização" da molécula em um meio rígido e cuidadosa degasagem da solução para remover o oxigênio dissolvido.

A técnica de fosforescência em baixas temperaturas é a mais convencional e, com a mesma, é possível conseguir um meio rígido trabalhando-se com amostras à temperatura do nitrogênio líquido (77K). As vantagens são: limite de detecção extremamente baixo (sinal/ruído = 3), sendo a fosforescência observada até para quantidades de sub-nanogramas; grande faixa de linearidade (entre 10^4 e 10^6 ordens de grandeza); grande seletividade, haja visto que o número de amostras que fosforecem é menor que aquelas que apresentam fluorescência e alta resolução espectral proporcionada pela baixa temperatura pois ocorre redução da congestão espectral (Ward e col., 1981).

Entretanto, existem grandes inconvenientes para que esta técnica seja utilizada em química analítica, pelos seguintes motivos: necessidade de equipamentos criogênicos; perda de tempo para degasificar, congelar e posicionar amostras na direção da fenda de entrada do monocromador. Somente assim é possível a obtenção de resultados reprodutíveis.

1.3) Fosforescência à Temperatura Ambiente

1.3.1) Introdução

Na literatura existem relatos sobre a observação de fosforescência à temperatura ambiente (FTA) desde o século XIX, quando Wiedmann (1888) observou emissão de corantes orgânicos em soluções sólidas e Schmidt (1896), em corantes adsorvidos em géis sólidos. Somente na década de 60, entretanto, Roth (1967) fez um estudo sobre o fenômeno e, finalmente, o grupo de Wellons, Paynter e Winefordner (1974), estabeleceu as bases desta, como técnica analítica, a qual ganhou relativa popularidade principalmente na análise de traços

orgânicos (Vo-Dinh, 1984).

A referida técnica consiste na utilização de um substrato sólido ou líquido, onde a amostra estaria "imobilizada", evitando-se assim desativação por colisões. Os principais substratos (chamados também de suportes ou matrizes) estão mencionados na Tab. 1.1, e alguns serão descritos a seguir.

Tabela 1.1: Principais substratos para uso em FTA

<u>A. Substratos Sólidos</u>	
Papel	Sacarose
Papel de troca iônica	Amido
Alumina	Carvão
Sílica-gel	Mat. inorgânicos
Asbestos	Misturas sal-polímero
Acetato de sódio	
<u>B. Meios Líquidos</u>	
Soluções micelares	
Soluções fotossensibilizadoras	

1.3.1.a) Suportes Celulósicos

A FTA em suportes celulósicos foi primeiro observada por Roth (1967), que estudou compostos tais como o ácido p-aminobenzoico e o 2-aminofluoreno depositados em superfícies de papéis de filtro e em finas camadas de celulose-D.

Schulman e col. (1972, 1973) investigaram o fenômeno em uma variedade de substratos como sílica, alumina, papel e asbestos, concluindo que a função do substrato é fornecer a rigidez necessária para que as moléculas permaneçam "imobilizadas".

A natureza iônica do composto também é importante na geração do fenômeno. O 2-naftol não o apresenta quando adsorvido em papel, enquanto que seu sal, o naftoato de sódio, a exibe de forma intensa (Schulman e col., 1977). Compostos não iônicos polares como o 5-acetiluracil, por exemplo, mostram sinais fracos de emissão fosforescente. (Wellons e col., 1974).

A principal interação entre a amostra e o substrato (no caso os grupos hidroxila do papel) é atribuída à formação de pontes de hidrogênio. Uma evidência para esta conclusão foi baseada na drástica redução da intensidade de emissão quando foi utilizado papel silanizado (quando há remoção de grupos hidroxilas ativos da

superfície do papel) como substrato. No caso do naftoato de sódio a redução da intensidade de emissão foi de 90% com o referido substrato (Schulman e col., 1977).

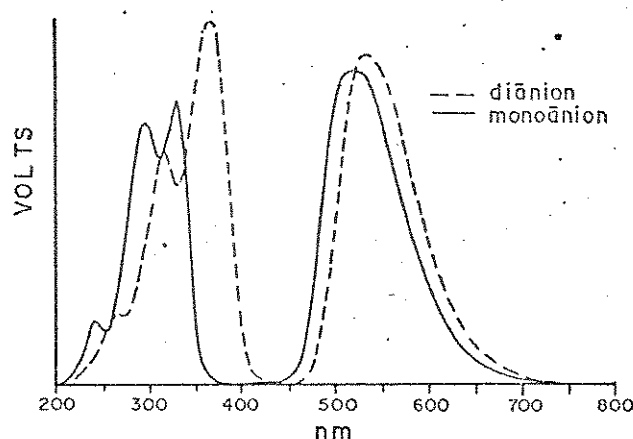


Figura 1.2: Espectros de excitação e FTA das espécies mono e dianiônica do 2-naftol-6-sulfonato de sódio adsorvido em papel de filtro a partir de, respectivamente, solução em água em NaOH 1M (Schulman e col., 1977).

Moléculas apolares e sem capacidade para formar pontes de hidrogênio, como o pireno, não mostram sinais significantes de FTA, concluindo-se que as forças entre a amostra e o substrato não são suficientemente fortes para impedir colisões e desativações roto-vibracionais (Vo-Dinh e col., 1977). A presença de átomos pesados, porém, pode provocar aumento da FTA nestas moléculas devido ao acoplamento spin-órbita, já mencionado.

O impedimento estérico, dificultando a interação amostra-substrato, também pode prejudicar a emissão tal como acontece com a substância 4-bifenilcarboxilato de sódio, quando comparada com o seu isômero 2-bifenilcarboxilato de sódio. Este último não apresenta impedimento estérico resultando em um sinal luminescente mais intenso. (Schulman e col., 1977).

O uso do papel de filtro como substrato é muito simples, versátil e de baixo custo (Vo-Dinh e col., 1977). Para o preparo das amostras, os procedimentos mais simples consistem em: preparo de uma solução do composto a ser analisado; deposição, com uma micro-seringa, de uma alíquota desta solução na superfície do papel, previamente recortado em pequenos discos; secagem deste em dessecador, estufa ou ainda, sob luz infra-vermelha e finalmente, colocação da amostra em um suporte mantendo-se um fluxo de ar ou de um gás inerte seco no

compartimento de amostras.

A secagem prévia e o fluxo de gás mencionados são fundamentais para evitar que a amostra entre em contato com o oxigênio ou umidade. O uso de uma lâmpada de luz infra-vermelha é o meio mais rápido e eficiente para tal secagem (Wellons e col., 1974).

Tabela 1.2: Resultados obtidos via FTA, para compostos orgânicos adsorvidos em papel de filtro (Wellons e col., 1974).

COMPOSTO ^a	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\lambda_{em.}$ (nm)	L.D. ^b (CM)
ácido 4-aminobenzóico	273	426	$2 \cdot 10^{-7}$
2,4-ditiopiri - midina	374	464	$1 \cdot 10^{-5}$
6-metilpurina	268	449	$8 \cdot 10^{-6}$
6-cloropurina	280	463	$3 \cdot 10^{-5}$
sulfanilamida	267	426	$3 \cdot 10^{-6}$
triptofano	280	448	$4 \cdot 10^{-6}$
5-acetiluracil	304	421	$2 \cdot 10^{-6}$
vanilina	332	519	$8 \cdot 10^{-7}$

^a Amostras dissolvidas em solução de NaOH 1M, empregando-se aliquotas de 5 μ l sobre o papel de filtro Eaton - Dikeman 613

^b L.D. = Limite de detecção. Relação sinal / ruído = 2

Entretanto, o grande inconveniente do papel de filtro é o intenso ruído de fundo proveniente do mesmo, na região de 400 a 600 nm. Muitas tentativas foram feitas no sentido de solucionar este problema como a realizada por Ward e col. (1981), através de lavagens e aquecimento do papel para remover substâncias adsorvidas durante a fabricação. Alguns dos solventes utilizados foram: NaOH, HNO₃, etanol e benzeno, que não produziram redução significativa no ruído.

Bateh e col. (1982) fizeram uma avaliação de diversos produtos celulósicos, mantendo-os imersos em solventes como dioxano, água, ácido periódico e ácido dietilenotriaminopentacético. O objetivo destes testes foi a remoção de traços de metais e substâncias como hemiceluloses e/ou ligninas, supostamente luminescentes. A irradiação

do papel, sob uma lâmpada de mercúrio, na esperança de degradar o papel também foi tentada. Semelhante trabalho mas igualmente sem sucesso, foi realizado por Fidanza e col. (1986), em estudos de fluorescência a temperatura ambiente. Alguns resultados publicados por Bateh e col. (1982) são apresentados na tabela seguinte:

Tabela 1.3: Resultados de vários tratamentos com o papel SS-903 (Bateh e col., 1982).

TIPO DE TRATAMENTO	RESULTADOS ^a	
	SINAL DO BRANCO	SINAL DA AMOSTRA
Imersão em dioxano+ água (1:1), 48hs	-2	+2
Imersão em éter, 48hs	-1	0
Imersão em água em ebulição, 0.5 h	0	0
Imersão em ácido periódico, 12hs	sem sinal	sem sinal
Irradiação sob luz ultra-violeta, 12hs 250 Watts	0	-2

^a Os valores apresentados correspondem, respectivamente, a:
 -2: decréscimo de cerca de 100% na intensidade do sinal
 -1: decréscimo de cerca de 50%
 0: sinal não se altera
 +1: aumento de cerca de 50%
 +2: aumento de cerca de 100%

Branco: somente papel; Amostra: ácido p-aminobenzóico

1.3.1.b) Sílica-gel

Roth (1967) também detectou FTA em alguns compostos orgânicos adsorvidos em sílica-gel. Ford e col. (1978) estudaram FTA de isômeros de ácidos ftálicos e outros compostos com estruturas semelhantes, em placas cromatográficas cobertas com a mesma substância. Foi observado que compostos com maior potencial para formar pontes de hidrogênio exibem FTA mais intensa que outros com estrutura molecular análoga mas incapazes de formar as referidas ligações.

Entretanto, estudos posteriores demonstraram que nem

sempre a formação de pontes de hidrogênio é o mecanismo que proporciona FTA. Foi observado que o sal do ácido poliacrílico, presente em algumas marcas de sílica-gel era o agente responsável pela ocorrência de FTA em alguns compostos nitrogenados heterocíclicos tal como a benzo [f] quinolina (Ford e col., 1980).

O procedimento experimental é simples e apresenta semelhanças com o procedimento empregado para o papel, envolvendo a deposição da solução a ser analisada, com uma micro-seringa, na superfície da placa coberta com a sílica-gel e secagem desta em estufa (Ford e col., 1978). A referida técnica é aplicável, porém, a um número mais reduzido de compostos e fornece, em geral, sinais menos intensos que os obtidos através do emprego do papel de filtro, além do que o efeito de supressão exercido pelo oxigênio é mais intenso, o que é consistente com o fato de a sílica possuir maior área superficial (Ford e col., 1979).

Outros materiais inorgânicos como carvão, H_3BO_3 , $CaHPO_4$, $NaHPO_4$ e $CaSO_4$ pulverizados podem ser utilizados como substratos para alguns compostos aromáticos polinucleares (Su e col., 1982).

1.3.1.c) Acetato de Sódio

Outro tipo de substrato capaz de proporcionar FTA em compostos polares iônicos é o acetato de sódio. A interação deste substrato com uma substância típica, o ácido *p*-aminobenzóico foi investigada em detalhes por espectroscopia de refletância, fluorescência e absorção no infravermelho, sendo que estes estudos indicaram o envolvimento de ligações hidrogênio entre a amostra e o substrato. (Von Wandruszka e col., 1976 e 1977).

Algumas pteridinas, que mostravam sinais de FTA pouco intensos quando adsorvidas sobre papel de filtro ou sobre fibras de vidro, passaram a exibir intensa emissão nos mesmos suportes quando estes foram previamente impregnados com acetato de sódio. Tal observação foi atribuída ao fato desta substância interagir com as moléculas por ligações de hidrogênio e conseqüentemente promover uma rápida interação favorável à fosforescência (Parker e col., 1979).

Os procedimentos mais simples consistem em misturar a solução a ser analisada com o substrato, aquecendo-se em estufa e, em

seguida, pulverizando e transferindo-a para a cela de análise (Von Wandruszka e col., 1976 e 1977).

O uso de acetato de sódio é limitado devido a sua grande seletividade, embora ele apresente as vantagens de ser pouco sensível à umidade e ao oxigênio.

1.3.1.d) Soluções Micelares

Kalyanasundaram e col. (1977) observaram que diversos arenos tais como pireno, naftaleno e bifenil exibiam FTA quando dissolvidos em soluções micelares aquosas e, posteriormente, Cline Love e col. (1980) estudaram o uso analítico das micelas como substrato para FTA. As propriedades micelares que as tornam viáveis para tal uso são: estrutura conformacional das micelas que protege a molécula, no estado triplete, de colisões com supressores de fosforescência; o micro-ambiente micelar pode fornecer polaridade e equilíbrio ácido-base adequados o que ocasiona um aumento no rendimento quântico; permitem a detecção de espécies hidrofóbicas em meio aquoso e favorecimento do acoplamento spin-órbita devido a maior interação, na parte hidrofílica das micelas, com íons de átomos pesados.

Cline Love e col. (1980) investigaram FTA de compostos como acetonas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos e aminas em meio micelar, relatando que a sensibilidade do método é comparável, para muitos dos compostos estudados, com resultados obtidos via fosforescência em temperaturas criogênicas.

Para o preparo das amostras em solução micelar, uma quantidade conhecida da solução a ser analisada em um solvente volátil é colocada em um recipiente onde o solvente é evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, é adicionada a solução aquosa de surfatante que redissolve o resíduo. Para a obtenção de fosforescência, também é necessário desoxigenar a solução, através do borbulhamento de nitrogênio, tornando o procedimento mais demorado.

O método requer também o uso de sais de átomos pesados para que ocorra o efeito do acoplamento spin-órbita e obtenção de sinais mais intensos (Cline Love e col., 1980 e Skrilec e col., 1980).

1.3.1.e) Sumário das Características Analíticas dos Métodos

Obs.: Nenhum dos métodos é completamente livre de problemas. Os limites de detecção variam entre nanogramas e subnanogramas, dependendo da relação sinal ruído utilizada pelo autor. A faixa dinâmica de linearidade varia de 10^2 a 10^3 .

SUBSTRATO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Papel de Filtro	Simple; rápido; materiais baratos; versátil, fornecendo os melhores resultados para uma grande variedade de compostos; facilmente automatizável	Sensível à umidade; intenso ruído de fundo
Silica-gel	Rápido; seletivo por certos compostos; menos sensível à umidade	Aplicável a um menor nº de substâncias que o papel; mais caro e mais suscetível à supressão por oxigênio
Acetato de sódio	Bastante seletivo; quase insensível à umidade; apresenta ruído de fundo mínimo	Preparo mais elaborado; uso restrito, e menor sensibilidade que o papel
Soluções micelares	Útil para amostras aquosas e compostos não polares; pode ser automatizado junto com equipamento de HPLC	Preparo muito elaborado (1h) requer desoxigenação vigorosa; menor faixa dinâmica de linearidade (10^2)

Referência: Vo-Dinh, 1984

1.3.2) PROCESSOS QUE AFETAM A FTA

1.3.2.a) Efeito do Átomo Pesado

Vo-Dinh (1984), apud Kasha (1965), observou que ocorre um aumento na força do oscilador da transição $S_0 + T_1$ da substância 1-cloronaftaleno quando esta é misturada com iodeto de etila. Confirmou-se então que a presença de átomos pesados, que podem estar como substituintes (efeito do átomo pesado interno), ou também, presentes no meio (efeito do átomo pesado externo) podem aumentar significativamente o processo de cruzamento intersistema e, portanto, a intensidade da emissão fosforescente (Vo-Dinh, 1984).

O efeito é explicado através do acoplamento spin-órbita.

Como a magnitude do acoplamento aumenta com o número atômico, devido ao aumento do campo magnético nuclear, proporcional a Z , a presença de átomos pesados proporciona uma maior emissão da fosforescência, havendo correspondente redução da fluorescência. (Vo-Dinh, 1984, apud McGlynn e col., 1969).

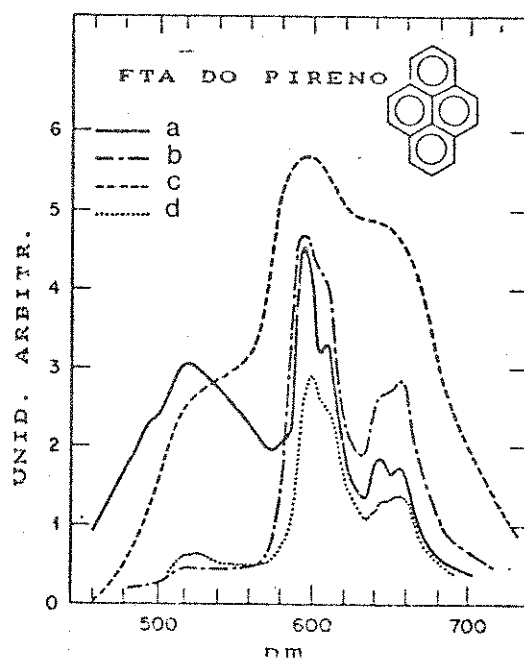


Figura 1.3: Efeito da adição de sais de átomos pesados no espectro do pireno: a) sem sal; b) com acetato de chumbo; c) com nitrato de prata e d) com iodeto de cério.

1.3.2.b) Efeitos do Oxigênio e da Umidade

Existem diversos modelos teóricos que tratam dos efeitos exercidos por moléculas de oxigênio na intensidade da emissão fosforescente (Vo-Dinh, 1984 e referências). Este, estando no estado fundamental como triplete, desativa o estado excitado da espécie em análise. Pode ocorrer o surgimento de certas bandas de absorção devido à formação de complexos de transferência de carga entre a espécie e o oxigênio.

Vo-Dinh e col. (1977), mostraram que quando amostras foram secas sob oxigênio puro apresentaram sinais menos intensos de FTA que quando secas sob nitrogênio puro.

A umidade também pode reduzir a intensidade de emissão das amostras. Atribui-se este fenômeno ao fato de as moléculas de água

romperem as ligações hidrogênio entre o substrato e as espécies fosforescentes passando a competir pelos sítios ativos da superfície sólida (Schulman e col., 1977 e Ford e col., 1978). As moléculas do composto em análise, interagindo menos com a superfície do substrato, ficam mais sujeitas a colisões e desativações vibracionais. Além disso, moléculas de água podem facilitar a difusão de oxigênio até as vizinhanças das moléculas fosforescentes, promovendo a desativação das espécies no estado triplete.

1.3.2.c) Efeito da Matriz

A adição de algumas substâncias ao papel de filtro, como por exemplo as que podem ocupar os canais e interstícios entre as fibras de celulose, é capaz de proporcionar maior rigidez às moléculas fosforescentes. Assim, pela inibição dos movimento e colisões moleculares, a FTA se torna mais intensa. Alguns materiais utilizados são: acetato de sódio, ácido bórico, NaF, NH_4Cl , glicose e sacarose, os quais também poderiam evitar a difusão de oxigênio (Niday e col., 1978).

Vo-Dinh e col. (1976) sugeriram que o uso de NaOH pode formar uma cobertura, junto com carbonatos provenientes do CO_2 existente na superfície do substrato. Tal fato foi constatado por microscopia eletrônica que pôde demonstrar uma fina cobertura da camada acima mencionada sobre a superfície do substrato.

1.3.3) INSTRUMENTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE FTA

A instrumentação básica para obtenção de espectros de luminescência compreende: fonte de luz para excitação das amostras, monocromadores, filtros, lentes, fotodetectores, amplificadores de sinal, registrador e o compartimento para as amostras (Vo-Dinh, 1984).

1.3.3.a) Fosforoscópio

Como a fosforescência vem acompanhada de outras emissões indesejáveis, tais como fluorescência, espalhamento Raman e, também, luz espalhada da própria fonte, costuma-se utilizar um dispositivo

chamado de fosforoscópio, cuja função é fazer a discriminação temporal destas emissões.

O fosforoscópio compreende um cilindro rotatório contendo uma janela lateral (Fig. 1.4) onde a amostra, em um tubo de quartzo, é colocada na altura da janela. Com o cilindro rodando, somente haverá excitação desta quando a janela passar em frente à fonte de luz. Analogamente, a detecção somente ocorrerá quando esta mesma janela passar em frente à entrada do fotodetector. Entre a excitação e a detecção, portanto, decorrerá um certo intervalo de tempo, que pode ser ajustável de acordo com a velocidade de rotação do cilindro. Como a fluorescência é um processo que ocorre na escala de tempo menor que micro-segundos, esta não será detectada.

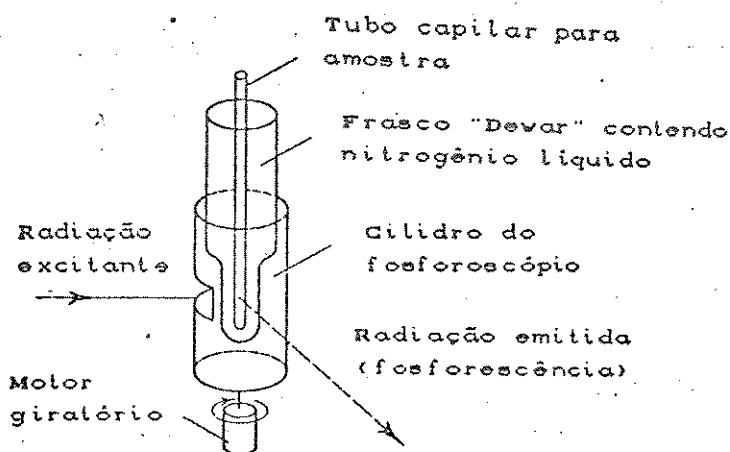


Figura 1.4: Modelo de um fosforoscópio do tipo cilindro rotatório (Rabek, 1982).

Outros instrumentos disponíveis e que substituem o fosforoscópio são: discos de Becquerel (Parker e col., 1961); espelho rotatório (Vo-Dinh e col., 1977) e discos tipo "Chopper" (Ford e col., 1979).

1.3.3.b) Integrador Síncrono tipo "Box-Car Averager"

Ao invés do uso de um fosforoscópio, pode ser utilizado um integrador síncrono tipo "Box-Car Averager" para recuperação do sinal, desde que a fonte de luz seja pulsada (por exemplo, laser de nitrogênio). Sua função é adquirir sinais repetitivos e fazer o processamento dos mesmos mediante o cálculo de uma média, após

determinado intervalo de tempo a contar a partir do momento da excitação da amostra. (Rabek, 1982).

Cada sinal deve ser precedido de um pulso eletrônico que acionará o equipamento, o qual é gerado em um fotodiodo que recebe parte da luz proveniente do laser (desviada mediante uma lâmina de microscópio). Assim, é possível ajustar quanto tempo ("time delay") após a excitação da amostra se iniciará a recuperação do sinal e, também, a largura do intervalo de tempo ("time width") em que os sinais serão coletados. Cada ponto corresponderá a uma média de várias medidas repetitivas. (Fig. 1.5).

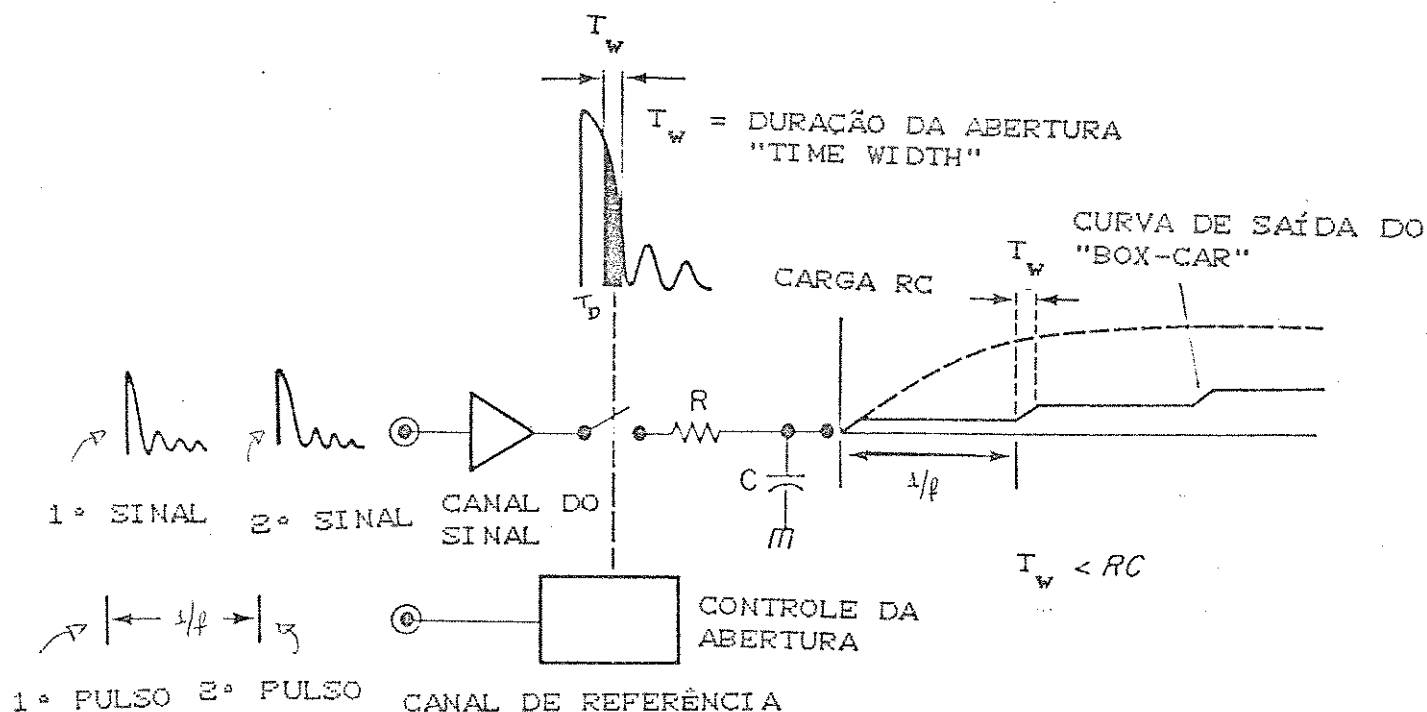


Figura 1.5: Gráfico da intensidade de emissão x tempo, após a excitação da amostra com um pulso de laser em $t=0$. O sinal é recuperado pelo "Box-Car" a partir de T_D , fazendo-se uma integração em todo o intervalo T_W .

Através deste instrumento, é possível discriminar temporalmente a fluorescência da fosforescência, registrar os espectros resolvidos no tempo e determinar os tempos de vida dos estados excitados de uma molécula.

CAPÍTULO 2

MICELAS EM QUÍMICA ANALÍTICA INTRODUÇÃO TEÓRICA

2.1) Surfatantes e Micelas

Surfatantes, também chamados de detergentes ou agentes tensoativos, são constituídos por moléculas que possuem duas regiões distintas, uma hidrofóbica e outra hidrofílica. A primeira, apolar, é geralmente formada por uma ou mais cadeias de hidrocarboneto podendo conter ligações insaturadas, enquanto que a hidrofílica pode ser neutra, catiônica, aniônica ou ainda duplamente carregada (Fendler, 1982).

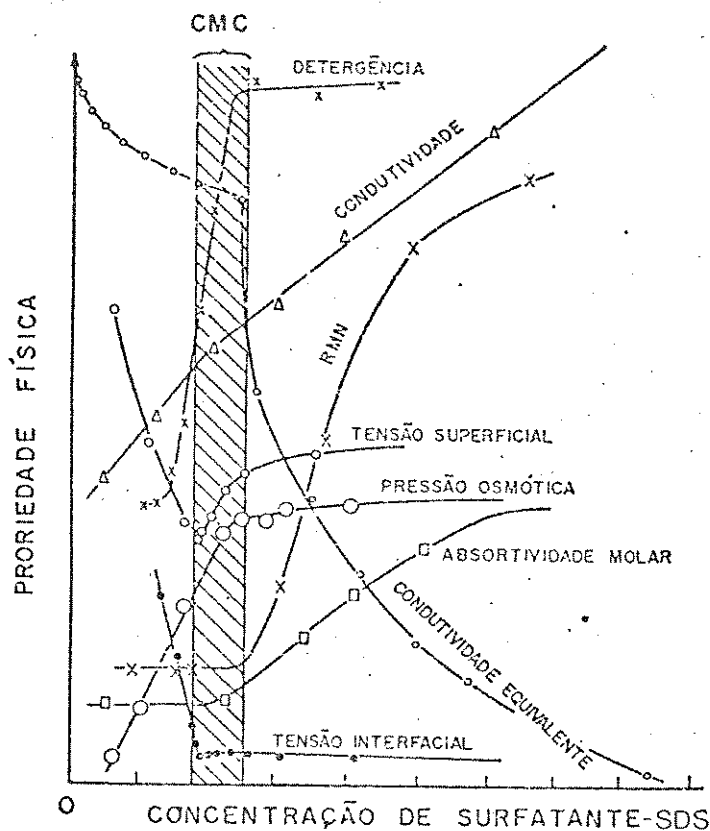


Figura 2.1: Propriedades físico-químicas do surfatante dodecilsulfato de sódio (Tonegutti, 1990, apud Adamson, 1982)

As soluções de surfatante se caracterizam por diversas

propriedades tais como a habilidade em diminuir a tensão superficial da referida solução e a formação de micelas a partir de um valor bem característico de concentração. Esta é definida como sendo a concentração micelar crítica (c.m.c.) e representa, na realidade, uma estreita faixa de concentrações onde diversas propriedades físico-químicas (Fig. 2.1) da solução sofrem sensíveis alterações.

Existem diversos métodos para a determinação da c.m.c., baseados em alterações das propriedades acima referidas. Um dos mais comuns é o da medida de condutividade da solução em função da concentração, quando ocorre uma brusca alteração na variação desta propriedade na região da c.m.c. (Fig. 2.1). Para maiores detalhes, o leitor interessado poderá consultar a referência de Shinoda e col. (1969).

Na Tab. 2.1 são mostrados três dos surfatantes mais comuns, os valores de c.m.c. e do número de agregação (número médio de moléculas de surfatante por micela).

Tabela 2.1: Exemplos de três surfatantes comuns

Nome	c.m.c. ^a	N ^b	Fórmula
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	8,1	62	$C_{12}H_{25}OSO_3^- Na^+$
Brometo de Cetil-trimetilamônio (CTAB)	0,92	61	$C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_3 Br^-$
Polioxietileno (23) Dodecanol (Brij-35)	(0,06-0,09)	40	$C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_9OH$

a) Valores em mM, 25°C, sol. aquosa

b) Número de agregação

Extraído de Fendler e col., 1975

Os valores fornecidos dependem de vários fatores tais como: a hidrofobicidade da cadeia de hidrocarbonetos, natureza do grupo polar e do contra-íon, tipos e concentrações de eletrólitos adicionados, temperatura, pressão e natureza dos solutos nelas dissolvidos. A concentração de micelas (CM) pode ser obtida através da Eq. 2.1:

$$CM = (S - C) / N \quad (\text{Eq. 2.1})$$

onde: S = concentração de surfatante; C = c.m.c. e
N = Número de agregação

Embora os sistemas micelares tenham sido investigados há mais de sete décadas, as particularidades de sua estrutura somente agora têm sido melhor compreendidas. As micelas iônicas possuem cerca de 50 a 200 moléculas de surfatante que, em solução aquosa, se organizam com as cadeias hidrofóbicas voltadas para o núcleo do agregado (Fig. 2.2). A parte hidrofílica se dirige, portanto, para a superfície formando a chamada camada de Stern, no qual cerca de 30 a 40% dos grupos estão ionizados, com os contra-íons remanescentes formando a dupla camada elétrica de Gouy-Chapman. O diâmetro do núcleo varia entre 10 e 30 Angstrons sendo que a camada de Stern tem alguns Angstrons de espessura enquanto que a de Gouy-Chapman pode atingir até algumas centenas de Angstrons.

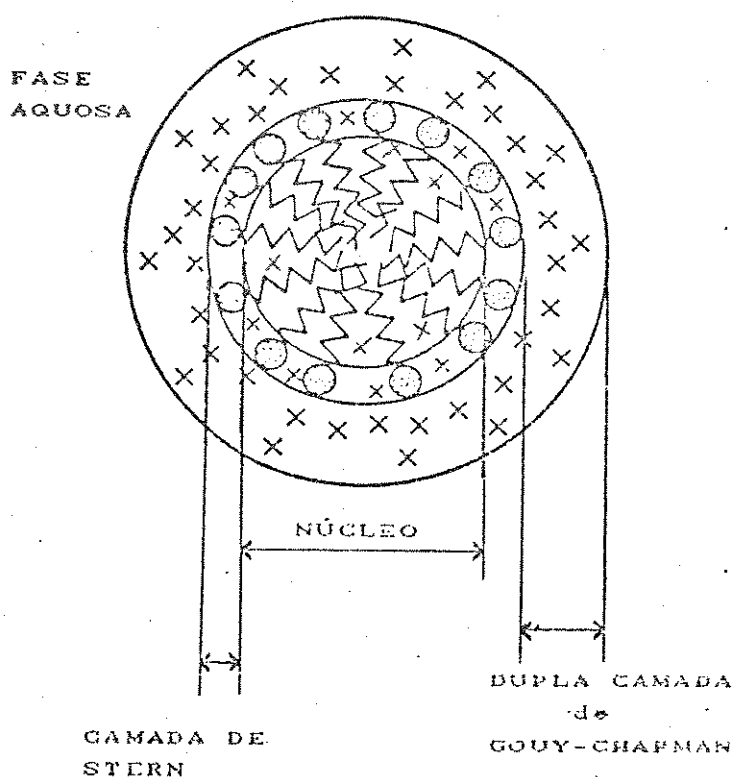


Figura 2.2 Modelo micelar (Fendler, 1982)
 $\text{SDS}_{(\text{monômero})} \rightleftharpoons \text{SDS}_{(\text{micela})}$

Historicamente, o primeiro modelo de micelas foi proposto por McBain em 1914, sendo conhecido como o modelo lamelar, onde as moléculas de surfatante estariam dispostas lado a lado e, também, extremidade a extremidade, formando uma folha (Menger, 1979). Hartley em 1933 propôs o modelo clássico, como sendo a micela constituída por um núcleo apolar envolvido por uma camada de íons (Fendler, 1982).

Tal modelo falha na explicação de diversas observações experimentais tais como as questões da penetração de água nas micelas e a presença de moléculas pouco polares localizadas na superfície, que é polar. Menger (1979) propôs, então, outro modelo construído com estruturas moleculares a partir de um centro de simetria. Os espaços vazios são reduzidos a um mínimo sendo admitidas dobras nas cadeias de hidrocarbonetos. Assim, temos a presença, em um equilíbrio dinâmico, de partes da cadeia apolar na superfície, coexistindo com íons e moléculas de água. Este modelo, porém, sobre-estima a penetração de água no interior micelar.

Recentemente foram propostos outros modelos como o do bloco-surfatante (Fromherz, 1980) e o reticular, em termos estatísticos (Dill e col., 1980), ambos citados em Fendler (1982).

Geralmente admite-se que as micelas, em concentrações não muito acima da c.m.c., são aproximadamente esféricas ou elipsoidais. Porém, com o aumento da concentração de surfatante, elas passam a se alongar, adquirindo geometria cilíndrica ou lamelar, até a formação das chamadas fases de cristal líquido.

Micelas como as mostradas na Fig. 2.2 são ditas normais. Existem também as micelas reversas, nas quais, quando em solvente apolar, os grupos polares estão voltados para o núcleo enquanto que a parte hidrofóbica, para a superfície.

As micelas fornecem microambientes que diferem substancialmente do ambiente da fase aquosa, possuindo polaridades e viscosidades efetivas que variam de acordo com a região do agregado. Micelas em soluções aquosas apresentam microviscosidades entre 15 e 30 cP sendo, portanto, mais altas que a viscosidade de solventes orgânicos ou da água (1 a 2 cP), mas muito menores que a de bicamadas de vesículas lipídicas (200 cP) (Turro e col., 1980). Algumas observações evidenciam a existência de um gradiente de viscosidade em direção ao núcleo micelar, com os grupos metila terminais da molécula de surfatante comportando como se estivessem em solvente apolar (Kalyanasundaram e col., 1976). Estudos via espectroscopia de absorção eletrônica mostram que a micropolaridade na região de Stern se assemelha à do metanol (Fendler, 1982, apud Mukerjee e col., 1977).

2.2) Interações de Solutos com Micelas

As micelas têm propriedades de compartimentalizar, solubilizar (ou separar) reagentes e solutos nelas dissolvidos. Podem também alterar o equilíbrio químico e pK_a aparente destes compostos, além de modificar velocidades e mecanismos de processos químicos e fotofísicos. Como mencionado anteriormente, estes solutos, por sua vez, também podem provocar alterações na geometria e nas propriedades das micelas (Fendler, 1982).

A solubilização de substâncias hidrofóbicas aumenta bastante na região acima da c.m.c.. Fendler e col. (1975) relacionam a localização mais provável de diversas substâncias no interior de micelas iônicas e não-iônicas. Admite-se, em geral, que solutos polares e iônicos tendem a se associar junto à parte polar da micela, enquanto que substâncias apolares se localizam no núcleo. A extensão com que uma molécula apolar se solubiliza no interior das micelas depende do tamanho e formato destas, assim como da densidade de carga da superfície e do potencial elétrico dos grupos polares.

Entretanto, substâncias de natureza apolar, mas que possuem elétrons polarizáveis, também são encontradas na superfície micelar. Moléculas de benzeno em soluções contendo CTAB, por exemplo, são adsorvidas na interface micela-fase aquosa. Em concentrações mais elevadas porém, ocorre redissolução, com a localização das mesmas no interior do agregado (Eriksson e col., 1966).

Em geral, substratos hidrofóbicos em soluções micelares obedecem a uma distribuição de Poisson entre as micelas (Fig. 2.3), como foi constatado por Almgren e col. (1979). A equação obtida é dada por:

$$P_i = (MS_i) / (MD) = ((\bar{n})^i / i!) \cdot e^{(-\bar{n})} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

onde: P_i = Probabilidade das micelas conter i moléculas de soluto.

(MS_i) = Concentração de micelas que contém i moléculas de soluto.

(MD) = Concentração total de micelas (Eq. 2.1)

$(\bar{n})$ = Número médio de ocupação de moléculas de soluto por micela.

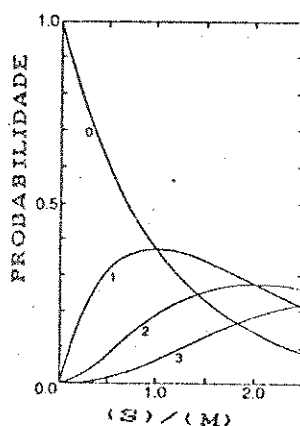


Figura 2.3: Distribuição de Poisson (Almgren e col., 1979).

Micelas são, entretanto, sistemas dinâmicos. Assim, elas possuem dois tempos de relaxação, um da ordem de milisegundos, correspondente à dissociação destas em monômeros e a subsequente reassociação, e outro, da ordem de microsegundos, correspondente à dissociação de uma única molécula de surfatante, que se reassocia com esta mesma micela ou ainda, com outra (Turro e col., 1980).

2.3) Emprego de Fluorimetria em Meio Micelar

Em química analítica, o uso de sistemas micelares como um meio adequado para a solubilização das substâncias a serem analisadas tem crescido muito nos últimos anos. O grande interesse se deve ao fato de que estes sistemas podem solucionar ou pelo menos amenizar alguns dos problemas tipicamente encontrados no desenvolvimento de metodologias analíticas, tais como: reações lentas; dificuldades na solubilização das amostras, assim como dos reagentes; necessidade de se melhorar a sensibilidade de alguns métodos e de evitar o efeito de interferentes e supressores da fluorescência. Revisões sobre o assunto, abrangendo as diversas áreas da química analítica, podem ser encontradas em Hinze (1979), Cline Love e col.(1984), Pelizzetti e col. (1985), Armstrong (1985) e McIntire (1990).

A fluorescência, bastante utilizada como técnica para

investigação de microambientes e processos da cinética micelar (Turro e col., 1980), também tem sido empregada como uma ferramenta para a determinação de metais e compostos orgânicos nestes meios (Hinze e col., 1984; Sanz-Medel e col., 1987 e Singh e col., 1982).

Esta técnica apresenta vantagens em relação à convencional em meio homogêneo, proporcionando aumento da sensibilidade, redução de interferentes e maiores facilidades experimentais. Os efeitos variam de um tipo de surfatante para outro e também, com o tipo de substância a ser analisada (Hinze, 1984).

Este aumento de sensibilidade (Tab. 2.2) decorre do fato de o cromóforo ser transferido do meio aquoso para um microambiente onde estará protegido da supressão da fluorescência provocada por pontes de hidrogênio com as moléculas de água e contra supressores presentes na fase aquosa. Além disso, o próprio ambiente, sendo mais organizado e mais viscoso, promove a redução das taxas dos processos de desativação não radiativos provocados por colisões com outras moléculas. (Hinze, 1984).

Tabela 2.2: Aumento das intensidades de fluorescência para compostos orgânicos em meio micelar (Hinze, 1984).

Composto	Meio	Fator ^a
Pireno	SDS	2,3
	CTAC	3,1
	TX-100	6,6
Naftaleno	TX-100	2,3
Insulina	CTAC	1,8
Retinol	TX-100	3,0
α-Tocoferol	Brij-35	6,0
4-amino-N-metilftalimida	SDS	4,2
	SDS	4,0

^a Fator de aumento da sensibilidade ($I_{micela}/I_{água}$)

CTAC: Cloreto de hexadeciltrimetilamônio

TX-100: Polioxietileno (9,5) octilfenol

SDS: Dodecilsulfato de sódio

Brij-35: Polioxietileno(23) dodecanol

A redução de interferentes (Tab. 2.3) ocorre quando se utiliza um surfatante, por exemplo, catiônico. Assim, supressores de mesma carga são repelidos da superfície micelar e, conseqüentemente, do fluóforo. O mesmo pode acontecer para surfatantes aniônicos tal como na determinação de antraceno em presença do íon iodeto, que atua

como supressor (McIntire, 1990, apud Chang e col., 1978).

A conveniência experimental é devido à não necessidade de se trabalhar com solventes orgânicos, voláteis, pois estes são solubilizados pelas micelas. Consequentemente, torna-se mais fácil a quantificação de amostras pelo método de adição padrão.

A fluorimetria em meio micelar tem sido também associada com outras técnicas tais como em sistemas de detecção para HPLC, podendo o surfatante tanto participar da fase móvel da coluna, como ser adicionado posteriormente (Armstrong e col., 1985). Também é utilizada em sistemas de análise por injeção em fluxo (McIntire, 1990, apud Ahiara e col., 1986) e em análises clínicas (McIntire, 1990, apud Halfman e col., 1986).

Tabela 2.3: Efeito de supressores de fluorescência em presença e ausência de surfatantes na determinação de compostos aromáticos (Chang e col., 1978).

COMPOSTO	SUPRESSOR	MEIO	% SINAL ^a
Antraceno	Íon Iodeto	água	13,0
		SDS	80,0
	Íon Piridínio	Água	41,0
		CTAC	79,0
	Nitrometano	Água Brij-35	38,0 65,0
Fluoranteno	Íon Tállo	Água	8,4
		CTAC	62,3
		TX-100	37,2
Fluoreno	Íon Iodeto	Água	6,0
		Brij-35	23,0
	Íon Tállo	Água	8,0
		Brij-35	24,1

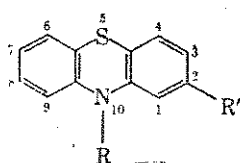
^a % Sinal = relação entre a intensidade de fluorescência do composto na presença e ausência de supressor, multiplicada por 100.

CAPÍTULO 3

SUBSTÂNCIAS ESTUDADAS

3.1) Fenotiazinas

As substâncias derivadas da fenotiazina compreendem uma família de grande importância farmacológica devido a ação tranquilizante e anti-histamínica que estes compostos oferecem. Alguns exemplos destas substâncias são: maleato de levomepromazina (ou metotrimeprazina), cloridrato de clorpromazina e promazina (Fig. 3.1).



	R	R'
fenotiazina	H	H
promazina.HCl	$(CH_2)_3 N(CH_3)_2$	H
maleato de levomepromazina	$CH_2 CH(CH_3) CH_2 N(CH_3)_2$	OCH_3
clorpromazina.HCl	$(CH_2)_3 N(CH_3)_2$	Cl

Figura 3.1: Derivados de fenotiazinas

Fenotiazinas também possuem atividade tensoativa formando micelas, devido a existência de um grupo hidrofóbico (cromóforo) e da cadeia hidrofílica contendo o grupo amino (Florence e col., 1971, Zografí e col., 1964). Os valores da c.m.c. estão na faixa dos encontrados para surfatantes iônicos, podendo ocorrer a formação de micelas mistas com determinados surfatantes que são frequentemente incluídos em dosagens farmacêuticas, tornando crítica a efetividade biológica.

Os compostos acima mencionados possuem espectros de fluorescência pouco intensos, com duas bandas de excitação (em torno de 250 e 350 nm, respectivamente) e duas de fluorescência (estas últimas entre 450 e 475 nm). Existem métodos analíticos baseados na oxidação do derivado por permanganato de potássio, formando o sulfóxido, cuja emissão fluorescente é mais intensa sendo que o

espectro de excitação passa a apresentar quatro bandas entre 200 e 350 nm. Estes métodos são empregados, também, na determinação destes fármacos em materiais biológicos (Mellinger e col., 1963 e 1964; Ragland e col., 1964).

Gifford e col. (1975), descreveram o limite de detecção e tempo de vida da fosforescência à 77 K de 13 substâncias derivadas de fenotiazinas.

3.2 - Alaranjado de Acridina

O corante alaranjado de acridina (Fig. 3.2) pode se apresentar em quatro espécies diferentes, dependentes do pH da solução em que ele se encontra (Zanker, 1952).

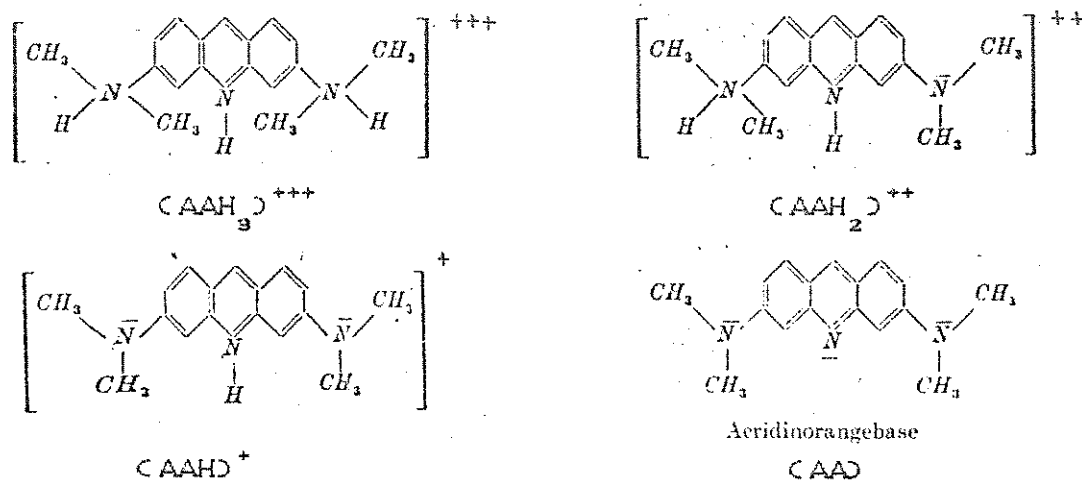
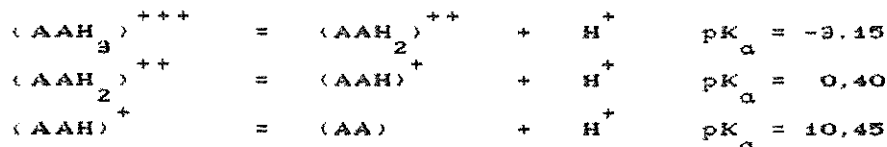


Figura 3.2: Estruturas das espécies de alaranjado de acridina presentes em equilíbrio ácido-base.



Em soluções aquosas neutras ou na presença do surfatante SDS, o corante se apresenta na forma monoprotonada. Os espectros eletrônicos de absorção e de emissão também variam para as diferentes espécies.

O alaranjado de acridina pertence a um grupo de corantes catiónicos cujas moléculas, planares, sofrem agregação em solução aquosa estabelecendo-se um equilíbrio com o dímero. Para a substância

mencionada, a constante de dimerização (Brignoli e col., 1978) é da ordem de $(9-11) \cdot 10^{-3}$ M (à temperaturas ambientes e baixas forças iônicas). Para a espécie monoprotonada, o espectro eletrônico de absorção apresenta duas bandas com máximos em 490 nm (monômero) e 470 nm (dímero), e as intensidades dependem das frações molares de cada forma. No espectro de fluorescência, os máximos ocorrem em 545 nm (monômero) e 650 nm (dímero). (Zanker, 1952).

Em meio micelar, corantes orgânicos podem apresentar particularidades que provocam alterações espectrais. São bastante estudados sistemas corante-detergente com cargas opostas, em concentrações bem abaixo da c.m.c., formando agregados de pares iônicos. Em concentrações de surfatante pouco menores que a c.m.c., corantes podem induzir a formação de micelas que não existiriam caso eles estivessem ausentes (Mukerjee e col., 1955). Tal ocorre com o alaranjado de acridina como foi constatando por Sato e col., 1981 e Ban e col., 1983.

Em farmacologia, o alaranjado de acridina é utilizado como antisséptico, além da sua importância como corante utilizado em microscopia.

3.3) Merbromin

A substância merbromin, também conhecida comercialmente pelo nome de mercúrio-cromo (Fig. 3.3), é um corante xantênico que apresenta intensa cor vermelha, possuindo grande aplicação devido à sua ação antisséptica. Tal composto pode ser obtido através da reação da dibromofluoresceína com acetato de mercúrio II em solução de NaOH (White, 1920).

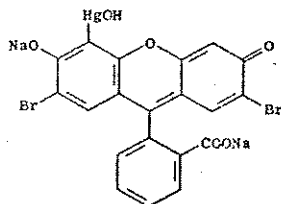


Figura 3.3: Estrutura do merbomin

Devido à sua intensa fluorescência, o merbromin tem sido

empregado em métodos analíticos para a determinação de fármacos como carbimazol e tiabendazol (tiocompostos) e alopurinol (Bedair e col., 1990) e, ainda, penicilinas (Mori e col., 1985 e 1989).

Estes métodos se baseiam na diminuição da intensidade da fluorescência apresentada pelo mercúrio-cromo, a qual é proporcional à concentração (em determinado intervalo) do composto em análise. Tal supressão ocorre devido à ligação do átomo de mercúrio com o de enxofre do fármaco ou, ainda, como no caso do alopurinol, com a hidroxila do anel pirimidínico. Alguns métodos colorimétricos também foram desenvolvidos baseando-se na absorção eletrônica dos novos cromóforos formados pelas reações acima mencionadas (Korany e col., 1989).

3.4) Cristal Violeta

Corantes triarilmetanos, tais como verde de malaquita, cristal violeta e azul vitória B, estão entre os mais antigos corantes sintéticos conhecidos (Fig. 3.4 - cristal violeta). O sistema cromóforo consiste em três anéis aromáticos ligados a um átomo de carbono central, possuindo grupos auxocrômicos substituídos nestes anéis em posição *para*, tais como $-OH$ ou $-NR_2$ ($R = H$, alquil ou aril) (Abrahart, 1977). O cristal violeta, além de sua grande importância como corante para papéis, madeiras e tintas, tem atividade terapêutica como anti-infectivo de uso tópico.

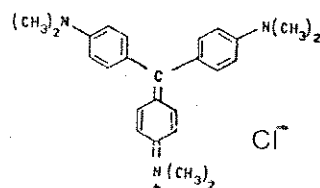


Figura 3.4: Estrutura do cristal violeta

Devido ao impedimento estérico na molécula, os três anéis aromáticos não estão dispostos no mesmo plano mas são forçados para fora por rotação em torno das ligações centrais. O cátion exibe uma estrutura tipo hélice, com simetria D_3 , sendo o estado S_1 duplamente degenerado (Lewis e col., 1942).

O composto apresenta duas bandas de absorção eletrônica na região visível do espectro, que se sobrepõem, e uma de fluorescência, em torno de 625 nm. Lewis e col. (1942) sugeriram que estas bandas estariam associadas à existência de duas espécies conformacionais em equilíbrio térmico, sendo uma a espécie simétrica tipo hélice e outra, assimétrica, teria um dos anéis aromáticos com orientação oposta aos demais.

Todavia, Korppi-Tommola e col. (1980 e 1984), estudando os espectros eletrônicos do cristal violeta em diversos solventes, observaram que a sobreposição entre as duas bandas era maior com o aumento da polaridade do meio. Concluíram, então, que o corante estaria dissociado e solvatado em solventes polares, mas, permaneceria na forma de par-iônico em meio apolar.

Em meio alcalino, o grupo hidroxila ataca o cátion do cristal violeta formando o carbinol, de fórmula $[(\text{H}_3\text{C})_2\text{N}.\text{C}_6\text{H}_4]_3.\text{C.OH}$. Este composto é incolor devido à ausência de conjugação entre os anéis (Abrahart, 1977).

OBJETIVOS

O objetivo inicial deste trabalho foi avaliar o emprego da fosforescência à temperatura ambiente como uma técnica analítica para a determinação de produtos farmacêuticos, tanto na forma pura como na forma comercialmente vendida e também, se possível, em amostras de materiais biológicos.

Esta técnica, que requer o uso de uma superfície sólida (substrato) onde a amostra é depositada ou de um meio micelar, se mostrou impraticável no decorrer dos trabalhos e passamos a investigar o uso da fluorimetria em meio micelar para aquela finalidade. Para tal, foi necessário uma investigação prévia do comportamento espectroscópico das substâncias, de modo a encontrar as melhores condições experimentais (tipos e concentrações de surfactantes, valores de pH, etc.) que permitissem a detecção quantitativa das substâncias analisadas.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1) Reagentes

- Papéis de filtro Whatman, nº 40 ("ashless") e nº 1 (qualitativo);
- Sílica-gel (Merck), Kiesegel 60G;
- Maleato de Levomepromazina, fornecido pelo Laboratório Cristália com especificação de pureza 99,98% e utilizado tal como fornecido;
- Cloridrato de Clorpromazina, fornecido pelo Laboratório Cristália, com especificação de pureza 99,99% e utilizado tal como fornecido;
- Pireno (Aldrich, 99,5%);
- Alaranjado de Acridina, (BDH, para microscopia) - 2g do composto foram dissolvidos em 100ml de água + 100ml de solução NaOH 0,1M. Após a filtração, o precipitado foi seco em estufa (60 °C, 6 horas) (Stone e col., 1961);
- Mercúrio-cromo, (Conelgo) - Purificado dissolvendo-o em água quente, precipitado com etanol p.a. e seco em dessecador;
- Cristal Violeta, (Riedel-De Haën, para microscopia) usado conforme recebido;
- Dodecil Sulfato de Sódio (Nuclear, p.a.) - extraído com éter etílico em um extrator de Soxhlet por 6 horas e recristalizado com etanol p.a. absoluto por 3 vezes (Chaimovich e col., 1975);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio, CTAB (Aldrich, 95%) - recristalizado com etanol p.a. absoluto, por três vezes (Chaimovich e col., 1975);
- Água bidestilada - todas as soluções aquosas (exceto quando especificado) foram preparadas em água bidestilada em destilador de vidro;
- Água deionizada (deionizador Barnstead, nanopure);
- Outros reagentes: etanol absoluto (Merck, p.a.); acetona (Merck, p.a.); clorofórmio (Merck, p.a.); metanol (Merck, p.a.); 1,4-dioxano (Distribuidor Analítica, p.a.); iodeto de sódio (Vetec, p.a.); nitrato de prata, (Vetec, p.a.); hidróxido de sódio (Vetec, p.a.); tricloreto de cromo III (Riedel-De Haën, p.a.); ácido clorídrico (Merck, p.a.); cloreto de metileno (Merck, p.a.); K_2HPO_4 (Vetec, p.a.); Tris-hidroximetilaminoametano (Sigma).

4.2) Instrumentação

- Lâmpada de Mercúrio (Phillips) HPL-125W, sem o bulbo externo;
- Lâmpada de luz infravermelha (Philips) 300W, fecho médio, modelo Comptalux;
- Espectrofotômetro de absorção UV/VIS (Intralab), modelo DMS 100;
- Microseringa (Hamilton), volume 10 μ l;
- Micropipetas (Kacil), volume 200 μ l;
- Cubetas de quartzo (SLM-Aminco), 5 faces polidas e 1,000 cm de caminho ótico;
- Condutivímetro (Micronal) modelo B331 - constante da cela: 0,74 cm⁻¹.
- Medidor de pH - (Micronal).

4.2.1) Espectrofluorímetro Convencional

Marca SLM-Aminco, modelo SPF-800 C, empregado nos estudos de fluorescência em meio micelar. As soluções foram analisadas em cubetas com 1,000 cm de caminho ótico, através de excitação a 90°. Os espectros estão corrigidos pela variação da intensidade de emissão da lâmpada e, em alguns casos, também corrigidos pela curva de resposta da fotomultiplicadora e do monocromador.

4.2.2) Espectrofluorímetro com Laser

Para a obtenção de espectros através de excitação pulsada com laser foi utilizado o esquema mostrado na Fig. 4.1:

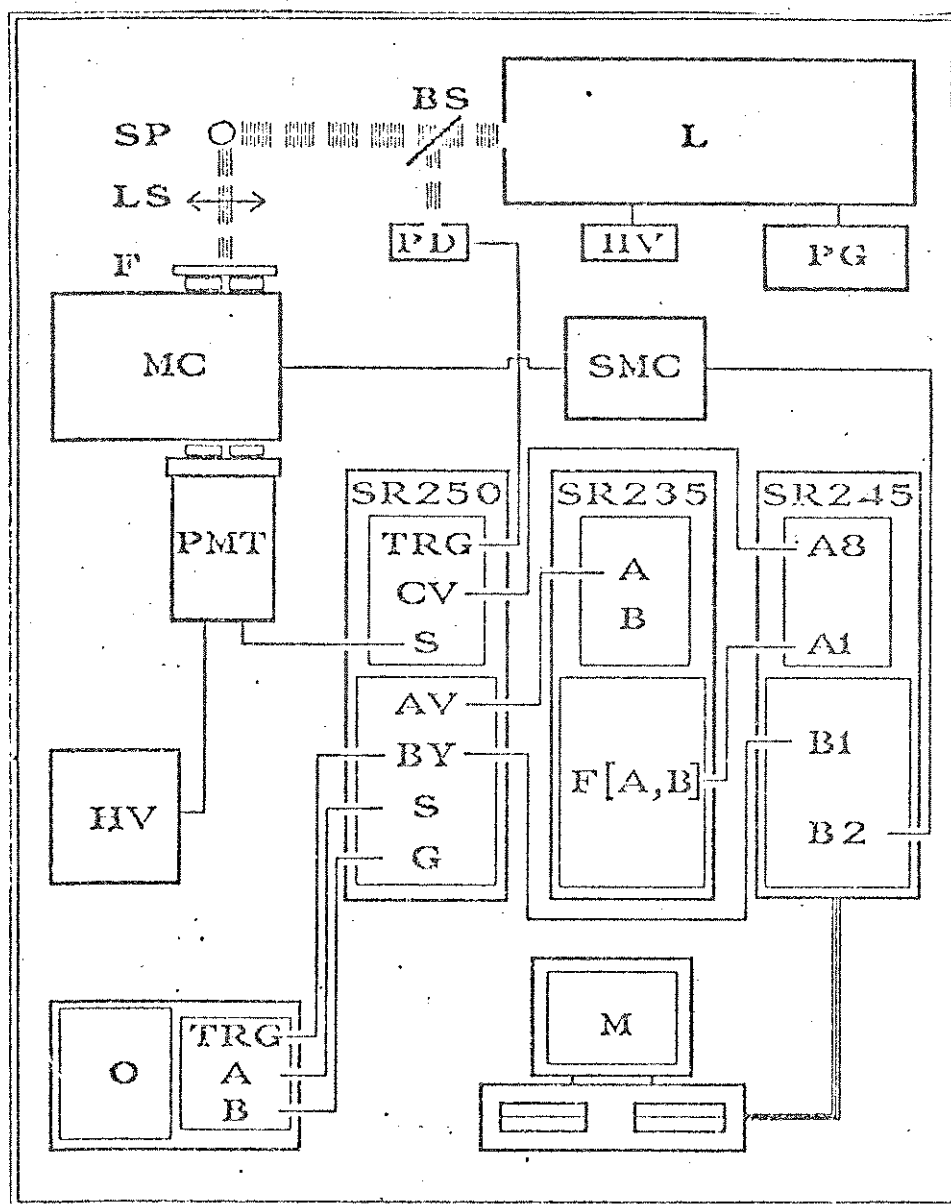


Figura 4.1: Esquema da montagem para o fluorímetro com excitação por laser de N_2 (337,1 nm).

LEGENDA: L = laser; BS = separador de feixe; PD = fototransistor; SP = compartimento para amostra; LS = lente; F = fenda; MC = monocromador; SMC = motor de passo para o monocromador; PMT = fotomultiplicadora; HV = fonte de alta tensão; SR250 = "Box-Car" onde TRG = gatilho, CV = controle da porta, AV = n° de amostragens, G = porta, S = sinal e BY = "busy"; SR235 = processador analógico; SR245 = interface e O = osciloscópio.

- Laser (Lambda Physik) modelo EMG 102 MSC, operado em modo pulsado com uma mistura de nitrogênio (60 mbar) + hélio (94 mbar), emitindo luz monocromática em 337,1 nm;

- Monocromador de emissão (Jarrel-Ash) de caminho ótico 25 cm. Foram utilizadas fendas de 50 e 25 μm (para a entrada e saída, respectivamente). A varredura da grade foi feita mediante um motor de passo;
- Fotomultiplicadora (EMI 6256 S);
- Integrador Síncrono (Stanford Research Systems), consistindo de:
 - a) "Box-Car", modelo SR 250,
 - b) Processador analógico, modelo SR 235,
 - c) Interface, modelo SR 245;
- Fototransistor (TIL 78);
- Osciloscópio (Nicolet), modelo 2090 III-A;
- Lentes convergentes e filtro GG-375.

Para a obtenção de espectros por este sistema, uma pequena parte da radiação pulsada, empregada para excitação, era desviada para o fototransistor mediante uma lâmina de microscópio. Este, por sua vez, fazia o engatilhamento do "Box-Car". Duas lentes convergentes foram utilizadas, uma delas entre o laser e a amostra e outra entre esta e o monocromador. O filtro GG-375, na entrada do monocromador, bloqueava a entrada de radiação espalhada do laser.

As amostras foram posicionadas de forma que a maior quantidade de luz emitida incidisse na fenda de entrada do monocromador, monitorando-se a intensidade do sinal pelo osciloscópio ou pelo voltímetro digital do integrador. O comprimento de onda selecionado no monocromador correspondia ao máximo de emissão da amostra. Devido a possibilidade das amostras sofrerem fotodegradação, procuramos mantê-las o menor tempo possível expostas à radiação durante esta etapa de posicionamento.

Amostras em solução foram colocadas em cubetas mantidas em suporte adequado, fixo à mesa por uma base magnética. Assim, o posicionamento era feito apenas para a primeira amostra, a fim de garantir maior reprodutibilidade nas medidas. Substratos sólidos para FTA foram mantidos na posição vertical por garras e presilhas, sendo necessário fazer o alinhamento para cada amostra. No primeiro caso, os espectros foram obtidos por excitação lateral e no segundo, por excitação frontal.

A aquisição e o processamento dos sinais enviados pela

fotomultiplicadora foi feita pelo integrador "Box-Car", otimizando os seguintes parâmetros: número de amostragens por ponto, atraso e largura da porta eletrônica do instrumento e sensibilidade. A linha de base foi ajustada manualmente para intensidade zero, selecionando-se no monocromador um comprimento de onda abaixo de 350 nm ou, ainda, atrasando-se a porta em uma posição em que não houvesse mais emissão luminescente.

Um microcomputador interfaceado (via RS-232) à instrumentação monitorava todo o procedimento de aquisição dos espectros através de programas em linguagem Basic.

4.3) Preparo das Amostras para FTA

4.3.1) Papel de Filtro

As amostras de papel de filtro foram cortadas a partir de folhas retiradas do meio da caixa, em pequenos quadrados de aproximadamente 1 cm². Elas foram sempre manuseadas através de uma pinça e mantidas em placas de Petri. Uma amostra de papel rascunho (tipo jornal) também foi analisada, devido ao fato desta ser menos luminescente que o papel de filtro podendo portanto proporcionar um ruído de fundo menos intenso.

As soluções da substância a ser analisada, no caso, maleato de levomepromazina 10⁻⁵ M em etanol, foram adicionadas através da microseringa. O volume empregado, em geral, foi de 3 µl. Soluções de sais de átomos pesados também foram adicionadas através da microseringa (3 µl): iodeto de sódio 1M, acetato de chumbo 0,25M e nitrato de prata 0,2M. As adições foram feitas cuidadosamente de modo que a ponta da micro-seringa não tocasse a superfície do papel. A secagem do solvente nesta superfície foi feita através da lâmpada de luz infravermelha durante 15 minutos, mantendo-a a 20 cm de altura da amostra, com intensidade controlada por um Variac. Estas condições foram otimizadas previamente para que a secagem não provocasse degradação na superfície do papel. As amostras foram mantidas em dessecador até o momento do estudo.

Os espectros foram obtidos através do fluorímetro com

laser, fixando-se as amostras na posição vertical entre dois suportes metálicos. Um fluxo de nitrogênio seco foi constantemente mantido em frente à amostra, para reduzir a adsorção de água e a presença de oxigênio no substrato.

Devido à intensa luminescência apresentada pelo papel de filtro, alguns tratamentos com solventes foram feitos em folhas de papel, antes de utilizá-los, a fim de reduzi-la. Foram eles:

- eluição: pedaços do papel foram colocados verticalmente em um béquer contendo 10 ml de etanol ou clorofórmio. Após a completa eluição por 3 vezes, foram secos à temperatura ambiente, analisando-se a parte central dos mesmos;

- refluxo: amostras de papel foram colocadas em um extrator de Soxhlet (sem o cartucho para sólidos), e refluxadas com etanol absoluto durante 2 horas;

- imersão em solventes: as amostras foram mantidas em diversos tubos de ensaio contendo 10 ml de um dos seguintes solventes: acetona, metanol, dioxano, água deionizada, dioxano + água deionizada (1:1) e éter. O período de imersão variou entre 24 e 72 horas. Para os testes com água deionizada, foram utilizados frascos de polietileno.

Em seguida, em todos os tratamentos acima mencionados, as amostras foram secas à temperatura ambiente e procedida à análise espectral como descrito previamente. Também foram feitos testes através da irradiação da superfície do papel com lâmpada de mercúrio sendo as amostras colocadas verticalmente em um carrossel, com a lâmpada no centro, a uma distância de 10 cm. O tempo de irradiação variou entre 10 minutos e 3 horas.

4.3.2) Sílica-gel

As placas de vidro utilizadas continham uma superfície rugosa e foram cobertas com uma suspensão de sílica-gel: dicloroetano (1:3) (Pavia e col., 1982). A solução de maleato de levomepromazina 10^{-5} M também foi utilizada como amostra, e os procedimentos para a deposição desta na superfície da sílica e posterior secagem e análise espectral foram idênticos aos descritos para o papel de filtro. Para análise, as placas foram suspensas na posição vertical.

4.3.3) Soluções Micelares

Uma solução de pireno 10^{-4} M em acetona foi utilizada como amostra. Uma alíquota desta foi colocada em um béquer de 10 ml, deixando que o solvente evaporasse. Em seguida, foi adicionado 5 ml de uma solução de SDS $8,0 \cdot 10^{-2}$ M, levando-se o béquer ao ultrassom por 10 minutos. Também foram preparadas amostras com a adição de 0,5 ml de acetato de chumbo 0,01M ou de nitrato de prata 0,01M.

A seguir, a amostra foi transferida para uma cubeta, onde tentamos fazer a desoxigenação da solução pelo borbulhamento de nitrogênio conforme ilustrado na Fig. 4.2. O oxigênio, presente também no nitrogênio como impureza, foi removido previamente pela reação com zinco metálico, através de um frasco lavador contendo amálgama Zn/Hg (9:1), com uma solução de CrCl_3 0,1 M / HCl 1 M, (na ausência de oxigênio em meio ácido o Cr^{3+} se reduz a Cr^{+2} , passando de verde para azul) (Vogel, 1979). Os espectros foram obtidos através do espectrofluorímetro com laser.

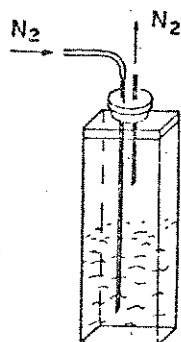


Figura 4.2: Sistema para remoção do oxigênio dissolvido na solução micelar.

4.4) Preparo das Amostras para Fluorimetria em Meio Micelar

4.4.1) Determinação da c.m.c. de SDS e de CTAB

A c.m.c. dos surfatantes SDS e CTAB foi determinada, após purificação, através de condutividade, sendo inicialmente medida a de um volume conhecido de água bidestilada (50 ml). Com uma micropipeta de 200 μl (previamente calibrada), foram feitas sucessivas adições de

solução estoque de surfatante (0,2 M para SDS e 0,04 M para CTAB) ao volume inicial de água (adições "in situ"). O sistema foi mantido sob agitação magnética à velocidade constante, monitorando-se eventuais variações da temperatura. As medidas foram feitas sempre 1 minuto após cada adição de surfatante e os resultados, graficados em função da concentração.

4.4.2) Maleato de Levomepromazina

Através do espectrofluorímetro com laser foram realizadas medidas de fluorescência do maleato de levomepromazina 10^{-5} M em diversas concentrações de soluções de SDS. As amostras foram preparadas "in situ", conforme acima mencionado. Foram colocados em uma cubeta 2 ml da solução aquosa da substância obtendo-se o espectro de fluorescência. Em seguida, foram feitas sucessivas adições de alíquotas de 10 μ l de SDS 0,1 M através da microseringa (previamente calibrada). A cubeta foi cuidadosamente agitada após cada adição, evitando-se a formação de bolhas, para em seguida obter o espectro de fluorescência. Estas adições foram efetuadas até que a solução na cubeta atingisse uma concentração de SDS em torno de 0,05 M. A intensidade de fluorescência foi monitorada em 450 nm, graficando-se os valores em função da concentração de SDS corrigida pela diluição.

Foram obtidas curvas analíticas para soluções da substância acima na faixa de 10^{-3} a 10^{-8} M, preparadas pela técnica de diluições sucessivas (razão 1:2) em etanol e em solução de SDS 0,08M. As intensidade dos sinais, monitoradas em 450 nm, foram graficadas em função da concentração, em escala logarítmica. Também foram preparadas soluções contendo iodeto de sódio em concentração 0,02 M (meio etanólico) e de 0,0 a 0,5 M (em SDS 0,08 MD, sendo usadas, como branco. soluções de iodeto de sódio.

Através do espectrofluorímetro convencional foram feitos espectros de excitação ($\lambda_{em.} = 450$ nm) e fluorescência ($\lambda_{exc.} = 250, 310$ e 350 nm) de soluções 10^{-3} a 10^{-8} M do composto (diluídas sucessivamente na razão 1:5). Os solventes foram água e soluções de SDS 0,04 e 0,2 M. Foram construídas duas curvas analíticas empregando-se a intensidade do sinal em 450 nm, sendo uma na faixa de 10^{-7} M (em SDS 0,02MD) e outra em escala logarítmica entre 10^{-4} e 10^{-8}

M com SDS 0,4M, subtraindo-se sempre o valor da intensidade do sinal relativo ao branco.

4.4.3) Cloridrato de Clorpromazina

Foram obtidos espectros de excitação ($\lambda_{em.} = 450 \text{ nm}$) e de fluorescência ($\lambda_{exc.} = 310 \text{ nm}$) do cloridrato de clorpromazina entre 10^{-3} e 10^{-6} M em solução de SDS 0,04 M.

4.4.4) Alaranjado de Acridina

Foram obtidos os espectros de absorção e de fluorescência ($\lambda_{exc.} = 492 \text{ nm}$) de soluções de alaranjado de acridina 10^{-5} M em diversas concentrações de SDS até 6,0 mM. As soluções foram preparadas por adição "in situ" de solução estoque de surfatante 0,2 M. Este experimento também foi repetido para obtenção de espectros de fluorescência do alaranjado de acridina 10^{-6} M em concentrações de SDS acima da c.m.c. Até 15 mM.

Foram construídas 3 curvas analíticas do corante em SDS 0,02 M, com as amostras preparadas por diluições sucessivas (1:5), compreendendo as seguintes concentrações: em torno de 10^{-10} M, de 10^{-9} M e entre 10^{-7} e 10^{-10} M. As intensidades de emissão foram monitoradas em 529 nm, graficando-se estes valores em função da concentração em escala linear e, para a terceira curva, em escala logarítmica. O branco foi subtraído.

4.4.5) Merbromin

Espectros de absorção e fluorescência ($\lambda_{exc./fl.} = 500 \text{ nm}/528 \text{ nm}$ (538 nm para as amostras em CTAB) de soluções aquosas de merbromin 10^{-5} M foram obtidos em diversos valores de pH entre 2 e 12 (ajustados pela adição de solução de NaOH ou HCl).

A partir de soluções aquosas 10^{-5} M da substância citada, também foram registrados espectros de fluorescência em diversas concentrações de surfatante pela técnica de adição "in situ". Foram elas:

-solução estoque de SDS 1,00 M em pH 11,5 (tampão

fosfato/NaOH), até atingir 5 c.m.c.;

-solução estoque de CTAB 0,20 M em pH 9,00 (tampão tris/HCl), até 10 c.m.c.;

-solução estoque de Brij-35, 0,045 M em ambas as soluções tampão acima mencionadas, até 100 c.m.c..

Curvas analíticas foram construídas para soluções cujas concentrações se situam entre 10^{-4} e 10^{-9} M, preparadas por diluições sucessivas 1:10, nos seguintes meios: água; solução de NaOH pH 11,5; solução de Brij-35 2mM em pH 11,5 tamponado (fosfato/NaOH) e solução de CTAB 1 mM em pH 9,00 tamponado (tris/HCl). O branco foi subtraído.

4.4.6) Cristal Violeta

Foram registrados os espectros de absorção e de emissão ($\lambda_{exc.} = 500$ nm) de soluções de cristal violeta 10^{-5} M em diversos valores de pH. Em seguida, foram feitas as medidas de intensidade de emissão (em 630 nm) na presença de solução de surfatante (soluções estoque de SDS 0,40 M, CTAB 0,10 M e Brij-35 0,045 M) a uma solução aquosa 10^{-5} M da substância contida na cubeta.

As curvas analíticas foram construídas para soluções da substância (concentrações entre 10^{-4} e 10^{-8} M, preparadas por diluições sucessivas 1:5) em água, SDS 0,010 M e Brij-35 2,0 mM. O branco foi subtraído.

CAPÍTULO 5

FOSFORESCÊNCIA À TEMPERATURA AMBIENTE (FTA) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Substrato: Papel de Filtro

Os espectros de luminescência mostrados na Fig. 5.1 correspondem aos dois tipos de papéis de filtro utilizados neste trabalho, Whatman 1 e Whatman 40. Observamos que eles possuem emissão muito intensa na região visível do espectro eletromagnético.

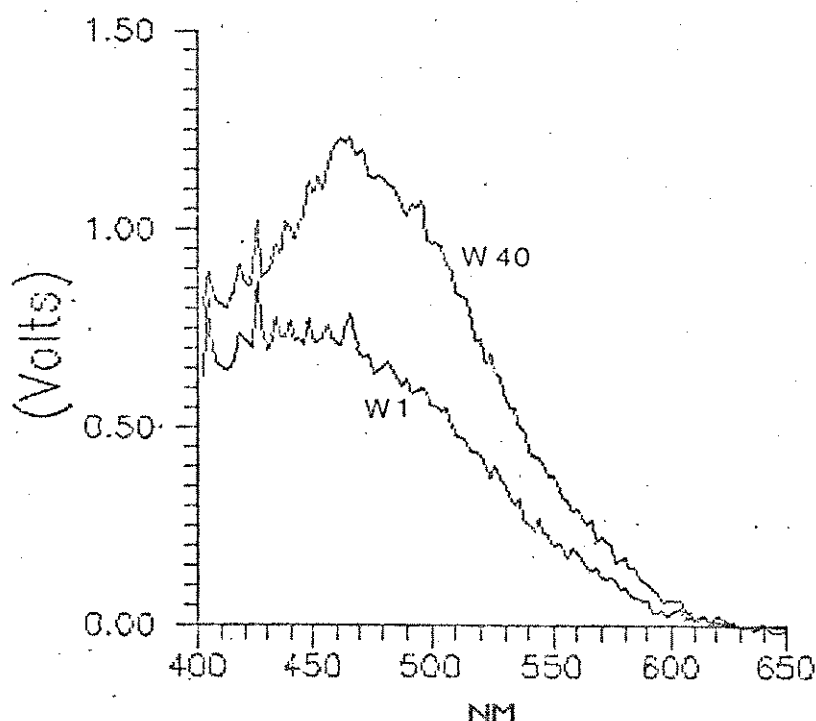


Figura 5.1: Espectros de luminescência dos papéis de filtro Whatman 1 e Whatman 40. $\lambda_{exc.} = 337,1 \text{ nm}$.

O composto maleato de levomepromazina, que em temperaturas criogênicas exibe fosforescência com intensidade máxima de emissão em 485 nm (Gifford e col. 1975), se torna não fosforescente quando suportado em papel de filtro, sendo que o espectro obtido (Fig. 5.2) não exibe bandas que possam ser distinguidas das bandas de emissão do papel (que chamaremos de referência). Ocorre apenas pequena diminuição

da intensidade de emissão desta substância em relação a este último. A adição de sais contendo átomos pesados não provoca aumento de intensidade da banda de emissão do composto (Fig. 5.2 e Tab. 5.1).

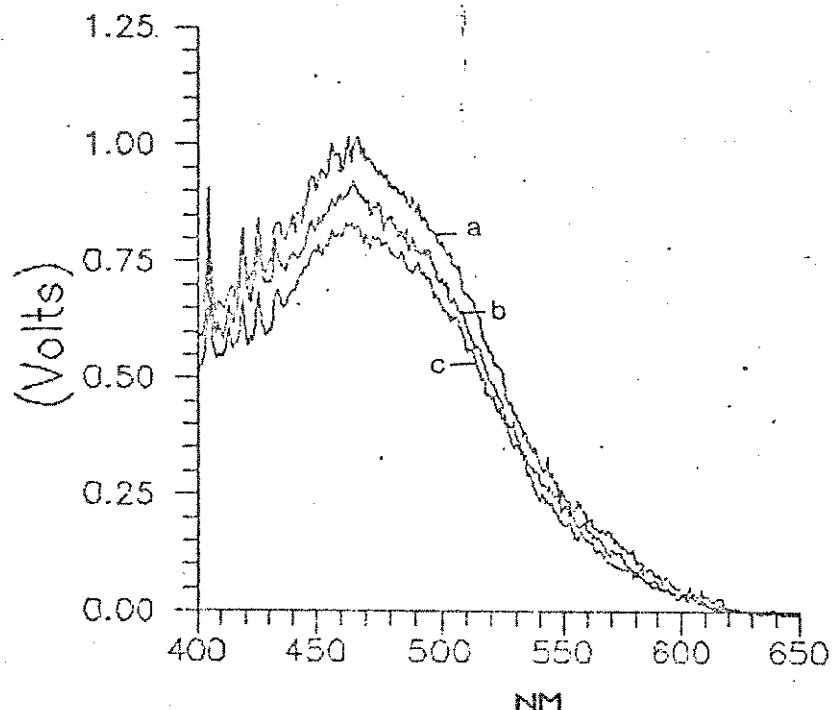


Figura 5.2: Espectros de luminescência de: a) Papel de Filtro Whatman 40; b) papel + 5 µl de sol. maleato de levomepromazina 10^{-5} M; c) idem à anterior, com adição, também, de 5 µl de sol. NaI 1M. $\lambda_{exc.} = 337,1$ nm.

Tabela 5.1: Efeitos do átomo pesado em FTA

5.1.a

AMOSTRA	I*
A	1,01
B	0,92
C	0,92

5.1.b

AMOSTRA	I*
C	0,69
D	0,69
E	0,62

* $\lambda_{exc./em.} = 337,1$ nm/465 nm. Espectros obtidos sob idênticas condições, exceto o número de amostragens/ponto (10 em 5.1.a e 30 em 5.1.b).

A) Papel de filtro Whatman 40; B) Papel + 5 µl sol. maleato de levomepromazina 10^{-5} M. As amostras C, D e E são iguais à amostra B, mas contém 5 µl das seguintes soluções: C) NaI 1M; D) $Pb(acetato)_2$ 0,2 M e E) $AgNO_3$ 0,2 M.

Os conjuntos de medidas (Figs. 5.1, 5.2 e Tab. 5.1) foram adquiridos em datas e condições instrumentais diferentes, não podendo ser diretamente comparados os resultados entre um conjunto e outro. Com o aumento do número de amostragens, ocorre diminuição na intensidade do sinal obtido (Tab. 5.1). O iodeto ataca a superfície do papel tornando-a amarelada, enquanto que o íon prata, sob radiação UV, escurece-a.

As variações das intensidades de emissão nas diferentes amostras, como mostram os resultados acima, somente foram confirmadas preparando-as em duplicata ou triplicata devido aos problemas já mencionados na parte experimental. Observamos que a iluminação da superfície do substrato pela radiação laser leva à fotodegradação deste, diminuindo a intensidade de fluorescência. Uma iluminação durante 3 minutos a uma taxa de 15 Hz reduz em cerca de 30% a intensidade de emissão do papel e após um total de 30 minutos, a redução é de 50%. Isto porém não provoca alterações macroscopicamente observáveis.

O papel jornal também apresenta emissão intensa e não uniforme, sofrendo fotodegradação sob irradiação com laser. A intensidade de emissão corresponde, em média, a cerca de 40% daquela observada para o papel de filtro (monitorada em 460 nm).

A Tabela 5.2 apresenta dados sobre os tratamentos de eluição, refluxo e imersão do substrato em diversos solventes, os quais não foram capazes de reduzir a intensa emissão do papel. Concluimos, portanto, que as substâncias luminescentes, sendo de difícil extração, correspondem a materiais tais como hemiceluloses e/ou ligninas.

Tabela 5.2: Tratamentos com solventes empregados nos papéis de filtro visando remover substâncias luminescentes.

PAPEL ^a	SOLVENTE	TRATAMENTO	I ^b
40	Etanol	Eluição, 3 vezes	0,91
40	Etanol e Clorofórmio	Eluição, 3 vezes/ solvente	0,91
1	Etanol	Eluição, 3 vezes	0,79
40	Etanol	Extrator de Soxhlet, 6 h	0,72
1		" "	0,85
1	Metanol	Imersão, 48 hs	0,88
1	Acetona	" "	0,93
1	Dioxano	" "	1,00
1	Água deionizada	" "	0,78
1	Água deioniz.: dioxano (1:1)	" "	0,93

^a Papéis Whatman, nº 40 e 1

^b Intensidades monitoradas em 466 nm (eluições e extrações) e 449 m (imersões). Os valores estão normalizados em relação à intensidade de emissão do papel de filtro sem tratamento (extrações e eluições) e em relação à do papel tratado com dioxano (imersões). $\lambda_{exc.} = 337,1$ nm.

Os tratamentos acima mencionados também foram tentados por Ward e col. (1981) e Bateh e col. (1982), com resultados também pouco satisfatórios (Cap. 1), embora fossem utilizados papéis de diferentes marcas, difíceis de serem adquiridos no mercado nacional. A intensidade de fluorescência deste depende do tipo de madeira e processamento ao qual o mesmo foi submetido.

Em uma última tentativa, também não obtivemos resultados satisfatórios com a iluminação da superfície dos papéis através de uma lâmpada de mercúrio, cujo espectro abrange desde o UV até o IV. O objetivo desta irradiação foi provocar fotodegradação da superfície do substrato, levando a formação de produtos menos luminescentes. Este efeito foi oposto ao obtido para a irradiação com o laser de nitrogênio.

Em razão do exposto, resolvemos não mais continuar com o uso do papel de filtro como substrato, nem na tentativa de utilizar

compostos diferentes do maleato de levomepromazina, pois, mesmo se conseguíssemos resultados mais satisfatórios, como por exemplo na determinação do pireno (que possui intensa emissão luminescente e pode ser excitado com o laser de nitrogênio), a técnica ainda seria bastante limitada. O emprego de um espectrofluorímetro, não disponível na época em que estes trabalhos foram realizados, e que permite excitar amostras em diferentes regiões do espectro; de um fosforoscópio, para discriminar temporalmente o sinal de luz e diferentes marcas de papel, talvez poderão levar a resultados mais satisfatórios.

5.2) Sílica-gel

A sílica-gel exibe emissão muito menos intensa que o papel de filtro, como pode ser visto na Fig. 5.3. Porém, ela apresenta inconvenientes experimentais pois, como a placa de vidro deve ser mantida na posição vertical e não há aderência adequada, o substrato se desprende facilmente da mesma.

A difusão da solução da amostra na superfície do substrato é pequena, ao contrário do que ocorre com o papel de filtro. Assim, temos apenas uma pequena área daquela superfície preenchida com amostra donde a intensidade do sinal é menor. Outro problema se refere à redução da aderência do substrato no local onde a amostra é adicionada.

Devido a estes fatores e ao fato de este substrato ser seletivo permitindo a determinação de um número pequeno de compostos via FTA, não julgamos conveniente insistir nesta metodologia.

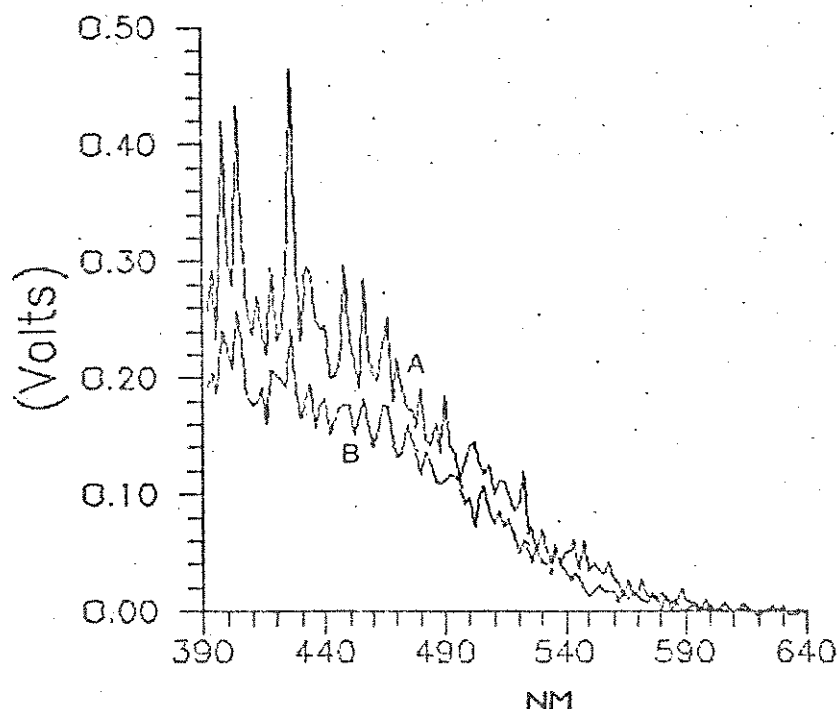


Figura 5.3: Espectros de emissão utilizando-se como substrato a sílica-gel. A) somente sílica e B) 9 μ l de sol. etanólica 10^{-5} M de Maleato de levomepromazina.

5.3) FTA Estabilizada por Micelas

Não foi possível obter remoção eficiente de oxigênio da solução micelar e, em consequência, os espectros de soluções de pireno (Fig. 5.4) foram atribuídos à fluorescência deste (Cline Love e col., 1980). Com a adição de sais de prata, como já mencionado, ocorreriam reações fotoquímicas na solução enquanto que sais de chumbo precipitariam na forma de dodecil sulfato de chumbo, pois o ponto de Kraft desta substância é de 53 °C (temperatura abaixo da qual não se formam micelas) (Miyamoto, 1980).

A remoção de oxigênio, essencial para se obter FTA em meio micelar (Cap. 1), apresenta um inconveniente muito grande, que é a formação de espuma, levando a perdas consideráveis de amostra no sistema por nós utilizado. Neste processo, o composto a ser determinado também estará presente na espuma, mas em concentração

diferente à da solução, o que irá alterar a concentração total da amostra. Além disso, com o borbulhamento de gás, a solução também estará sujeita à evaporação de solvente, sendo esta outra fonte de erro para trabalhos quantitativos.

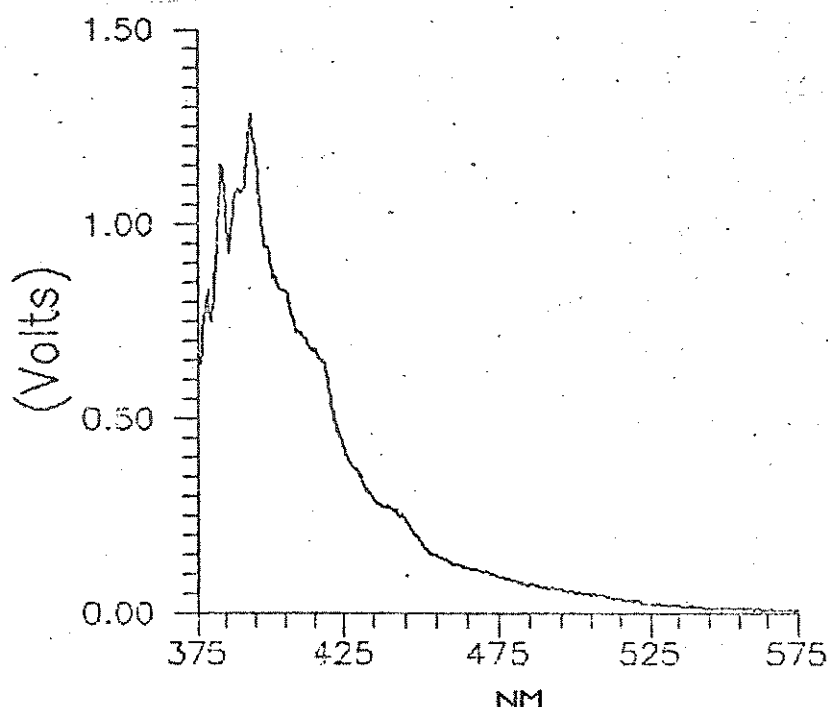


Figura 5.4: Espectro de fluorescência de sol. pireno (10^{-5} M) em SDS 0,08M após esta ter sido borbulhada por N_2 durante 30 min.

Métodos de degasagem por sucessivas etapas de congelamento e aquecimento a pressão reduzida consomem muito tempo tornando inviáveis em práticas rotineiras. Estes métodos também podem levar à evaporação de solvente e expansão do volume de água em baixas temperaturas, quebrando o tubo capilar.

CAPÍTULO 6

FENOTIAZINAS RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de absorção do maleato de levomepromazina e do cloridrato de clorpromazina (Fig. 6.1) não sofrem alterações nas posições dos máximos das bandas quando se varia a concentração destas substâncias. Verificamos, também, que em meio micelar a posição das bandas é independente da concentração de surfatante.

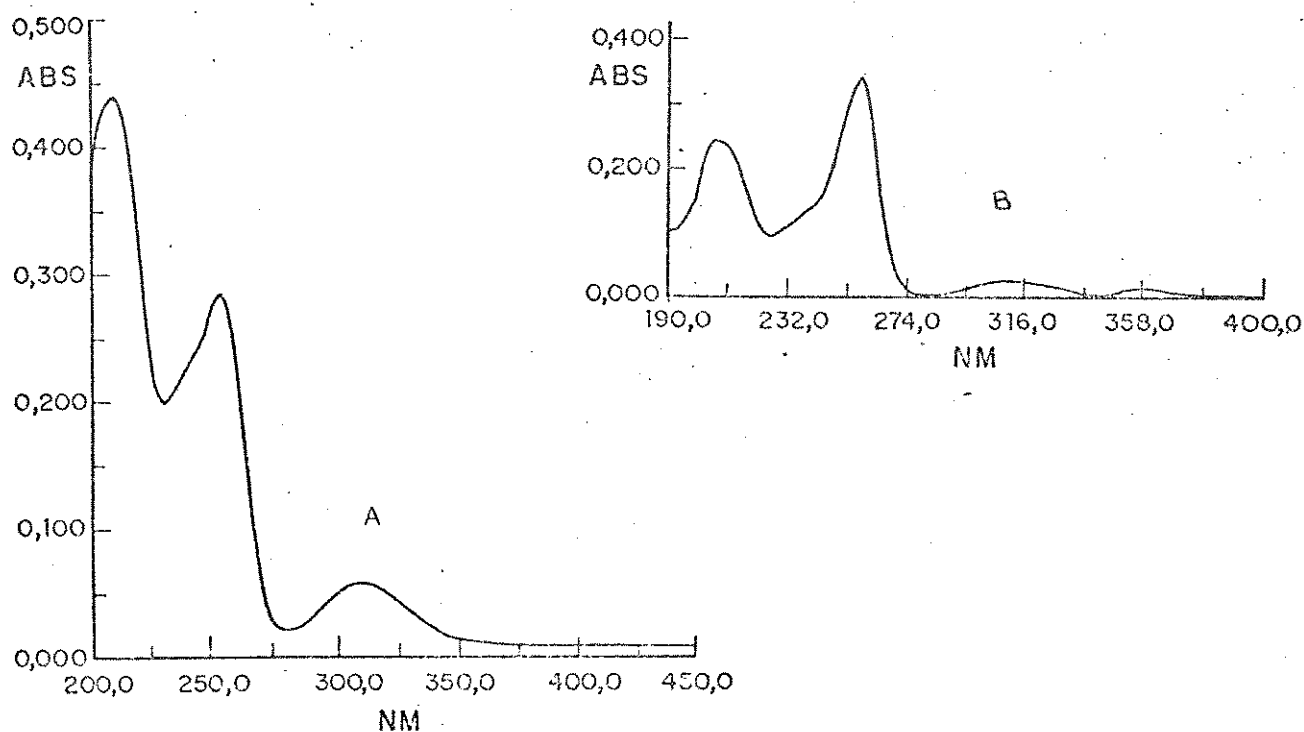


Figura 6.1: Espectros de absorção de sol. 10^{-5} M de: A) Maleato de levomepromazina e B) cloridrato de clorpromazina. Solvente: etanol.

Todavia, os espectros de excitação dependem da concentração destas substâncias (Fig. 6.2). Para o maleato de levomepromazina, este se assemelha ao de absorção, quando em concentrações da ordem de 10^{-6} M. Acima desta, porém, ocorre uma gradual alteração na relação entre as intensidades das bandas em 255 e 305 nm, sendo que a primeira diminui até praticamente desaparecer

quando a concentração está em torno de 10^{-4} M. A banda remanescente (305 nm), cuja intensidade vem aumentando com a concentração, se desdobra em duas outras, respectivamente em torno de 280 e 355 nm, quando a concentração da solução atinge 10^{-3} M.

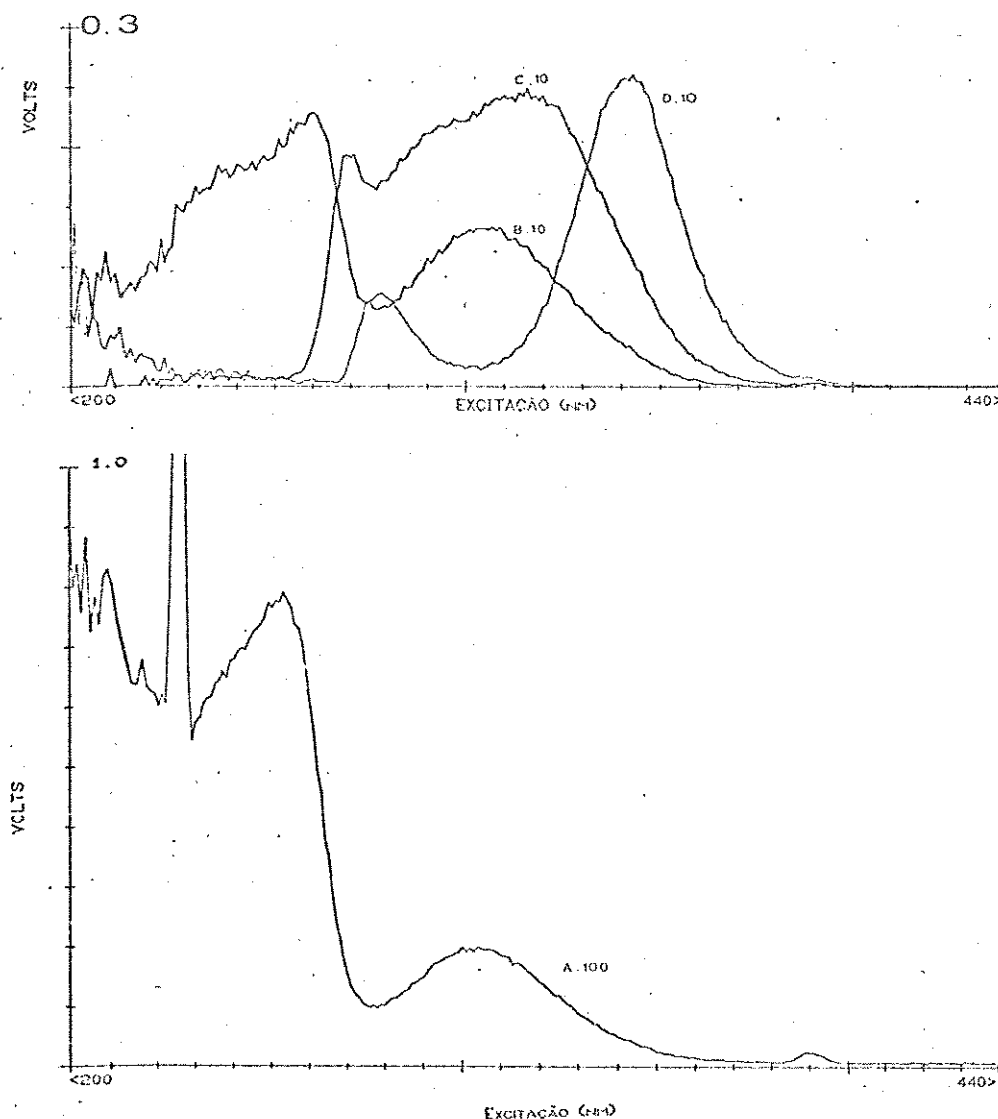


Figura 6.2: Espectros de excitação do maleato de levomepromazina em água: A) $8,0 \cdot 10^{-6}$ M; B) $4,0 \cdot 10^{-5}$ M; C) $2,0 \cdot 10^{-4}$ M e D) $1,0 \cdot 10^{-3}$ M. Os números 10 e 100, nos espectros, correspondem ao ganho. $\lambda_{em.} = 450$ nm.

Os perfis dos espectros de fluorescência não variam significativamente com a concentração (Fig. 6.3), apresentando uma banda larga e assimétrica em torno de 450 nm ($\lambda_{exc.} = 250$ ou 310 nm).

Para a solução 10^{-3} M ($\lambda_{exc.} = 310$ nm), ocorre um pequeno aumento (10%) na largura da banda a meia altura quando comparada com a da solução $2,0 \cdot 10^{-4}$ M. Este alargamento sugere a presença de agregados contribuindo para a emissão.

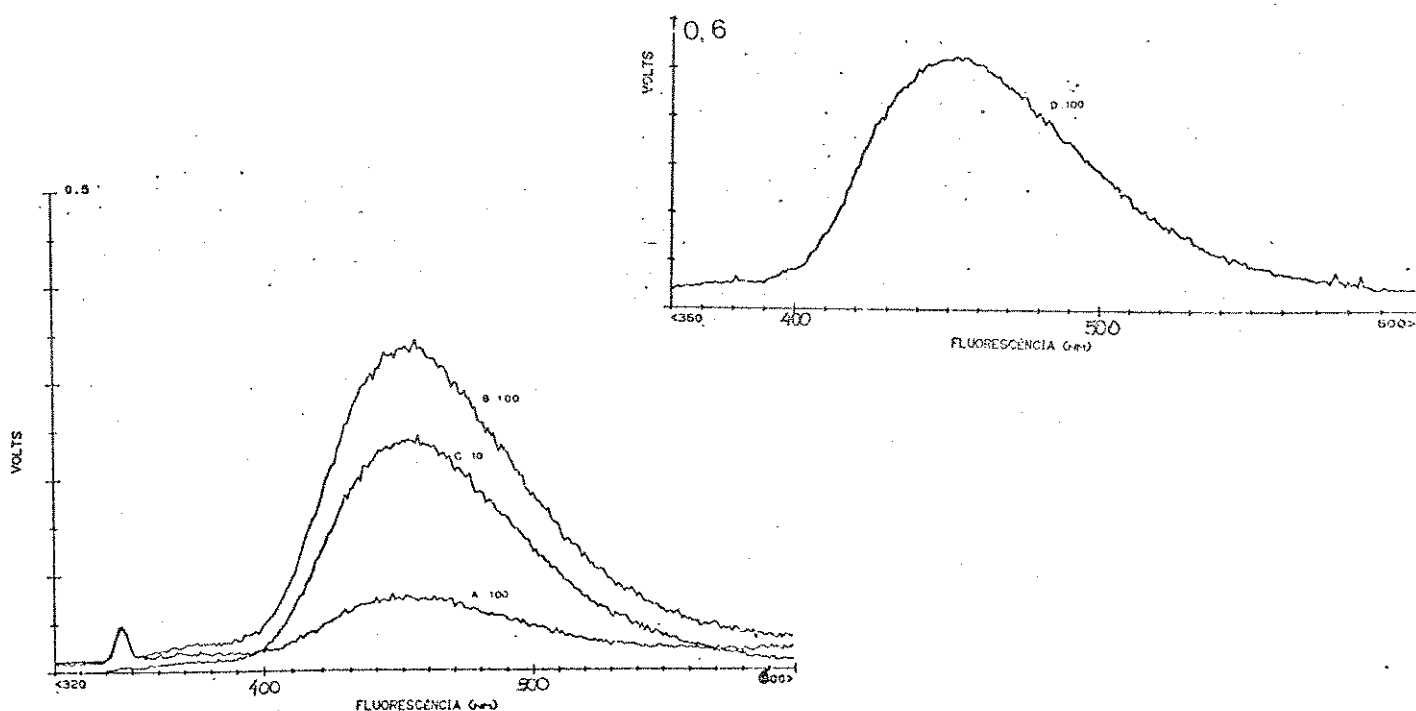


Figura 6.3: Espectros de fluorescência do maleato de levomepromazina em água: A) $9,0 \cdot 10^{-6}$ M; B) $4,0 \cdot 10^{-5}$ M; C) $2,0 \cdot 10^{-4}$ M e D) $1,0 \cdot 10^{-3}$ M. Os números 10 e 100, nos espectros, correspondem ao ganho. $\lambda_{exc.} = 310$ nm e, para o espectro D, 350 nm.

As alterações observadas nos espectros de excitação não foram detectadas nos de absorção pois estes envolvem também transições cujos decaimentos não são radiativos. Estas alterações podem ser explicadas através da Teoria Excitônica, que se baseia na interação entre cromóforos em cristais moleculares e agregados diméricos (Rohatgi, 1968). De acordo com a resultante dos momentos de dipolo de transição das moléculas do dímero, ocorre um deslocamento espectral, criando-se uma degenerescência; quando estes dipolos sofrem interação de primeira ordem com a radiação eletromagnética, esta degenerescência é destruída resultando dois estados excitados com energias distintas.

As diferentes transições eletrônicas possíveis em

agregados provêm da maneira como os momentos de transição se orientam nestes (Kasha e col., 1965) sendo que para as substâncias utilizadas, podemos supor que os momentos de transição estejam oblíquos em relação ao eixo dimérico (Fig. 6.4). Um arranjo em fase destes vetores diminui a energia da transição (atrativo) enquanto que o fora de fase (repulsivo), leva a um aumento da energia do estado excitado. Como a resultante do momento de transição é diferente de zero em ambos os casos, temos um desdobramento da banda de excitação em duas novas bandas.

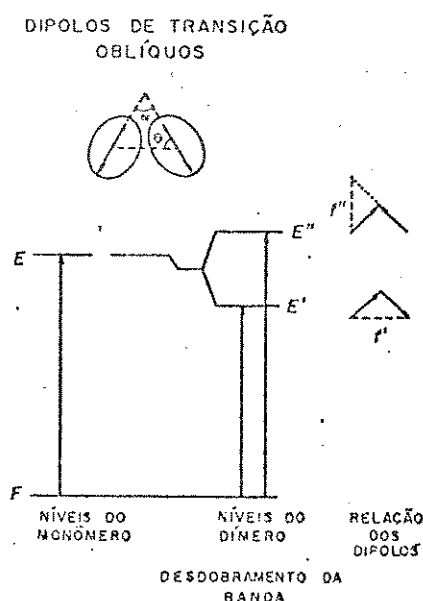


Figura 6.4: Diagrama de energia da banda excitônica para o dímero molecular com os dipolos de transição oblíquos (Dibbern, 1989, apud Kasha e col. 1965).

A formação de agregados provavelmente vem ocorrendo desde concentrações abaixo de 10^{-3} M devido ao perfil da banda de excitação em 305 nm, que mostra uma tendência a se desdobrar já na região de 10^{-4} M. Estas substâncias também formam micelas, embora os valores de c.m.c. relatados na literatura estejam acima das concentrações até agora investigadas. Florence e col. (1971) determinaram por medidas de pH e RMN valores de c.m.c. desta substância, como sendo $1,79 \cdot 10^{-2}$ M

(solução aquosa) e $4,56 \cdot 10^{-3}$ M (solução 0,154 M de NaCl)¹, propondo também uma estrutura para estes agregados (Fig. 6.5).

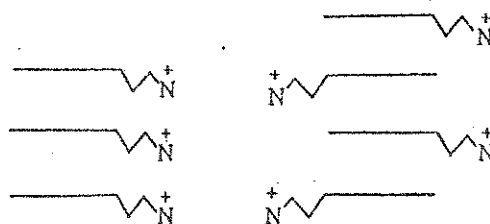


Figura 6.5: Estruturas dos agregados de fenotiazinas proposta por Florence e col. (1971) nas formas: A) Adjacente e B) Alternada.

Nas estruturas acima, as moléculas estariam superpostas com a cadeia carbônica tanto na forma adjacente como alternada, admitindo-se também a possibilidade de formar uma espiral, em um arranjo intermediário aos dois acima citados. Nesta situação, o modelo seria compatível com o alinhamento oblíquo dos dipolos de transição já proposto a partir de nossos espectros de excitação.

Quando estes compostos foram dissolvidos em solução micelar de SDS, notamos os mesmos efeitos verificados para soluções aquosas e os espectros não serão aqui apresentados. Assim, as micelas não são efetivas em promover a desagregação das moléculas da substância, pelo menos nas concentrações de SDS utilizadas (0,04 e 0,2M).

A Tab. 6.1 mostra alguns dos resultados obtidos para soluções de maleato de levomepromazina e cloridrato de clorpromazina, sendo que este último é menos fluorescente em relação ao primeiro, tendo sido determinado apenas em concentrações ao redor de 10^{-5} M.

1

O método se baseia em medir o pH da solução do surfatante em diversas concentrações através de uma titulação. Como as fenotiazinas se dissociam mais facilmente na forma micelar, o pH da solução cai significativamente na c.m.c. (Florence e col., 1971).

Tabela 6.1: Intensidades de fluorescência de algumas soluções de derivados de fenotiazinas.

Exc./Em. (nm)	Meio	Fenda* (nm)	Concentração (M)	I (Volte)
MALEATO DE LEVOMEPRMAZINA				
310/442	Água	2,5	2,0. 10E(-4)	2,39
			4,0. 10E(-5)	0,33
			8,0. 10E(-6)	0,08
310/445	SDS 0,04M	2,5	2,0. 10E(-4)	0,72
			4,0. 10E(-5)	0,39
			8,0. 10E(-6)	0,13
			solvente	0,03
250/445	SDS 0,04M	5,0	4,0. 10E(-5)	0,29
			8,0. 10E(-6)	0,30
			1,6. 10E(-6)	0,45
			1,6. 10E(-7)	0,25
			solvente	0,14
310/445	SDS 0,20M	2,5	1,0. 10E(-3)	0,12
			2,0. 10E(-4)	2,47
			4,0. 10E(-5)	1,59
			8,0. 10E(-6)	0,60
			1,6. 10E(-6)	0,33
			solvente	0,26
CLORIDRATO DE CLORPROMAZINA				
310/455	SDS 0,04M	2,0	1,0. 10E(-3)	0,02
			2,0. 10E(-4)	0,30
			4,0. 10E(-5)	0,14
			8,0. 10E(-6)	0,07
			solvente	0,04

* Corresponde à fenda de entrada do monocromador de emissão. As demais condições do espectrofluorímetro foram mantidas constantes.

Devido à formação de agregados, não foi possível a obtenção de sinais intensos em 10^{-9} M, quando $\lambda_{exc.} = 310$ nm. Em base aos resultados acima, construímos a curva analítica ilustrada na Fig. 6.6. para soluções em concentrações da ordem de 10^{-7} M, em SDS 0,04 M, havendo dispersão muito pequena dos dados experimentais (variância $7,6 \cdot 10^{-5}$). Não obtivemos medidas reprodutíveis para soluções abaixo desta concentração devido ao intenso ruído de fundo e emissão de impurezas do solvente.

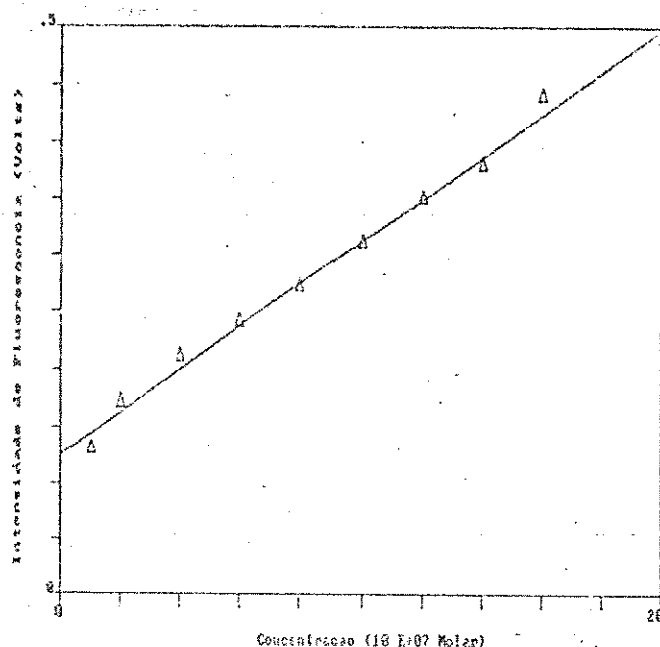


Figura 6.6: curva analítica para sol. de maleato de levomepromazina em SDS 0,04 M. $\lambda_{exc./em.} = 250 \text{ nm}/450 \text{ nm}$.

As medidas efetuadas através do espectrofluorímetro com laser mostraram que, para uma solução 10^{-5} M de maleato de levomepromazina em SDS 5 mM, a intensidade de emissão é cerca de três vezes maior quando comparada com a intensidade da mesma em água. Isto ocorre na região da c.m.c. (4,8 mM - vide Apêndice), mostrando que as moléculas da levomepromazina estão incorporadas nas micelas. A intensidade do sinal permanece estável em uma faixa de concentrações de SDS até cerca de 8 mM.

As curvas analíticas para soluções em etanol e em SDS 0,08M (Fig. 6.7), obtidas através de medidas no fluorímetro com laser, mostram que o primeiro solvente proporciona menor dispersão dos dados em relação ao polinômio de segundo grau ajustado para o gráfico. As variâncias calculadas foram $6,4 \cdot 10^{-4}$ (SDS 0,08 M) e $8,0 \cdot 10^{-4}$ (etanol). Devido à presença de ruído de fundo, as barras de erro se tornam muito significativas em escalas logarítmicas quando o sinal é pouco intenso, sendo possível detectar apenas concentrações até 10^{-6} M.

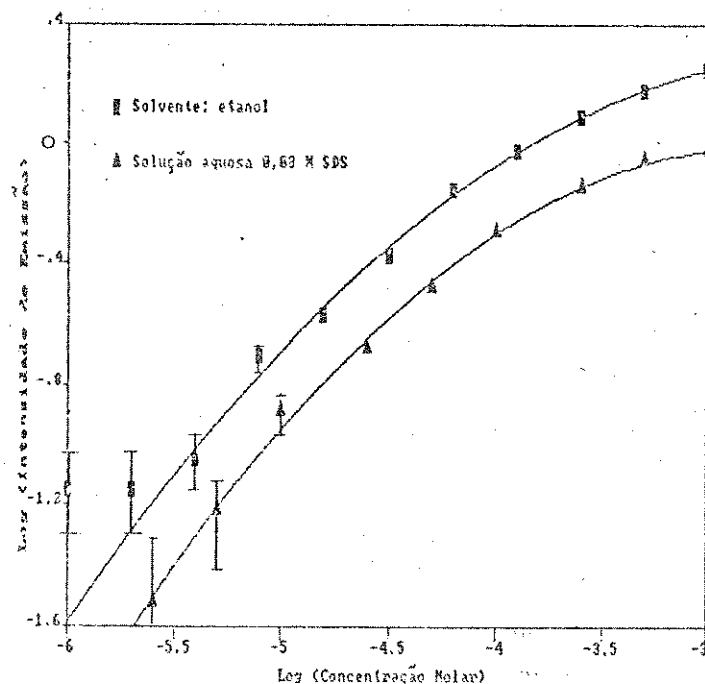


Figura 6.7: Curvas analíticas para sol. de maleato de levomepromazina em: A) etanol e B) SDS 0,08 M.
 $\lambda_{exc./em.} = 337,1 \text{ nm} / 450,0 \text{ nm}$

A presença de iodeto de sódio, embora pouco solúvel nas soluções investigadas, proporciona um aumento na intensidade de emissão de soluções de maleato de levomepromazina 10^{-5} M. O aumento é de 30% quando na presença de 0,02 M NaI em etanol, e de 15% para 0,5 M do sal em SDS 0,08 M (medidas monitoradas em 446 nm). O efeito é menos significativo em micelas de SDS devido estas serem também aniônicas, repelindo portanto o íon iodeto da superfície. Seria de se esperar que este íon, conhecido pelo seu efeito em aumentar a taxa de cruzamento inter-sistema de espécies no estado excitado, provocasse supressão na intensidade de fluorescência.

Gifford e col. (1977) determinaram os limites de detecção para a clorpromazina.HCl ($9 \cdot 10^{-8}$ MD) e para o maleato de levomepromazina ($4,5 \cdot 10^{-8}$ MD) pela técnica de fosforescência a 77 K. Mellinger e col. (1964) determinaram espectrofluorimetricamente concentrações de clorpromazina.HCl da ordem de 10^{-7} M em ácido sulfúrico, pelo método da oxidação da substância por KMnO_4 ($\lambda_{exc.} =$

340 nm e $\lambda_{em.} = 380$ nm). Assim, nossos resultados mostram que é possível, em meio micelar, determinar concentrações próximas aos resultados acima.

CAPÍTULO 7

ALARANJADO DE ACRIDINA RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de absorção e de fluorescência de soluções 10^{-5} M de alaranjado de acridina em diversas concentrações de SDS são apresentados, respectivamente, nas Figs. 7.1 e 7.2.

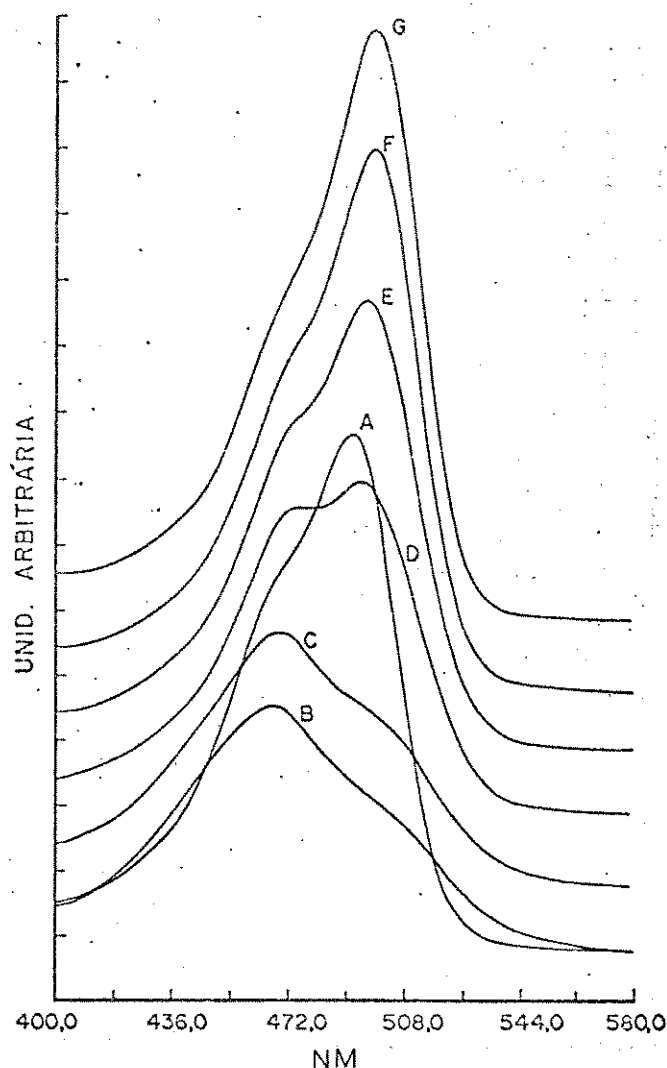


Figura 7.1: Espectros de absorção para sol. de alaranjado de acridina 10^{-5} M nas seguintes concentrações de SDS (mM): A) 0,0; B) 0,5; C) 2,0; D) 3,0; E) 3,5; F) 4,0 e G) 6,0.

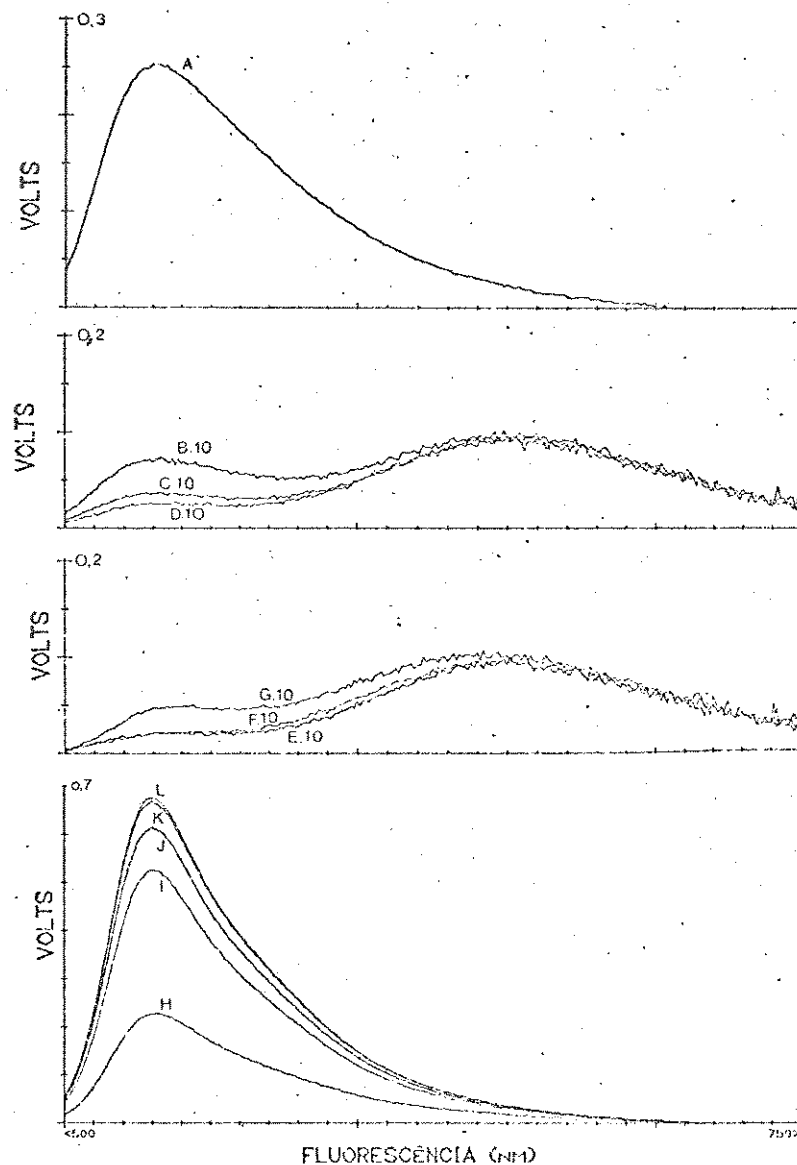


Figura 7.2: Espectros de fluorescência de sol. de alaranjado de acridina 10^{-5} M nas seguintes concentrações de SDS (mM): A) 0,0; B) 0,5; C) 1,0; D) 1,5; E) 2,0; F) 2,5; G) 3,0; H) 3,5; I) 4,0; J) 4,5; K) 5,0 e L) 5,5. O número 10, em alguns espectros, corresponde ao ganho. Nos demais, ganho 1. $\lambda_{exc.} = 492$ nm.

Na ausência de surfatante, os espectros são semelhantes aos descritos por Zanker (1952), mostrando que a forma monomérica do corante predomina em soluções quando utilizadas nas concentrações menores ou iguais a 10^{-5} M. A banda correspondente a esta forma

absorve em torno de 490 nm, e a do dímero em 470 nm. Já o espectro de fluorescência apresenta bandas, respectivamente, em 545 e em 650 nm.

As intensidades nos máximos das bandas correspondentes à emissão do monômero podem ser visualizadas na Fig. 7.3. Com adições de pequenas quantidades de SDS ocorre redução drástica nas intensidades de absorção e emissão. O espectro de absorção se torna mais largo, com a banda correspondente ao dímero mais intensa que a do monômero. Sato e col. (1981) e Ban e col. (1983), propõem que estes dímeros e agregados maiores estejam na forma de par-iônico do tipo $(AAH^+---DS^-)_n$. O espectro de fluorescência também mostra a presença do dímero em virtude da emissão em 650 nm, sendo a banda do monômero bastante suprimida.

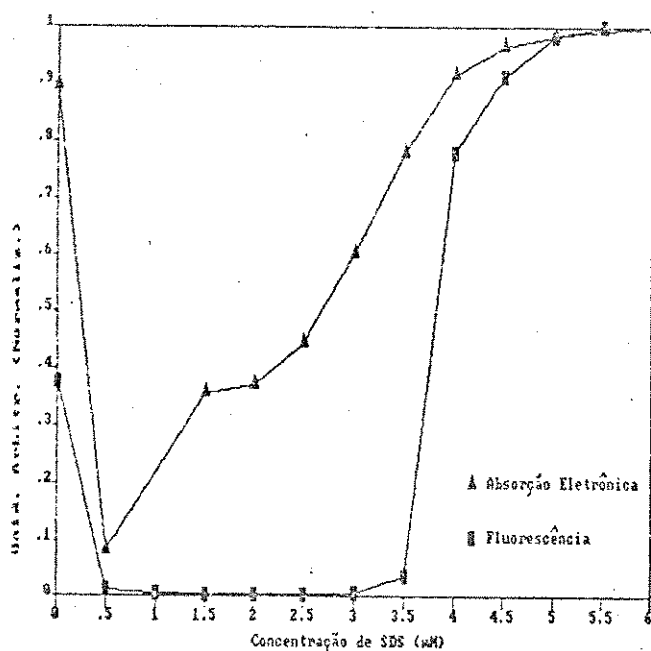


Figura 7.3: Intensidades de absorção e fluorescência, para sol. de alaranjado de acridina 10^{-5} M em SDS, até a c.m.c.. $\lambda_{abs.} = 495$ nm e $\lambda_{exc./em.} = 492$ nm / 590 nm.

Continuando-se com adições de SDS, as bandas de absorção correspondentes ao monômero sofrem aumento brusco de intensidades quando a concentração de SDS está entre 2,0 e 5,0 mM. Este fenômeno foi simultaneamente observado nos espectros de fluorescência, praticamente na mesma faixa de concentrações de SDS (3,0 a 5,5 mM).

Ban e Sato consideraram que está ocorrendo a formação de agregados pré-micelares ricos em moléculas de corante, devido ao fato do surfatante e o corante possuírem cargas opostas.

Com a adição de mais surfatante, tais agregados vão se desfazendo e se rearranjando até que, na c.m.c., se formam as micelas convencionais. Posteriormente, uma maior concentração de surfatante, e consequentemente de micelas, proporciona uma redistribuição das moléculas de alaranjado de acridina entre elas, até que este predomine na forma monomérica. Isto foi confirmado por cálculos estatísticos utilizando-se a distribuição de Poisson (Ban e col., 1983). Desta maneira, é justificado o aumento das intensidades de absorção e fluorescência das bandas correspondentes ao monômero neste meio. No caso da fluorescência, o aumento de intensidade pode se dar também pela diminuição dos processos de desativação não radiativos devido à proteção que as micelas fornecem às moléculas de corante.

A estabilização das intensidades de absorção e emissão¹ começa a ocorrer na região da c.m.c., cujo valor determinamos como sendo 4,8 mM em solução aquosa (método de medidas de condutividade - Apêndice). Ban e Sato observaram que, para uma maior concentração de corante, se faz necessário uma maior concentração de micelas para que ocorra a desagregação do primeiro, fazendo cálculos estatísticos pela distribuição de Poisson e medidas de tempo de vida das espécies de corante presentes em solução micelar.

Comparando-se os espectros obtidos para amostras de alaranjado de acridina $1,0 \cdot 10^{-6}$ M, constatamos que, em soluções de SDS cujas concentrações se situam entre 0,5 e $3,0 \cdot 10^{-2}$ M, as intensidades de fluorescência são cerca de cinco vezes maiores quando comparadas com medidas efetuadas em água. Acima desta faixa, a intensidade sofre uma pequena redução, atingindo, em 0,15 M, um valor quatro vezes maior que em água. Esta redução se deve ao aumento da supressão causada por impurezas no surfatante.

¹Rujimethabas e col., (1978) determinaram a c.m.c. do SDS através de medidas das intensidades de absorção e emissão de soluções de alaranjado de acridina em diversas concentrações de SDS. Um aumento percentual brusco na intensidade de fluorescência em 6,1 mM forneceu um valor de c.m.c. próximo ao da literatura, determinado por condutividade (8,1 mM - Fendler e col., 1975).

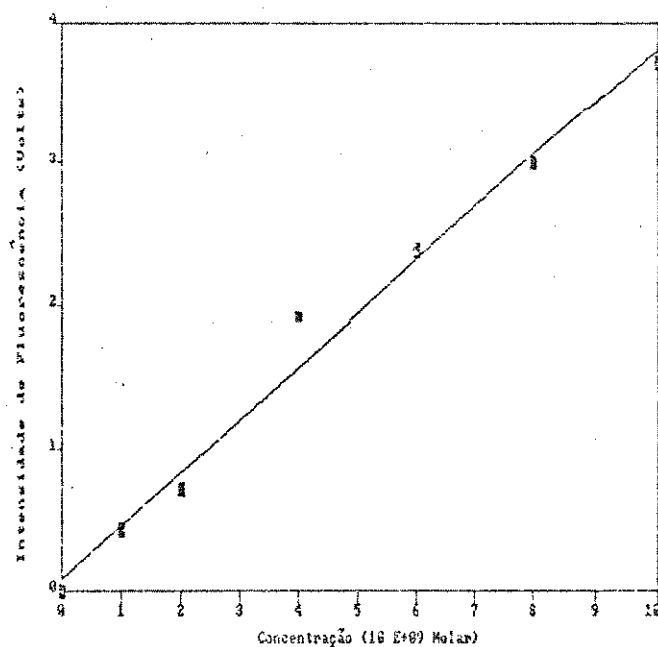
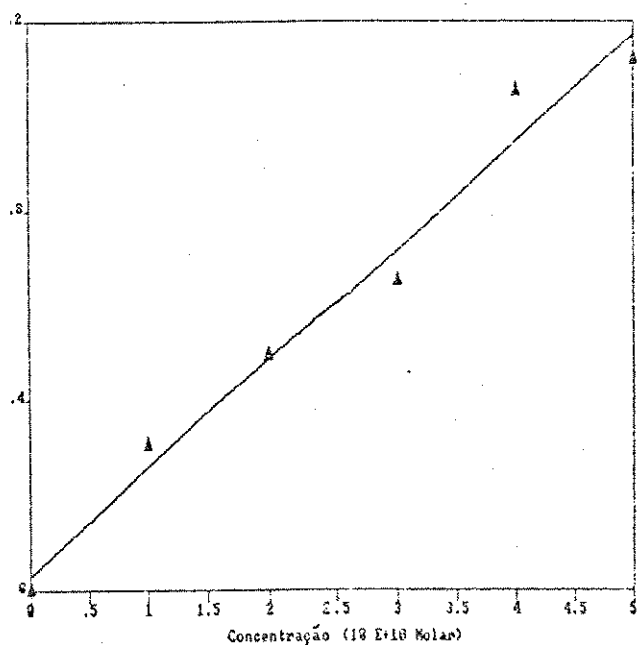
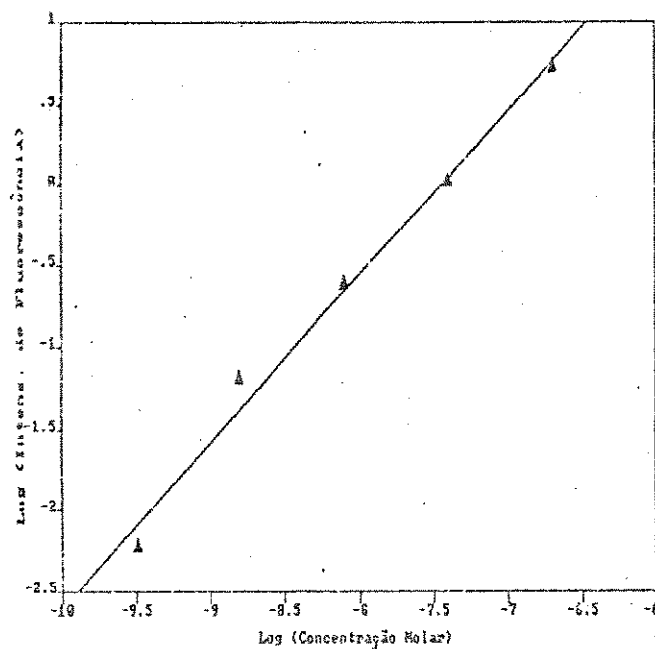


Figura 7.4: Curvas analíticas para sol. de alaranjado de acridina em SDS 0,02M nas seguintes concentrações:

7.4.a: 10^{-7} a 10^{-10} M

7.4.b: 10^{-9} M

7.4.c: 10^{-10} M

$\lambda_{exc./em.} = 492 \text{ nm}/529 \text{ nm}$

A curva analítica ilustrada na Fig. 7.4.a mostra que é

possível determinar concentrações entre $3,2 \cdot 10^{-10}$ e $2,0 \cdot 10^{-7}$ M de forma reprodutível, utilizando-se solução 0,02 M de SDS. As curvas observadas quando a concentração de alaranjado de acridina varia entre 10^{-9} e 10^{-10} M (Figs. 7.4.b e 7.4.c), apresentam pequena dispersão dos resultados, com variâncias de $2,2 \cdot 10^{-2}$ e $3,7 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. Os espectros obtidos para a construção da curva da Fig. 7.4.c são apresentados na Fig. 7.5.

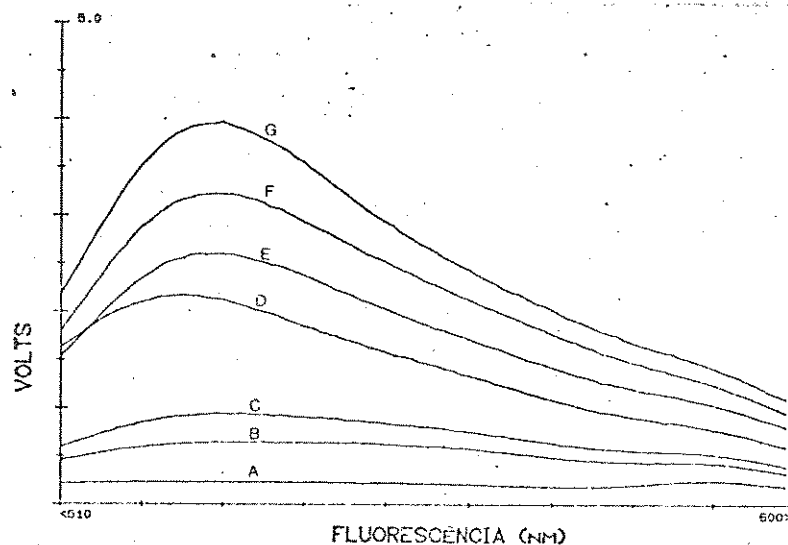


Figura 7.5: Espectros de fluorescência de sol. de alaranjado de acridina em SDS 0,02M nas seguintes concentrações (nanomolar): A) 0,0; B) 1,0; C) 2,0; D) 4,0; E) 6,0; F) 8,0 e G) 10,0. $\lambda_{exc.} = 492 \text{ nm}$.

Medidas de fluorescência para soluções cujas concentrações são da ordem de 10^{-11} M não apresentaram resultados reprodutíveis devido ao limite de sensibilidade do aparelho e às impurezas provenientes do surfatante. Observamos, embora de forma qualitativa, que um número maior de lavagens da cubeta com água bidestilada leva a resultados mais reprodutíveis em concentrações de alaranjado de acridina menores ou iguais a 10^{-9} M, mostrando portanto o efeito da provável adsorção do corante nas paredes das cubetas. Concentrações acima de 10^{-5} M também são difíceis de serem obtidas devido à baixa solubilidade dos cristais em água e ao corante estar na forma dimerizada.

CAPÍTULO 8

MERBROMIN (MERCÚRIO-CROMO) RESULTADOS E DISCUSSÃO

O mercúrio-cromo é vendido comercialmente em solução, em torno de 2%. Porém, nas concentrações em que trabalhamos, abaixo de 10^{-4} M, as soluções se tornam vermelho-amareladas. Tal efeito é atribuído à desagregação deste (Pandya e col., 1977), sendo um fenômeno bastante comum em soluções de corantes.

O comportamento espectroscópico do merbromin depende do pH da solução em que esta substância se encontra (Figs. 8.1 e 8.2). A absorção e a fluorescência, pouco intensas em meio ácido, aumentam significativamente com o pH, até que este atinja 10,5. O máximo de absorção gradualmente se desloca de 453 nm (pH 2,1) até atingir 500 nm (pH 5,8). Em pH = 10,5 notamos dois máximos na região do visível (480 e 500 nm). Como o anel benzênico está em um plano perpendicular ao restante da molécula (Martin e col., 1975), a banda de absorção na região visível do espectro corresponde ao grupo xantênico.

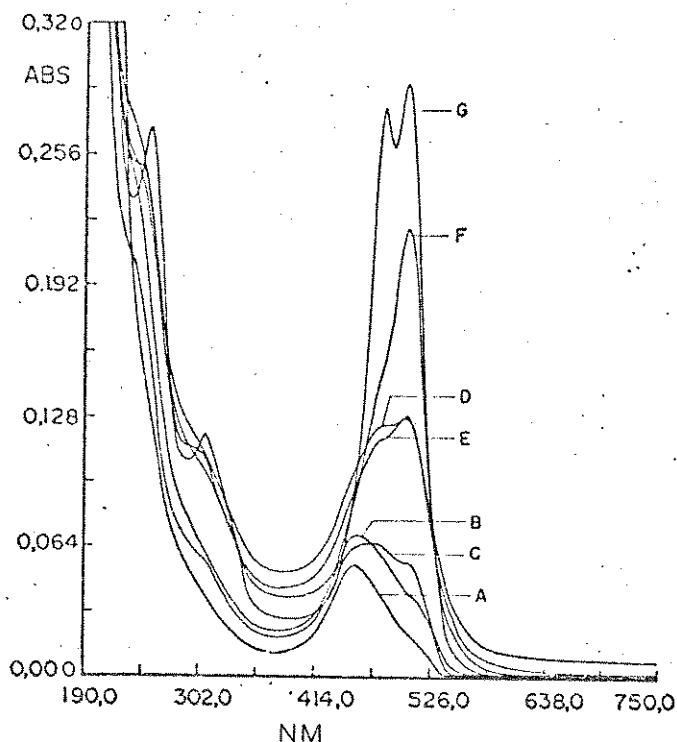


Figura 8.1: Espectros de absorção de soluções aquosas de merbromin $1,1 \cdot 10^{-5}$ M nos seguintes valores de pH: A) 2,1; B) 3,2; C) 4,6; D) 5,8 (ocorre naturalmente em água); E) 7,2; F) 9,1 e G) 10,5.

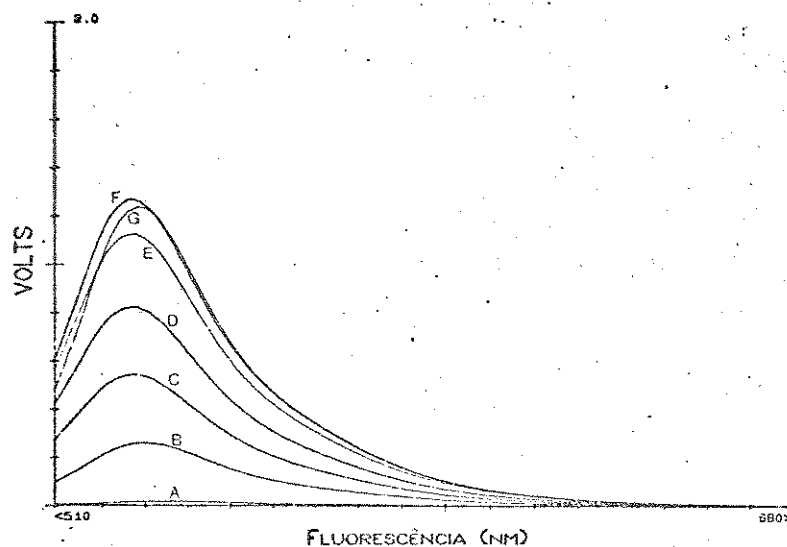


Figura 8.2: Espectros de fluorescência de soluções aquosas de merbromin $1,1 \cdot 10^{-5}$ M nos seguintes valores de pH: A) 3,2; B) 4,6 C) 5,8; D) 7,2; E) 8,4; F) 9,1 (750 V) e G) 10,5 (730 V). Valores entre parênteses correspondem à tensão aplicada na fotomultiplicadora. Nos demais espectros: 800 Volts.

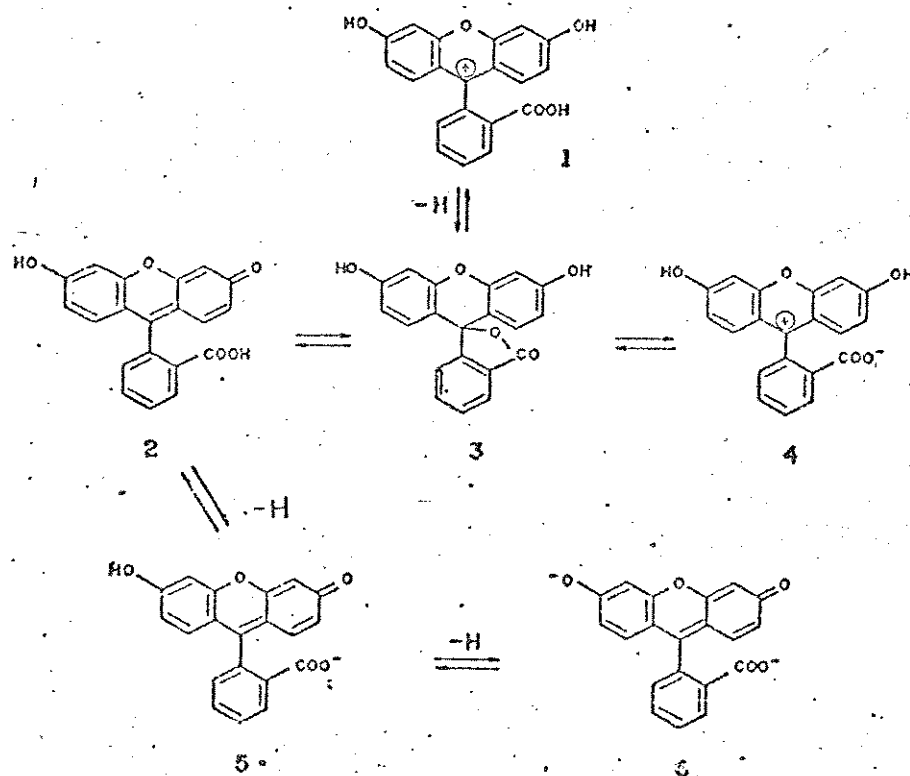
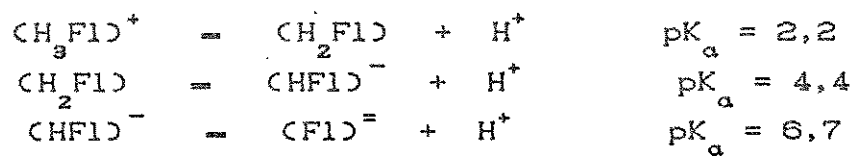


Figura 8.3: Espécies de fluoresceína presentes em equilíbrio ácido-base: 1) catiônica (H_2Fl^+); 2) neutra (H_2Fl); 3) lactônica; 4) anfotérica; 5) monoaniônica (HFl^-) e 6) dianiônica (Fl^{2-}).



Martin e col. (1975) estudando o comportamento de outro corante xantênico, a fluoresceína, identificaram as diversas espécies desta substância presentes em equilíbrio ácido-base (Fig. 8.3), determinando também os respectivos valores de pK_a . Como o merbromin possui estrutura semelhante, podemos fazer analogia do comportamento deste com o da fluoresceína, com base nos trabalhos de Martin e col., 1975 e de Dibbern, 1989.

Como no caso da fluoresceína, podemos concluir que as espécies aniônicas do merbromin são responsáveis pelo aumento das intensidades de absorção e de emissão. É possível a existência de um equilíbrio, em meio ácido, entre as espécies neutra, lactônica e anfotérica, pois estas ocasionam diminuições nas intensidades espectrais devido à perda de conjugação eletrônica no anel xantênico.

A Fig. 8.4 ilustra os espectros de soluções de merbromin em surfatantes e a Tab. 9.1 apresenta resultados para soluções em meio tamponado.

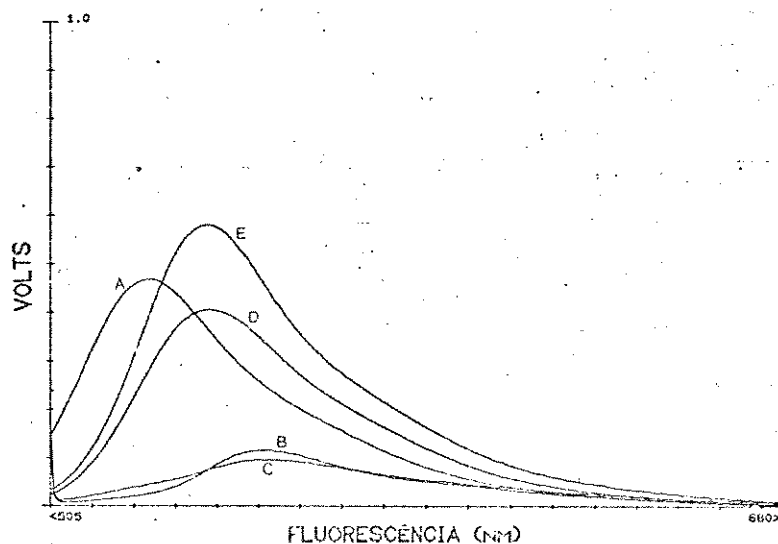


Figura 8.4: Espectros de fluorescência de soluções de merbromin $2,0 \cdot 10^{-5}$ M em: A) água; B) 0,005M Brij-35; C) 0,05M Brij-35; D) 0,005 M CTAB e E) 0,03M CTAB. Soluções em Brij-35: ganho 10. Nas demais, ganho 1. ($\lambda_{exc.} = 300 \text{ nm}$)

Tabela 9.1: Resultados comparativos das intensidades de fluorescência de soluções de merbromin ($\lambda_{exc.} = 500 \text{ nm}$). Os resultados estão separados em duas partes pois cada uma foi obtida em diferentes condições instrumentais.

Merbromin	Surfatante		pH	Fluorescência	
(10^5 MD)	Nome	mM		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$I_{\text{máx.}}$ (V)
1,11	-	-	9,0 ^a	527	0,45
1,08	Brij-35	1,1	9,0 ^a	527	0,44
1,11	CTAB	0,9	9,0 ^a	538	0,24
1,04	CTAB	13,2	9,0 ^a	538	0,19
1,11	-	-	11,7 ^b	527	0,32
1,10	Brij-35	0,6	11,7 ^b	527	0,31
1,07	Brij-35	1,5	11,7 ^b	527	0,30
1,09	SDS	22,2	11,7 ^b	527	0,30
0,84	-	-	11,5 ^c	527	0,94
0,84	Brij-95	2,0	11,5 ^b	527	0,93

^a tampão tris/HCl

^b tampão fosfato/NaOH

^c sol. NaOH

Observamos que em valores de pH elevados, tanto na presença como na ausência de solução tampão, o surfatante Brij-35 não provoca alterações espectrais, quer em intensidade quer na posição da banda. Porém, em soluções aquosas (pH em torno de 6,0) sem solução tampão, a presença deste surfatante desloca a posição do máximo de 528 nm para aproximadamente 555 nm, causando grande supressão na intensidade de emissão. O efeito pode ser atribuído ao deslocamento de equilíbrio provocado pelo Brij-35 no sentido de se formarem as espécies de merbromin mais apolares que estão presentes em meio ácido, as quais absorvem e emitem fracamente (Fig. 8.4).

O surfatante CTAB provoca, tanto em pH 5,8 (sol. aquosa) como em pH 9,0 (meio tamponado), deslocamento espectral do máximo da banda de fluorescência para aproximadamente 542 nm e 538 nm respectivamente. O deslocamento, neste caso é atribuído à incorporação das moléculas de merbromin à micelas formadas por moléculas de surfatante de carga oposta àquelas. Porém, em meio tamponado (pH = 9,0), ocorre supressão da intensidade de fluorescência após adição de CTAB, o que foi atribuído ao efeito do íon brometo, o qual suprime a emissão. Em meio não tamponado (pH 5,8), este efeito é compensado pelo

deslocamento de equilíbrio que o CTAB provoca, no sentido de dissociar as moléculas de merbromin.

As curvas analíticas ilustradas nas Figs. 8.5.A e 8.5.B apresentam variâncias de $3,6 \cdot 10^{-3}$ (sol. aquosa); $2,4 \cdot 10^{-2}$ (sol. NaOH, pH 11,5); $5,5 \cdot 10^{-3}$ (2,0 mM Brij-35, tampão fosfato, sendo excluído o ponto correspondente à menor intensidade) e $3,8 \cdot 10^{-3}$ (CTAB 1,0 mM, tampão tris, excluídos os dois últimos pontos).

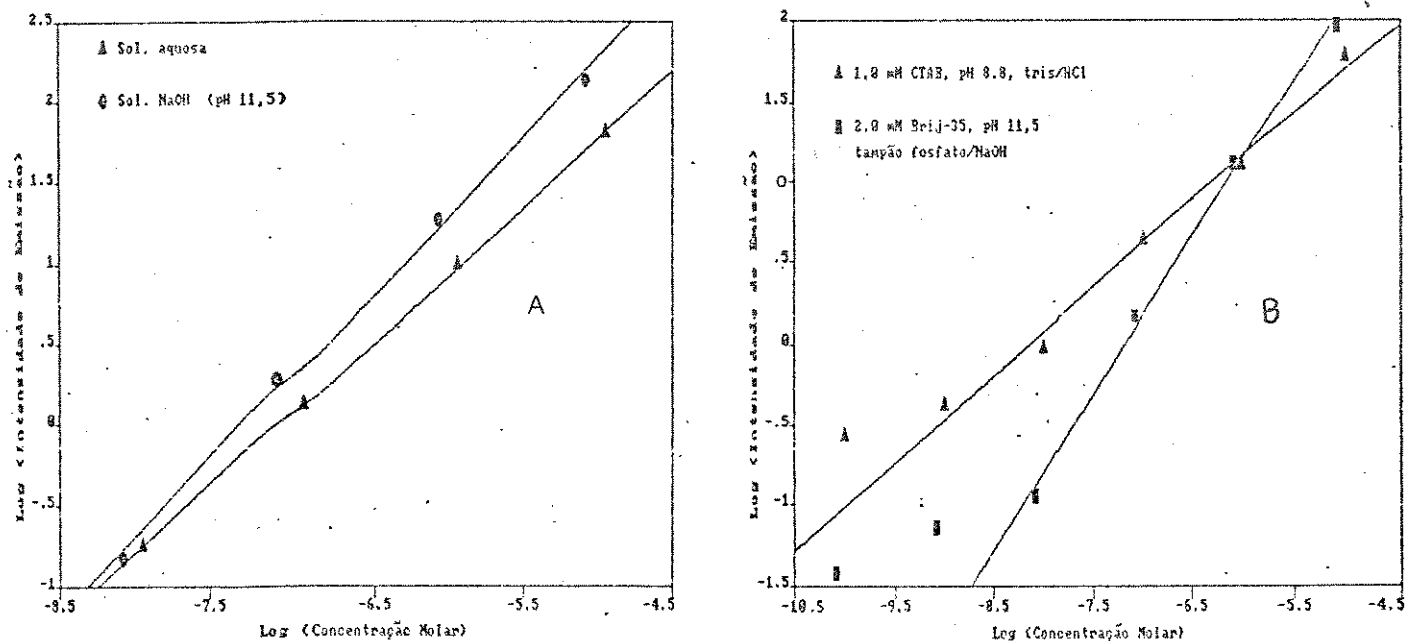


Figura 8.5: Curvas analíticas para sol. de merbromin em meios aquoso (8.5.a) e micelar (8.5.b). $\lambda_{exc./em.} = 500 \text{ nm}/527 \text{ nm}$ (530 nm para sol. CTAB).

Na ausência de surfatante, foram determinadas soluções de até 10^{-8} M de mercúrio-cromo (Fig. 8.5.A). Já em presença de CTAB e Brij-35, foi possível obter valores de até 10^{-10} M, embora neste caso, os pontos correspondentes estejam mais distantes da reta (Fig. 8.5.B). A maior sensibilidade é proporcionada pelo meio contendo Brij-35 em meio tamponado, o que evita deslocamentos de equilíbrio das espécies presentes (embora em pH 11,5 acreditamos que todo o merbromin esteja na forma dianiônica). O CTAB, como já mencionado, proporciona sinais menos intensos.

Medidas em CTAB e na presença de tampão fosfato não foram realizadas devido à formação de precipitados. Soluções em concentrações da ordem de 10^{-4} M se agregam, conforme pode ser

inferido do alargamento da banda e do deslocamento do máximo de absorção de 527 nm para aproximadamente 535 nm (sol. aquosa) e, de 538 nm para em torno de 560 nm (sol. 1,0 mM CTAB, pH 9,0 em tampão Tris). Em CTAB, ocorre precipitação de merbromin nesta concentração e a intensidade de fluorescência é reduzida em cerca de 10 vezes.

CAPÍTULO 9

CRISTAL VIOLETA RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de absorção de soluções $1,1 \cdot 10^{-5}$ M de cristal violeta em diversos valores de pH (entre 3 e 7) não sofrem alterações na posição das bandas ($\lambda_{\text{máx.}} = 582$ nm) (Fig. 9.1), com intensidades praticamente estáveis. Somente em pH 2,1 notamos um pequeno deslocamento do máximo para 585 nm, e o surgimento de um pequeno ombro em torno de 420 nm. Analogamente, os espectros de fluorescência são idênticos com máximo em torno de 630 nm ($\lambda_{\text{exc.}} = 580$ nm) (Fig. 9.3, espectro A). Em pH 2,1 a intensidade de fluorescência deste máximo é cerca de 10% menor comparando-se com aquelas relativas a outros valores de pH.

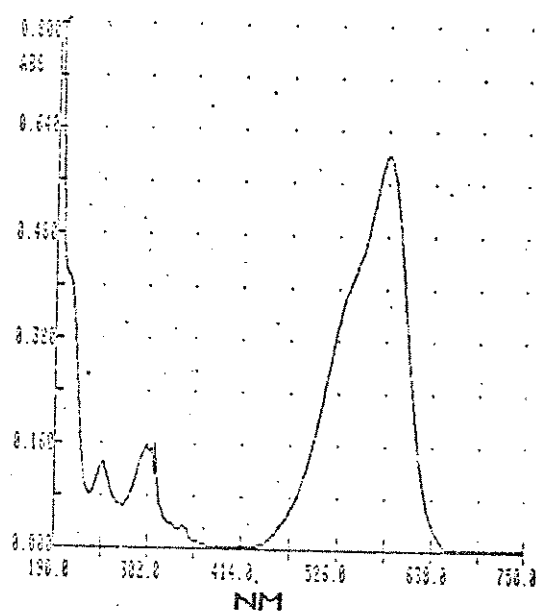


Figura 9.1: Espectro de absorção de solução de cristal violeta $1,1 \cdot 10^{-5}$ M em água, no pH de 5,8.

Os espectros de excitação mostram que, com o abaixamento do pH para 3,1 e em seguida para 2,1 ocorre um alargamento da referida banda, cujo comprimento de onda máximo está entre 570 e 590 nm, com o simultâneo surgimento de outra banda, menos intensa, em 380 nm. Assim,

podemos supor que ocorre protonação do corante em valores de pH baixos, justificando as alterações espectrais observadas.

A Fig. 9.2 ilustra as intensidades de fluorescência de soluções $1,1 \cdot 10^{-5}$ M de cristal violeta em função da concentração de surfatante. Em nenhuma situação (tanto para SDS como CTAB ou Brij-35), ocorrem deslocamentos significativos do máximo de emissão, em torno de 630 nm. A determinação precisa deste é difícil devido à banda larga e presença de ruído. A Fig. 9.3 mostra os espectros para soluções em Brij-35.

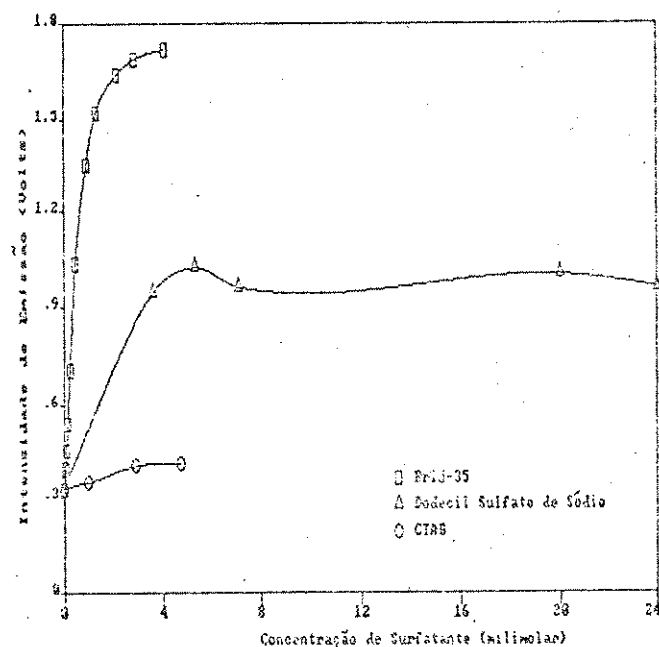


Figura 9.2: Intensidades de fluorescência de soluções de cristal violeta $1,1 \cdot 10^{-5}$ M em meio micelar.
 $\lambda_{exc./em.} = 580/630$ nm.

Os espectros de absorção para soluções do corante obtidos em presença de tensoativos apresentam pequenas diferenças de intensidades quando as concentrações dos surfatantes correspondem àquelas do último ponto de cada curva mostrada na Fig. 9.2. A posição dos máximos de absorção sofrem pequenas alterações devido aos diferentes sítios de solubilidade. Assim, tais máximos ocorrem em 583 nm (CTAB), 585 nm (SDS) e 589 nm (Brij-35) e 582 nm (água) (Fig. 9.1).

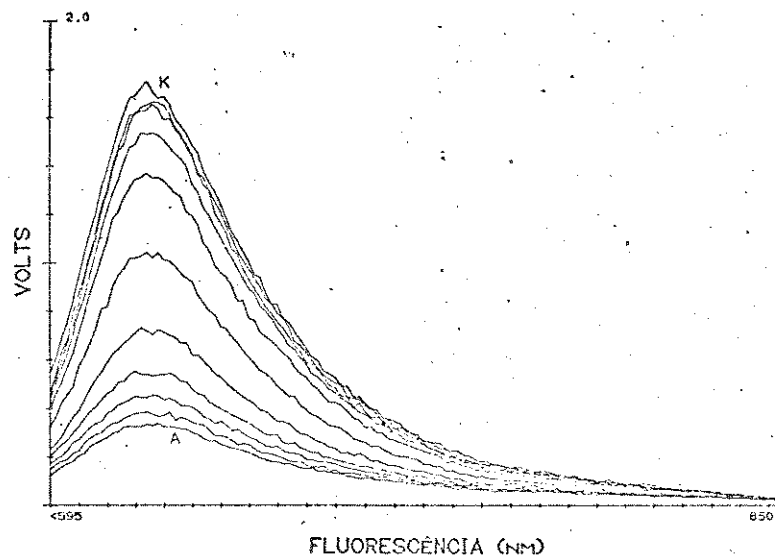


Figura 9.3: Espectros de fluorescência de soluções de cristal violeta $1,1 \cdot 10^{-5}$ M nas seguintes concentrações de Brij-35 (mM): A) 0,00; 0,05; 0,09; 0,14; 0,23; 0,45; 0,90; 1,3; 2,2; 2,9 e K) 4,1. Valores em sequência de baixo para cima, nos espectros. $\lambda_{exc.} = 580$ nm.

Portanto, devido a estas pequenas diferenças em intensidades nos espectros de absorção, podemos associar o aumento da intensidade de fluorescência à proteção que as micelas proporcionam ao cromóforo contra desativação não radiativa. Deste modo, o CTAB não ocasiona aumento significativo da emissão, haja visto que este tem a mesma carga do corante, repelindo-o da superfície micelar. SDS e Brij-35, aumentam a intensidade de emissão em, respectivamente, cerca de 3 e 5 vezes. Assim, para a construção das curvas analítica foram escolhidos os seguintes meios: SDS 0,010M e Brij-35 2,0 mM, para os quais obtivemos intensidades maximizadas.

A necessidade de se trabalhar com uma concentração de Brij-35 muito acima da c.m.c vem do fato de este valor ser baixo para o surfatante em questão ($6,0$ a $9,5 \cdot 10^{-5}$ M, Fendler e col., 1975), não sendo o número de micelas suficiente para incorporar todas as moléculas de soluto.

A Fig. 9.4 mostra as curvas analíticas. Foi possível determinar, em meio micelar, até concentrações da ordem de 10^{-8} M de cristal violeta (contra 10^{-7} M em solução aquosa não micelar). A dispersão dos pontos é pequena tanto em SDS como em Brij-35 sendo que

para este último os sinais são pouco mais intensos. As variâncias calculadas foram $1,7 \cdot 10^{-2}$ (Brij-35) e $6,2 \cdot 10^{-3}$ (SDS). Os pontos correspondentes à concentração $2,06 \cdot 10^{-5}$ M não estão incluídos no cálculo da equação da regressão nem da variância.

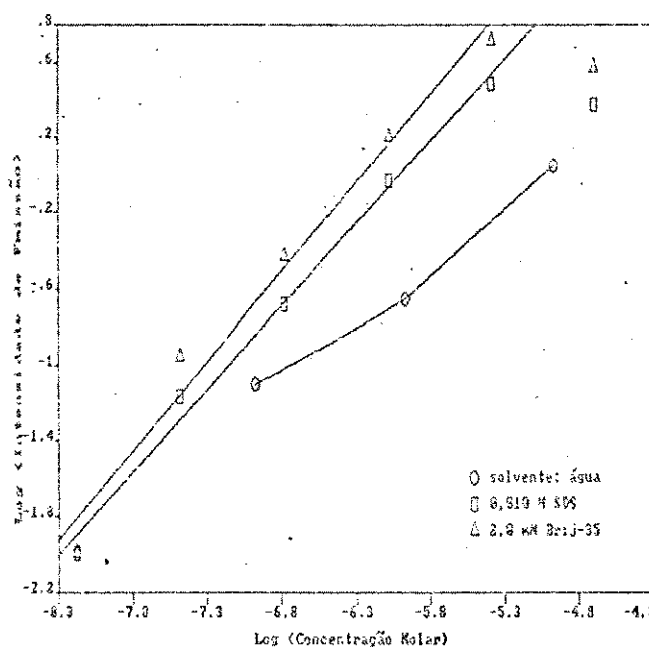


Figura 9.4: Curvas analíticas para soluções de cristal violeta em água e em meio micelar, monitoradas em 630 nm. ($\lambda_{exc.} = 580$ nm)

Em concentrações da solução em torno de 10^{-4} M, tanto em água como em surfatante, observamos a supressão da fluorescência devido ao início da formação de agregados. Isto pode também ser constatado nos deslocamentos espectrais para comprimentos de onda maiores e no alargamento das bandas (Fig. 9.5). A solução micelar não acarreta deslocamento do equilíbrio entre as espécies monoméricas e agregadas. Caso isto não ocorresse, tais agregados estariam presentes apenas quando as concentrações do corante fossem maiores.

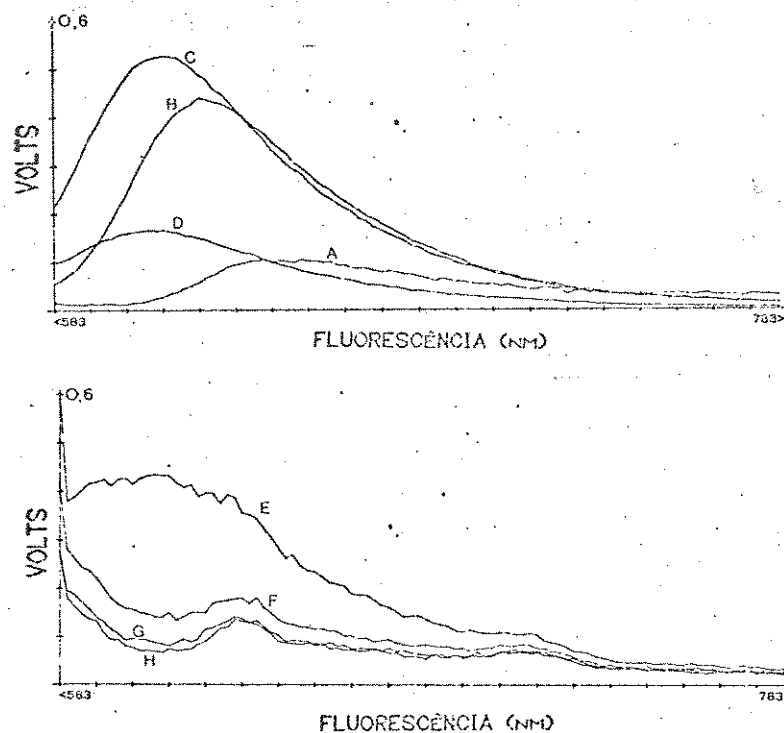


Figura 9.5: Espectros de fluorescência de sol. de cristal violeta em 2,0 mM de Brij-35, nas seguintes concentrações (M): A) $1,0 \cdot 10^{-4}$; B) $2,1 \cdot 10^{-5}$; C) $4,1 \cdot 10^{-6}$; D) $9,2 \cdot 10^{-7}$; E) $1,6 \cdot 10^{-7}$; F) $3,2 \cdot 10^{-8}$; G) $6,4 \cdot 10^{-9}$ e H) referência. Ganho 100, exceto B, C e D, onde foi utilizado ganho 10. $\lambda_{exc.} = 580 \text{ nm}$.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Vimos que a técnica de fosforescência à temperatura ambiente, embora apresentando vantagens tais como simplicidade, rapidez, possibilidade de automação e limites de detecção baixos, não apresentou resultados satisfatórios nas condições em que trabalhamos. Talvez estes possam ser melhorados mediante o uso de um espectrofluorímetro no qual se pode selecionar o comprimento de onda da luz empregada para excitação e subtrair o espectro relativo à emissão do substrato.

Mesmo tendo sido extensivamente investigados muitos tipos de materiais para serem utilizados como substrato, este continua a ser um fator limitante para o bom desempenho da referida técnica e, por este motivo, o número de trabalhos publicados sobre o assunto vem diminuindo drasticamente nos últimos anos.

Os sistemas micelares têm recebido bastante atenção por parte de pesquisadores em diversas áreas da química e bioquímica. Em química analítica, existem muitas possibilidades de trabalho na determinação de compostos químicos por fluorimetria em meio micelar. Esta é uma alternativa para grupos de pesquisa e de limitadas disponibilidades financeiras, devido a não necessidade de equipamentos de alto custo e para laboratórios de análises clínicas, devido à elevada sensibilidade da técnica. Para a obtenção de resultados mais satisfatórios, faz-se necessário um razoável conhecimento do comportamento e dos tipos de interações das substâncias em análise com as micelas, para que os trabalhos sejam melhor direcionados.

Os resultados obtidos mostram a possibilidade de se determinar concentrações de até 10^{-10} Molar oferecendo, portanto, possibilidades de desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de componentes traços em, por exemplo, amostras de materiais biológicos, além de permitir a adaptação das metodologias já existente para fluorimetria convencional (em solventes homogêneos). Também é possível o acoplamento com outras técnicas analíticas tal como a cromatografia com detector de fluorescência.

APÊNDICE

Determinação da c.m.c. do SDS e CTAB

A c.m.c. determinada pelo método de condutividade forneceu os seguintes valores: 4,8 mM (SDS) e 0,9 mM (CTAB), enquanto que os valores fornecidos pela literatura são respectivamente, 8,1 e 0,9 mM.

O método empregado para purificação destes surfatantes não foi eficiente, portanto, na remoção das impurezas no caso do SDS. Estas possivelmente corresponderiam a álcoois de cadeia longa, a partir do qual o surfatante é produzido.

No caso do CTAB, mais solúvel no solvente ao qual ele foi recristalizado, tínhamos a presença de menos impurezas e/ou o processo de purificação foi adequado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E. N. (1977). *Dyes and their Intermediates*. p 151, 2^a ed, Chemical Publishing.
- Adamson, A. W. (1982). *Physical Chemistry of Surfaces*. p 473, 2^a ed., John Wiley & Sons.
- Ahiara, M., Arai, M. e Taketatsu, T. (1986). *Analyst* 111, 641. Flow Injection Spectrofluorimetric Determination of Europium (III) Based on Solubilizing its Ternary Complexes with Thenoyltrifluoroacetone and Trioctylphosphine Oxide in Micellar Solution.
- Almgren, M., Grieser, F. e Thomas, J. K. (1979). *J. Am. Chem. Soc.* 101, 279. Dynamic and Static Aspects of Solubilization of Neutral Arenes in Ionic Micellar Solutions.
- Armstrong, D. W. (1985). *Sep. Purif. Methods* 14, 213. Micelles in Separations: A Practical and Theoretical Review.
- Ban, T., Kasatani, K., Kawasaki, M. e Sato, H. (1983). *Photochem. Photobiol.* 37, 131. Fluorescence Decay of the Acridine Orange-Sodium Dodecyl Sulfate System: Formation of Dye-Rich Induced Micelles in the Premicellar Region.
- Bateh, R. P. e Winefordner, J. D. (1982). *Talanta* 29, 713. An Evaluation of Cellulose as a Substrate for Room-Temperature Phosphorescence.
- Bedair, M. M., Korany, M. A., Elsayed, M. A. e Fahmy, O. T. (1990). *Spectrosc. Lett.* 23, 161. Spectrofluorimetric Determination of Three Pharmaceutical Thiocompounds and Allopurinol Using Mercurochrome.
- Brignoli, C. A. e DeVoe, H. (1978). *J. Phys. Chem.* 82, 2570. Least-Squares Computer Analysis of Dye Absorption Spectra. Acridine Orange Dimerization Equilibrium.
- Chaimovich, H., Blanco, A., Chayet, L., Costa, L. M., Monteiro, P. M., Bunton, C. A. e Paik, C. (1975). *Tetrahedron* 31, 1139. Micellar Catalysis of the Reaction of 2,4-Dinitrofluorobenzene with Phenoxide and Thiophenoxide Ions.
- Chang, S. A., Spurlin, S. R. e Hinze, W. L. (1978). *Sci. Ciência* 6, 54. Practical Applications of Micelle Systems in Analytical Chemistry.
- Cline-Love, L. J., Dorsey, J. G. e Habarta, J. G. (1984). *Anal. Chem.* 56, 1132A. The Micelle-Analytical Chemistry Interface.
- Cline Love, L. J., Skrilec, M. e Habarta, J. G. (1980). *Anal. Chem.* 52, 754. Analysis by Micelle-Stabilized Room-Temperature Phosphorescence in Solution.

Dibbern, D. N. (1989). *Estudo Espectroscópico da Fluoresceína em Poli(Álcool Vinílico) e Poli(Acetato de Vinila)*, Tese de Mestrado, Unicamp.

Dill, K. A. e Flory, P. J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 3115. Interphases of Chain Molecules: Monolayers and Lipid Bilayer Membranes.

Eriksson, J. C. (1966). *Act. Chim. Scand.* 20, 2019. NMR-Studies of the solubilization of Aromatic Compounds in Cetyltrimethylammonium Bromide Solution.

Fendler, J. H. (1982). *Membrane Mimetic Chemistry*, 1ª ed., John Wiley & Sons.

Fendler, J. H. e Fendler, E. J. (1975). *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, 1ª ed., Academic Press.

Fidanza, J. e Aaron, J. -J. (1986). *Talanta* 33, 215. Evaluation of Filter Papers as Substrates for Solid-Surface Room-Temperature Fluorimetry and Photochemical Fluorimetry.

Florence, A. T. e Parfitt, R. T. (1971). *J. Phys. Chem.* 75, 3554. Micelle Formation by Some Phenothiazine Derivatives. II. Nuclear Magnetic Resonance Studies in Deuterium Oxide.

Ford, C. D. e Hurtubise, R. J. (1978). *Anal. Chem.* 50, 610. Room-Temperature Phosphorescence of the Phthalic Acid Isomers, p-Aminobenzoic Acid and Terephthalamide Adsorbed on Silica Gel.

Ford, C. D. e Hurtubise, R. J. (1979). *Anal. Chem.* 51, 659. Design of a Phosphoroscope and the Examination of Room-Temperature Phosphorescence of Nitrogen Heterocycles.

Ford, C. D. e Hurtubise, R. J. (1980). *Anal. Chem.* 52, 656. Room-Temperature Phosphorescence of Nitrogen Heterocycles Adsorbed on Silica-Gel.

Fromherz, P. (1980). *Chem Phys. Lett.* 77, 460. Micelle Structure: A Surfactante-Block Model.

Gifford, L. A., Miller, J. N., Thorburn Burns, D. e Bridges, J. W. (1975). *Anal. Chem.* 47, 1699. Phosphorimetric Analysis of Phenothiazine Derivatives.

Hartley, G. S. (1935). *Trans. Faraday Soc.* 31, 31. The Application of the Debye-Hückel Theory of Colloidal Electrolytes.

Hinze, W. L. (1979). *Solution Chemistry of Surfactants*, 1, 79, (Mittal, K. L. Ed.), Plenum Press. Use of Surfactants and Micellar Systems in Analytical Chemistry.

Hinze, W. L., Singh, H. N., Baba, Y. e Harvey, N. G. (1984). *Trends Anal. Chem.* 3, 193. Micellar Enhanced Analytical Fluorimetry.

Kalyanasundaram, K., Grieser, F. & Thomas, J. K. (1977). *Chem. Phys. Lett.* 51, 501. Room-Temperature Phosphorescence of Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Micellar Solutions.

Kalyanasundaram, K. & Thomas, J. K. (1976). *J. Phys. Chem.* 80, 1462. On the Conformational State of Surfactants in the Solid State and in Micellar Form. A Laser Excited Raman Scattering Study.

Kasha, M., Rawls, H. R. & El-Bayomi, M. A. (1965) *Pure Appl. Chem.* 75, 371. The Exciton Model in Molecular Spectroscopy.

Korany, M. A., Bedair, M. M., Elsayed, M. A. & Fahmy, O. T. (1989). *Anal. Lett.* 22, 1909. Colourimetric Determination of Pharmaceutical Thiocompounds and Allopurinol Using Mercurochrome.

Korppi-Tommola, J., Kolehmainen, E., Salo, E. & Yip, R. W. (1984). *Chem. Phys. Lett.* 104, 373. The Temperature-Dependent Red-Shift of the Visible Absorption Spectra of Crystal Violet in Alcohol Solutions.

Korppi-Tommola, J. & Yip, R. W. (1980). *Can. J. Chem.* 59, 191. Solvent Effects on the Visible Absorption Spectrum of Crystal Violet.

Lewis, G. N., Magel, T. T & Lipkin, D. (1942). *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 1774. Isomers of Crystal Violet Ion. Their Absorption and Re-emission of Light.

Martin, M. M. & Lindqvist, L. (1975). *J. Luminescence* 10, 381. The pH Dependence of Fluorescein Fluorescence.

McGlynn, S. P., Azumi, T. & Kinoshita, M. (1969). *Molecular Spectroscopy of the Triplet State*, Prentice-Hall.

McIntire, G. L. (1986). *Am. Lab.* 18, 173. Electrochemistry in Micelles.

McIntire, G. L. (1990). *Crit. Rev. Anal. Chem.* 21, 257. Micelles in Analytical Chemistry.

Mellinger, T. J. & Keeler, C. E. (1963). *Anal. Chem.* 35, 554. Spectrofluorometric Identification of Phenothiazine Drugs.

Mellinger, T. J. & Keeler, C. E. (1964). *Anal. Chem.* 36, 1840. Factors Influencing Spectrofluorometry of Phenothiazine Drugs.

Menger, F. M. (1979). *Acc. Chem. Res.* 12, 111. On the Structure of Micelles.

Miyamoto, S. (1960). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 33, 371. The Effect of Metallic Ions on Surface Chemical Phenomena. III. Solubility of Various Metal Dodecyl Sulfates in Water.

Mori, I., Fujita, Y., Fujita, K., Kitano, S., Kawabe, H., Koshiyama, Y., Tanaka, T., Miyawaki, S., Nagao, Y. & Nagai, K. (1985). *Chem. Pharm. Bull.* 10, 4629. Determination of Penicillins with Mercurochrome.

Mori, I., Fujita, Y., Ikuta, K., Kitano, S., Kawabe, H., Nakahashi, Y., Kato, K. e Inamori, Y. (1989). *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1827. Determination of β -Lactam Antibiotics in Water by Fluorescence Quenching of Mercurochrome, and Application for Simple Investigation of Potency.

Mukerjee, P. (1979). *Solution Chemistry of Surfactants*. (Mittal, K. L. Ed.), Plenum Press.

Mukerjee, P. e Mysels, K. (1955). *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2937. A Re-evaluation of the Spectral Change Method of Determining Critical Micelle Concentration.

Pandya, M. L. e Machwe, M. K. (1977). *Curr. Sci.* 46, 254. Effect of Concentration on the Fluorescence of Mercurochrom.

Parker, R. T., Freeland, R. S., Schulman, E. M. e Bruce Dunlap, R. (1979). *Anal. Chem.* 51, 1921. Room-Temperature Phosphorescence of Selected Pteridines.

Parker, C. A. e Hatchard, C. G. (1961). *Trans. Faraday Soc.* 57, 1994. Triplet-Singlet Emission in Fluid Solutions. Phosphorescence of Eosin.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M. e Kriz, G. S. Jr. (1982). *Introduction to Organic Laboratory Techniques*. 2^a ed., CBS College Publishing

Paynter, R. A., Wellons, S. L. e Winefordner, J. D. (1974). *Anal. Chem.* 46, 736. New Method of Analysis Based on Room-Temperature Phosphorescence.

Pelizzetti, E. e Pramauro, E. (1985). *Anal. Chim. Acta* 169, 1. Analytical Applications of Organized Molecular Assemblies.

Rabek, J. F. (1982). *Experimental Methods in Photochemistry and Photophysics*, 1^a ed., John Wiley & Sons:

Ragland, J. B. e Kinross-Wright, V. J. (1964). *Anal. Chem.* 36, 1356. Spectrofluorometric Measurement of Phenothiazines.

Rohatgi, K. K. (1968). *J. Mol. Spectry.* 27, 545. Absorption Spectra of the Dimers of Ionic Dyes.

Roth, M. (1967). *J. Chromatography* 30, 276. Phosphorescence à Température Ordinaire: Un Moyen Sélectif et non Destructif pour la Détection de Certains Composés Aromatiques en Chromatographie sur Papier et sur Couche de Cellulose.

Rujimethabhas, M. e Wilairat, P. (1978). *J. Chem. Ed.* 55, 342. Determination of Critical Micelle Concentration Using Acridine Orange Dye Probe.

- Sanz-Medel, A., Martinez-Garcia, P. L. e Diaz-Garcia, M. E. (1987). *Anal. Chem.* 59, 774. Micelle-Stabilized Room-Temperature Liquid Phosphorimetry of Metal Chelates and its Applications to Niobium Determination
- Sato, H., Kawasaki, M. e Kasatani, K. (1981). *J. Photochem.* 17, 243. Fluorescence and Energy Transfer of Dye-Detergent Systems in the Premicellar Region.
- Schmidt, G. C. (1896). *Ann. Physik (Leipzig)* 58, 103. Beiträge zur Kenntniss der Fluoreszenz.
- Schulman, E. M. e Parker, R. T. (1977). *J. Phys. Chem.* 81, 1932. Room-Temperature Phosphorescence of Organic Compounds. The Effects of Moisture, Oxygen and the Nature of the Support-Phosphor Interactions.
- Schulman, E. M. e Walling, C. (1972). *Science* 178, 53. Phosphorescence of Adsorbed Ionic Organic Molecules at Room-Temperature.
- Schulman, E. M. e Walling, C. (1973). *J. Phys. Chem.* 77, 902. Triplet-State Phosphorescence of Adsorbed Ionic Organic Molecules at Room-Temperature.
- Shinoda, K., Nakagawa, T., Tamamushi, B. I. e Isemura, T. (1969). *Colloidal Surfactants*, 2^a ed., Academic Press.
- Singh, H. N. e Hinze, W. L. (1982). *Anal. Lett.* 15, 221. Micellar Enhanced Spectrofluorometric Methods. Application to the Determination of Pyrene.
- Skrilec, M. e Cline-Love, L. J. (1980). *Anal. Chem.* 52, 1559. Room-Temperature Phosphorescence Characteristics of Substituted Arenes in Aqueous Thallium Lauryl Sulfate Micelles.
- Su, S. Y. e Winefordner, J. D. (1982). *Microchem. J.* 27, 151. New Substrate for RTP-inorganic Compounds Plate.
- Tonegutti, C. A. (1990). *Transferência de Fase de m-Alcoxifenóis da Água para Carvão Ativo e Micelas de CTAB*. Tese de Mestrado, Unicamp.
- Turro, N. J., Grätzel, M. e Braun, A. M. (1980). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19, 675. Photophysical and Photochemical Process in Micellar Systems.
- Udenfriend, S. (1969). *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Vol. 2, Academic Press.
- Vo-Dinh, T. (1984). *Room-Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*. Chemical Analysis, Vol. 68, 1^a ed., John Wiley & Sons.
- Vo-Dinh, T., Lue-Yen, E. e Winefordner, J. D. (1976). *Anal. Chem.* 48, 1187. Heavy-Atom Effect on Room-Temperature Phosphorimetry.
- Vo-Dinh, T., Lue Yen, E. e Winefordner, J. D. (1977). *Talanta* 24, 146. Room-Temperature Phosphorescence of Several Polyaromatic Hydrocarbons.

Vo-Dinh, T., Walden, G. L. e Winefordner, J. D. (1977). *Anal. Chem.* 49, 1126. Instrument for the Facilitation of Room-Temperature Phosphorimetry with a Continuous Filter Paper Device.

Vo-Dinh, T. e Winefordner, J. D. (1977). *Appl. Spectrosc. Rev.* 13, 261. Room-Temperature Phosphorimetry as a New Spectrochemical Method of Analysis.

Vogel A. I. (1979) *Química Analítica Qualitativa*. 2ª ed, Mestre Jou.

Von Wandruszka, R. M. A. e Hurtubise, R. J. (1976). *Anal. Chem.* 48, 1784. Determination of p-Aminobenzoic Acid by Room-Temperature Solid Surface Phosphorescence.

Von Wandruszka, R. M. A. e Hurtubise, R. J. (1977). *Anal. Chem.* 49, 2164. Room-Temperature Phosphorescence of Compounds Adsorbed on Sodium Acetate.

Ward, J. L., Lue Yen-Bower, E. e Winefordner, J. D. (1981). *Talanta* 28, 119. The Use of Rinsing and Heating of Filter Paper in an Attempt to Reduce Phosphorescence Background at Room-Temperature.

Ward, J. L., Walden, G. L. e Winefordner, J. D. (1981). *Talanta* 28, 201. A Review of Recent Uses of Phosphorimetry for Organic Analysis.

Wehry, E. L. (1976). *Modern Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press.

Wellons, S. L., Paynter, R. A. e Winefordner, J. D. (1974). *Spectrochim. Acta* 30, 2133. Room-Temperature Phosphorimetry of Biologically-Important Compounds Adsorbed on Filter Paper.

Wiedman, E. (1888). *Ann. Physik (Leipzig)*. 34, 446. Über Fluorescenz und Phosphorescenz. I. Abhandlung.

White, E. C. (1920). *J. Am. Chem. Soc.* 42, 2355. Mercury Derivatives of Phthaleins.

Zanker, V. (1952). *Z. Phys. Chem.* 199, 225. Über den Nachweis Definierter Reversibler Assoziate (reversible Polymerisate) des Acridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung.

Zograf, G., Auslander, D. E. e Lytell, P. E. (1964). *J. Pharm. Sci.* 53, 573. Interfacial Properties of Phenothiazine Derivatives.