



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METAIS PESADOS EM ÁGUAS EMPREGANDO SENSORES FLUORIMÉTRICOS E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

TESE DE DOUTORADO

SILVIA CRISTINA LOPES PINHEIRO

ORIENTADOR: PROF. DR. IVO MILTON RAIMUNDO JR.

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARÍA-CRUZ MORENO-BONDI

CAMPINAS, NOVEMBRO DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

P655d Pinheiro, Silvia Cristina Lopes.
Determinação simultânea de metais pesados em águas empregando sensores fluorimétricos e calibração multivariada / Silvia Cristina Lopes Pinheiro. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior.
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria-Cruz Moreno-Bondi.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Sensores fluorimétricos. 2. Reagentes luminescentes. 3. Metais pesados. 4. Determinação simultânea. I. Raimundo Júnior, Ivo Milton. II. Moreno-Bondi, Maria-Cruz. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Simultaneous determination of heavy metals in waters employing fluorimetric sensors and multivariate calibration

Palavras-chaves em inglês: Fluorimetric sensors, Luminescent reagents, Heavy metals, Simultaneous determination

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior (orientador), Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho (DQ-UFSCar), Prof. Dr. Fabio Rodrigo Piovezani Rocha (CENA-USP), Profa. Dra. Solange Cadore (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Ítalo Odone Mazali (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 12/11/2010

Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza, e, no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.

JOHANN JOACHIM BECHER, PHYSICA SUBTERRANEA (1667)

*Aos meus pais, Madalena e José e
à minha irmã, Tânia
dedico o resultado
de anos de trabalho.*

AGRADECIMENTOS

★ Ao Prof. Dr. Ivo M. Raimundo Jr. que me apresentou aos sensores químicos de fibras ópticas no início da minha carreira acadêmica. Muito obrigada pelo conhecimento, paciência e dedicação durante todos estes anos. Obrigada pela orientação, compreensão, amizade e pela oportunidade que me foi dada durante estes anos.

★ À Prof^a. Dr^a. María-Cruz Moreno-Bondi por receber-me em seu grupo de pesquisa (*GSOLFA, Grupo de Sensores Optoquímicos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada*) na Universidad Complutense de Madrid durante a realização dos estágios de Doutorado. Obrigada pela orientação, dedicação e ajuda nos momentos dentro e fora do laboratório e pelos ensinamentos adquiridos durante os 16 meses. (¡Muchas gracias!, Marí-Cruz).

★ Ao Prof. Dr. Guillermo Orellana, também do *GSOLFA*, pelos ensinamentos, dedicação e paciência durante a realização dos estágios (¡Muchas gracias, Guillermo!).

★ Ao Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder por todo o apoio e dicas durante sua visita na UCM, pela amizade e pelos momentos divertidos no laboratório durante todos estes anos.

★ Ao Prof. Dr. Célio Pasquini, pelo apoio e ajuda no GIA.

★ À Prof^a. Dr^a. Claudete Fernandes Pereira, por receber-me com empenho e dedicação em seu grupo de pesquisa durante a realização da missão de estudos na Universidade Federal da Paraíba.

- ★ Ao Prof. Dr. Mário César Ugulino Araújo, pelos ensinamentos de Quimiometria durante a missão na Universidade Federal da Paraíba e por todo o apoio nos cálculos quimiométricos deste trabalho.
- ★ Ao Prof. Dr. Roberto Kawakami Harrop Galvão, pelos ensinamentos e dedicação durante a missão realizada no Instituto Tecnológico de Aeronáutica.
- ★ À Claudia Martelli, por todo o apoio, ensinamentos e amizade durante a realização dos experimentos no Instituto de Química / Unicamp.
- ★ Ao Dr. Javier Lucas, pela ajuda na preparação das fases sensoras, pelas dicas, ensinamentos e momentos divertidos em Madrid (¡Gracias, Javi!).
- ★ À Dra. Ana Belém Descalzo, pela síntese do ligante bpySOMA para desenvolver o sensor seletivo para Cu(II) (¡Gracias, Ana!).
- ★ Ao Sr. Fontana, ex-funcionário do Instituto de Química / Unicamp, pela dedicação em seu trabalho e principalmente pela amizade, conversas e visitas agradáveis.
- ★ Ao Mário (Mecânica Fina), por sempre atender aos pedidos de maneira eficaz e rápida e pela perfeição no desenvolvimento das celas e peças solicitadas.
- ★ À Fabiana, por gentilmente pesar os reagentes luminescentes no IQ/Unicamp.
- ★ Aos colegas do GIA/LQA, Juliana, Lívia, Klécia, Matheus, Glauciene, Cassiana, Carol, Mário, Laiane, Benedito e Gilze, pela amizade, ajuda nos experimentos e momentos agradáveis durante todos esses anos.

★ Aos colegas do GIA/LQA que já não estão mais presentes: Karime, Alexandre, Flávia, Nívea e Amanda.

★ Aos colegas do GSOLFA, Siuuuvia, Javi, Elena (la Gallega), Jolanta, Sofia, Clara, Mónica, Erika, Ana, Nuria, Sonia, Irene, André, Juan, Paco, David, Manoel, Chen, Ruimán e Aurelien, pela amizade, ajuda nos experimentos e momentos divertidos em Madrid.

★ Ao Adamastor, aluno da Universidade Federal da Paraíba, pela preciosa ajuda no tratamento dos dados durante a missão de estudos.

★ À Mirla, aluna da Prof^a. Dr^a. Solange Cadore, por gentilmente auxiliar nas análises das amostras de Cu(II) por FASS, no IQ/Unicamp.

★ À minha querida amiga Mariana Ribeiro, por me aturar durante tanto tempo, por sempre me apoiar e acreditar que um dia eu terminaria esse trabalho. Pela amizade à distância, conversas através de cartas, pela inesquecível visita em Madrid, por sempre dizer exatamente o que eu precisava ouvir nos momentos difíceis e por me acompanhar nos momentos felizes.

★ Ao meu amigo Adriano Andreghetto, pra não ficar com ciúmes da dedicatória para a Rib. Obrigada por me apoiar e me incentivar durante esses anos.

★ À minha grande amiga Siuuuvia Mateos García, pela amizade e por tornar os momentos difíceis em Madrid menos dolorosos. Obrigada pelos ensinamentos em espanhol (principalmente daquelas palavras que não existem no dicionário), conversas, passeios, viagens e aventuras inesquecíveis (¡Gracias, Siuuuvia!).

- ★ À minha amiga Mariela Reyes, que apareceu em uma fila na minha vida, mas que mesmo à distância sabe dizer-me palavras de encorajamento e força.

- ★ Aos meus amigos bozós: Aline, Thais, Sara, Humberto, André e Cocadinha, companheiros de Graduação, que me ensinaram a rir de mim mesma (e deles, claro!) e que participam de momentos da minha vida com picos de audiência.

- ★ À minha querida irmã, Ká, que apesar dos desentendimentos de sempre, acredita em mim e em tudo o que faço. Obrigada pelo apoio sempre!

- ★ Ao meu querido pai, José, que sempre fez o melhor para a minha educação. Obrigada pelo apoio e pelas broncas de sempre!

- ★ À minha querida mãe, Madalena, que mesmo sem entender muito bem o que eu faço e com seu amor incondicional, ensinou-me os maiores valores da vida e sempre apoiou minhas decisões, mesmo não concordando com elas.

- ★ Ao Papai do Céu, por sempre iluminar meu caminho!

- ★ À FAPESP (05/04258-6), CAPES/MECD–DGU (125/06), CAPES/PROCAD e Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA, processos CNPq 573894/2008-6 e FAPESP 2008/57808-1) e CNPq/Universal 476749/2008-5, pelo apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

Formação Acadêmica

- 2005 – 2010 **Doutorado em Ciências**
Universidade Estadual de Campinas
Determinação simultânea de metais pesados em águas empregando sensores fluorimétricos e calibração multivariada
- 2004 – 2005 **Mestrado em Química Analítica**
Universidade Estadual de Campinas
Avaliação do complexo $Pd_2(dppm)_2Cl_2$ no desenvolvimento de um sensor óptico para a determinação de monóxido de carbono
- 2000 – 2003 **Graduação em Bacharelado em Química**
Universidade Estadual de Campinas

Formação complementar

- 2009 – 2009 Universidad Complutense de Madrid
Estágio de Doutorado em Química Analítica (08/2009 – 12/2009)
- 2009 – 2009 Universidade Federal da Paraíba
Estágio de Doutorado em Química Analítica (01/2009 – 02/2009)
- 2006 – 2007 Universidad Complutense de Madrid
Estágio de Doutorado em Química Analítica (10/2006 – 09/2007)

Atividades acadêmicas

Programa de Estágio Docente (2004, 2008 e 2009)
Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas

Workshop “Materiais para Sensores Químicos e Processos Ambientais” – Seminário:
“Sensores Fluorimétricos a base de sol-gel para a determinação simultânea de metais pesados em águas”, IQ/Unicamp, 06/08/2009.

Curso “Advanced Study Course on Optical Chemical Sensors and Biosensors”,
Universidad Complutense de Madrid, 26/08/09 – 03/09/09.

IV Workshop do Projeto CAPES-PROCAD: “Instrumentação e Metodologias Espectroanalíticas” – Seminário: “*Determinação simultânea de metais pesados em águas empregando sensores ópticos e calibração multivariada*”, Recife, 02–05/02/2010.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr., I.M.; Moreno-Bondi, M.C.; Orellana, G.; “Simultaneous determination of copper, mercury and zinc in water with a tailored fluorescent bipyridine ligand entrapped in silica sol-gel” *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 398, 3127-3138.
2. Sussulini, A.; Lima A.G.; Figueiredo, E.C.; Fernandes, H.L.; Pinheiro, S.C.L.; Bueno, I.M.S.; Pereira, F.M.V.; “X-ray scattering information of ED-XRF technique for powdered fruit juice mixes” *X-Ray Spectrometry* **2009**, 38, 254–257.
3. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr. I.M.; “Uso de membranas de Nafion para a construção de sensores ópticos para medidas de pH” *Química Nova*, **2005**, 28, 932–936.

Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais

1. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr. I.M.; Moreno-Bondi, M.C.; Orellana, G., Descalzo, A.B.; “*Evaluation of fluorescent reagents for simultaneous determination of heavy metals in waters*”, X Europt(r)ode, 2010, Praga, Livro de Resumos, P–115.
2. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr. I.M.; Moreno-Bondi, M.C.; Orellana, G.; “*Caracterização do ligante bpySOH para sua aplicação na determinação simultânea de metais pesados em águas*”, 31^a Reunião Anual da SBQ, 2008, Águas de Lindóia, Livro de Resumos, QA–044.
3. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr., I.M.; Alves, O.L.; Gimenez, I.F.; “*Caracterização de fase sensora baseada no complexo Pd₂(dppm)₂Cl₂ imobilizado em membranas de PVC para monitorar CO em ar*”, 28^a Reunião Anual da SBQ, 2005, Poços de Caldas, Livro de Resumos, QA–185.
4. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr., I.M.; “*Desenvolvimento de um sensor óptico para a determinação de monóxido de carbono*”, XII Congresso Interno de Iniciação Científica, 2004, Campinas, Livro de Resumos, p.121.

5. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr., I.M.; Gushiken, Y.; Castellani, A.M.; *“Desenvolvimento de um sensor óptico para a determinação de umidade relativa em ar”*, 27^a Reunião Anual da SBQ, 2004, Salvador, Livro de Resumos, QA055.
6. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr., I.M.; *“Desenvolvimento de membranas de Nafion para a construção de optodos para medidas de pH”*, 26^a Reunião Anual da SBQ, 2003, Poços de Caldas, Livro de Resumos, QA001.
7. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr., I.M.; *“Desenvolvimento de um sensor óptico para a determinação de umidade relativa em ar”*, XI Congresso Interno de Iniciação Científica, 2003, Campinas, Livro de Resumos, p.91.
8. Pinheiro, S.C.L.; Raimundo Jr., I.M.; *“Desenvolvimento de membranas de Nafion para a construção de sensores químicos de fibras ópticas para medidas de pH”*, X Congresso Interno de Iniciação Científica, 2002, Campinas, Livro de Resumos, p.96.

Cursos

Segurança em Laboratório Químico – Conselho Regional de Química 4^a Região – 2008.

Gestão da Qualidade em Laboratório – Conselho Regional de Química 4^a Região – 2008.

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METAIS PESADOS EM ÁGUAS EMPREGANDO SENSORES FLUORIMÉTRICOS E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

O objetivo deste trabalho foi desenvolver sensores fluorimétricos empregando os reagentes luminescentes ZOx (2-piridin-2-il-benzooxazol), $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ (complexo de Ru(II), onde s2d: 1,10-fenantrolina-4,7-di-il) bis(benzenossulfonato e bim: 2,2'-biimidazol) bpySOH (4-[2-(4'-metil-[2,2'] bipiridil-4-il)-vinil]-fenol) e bpySOMA (2-metileno ácido butírico-4-[2-(4'-metil-[2,2'] bipiridil-4-il)-vinil]-fenil éster) para a determinação simultânea de metais pesados em águas. Os fluoróforos ZOx e $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ não forneceram resultados satisfatórios uma vez que sofreram lixiviação das matrizes (sol-gel) nas quais estavam imobilizados. Por outro lado, o reagente bpySOH e seu derivado bpySOMA forneceram bons resultados na caracterização em solução assim como na forma imobilizada. Estudos espectrofotométricos em solução com o bpySOH demonstraram estequiometrias de complexação ligante:metal de 1:1 para Cd(II), Ni(II) e Zn(II) e de 2:1 para Cu(II) e Hg(II). As constantes de estabilidade calculadas através de dados espectrofotométricos indicaram que os complexos de Cu(II), Hg(II) e Zn(II) são os mais estáveis. Estudos mostraram que Cu(II), Ni(II) e Zn(II) desativam a emissão do ligante, enquanto Hg(II) e Cd(II) incrementam essa propriedade. Experimentos de tempo de vida demonstraram um mecanismo de supressão estática da fluorescência para todos os complexos. Como estratégia de imobilização do ligante, avaliou-se uma matriz sol-gel (a partir do precursor TMOS). Imobilizado, o ligante mostrou resposta reversível para Cu(II), Hg(II) e Zn(II). O intervalo de resposta obtido para os íons metálicos foi de 2,50–30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A determinação simultânea em misturas contendo 2 ou 3 íons foi realizada utilizando Regressão por Mínimos Quadrados Parciais. Os modelos de calibração multivariada apresentaram resultados de previsão satisfatórios com valores de RMSEP inferiores a 3,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O derivado bpySOMA, por sua vez, apresentou comportamento semelhante em termos de valores de estequiometrias de complexação e constantes de estabilidade. Para imobilizá-lo, empregou-se um MIP seletivo para Cu(II). Estudos indicaram a seletividade para este metal frente a Cd(II), Hg(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II). Uma faixa de resposta foi obtida no intervalo de 0,1–6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O sensor foi aplicado à determinação de Cu(II) em águas de torneira fortificadas com o metal. Os resultados obtidos, quando comparados com um método de referência (FAAS) indicaram a aplicabilidade do sensor e que o mesmo apresenta potencialidade para trabalhos futuros.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HEAVY METALS IN WATER EMPLOYING FLUORIMETRIC SENSORS AND MULTIVARIATE CALIBRATION

This thesis is aimed at developing fluorimetric sensors employing luminescent reagents ZOX (2-pyridin-2-yl-benzooxazole), $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ (Ru complex, where s2d: 1,10-phenanthroline-4,7-diyl)bis(benzenesulfonate) and bim: 2,2'-biimidazole), bpySOH (4-[2-(4'-methyl-[2,2']bipyridinyl-4-yl)-vinyl]-phenol) and bpySOMA (2-methylene-butyric acid 4-[2-(4'-methyl-[2,2']bipyridinyl-4-yl)-vinyl]-phenyl ester) for the simultaneous determination of heavy metals in waters. The fluorophores ZOX and $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ did not provide satisfactory results, being leached out from the matrix in which they were immobilized. On the other hand, bpySOH and its derivative bpySOMA provided good results in solution as well as after immobilization. Spectrophotometric studies of bpySOH in solution showed stoichiometries ligand:metal of 1:1 for Cd(II), Ni(II) and Zn(II) while 2:1 ratio was obtained for Cu(II) and Hg(II). Stability constants calculated from spectrophotometric data indicated that Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes are the most stable. In addition, it was observed that Cu(II), Ni(II) and Zn(II) quench the fluorescence of the ligand, while Hg(II) and Cd(II) enhance this property. Lifetime studies demonstrated a static mechanism of quenching of fluorescence for all complexes. The ligand was immobilized in a sol-gel matrix (obtained from TMOS precursor), which presented reversible response for Cu(II), Hg(II) and Zn(II). The response range for the metal ions was 2.50–30.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Simultaneous determinations of mixtures containing 2 or 3 ions were performed using the Partial Least Square method. Multivariate calibration models showed satisfactory prediction results, with RMSEP values lower than 3.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The derivative ligand bpySOMA showed similar results in terms of complexation stoichiometries and stability constant values. It was immobilized as a molecularly imprinted polymer selective to Cu(II), confirmed by the response of the non-imprinted polymer for Cd(II), Hg(II), Ni(II), Pb(II) and Zn(II) ions. A response range of 0.1–6.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ was obtained. The sensor was applied to the determination of Cu(II) in tap water and the results agreed with those obtained by Flame Atomic Absorption Spectrometry.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	xxv
----------------------------	-----

Lista de Tabelas.....	xxvi
-----------------------	------

Lista de Figuras.....	xxxi
-----------------------	------

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1.1. Introdução.....	1
1.1.1. Metais Pesados.....	1
1.1.2. Sensores Ópticos para a Determinação de Metais em Águas.....	3
1.1.3. Métodos Quimiométricos de Calibração Multivariada Empregados na Determinação Simultânea de Cátions de Metais Pesados.....	5
1.1.4. Espectroscopia de Luminescência.....	8
1.2. Objetivos.....	14

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1. Reagentes Luminescentes.....	17
2.2. Reagentes de Grau Analítico.....	17
2.3. Soluções de Cátions Metálicos.....	20
2.4. Soluções Tampão.....	20
2.5. Equipamentos.....	21
2.6. Sistema de Medidas.....	21
2.7. Célula de fluxo.....	22

Capítulo 3

Avaliação dos reagentes luminescentes ZOX, $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{bim})]^{2-}$ e bpySOH

3.1. Introdução.....	27
3.1.1. Tecnologia Sol-Gel Para Imobilização de Reagentes.....	27
3.2. Avaliação do Reagente Luminescente ZOX.....	30
3.2.1. Caracterização do ligante em meio orgânico.....	30
3.2.2. Técnicas de imobilização empregadas.....	31
3.3. Avaliação do Reagente Luminescente $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{bim})]^{2-}$	36
3.3.1. Características de Complexos de Rutênio.....	36
3.3.2. Caracterização do ligante em solução.....	37
3.3.3. Estudos com íons Cu(II).....	37
3.3.4. Técnicas de Imobilização Empregadas.....	39
3.3.4.1. Sol-Gel.....	39
3.3.4.2. Filmes de Metacrilato.....	52
3.3.4.3. Membranas Comerciais Immobilon.....	54
3.4. Avaliação do Reagente Luminescente bpySOH.....	56
3.4.1. Caracterização do Ligante em Metanol.....	56
3.4.2. Avaliação Das Interações bpySOH–Metais em Metanol.....	59
3.4.2.1. Seletividade frente a Metais Pesados.....	59
3.4.2.2. Cálculos das Estequiometrias de Complexação.....	62
3.4.2.3. Cálculo das constantes de estabilidade.....	67
3.4.2.4. Determinação do Tempo de vida dos complexos metálicos.....	68
3.4.3. Caracterização do Ligante em Meio Aquoso.....	69
3.4.4. Avaliação das interações bpySOH–metais em meio aquoso.....	72
3.4.5. Avaliação De Uma Fase Sensora Baseada Em Sol-Gel.....	77
3.4.5.1. Condições Experimentais.....	78
3.4.5.2. Comportamento do Sol-Gel em Diferentes Valores de pH.....	79
3.4.5.3. Regeneração do Sinal Analítico da Fase Sensora.....	83
3.4.5.4. Resposta da Fase Sensora Frente a Metais Pesados.....	83
3.4.5.5. Tempo de Resposta ($t_{90\%}$).....	81
3.4.6. Determinação simultânea de metais pesados.....	93
3.4.6.1. Aspectos Gerais.....	93
3.4.6.2. Estratégia 1.....	93

3.4.6.3. Estratégia 2.....	98
3.4.6.4. Determinação simultânea de metais pesados em amostras de águas minerais.....	108
3.4.7. Considerações finais.....	109

Capítulo 4

Avaliação do reagente luminescente SOMA

4.1. Introdução.....	113
4.1.1. Polímeros de Impressão Molecular, MIP.....	113
4.2. Síntese e Caracterização do Reagente Luminescente bpySOMA	117
4.3. Caracterização do Reagente Luminescente em Solução.....	120
4.4. Avaliação Das Interações bpySOMA–Metais em Metanol.....	124
4.4.1. Cálculo das Constantes de Estabilidade dos Complexos.....	127
4.5. Técnica de Imobilização Empregada.....	130
4.5.1. Avaliação do MIP e do NIP.....	131
4.5.2. Resposta do MIP e do NIP para Cu(II).....	137
4.5.3. Seletividade Frente a Metais Pesados.....	141
4.5.4. Aplicação do MIP na Determinação de Cu(II) em Amostra de Água de Torneira.....	142

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

5.1 Conclusões.....	147
5.2 Perspectivas.....	148

Capítulo 6

Referências Bibliográficas.....	149
---------------------------------	-----

Apêndice I.....	157
-----------------	-----

Apêndice II.....	169
------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABDV: 2,2'-azobis-2,4-dimethyl- valeronitrilo

ACN: Acetonitrila

AIBN: Azobisisobutironitrilo

AMH: 3-(acrilololoxi)-2- metacrilato de hidroxipropila

APS: Algoritmo de Projeções Sucessivas

APTEOS: Amino-propil-trietil ortosilicato

bpySOH: 4-[2-(4'-metil-[2,2'] bipiridil-4-il)-vinil]-fenol

bpySOMA: (2-metileno ácido butírico-4-[2-(4'-metil-[2,2'] bipiridil-4-il)-vinil]-fenil éster)

DCM: Diclorometano

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Sal dissódico de etilenodiamino tetra-acético

ESI: Electrospray ionization

Et₃N: Trietilamina

EtOH: etanol

GSOLFA: Grupo de Sensores Optoquímicos e Laboratório de Fotoquímica Aplicada

¹H-RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Próton

HEMA: 2-hidroxietilmetacrilato

J: Constante de acoplamento

K: Constante de estabilidade

λ : Comprimento de onda

MAA: Ácido metacrílico

MBAA: N-N'-metilenbisacrilamida

MCA: Metacrilamida

MeOH: metanol

MIP: polímero de impressão molecular

MTMOS: Metil-trimetil ortosilicato

MTriEOS: Metiltrietoxissilano

n-propil-TriMOS: n-propiltrimetoxissilano

PCA: Análise de Componentes Principais

PFM: Polifluoroalquilmetacrilato

PLS: Mínimos Quadrados Parciais

PVC: Cloreto de polivinila

RMSEP: Erro Médio Quadrado de Previsão

[Ru(s2d)₂(bim)]²⁺: complexo de Ru(II), onde s2d: 1,10-fenantrolina-4,7-di-il)
bis(benzenosulfonato e bim: 2,2'-biimidazol.

τ : Tempo de vida

t_{90%}: tempo de resposta para 90% do sinal analítico

TEOS: Tetraortossilicato

TFP-TriMOS: 3,3,3-Trifluoropropil-trimethoxi silano

THF: Tetrahidrofurano

TMOS: Tetrametil orto-silicato

u.a.: unidades arbitrárias

UCM: Universidad Complutense de Madrid

ZOX: (2-piridin-2-il-benzooxazol)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Padrão de potabilidade para íons metálicos que representam risco à saúde humana.	2
Tabela 1.2. Padrão de aceitação para o consumo humano.	3
Tabela 3.1. Composição da membrana de PVC avaliada na imobilização do ligante ZOX.	31
Tabela 3.2. Composições das formulações de sol-gel baseadas em MTMOS, TMOS e APTEOS.	43
Tabela 3.3. Composições das formulações de sol-gel baseadas em MTMOS, TMOS, TEOS e APTEOS.	42
Tabela 3.4. Volumes utilizados de MTMOS, TMOS, TEOS e APTEOS na preparação das composições H, L e N.	44
Tabela 3.5. Composições dos materiais ormosil preparados para a imobilização do reagente $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{bim})]^{2-}$	51
Tabela 3.6. Composições das membranas de metacrilato preparadas para a imobilização do $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{bim})]^{2-}$	53
Tabela 3.7. Valores de τ para soluções de bpySOH de diferentes concentrações.	58
Tabela 3.8. Valores de estequiometria de complexação calculados para os complexos metálicos formados com bpySOH.	67
Tabela 3.9. Valores de constante de estabilidade dos complexos metálicos em metanol. ($[\text{bpySOH}] = 3,05 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	68

Tabela 3.10. Valores de tempo de vida de fluorescência de bpySOH na presença de diferentes concentrações de metais.	69
Tabela 3.11. Valores de tempo de vida para soluções de bpySOH em tampão fosfato 20 mmol L ⁻¹ de diferentes valores de pH.	71
Tabela 3.12. Condições empregadas no espectrofluorímetro Cary-Eclipse.	79
Tabela 3.13. Tempos de bombeamento das espécies mencionadas para a determinação de metais pesados.	84
Tabela 3.14. Parâmetros empregados nas duas estratégias avaliadas para a determinação simultânea de metais pesados em águas empregando o sol-gel e técnicas de calibração multivariada.	98
Tabela 3.15. Valores previstos e esperados para as concentrações de Cu(II) na mistura Cu(II)–Hg(II).	101
Tabela 3.16. Valores previstos e esperados para as concentrações de Hg(II) na mistura Cu(II)–Hg(II).	102
Tabela 3.17. Valores previstos e esperados para as concentrações de Cu(II) na mistura Cu(II)–Zn(II).	103
Tabela 3.18. Valores previstos e esperados para as concentrações de Zn(II) na mistura Cu(II)–Zn(II).	104
Tabela 3.19. Valores previstos e esperados para as concentrações de Hg(II) na mistura Hg(II)–Zn(II).	105
Tabela 3.20. Valores medidos e previstos das concentrações de Zn(II) na mistura Hg(II)–Zn(II).	106
Tabela 3.21. Valores medidos e previstos das concentrações dos metais na mistura ternária.	107

Tabela 3.22. Valores medidos e previstos de Cu(II) e Hg(II) nas amostras de águas minerais naturais contaminadas com estes metais.108

Tabela 4.1. Valores de tempo de vida do estado excitado em função do pH para bpySOMA $3,53 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$123

Tabela 4.2. Constantes de estabilidade e estequiometrias dos complexos com o ligante bpySOMA.129

Tabela 4.3. Composição empregada para a síntese do MIP de bpySOMA e Cu(II).130

Tabela 4.4. Valores de concentração de Cu(II) obtidos com o emprego do sensor fluorimétrico e com FAAS para amostras de água de torneira fortificadas com o íon metálico.143

Tabela AI.1 Parâmetros empregados nas primeira estratégia avaliada para a determinação simultânea de metais pesados em águas empregando o sol-gel e técnicas de calibração multivariada.159

Tabela AI.2. Concentrações de Cu(II) e Hg(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura binária.160

Tabela AI.3. Concentrações de Cu(II) e Zn(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura binária.161

Tabela AI.4. Concentrações de Hg(II) e Zn(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura binária.162

Tabela AI.5. Concentrações de Cu(II), Hg(II) e Zn(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura ternária.163

Tabela AII.1. Parâmetros empregados na segunda estratégia avaliada para a determinação simultânea de metais pesados em águas empregando o sol-gel e técnicas de calibração multivariada.171

Tabela AII.2. Concentrações de Cu(II) e Hg(II) em cada amostra desta mistura.172

Tabela AII.3. Concentrações de Cu(II) e Zn(II) em cada amostra desta mistura.173

Tabela AII.4. Concentrações de Hg(II) e Zn(II) em cada amostra desta mistura.174

Tabela AII.5. Concentrações de cada metal nas amostras da mistura ternária.175

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Diferentes propriedades originadas da interação entre luz e matéria.	8
Figura 1.2. Possíveis processos de relaxação de moléculas excitadas.	9
Figura 1.3. Diagrama de Jablonski simplificado ilustrado os principais fenômenos de absorção e emissão de energia.	10
Figura 1.4. Parâmetros que influenciam a emissão de fluorescência.	10
Figura 1.5. Diagrama de Jablonski representando o tempo de vida de um fluoróforo.....	13
Figura 2.1. Esquema do sistema de medidas.	22
Figura 2.2. Esquema da célula de fluxo Hellma 176.52 empregada no empacotamento de sol-gel.	22
Figura 3.1. Representação esquemática das etapas de um processo sol-gel.	28
Figura 3.2. Estrutura molecular do reagente luminescente ZOX.	30
Figura 3.3. Espectros de emissão de sol-gel na presença de diferentes metais.	33
Figura 3.4. Espectros de emissão do sol-gel para Cd(II) $1,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	34
Figura 3.5. Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$, onde o grupo s2d corresponde a (1,10-fenantrolina-4,7-di-il)bis(benzenosulfonato) e bim: 2,2'-biimidazol.	36
Figura 3.6. Espectros de intensidade de emissão de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $2,59 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de Cu(II).	38

Figura 3.7. Espectros de excitação e emissão de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ imobilizado.	41
Figura 3.8. Intensidades de emissão em função do tempo para a resposta de $\text{Cu}(\text{II})$ em diferentes valores de pH.	42
Figura 3.9. Espectros de emissão dos sobrenadantes das composições H, L e M de sol-gel.	46
Figura 3.10. Intensidades de emissão em função do tempo para a resposta de $\text{Cu}(\text{II})$ em diferentes valores de pH.	47
Figura 3.11. Intensidades de emissão em função da força iônica da solução tampão pH 7,0 para a resposta para $\text{Cu}(\text{II})$	48
Figura 3.12. Estrutura do ligante bpySOH.	56
Figura 3.13. Espectros de absorção para diferentes concentrações de bpySOH em metanol.	57
Figura 3.14. Espectros de excitação e emissão para soluções de bpySOH em metanol.	57
Figura 3.15. Espectros de absorção de bpySOH na presença de metais pesados.	60
Figura 3.16. Espectros de emissão de bpySOH na presença de íons metálicos.	60
Figura 3.17. Espectros de absorção para soluções de bpySOH $3,51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ contendo incrementos crescentes de $\text{Cd}(\text{II})$	63
Figura 3.18. Espectros de absorção para soluções de bpySOH $3,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ contendo incrementos crescentes de $\text{Cu}(\text{II})$	64
Figura 3.19. Espectros de absorção para soluções contendo diferentes relações bpySOH/ $\text{Hg}(\text{II})$	65

Figura 3.20. Espectros de absorção para soluções contendo diferentes relações bpySOH/Ni(II).	66
Figura 3.21. Espectros de absorção para soluções contendo diferentes relações bpySOH/Ni(II).	66
Figura 3.22. Espectros de absorção de bpySOH $2,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH.	70
Figura 3.23. Espectros de emissão de bpySOH $2,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH.	70
Figura 3.24. Espectros de absorção e emissão para diferentes concentrações de Cd(II) em pH 7,0.	73
Figura 3.25. Espectros de absorção e emissão para diferentes concentrações de Cu(II) em pH 7,0.	73
Figura 3.26. Espectros de absorção e emissão para diferentes concentrações de Hg(II) em pH 7,0.	74
Figura 3.27. Espectros de absorção e emissão para diferentes concentrações de Ni(II) em pH 7,0.	75
Figura 3.28. Espectros de absorção e emissão para diferentes concentrações de Zn(II) em pH 7,0.	76
Figura 3.29. Variação da intensidade de emissão em função da concentração de metal.	77
Figura 3.30. Variação da intensidade de emissão do sol-gel em função do pH da solução.	80
Figura 3.31. Variação da intensidade de emissão em 515 nm em função do tempo de reação para Hg(II) $1,02 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	81

Figura 3.32. Espectros de excitação e emissão do bpySOH imobilizado no sol-gel medidos sob fluxo de solução tampão pH 5,0.	82
Figura 3.33. Curva de resposta para duas concentrações de Ni(II), indicando a irreversibilidade da fase sensora frente a este metal.	85
Figura 3.34. Curva de resposta da fase sensora frente a diferentes concentrações de Cu(II).	86
Figura 3.35. Respostas obtidas em função da concentração de Cu(II).	87
Figura 3.36. Curva de resposta para Hg(II).	88
Figura 3.37. Respostas obtidas em função da concentração de Hg(II).	88
Figura 3.38. Curva de resposta para as diferentes concentrações de Zn(II).	89
Figura 3.39. Respostas obtidas em função da concentração de Zn(II).	88
Figura 3.40. Respostas obtidas em função das concentrações de Cu(II), Hg(II) e Zn(II).	90
Figura 3.41. Intensidades de emissão normalizadas em função do tempo para Cu(II), Hg(II) e Zn(II).	92
Figura 3.42. Conjunto de espectros de emissão para os diferentes comprimentos de onda de emissão para a mistura Hg(II)–Zn(II) no intervalo de tempo de reação de 2–5 minutos.	95
Figura 3.43. Espectros de I_0/I obtidos para a mistura Cu(II)–Hg(II) no intervalo de tempo 0–10 minutos.	99
Figura 3.44. Espectros I_0/I para a amostra contendo $11,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) e $17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II).	100

Figura 3.45. Espectros I ₀ /I para a amostra contendo 10,7 μmol L ⁻¹ de Cu(II) e 2,67 μmol L ⁻¹ de Hg(II) obtidos com os parâmetros da estratégia 1.	100
Figura 4.1. Esquema geral do princípio da técnica de impressão molecular.	113
Figura 4.2. Esquema da reação de síntese da reagente luminescente bpySOMA.	117
Figura 4.3. Espectro de ¹ H-RMN do reagente luminescente bpySOMA.	118
Figura 4.4. Espectro MS do reagente luminescente bpySOMA.	119
Figura 4.5. Espectros de absorção e emissão de uma solução 3,53 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de bpySOMA em metanol.	120
Figura 4.6. Espectros de absorção de bpySOMA 2,02 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH.	121
Figura 4.7. Espectros de emissão de bpySOMA 2,02 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH.	122
Figura 4.8. Espectros de emissão do reagente bpySOMA 3,53 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ obtidos em diferentes solventes.	124
Figura 4.9. Espectros de absorção de bpySOMA na presença de distintos íons metálicos.	125
Figura 4.10. Espectros de emissão de bpySOMA na presença de diferentes metais pesados.	125
Figura 4.11. Espectros de absorção para o complexo Cu(II)—bpySOMA.	127
Figura 4.12. Espectros de absorção para o complexo H(II)—bpySOMA.	128
Figura 4.13. Espectros de absorção para o complexo Zn(II)—bpySOMA.	128

Figura 4.14. Fotografia dos materiais MIP e NIP para a imobilização do bpySOMA.	131
Figura 4.15. Espectros de emissão do MIP em solução tampão fosfato 0,01 mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH.	132
Figura 4.16. Variação da intensidade de emissão em diferentes valores de pH em função do tempo.	132
Figura 4.17. Espectros de excitação e emissão do MIP em solução tampão fosfato 0,01 mol L ⁻¹ pH 5,0.	133
Figura 4.18. Curva de resposta para Cu(II) 1,00 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ empregando soluções de HCl de diferentes concentrações para regenerar o sinal analítico da fase sensora.	134
Figura 4.19. Resposta da fase sensora para Cu(II) 1,00 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em soluções tampão fosfato de diferentes valores de pH.	135
Figura 4.20. Resposta da fase sensora para Cu(II) 1,00 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em soluções tampão fosfato pH 5,0 de diferentes valores de força iônica.	136
Figura 4.21. Curva analítica de resposta do MIP para diferentes concentrações (μmol L ⁻¹) de Cu(II):	137
Figura 4.22. Curva de razão de intensidades em função da concentração de Cu(II) obtida para o MIP.	138
Figura 4.23. Curva analítica de resposta do NIP para diferentes concentrações de Cu(II).	139
Figura 4.24. Curva de razão de intensidade em função da concentração de Cu(II) obtida para o NIP.	139
Figura 4.25. Comparação da resposta obtida para MIP e NIP na avaliação de diferentes concentrações de Cu(II).	140

Figura 4.26. Resposta do MIP e NIP para diferentes íons metálicos.	141
Figura AI.1. Desenho Doehlert para a construção do conjunto de amostras de calibração e previsão para as amostras da mistura Cu(II)–Zn(II).	164
Figura AI.2. Gráfico de variância residual <i>versus</i> número de variáveis latentes.	165
Figura AI.3. Modelo de calibração calculado através de PLS para a posterior previsão da concentração de Cu(II).	166
Figura AI.4. Previsão da concentração das amostras de Cu(II) na mistura Cu(II)–Zn(II).	167

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1. METAIS PESADOS

Os metais pesados surgem nas águas naturais devido aos lançamentos de efluentes industriais, tais como os gerados em indústrias extrativistas de metais, indústrias de tintas e pigmentos e, especialmente, as galvanoplastias, que se espalham em elevado número nas grandes cidades. Além destas, os metais pesados podem ainda estar presentes em efluentes de indústrias químicas, como as de formulação de compostos orgânicos e de elementos e compostos inorgânicos, indústrias de couros, peles e produtos similares, indústrias do ferro e de aço e indústria de petróleo (Moore & Ramamoorthy, 1984). A seguir, são apresentadas as principais características e algumas informações sobre os metais pesados avaliados neste trabalho.

Níquel é um metal maleável e dúctil que possui boa condutividade térmica e elétrica, força e dureza moderadas. Muito embora possa apresentar estados de oxidação de 1– a 4+, os compostos de estado 2+ são os mais comumente encontrados. Uma média de ingestão diária de 200–300 μg é adequada para que seja eficiente em determinadas funções do metabolismo, embora quando administrado em doses excessivas pode causar risco à saúde (Moore & Ramamoorthy, 1984).

Cobre, que pertence à terceira série de metais de transição, exibe uma ampla variação em suas propriedades espectrais, magnéticas, capacidade de complexação e estados de oxidação, que resultam da sua subcamada d parcialmente preenchida. São conhecidos complexos de cobre nos estados de oxidação 1+, 2+ e 3+, sendo 2+ o mais comum. Os níveis de cobre solúvel em águas doces variam de 0,5 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, aumentando para $\geq 2 \mu\text{g L}^{-1}$ em áreas urbanas. É altamente tóxico para plantas aquáticas e peixes, com LC_{50} de 0,017 a 1,0 mg L^{-1} em condições normais (Moore & Ramamoorthy, 1984).

Zinco é um elemento do grupo 12 da classificação periódica dos elementos, juntamente com o cádmio e mercúrio. É essencial aos mamíferos,

desempenhando um papel vital na biosíntese de ácidos nucleicos e outros processos celulares, além de atuar no metabolismo de hormônios (*Moore & Ramamoorthy, 1984*).

Cádmio é o segundo membro do Grupo 12 (Zn, Cd, Hg) na classificação periódica dos elementos. Seu estado estável é 2+, apresenta coloração prateada e é dúctil. Possui caráter covalente moderado e elevada afinidade por grupos sulfidrilas, resultando em alta solubilidade em lipídeos, bioacumulação e toxicidade. Acumula-se no fígado e nos rins através de ligações fortes com resíduos de cisteína. Além disso, desloca o zinco em muitas reações enzimáticas causando interrupção da atividade (*Moore & Ramamoorthy, 1984*).

O mercúrio é o terceiro elemento do grupo 12 da Tabela periódica. Em águas naturais pode existir em três estados de oxidação: Hg^0 , Hg(I) e Hg(II) . A natureza das espécies e suas distribuições dependerão do pH, potencial de oxirredução, natureza e concentração de ânions com os quais forma complexos. Todos os compostos de mercúrio são altamente tóxicos para os organismos aquáticos, além de apresentar grande risco à saúde humana se ingerido (*Moore & Ramamoorthy, 1984*).

A Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005, estabelece os seguintes valores máximos permitidos de metais em águas doces:

Tabela 1.1. Padrão de potabilidade para íons metálicos que representam risco à saúde humana.

Metal	VMP ^a (mg L ⁻¹)
Cádmio	0,001
Chumbo	0,01
Cobre dissolvido	0,009
Cromo	0,05
Mercúrio	0,0002
Níquel	0,025
Zinco	0,18

^a Valor máximo permitido

Tabela 1.2. Padrão de aceitação para o consumo humano.

Metal	Valor (mg L ⁻¹)
Ferro	0,3
Manganês	0,1
Zinco	5,0

Estes metais, dentre outros, podem ser extremamente tóxicos mesmo presentes em baixas concentrações em águas naturais. Seus efeitos podem expressar-se de forma aguda ou crônica e dentre os mecanismos de toxicidade estão incluídas as interações com sistemas enzimáticos, membranas celulares e efeitos específicos sobre certos órgãos e metabolismo celular (*Freitas et al., 2001; Shi et al., 2005*).

Por esta razão, torna-se necessário detectar a presença destas espécies em águas e, para isso, diversos são os métodos analíticos empregados (*Wolfbeis & Oehme, 1997; Jaffrezic-Renault et al., 2006*). Dentre eles, pode-se mencionar a espectrometria de absorção atômica, espectroscopia de emissão em plasma induzido, fluorescência de raios-X e espectrometria de fluorescência atômica (*Liawruangrath et al., 2007*). Embora estas técnicas instrumentais apresentem várias vantagens (precisão, sensibilidade, seletividade, etc.), possuem uma série de desvantagens.

Para contornar essas dificuldades, podem ser empregados os sensores ópticos, que serão abordados na sequência.

1.1.2. SENSORES ÓPTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ÁGUAS

Uma alternativa para as técnicas instrumentais anteriormente mencionadas é o emprego de sensores ópticos. Um *optodo* pode ser definido como um

dispositivo capaz de responder de maneira seletiva à presença de um analito, fornecendo informação devido à alteração nas suas propriedades óptica, como emissão, absorção ou reflexão de luz. De maneira geral, é desejável que esta resposta seja reversível (Wolfbeis & Oehme, 1997).

Diversos são os trabalhos que empregam sensores ópticos para a determinação de metais pesados em águas (Gravrilenko *et al.*, 2007; Steinberg *et al.*, 2003; Ensafi & Fouladgar, 2008; Duan *et al.*, 2008). Kramer & Kovbasyuk (2006) propuseram um sensor fluorescente para a determinação de Cu(II) utilizando um reagente luminescente imobilizado em uma matriz sólida. A resposta foi baseada na supressão da fluorescência do reagente causada pelo metal. O limite de detecção foi de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o sensor mostrou-se seletivo para Cu(II) (estequiometria do complexo 1:1), na presença de outros metais (Co(II), Zn(II), Ni(II), Ca(II) e Mg(II)).

Molina-Díaz *et al.* (2007) determinaram Zn(II) em água potável com o uso de um reagente fluorescente imobilizado em uma matriz de sílica-gel. O reagente p-(tosiloamino) quinolina (*p*-TAQ) forma complexo com íons Zn(II). A intensidade de fluorescência foi monitorada a 495 nm, com excitação a 377 nm. A faixa linear de resposta foi de 5–125 $\mu\text{g L}^{-1}$, com limite de detecção de 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$. O sensor foi aplicado na determinação de amostras água potável.

Um sensor óptico seletivo para a determinação de Hg(II) foi proposto por Ensafi e colaboradores (Ensafi *et al.*, 2008). Neste trabalho, um reagente sensível ao íon metálico foi imobilizado covalentemente em uma membrana de triacetilcelulose. Em contato com o íon metálico, houve mudança de coloração de amarelo para laranja (323–429 nm) em pH 6,0. O intervalo de resposta da fase sensora é de $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O tempo de resposta foi de 6 minutos, com vida útil de aproximadamente 6 meses.

Observa-se nestes sensores a seletividade frente a um determinado metal pesado. Entretanto, quando se observa que outro metal interfere na resposta analítica, estes sensores apresentam inúmeras desvantagens. Desta maneira, quando se deseja determinar simultaneamente duas ou mais espécies em uma

amostra, ou a presença de um metal na presença de outro interferente, faz-se necessário o emprego de técnicas quimiométricas, que serão brevemente abordadas a seguir.

1.1.3. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CÁTIOS DE METAIS PESADOS

Os métodos quimiométricos de calibração multivariada têm sido aplicados em determinações simultâneas, as quais são uma das principais potencialidades da quimiometria. Os métodos de Mínimos Quadrados Parciais (PLS), Regressão por Componentes Principais (PCR) e Redes Neurais Artificiais (ANN) têm sido empregados em conjunto com métodos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos para a determinação simultânea de íons metálicos em diferentes matrizes (*Araújo et al., 2000; Hernández et al., 1996; Blanco et al., 1995; Izquierdo et al., 1998*). A grande maioria das aplicações é baseada em medidas em solução aquosa, sendo que poucos desenvolvimentos têm sido efetuados com o uso de sensores ópticos, principalmente para a determinação de metais pesados (*Narayanaswamy & Raimundo Jr., 2003; Muller-Ackermann et al., 1995*). Nestas poucas aplicações, um sério problema encontrado está relacionado à lixiviação do reagente imobilizado, que altera as propriedades da fase sensora e, portanto, o sinal analítico obtido. Muito embora possa ser minimizado em determinações unielementares, que empregam poucas medidas na etapa de calibração, viabilizando uma troca freqüente da fase sensora, o problema relacionado à lixiviação compromete a precisão e a exatidão em métodos de determinação simultânea baseados em calibração multivariada, dada a necessidade de um grande número de medidas na referida etapa de calibração.

Desta forma, o desenvolvimento de fases sensoras estáveis, tanto do ponto de vista da lixiviação do reagente como da sua foto-estabilidade, é fundamental

para a aplicação de sensores ópticos em determinações simultâneas baseadas em calibração multivariada.

Ren e Gao (*Ren & Gao, 2005*) avaliaram a determinação simultânea de Cd(II), Cu(II), Ni(II) e Zn(II) com o emprego de dois métodos quimiométricos: mínimos quadrados parciais de Kernel (KPLS) e Wavelets de mínimos quadrados parciais (WPTPLS), com o uso do indicador alaranjado de xilenol em solução tampão pH 9,0. No método KPLS, o tamanho da matriz é dependente apenas do número de amostras; assim, o método foi adequado para a matriz de dados com vários valores de comprimentos de onda e poucas amostras. As representações do pacote Wavelet, por sua vez, fornecem uma descrição de frequência em tempo real, portanto, neste domínio, a qualidade do sinal pode ser melhorada, com a diminuição do ruído. Os resultados experimentais obtidos demonstraram que ambos os métodos podem ser empregados com sucesso, mesmo quando há sobreposição espectral dos dados.

Muñoz e colaboradores (*Muñoz et al., 2002*) propuseram um sistema de fluxo contínuo para a determinação simultânea de Cd(II), Co(II), Cr(VI), Cu(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II) em águas de rios. Os limites de detecção para os íons metálicos foram: 0,176 nmol L⁻¹ Cd(II), 1,91 nmol L⁻¹ Co(II), 1,35 nmol L⁻¹ Cr(VI), 0,229 nmol L⁻¹ Cu(II), 1,61 nmol L⁻¹ Ni(II), 0,469 nmol L⁻¹ Pb(II) e 4,01 nmol L⁻¹ Zn(II). O procedimento foi aplicado a uma amostra de água de rio e os resultados foram comparados com espectroscopia de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Suzuki e colaboradores (*Suzuki et al., 2004*) propuseram um método baseado em redes neurais artificiais para o processamentos de dados espectrofotométricos para a determinação simultânea de Cd(II), Hg(II) e Zn(II) em soluções aquosas. Três tipos de indicadores metalocrômicos comercialmente disponíveis foram utilizados como um modelo de configuração para criar os dados espectrais similares aos que são habitualmente gerados em sensores ópticos. Em métodos convencionais de treinamento de ANN para sensores químicos baseados em dados espectrofotométricos, a calibração é estabelecida pela correlação matemática entre o sinal de medida óptica de entrada de rede com a concentração

da amostra de calibração como saída de rede. Em diversas situações, no entanto, especialmente quando se trata de misturas de analitos, a relação entre um espectro de absorção e as concentrações de íons correspondentes é ambígua. Na etapa de formação, as misturas de amostra de calibração foram medidas para a construção das redes para correlacionar os dados de entrada (concentração de íons) com a saída de dados (espectros). Na etapa de previsão, a concentração de íons de amostra desconhecida foi estimada usando as ANN construídas. Os espectros medidos das amostras desconhecidas foram alimentados na camada de saída e as concentrações adequadas de entrada foram determinadas por ANN. Foram empregadas 143 misturas ternárias contendo Cu(II), Hg(II) e Zn(II) em um intervalo de concentração de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores de RMSEP (erros médios quadrático de previsão) obtidos foram 0,96 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Cu(II), 0,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Hg(II) e 0,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Zn(II), indicando que as redes neurais são ferramentas úteis para a determinação simultânea da concentração destas espécies.

Narayanaswamy e Raimundo Jr. (*Narayanaswamy e Raimundo Jr., 2003*) propuseram o uso de redes neurais artificiais (ANN) como uma ferramenta para a determinação simultânea de Cd(II), Hg(II) e Zn(II) em águas. Para tal, empregou-se um optodo baseado no reagente Br-PADAP imobilizado em resina Amberlite XAD-4. Os estudos foram realizados com misturas binárias e ternárias dos íons metálicos no intervalo de concentração de 0–3,0 mg L^{-1} em solução tampão pH 8,0. Foram realizadas medidas de reflectância na região de 400–800 nm e os espectros foram suavizados com a técnica de média móvel e, em seguida, normalizados. Misturas de Zn(II)–Cd(II) e Hg(II)–Cd(II) foram empregadas para avaliar a capacidade de predição da ANN, todas com baixos valores de erros absolutos e de desvio padrão. Resultados semelhantes foram obtidos quando a mistura ternária foi empregada.

Como pode ser verificado, os sensores apresentados são baseados em técnicas espectrofotométricas, principalmente. Sensores ópticos baseados em técnicas fluorimétricas para a determinação simultânea de metais pesados ainda não é um tema de grande abordagem nas investigações. Devido ao fato deste

trabalho apresentar este tipo de sensor, são abordados, a seguir, os aspectos fundamentais da técnica de espectroscopia de luminescência.

1.1.4. ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA

Luminescência é o fenômeno de emissão de fótons nas regiões do ultravioleta, visível ou infravermelho a partir da relaxação de uma espécie excitada. A palavra luminescência, que tem origem no Latim (*lumen* = luz) foi inicialmente introduzida como *luminescentz* pelo físico e historiador Eilhardt Wiedemann em 1888, para descrever “todo fenômeno de luz que não era condicionado com um aumento de temperatura”, oposto à incandescência. Luminescência é considerada como *luz fria*, enquanto incandescência é *luz quente*. Fluorescência e fosforescência são fenômenos particulares de luminescência. O modo de excitação é a absorção de fótons, que promovem a espécie a um estado eletrônico excitado. A emissão de fótons acompanhada de relaxação é chamada fotoluminescência (fluorescência ou fosforescência), que é um dos possíveis efeitos físicos resultantes da interação da luz com a matéria, como é mostrado na Figura 1.1 (Valeur, 2002).

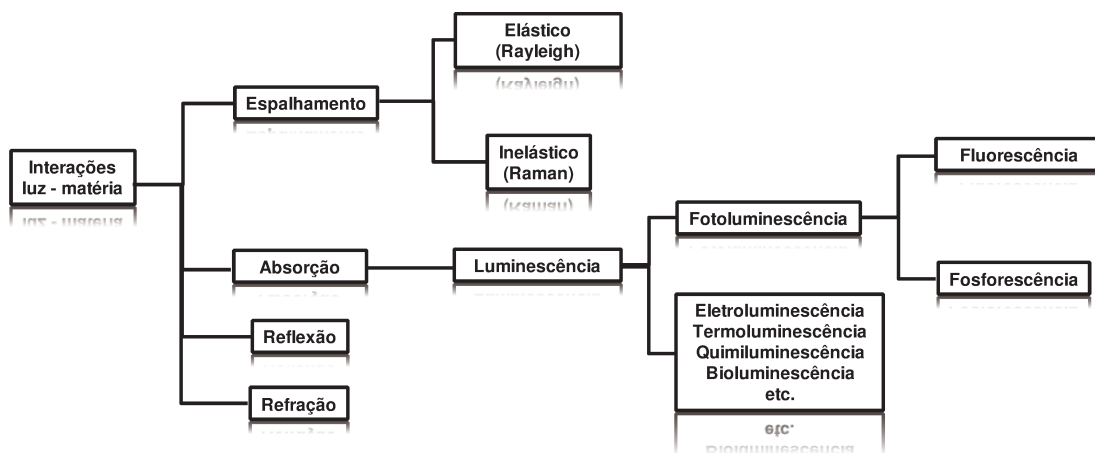


Figura 1.1. Diferentes propriedades originadas da interação entre luz e matéria.

Uma vez que uma molécula é excitada pela absorção de fótons, ela pode retornar ao estado fundamental com emissão de fluorescência; entretanto, outros caminhos para a relaxação também são possíveis, como mostra a Figura 1.2. A conversão interna (isto é, o retorno direto para o estado fundamental sem a emissão de fluorescência), cruzamento intersistemas (possivelmente seguido por emissão de fosforescência), transferência de carga intermolecular e mudança conformacional. (*Valeur, 2002*).



Figura 1.2. Possíveis processos de relaxação de moléculas excitadas.

Os fenômenos anteriormente mencionados competem com a emissão de fluorescência se tiverem lugar numa escala de tempo comparável ao intervalo médio (tempo de vida) no qual as moléculas permanecem no estado excitado.

O diagrama de Jablonski, apresentado na Figura 1.3, é conveniente para a ilustração de possíveis processos: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistemas e fosforescência (*Valeur, 2002*).

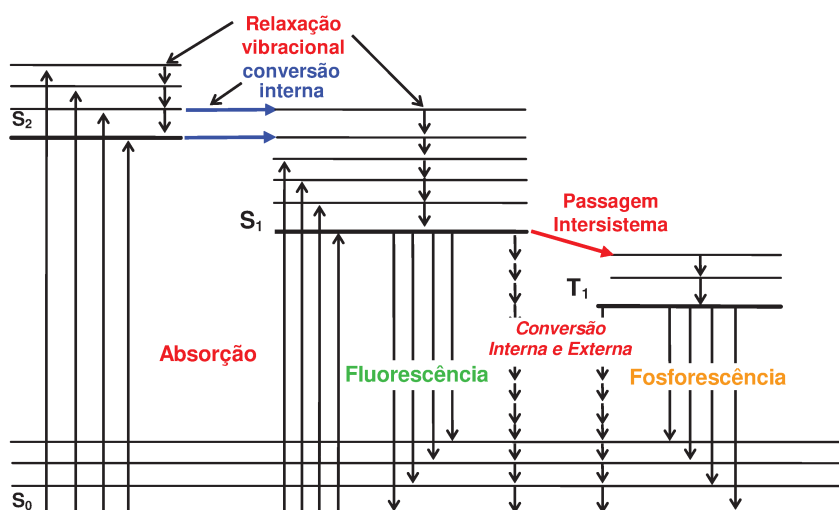


Figura 1.3. Diagrama de Jablonski simplificado ilustrado os principais fenômenos de absorção e emissão de energia.

O sucesso da fluorescência como ferramenta de investigação no estudo da estrutura da matéria ou sistemas vivos decorre da alta sensibilidade, a especificidade das características da fluorescência devido ao microambiente da molécula emissora e a capacidade deste último para fornecer informação espacial e temporal. A Figura 1.4 mostra os parâmetros físicos e químicos que caracterizam o microambiente e podem, portanto, afetar as características da fluorescência de uma molécula (Valeur, 2002).

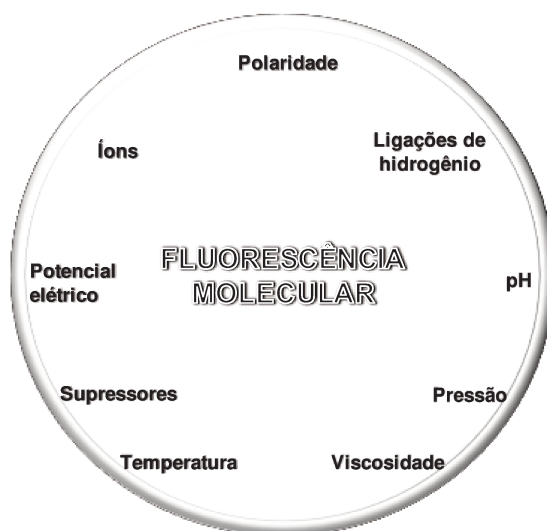


Figura 1.4. Parâmetros que influenciam a emissão de fluorescência.

A supressão se refere a qualquer processo que diminua a intensidade de emissão de fluorescência de um fluoróforo. Diversas interações moleculares podem resultar nesse fenômeno como, por exemplo, reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão colisional (*Lakowisky, 1999; Valeur, 2002*).

Os dois tipos mais conhecidos de supressão são a estática e a dinâmica (colisional) e ambos requerem contato molecular entre fluoróforo e supressor. Na supressão colisional, o supressor deve difundir-se ao fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado e, após este contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem a emissão de fóton. Geralmente, a supressão ocorre sem mudanças permanentes nas moléculas, isto é, sem reações fotoquímicas. Na supressão estática, um complexo é formado entre o fluoróforo e o supressor, e este complexo não é fluorescente (*Lakowisky, 1999; Valeur, 2002*).

A supressão colisional da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_D[Q]$$

Nesta equação, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, k_q é a constante de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor e $[Q]$ é a concentração do supressor. A constante de supressão de Stern-Volmer é dada por $k_q\tau_0$.

Os dados de supressão são geralmente expressos como uma curva de F_0/F versus $[Q]$, pois se espera que F_0/F seja linearmente dependente de $[Q]$.

A supressão também pode ocorrer como um resultado da formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Quando este complexo absorve luz, ele retorna imediatamente ao estado fundamental sem a emissão de fótons.

A dependência da intensidade de fluorescência sobre a concentração de supressor para a supressão estática é facilmente derivada considerando-se a constante de associação para a formação do complexo, que é dada por:

$$K_S = [F-Q] / [F] [Q]$$

Onde $[F-Q]$ é a concentração do complexo, $[F]$ é a concentração do fluoróforo não complexado e $[Q]$ é a concentração do supressor. Se a espécie complexada não é fluorescente, então a fração da fluorescência que permanece, F/F_o , é dada pela fração de fluoróforo total que não está complexada, $f = F/F_o$. Relembrando que a concentração total do fluoróforo é dada por

$$[F]_o = [F] + [F-Q]$$

Substituindo na equação anterior:

$$K_S = [F]_o - [F] / [F][Q] = [F]_o / [F][Q] - 1 / [Q]$$

Podemos substituir as intensidades de fluorescência pela concentração do fluoróforo e rearranjar a equação, resultando em:

$$F_o / F = 1 + K_S[Q]$$

A dependência de F_o/F com $[Q]$ é linear e idêntica àquela observada para a supressão dinâmica, exceto pelo fato de que a constante de supressão é agora a constante de associação.

A medida do tempo de vida de fluorescência é o método mais recomendado para diferenciar entre supressão estática e dinâmica. O fluoróforo complexado é não fluorescente e, então, a fluorescência é observada a partir do fluoróforo não complexado. A fração não complexada não é perturbada e, dessa maneira, o tempo de vida é τ_o . Assim, para a supressão estática, $\tau_o/\tau = 1$. Diferentemente, para a supressão dinâmica, $\tau_o/\tau = F_o/F$ (Lakowisky, 1999; Valeur, 2002).

Uma grande variedade de substâncias atua como supressores, dentre elas o oxigênio molecular e cátions, como metais pesados, analitos investigados neste trabalho.

O tempo de vida de um fluoróforo é uma de suas características mais importantes, uma vez que determina o tempo disponível para o fluoróforo interagir ou difundir-se em seu ambiente e, portanto, fornece informação sobre sua emissão. Pode ser representado por um diagrama de Jablonski simplificado, como mostra a Figura 1.5 (Lakowisky, 1999; Valeur, 2002).

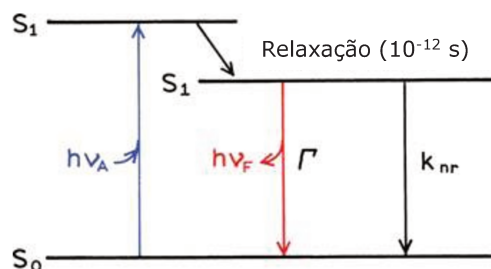


Figura 1.5. Diagrama de Jablonski representando o tempo de vida de um fluoróforo, onde S_0 = estado fundamental singlete, S_1 = estado excitado singlete, $h\nu_A$ e $h\nu_F$ = absorção e emissão de radiação, Γ = velocidade emissiva do fluoróforo e k_{nr} = velocidade de emissão não radiativa.

O tempo de vida do estado excitado é definido pelo tempo médio em que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental e, como mencionado anteriormente, a partir deste parâmetro pode-se obter informações sobre o tipo de supressão que um determinado fluoróforo sofre quando em contato com outras moléculas (Lakowisky, 1999; Valeur, 2002).

1.2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver sensores fluorescentes baseados em reagentes luminescentes imobilizados em distintos suportes para a determinação simultânea de metais pesados em águas. Para tanto, foram empregados fluoróforos previamente sintetizados no GSOLFA e técnicas de calibração multivariada.

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1. REAGENTES LUMINESCENTES

Os reagentes luminescentes empregados neste trabalho foram sintetizados no *Grupo de Sensores Optoquímicos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada, GSOLFA (UCM)*. Foram eles ZO_X (2-piridin-2-il-benzooxazol), [Ru(s2d)₂(bim)]²⁻ (complexo de Ru(II), onde s2d: 1,10-fenantrolina-4,7-di-il) bis(benzenosulfonato e bim: 2,2'-biimidazol), bpySOH (4-[2-(4'-metil-[2,2'] bipiridil-4-il)-vinil]-fenol) e bpySOMA ((2-metileno de ácido butírico-4-[2-(4'-metil-[2,2'] bipiridil-4-il)-vinil]-fenil éster).

2.2. REAGENTES DE GRAU ANALÍTICO

SAIS DE METAIS PESADOS

- Acetato de zinco, Zn.(C₂H₃O₂)₂.2H₂O (*Panreac*);
- Cloreto de cádmio II, CdCl₂.2 ½ H₂O (*RPACS – Carlo Erba*);
- Cloreto de mercúrio (II), HgCl₂, (*Acros Organics, Sigma, Vetec*);
- Cloreto de níquel II, NiCl₂ (*Aldrich*);
- Cloreto de níquel II hexahidratado, NiCl₂.6H₂O (*Vetec*);
- Cloreto de zinco II, ZnCl₂ (*Aldrich, Ecibra*);
- Nitrato de cádmio tetrahidratado, Cd(NO₃)₂.4H₂O (*Vetec*);
- Nitrato de chumbo II, Pb(NO₃)₂ (*Ecibra*);
- Nitrato de ferro (III) nonoidratado, Fe(NO₃)₃.9H₂O (*Merck, Vetec*);
- Sulfato de cobre pentahidratado, CuSO₄.5H₂O, (*Aldrich, Synth*);
- Sulfato de zinco heptahidratado, ZnSO₄.7H₂O, (*Merck*).

REAGENTES PARA A PREPARAÇÃO DE SOL-GEL

- 3,3,3-Trifluoropropil-trimethoxi silano, TFP-TriMOS (*Fluka*);
- 3-Aminopropil-trietoxisilano (*Fluka*);
- 3-Glicidoxipropiltrimetoxisilano (*Aldrich*);
- Amino-propil-trietil ortosilano, APTEOS (*Fluka*);
- Hidróxido de amônio, NH_4OH (*Aldrich*);
- Metiltrietoxisilano, MTriEOS (*Fluka*);
- Metil-trimetil ortosilano, MTMOS, (*Fluka*);
- n-propiltrimetoxisilano, n-propil-TriMOS (*Fluka*);
- Tetrametil ortosilano 99%, TMOS (*Aldrich*);
- Tetraortosilano, TEOS, (*Aldrich, Fluka*).

REAGENTES PARA A PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS DE ACRILTATO

- 2,2'-azobis-2,4-dimetil-valeronitrilo, ABDV (*Aldrich*);
- 2-2-dimetoxi-2-fenil- acetona, $\text{C}_6\text{H}_5\text{COC}(\text{OCH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$ (*Aldrich*);
- 2-hidroxietilmetacrilato, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (*Aldrich, Fluka*);
- 3-(Acriloloxi)-2-hidroxi propil metacrilato, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_7$, (*Aldrich*);
- 3-(trimetoxisilil-propil) metacrilato, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ (*Aldrich*);
- Ácido metacrílico, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ (*Aldrich*);
- Acrilamida, $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$ (*Aldrich*);
- Anidrido metacrílico, $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}]_2$ (*Aldrich*);
- Azobisisobutironitrilo, AIBN (*Merck*);
- Hidróxido de potássio, KOH (*Aldrich*);
- Metacrilamida, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$ (*Aldrich, Fluka*);
- N-N'-metilenbisacrilamida, MBAA (*Fluka*);
- Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 (*Scharlau*);
- Poli(etilenoglicol) diacrilato, (*Aldrich*);

- Polifluoroalquilmetacrilato, PFM (*Aldrich*);
- Trietilamina, $(C_2H_5)_3N$ (*Fisher Scientific*).

REAGENTES PARA A PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS DE PVC

- Butirato de 10-hidroxidecila, Ionóforo $\geq 98,0\%$, $C_{14}H_{28}O_3$ (*Fluka*);
- Cloreto de polivinila, PVC (*Fluka*);
- N,N,N',N'-Tetrabutil-3,6-dioxa-octanedi (tioamida), $C_{22}H_{44}N_2O_2S_2$, (*Fluka*).

SOLVENTES

- Acetona CH_3COCH_3 (*Qemical*);
- Acetonitrila, CH_3CN (*Aldrich*);
- Diclorometano, CH_2Cl_2 (*Synth*);
- Dimetilformamida, $(CH_3)_2NCHO$ (*Aldrich*);
- Dimetilsulfóxido, $(CH_3)_2SO$ (*SDS, Aldrich*);
- Etanol absoluto, CH_3CH_2OH (*Recaptur*);
- Éter dietílico, $(CH_3CH_2)_2O$ (*Aldrich*);
- Metanol, CH_3OH (*J.T. Baker, SDS*);
- Tetrahidrofurano, THF (*SDS*);
- Tolueno, $C_6H_5CH_3$ (*J. T. Baker, SDS*).

DIVERSOS

- Ácido acético, CH_3COOH (*Aldrich*);
- Ácido bórico, H_3BO_3 (*Merck*);
- Ácido clorídrico, HCl , (*Recaptur*);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA (*Merck*);

- Ácido fosfórico, H_3PO_4 (*Nuclear*);
- Ácido nítrico, HNO_3 (*Prolabo*);
- Cloreto de potássio, KCl (*Synth*);
- Fosfato de sódio dodeca-hidratado, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (*Pan React*);
- Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*Aldrich*);
- Hidróxido de sódio, NaOH (*Aldrich*, *Synth*).

2.3. SOLUÇÕES DE CÁTIOS METÁLICOS

Soluções estoques de Cd(II) , Cu(II) , Fe(III) , Hg(II) , Ni(II) , Pb(II) e Zn(II) foram preparadas a partir de quantidades adequadas de seus respectivos sais em água deionizada e em solventes orgânicos. A partir destas soluções estoque, foram preparadas as soluções de diferentes concentrações utilizadas neste trabalho.

2.4. SOLUÇÕES TAMPÃO

Soluções Tampão Fosfato 50 e 100 mmol L^{-1} e Britton-Robinson (CH_3COOH , H_3PO_4 , H_3BO_3 0,04 mol L^{-1} e NaOH 0,2 mol L^{-1} , 0,5 mol L^{-1}) foram preparadas a fim de verificar o comportamento das interações ligantes–metais neste distintos ambientes químicos.

2.5. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram os espectrofotômetros *Cary 3 Bio UV-VIS* (Programa *Cary WinUV*) e *Agilent HP 8453* (Programa *HP-UV-Visible*) para o registro dos espectros de absorção.

Para a obtenção dos espectros de emissão, excitação e experimentos em função do tempo foram empregados os espectrofluorímetros *Perkin Elmer LS 50 e 55* (Programa *FL WinLab*) e *Varian Cary Eclipse* (Programa *Cary Eclipse*).

Para os experimentos de tempo de vida de fluorescência, utilizou-se o espectrofluorímetro *Horiba Jobin Yvon Fluoromax 4 TCSPC* (Programa *Data Station v 2.5*).

Foram utilizados ainda espectrômetro de ressonância magnética nuclear *Bruker Avance DPX300* (300 MHz), espectrômetro de massas de ion trap *Bruker* (modelo *Esquire-LC*), pHmetro *Crison* e *Corning 443i*, centrífuga *Cencon* e micro-balança *Perkin Elmer* (Modelo AD-6).

2.6. SISTEMA DE MEDIDAS

Para as medidas de intensidade de fluorescência utilizou-se um sistema de medidas composto por bomba peristáltica, célula contendo a fase sensora (célula de Teflon para as membranas ou célula de fluxo para material sólido) introduzida em um espectrofluorímetro e frasco para descarte, como mostra a Figura 2.1.

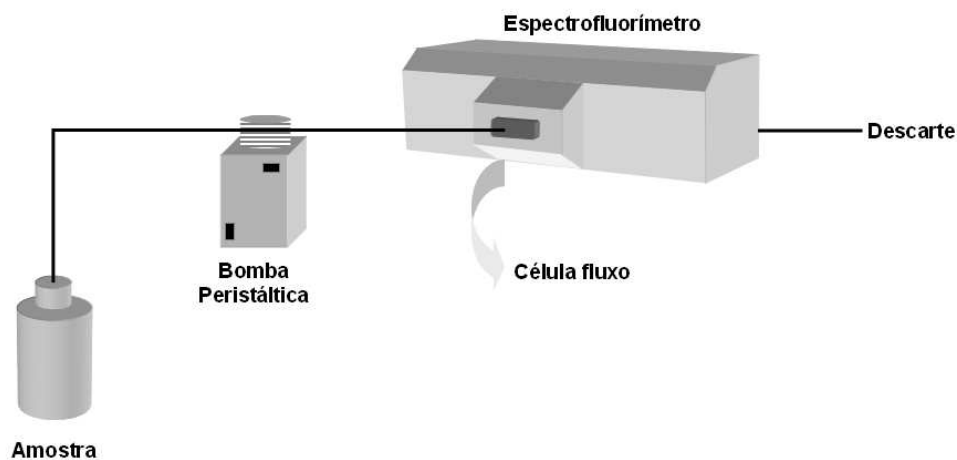


Figura 2.1. Esquema do sistema de medidas utilizado no desenvolvimento desta Tese.

2.7. CÉLULA DE FLUXO

Nos experimentos utilizando sol-gel e MIP, empregou-se uma célula de fluxo Hellma 176.052 para o empacotamento da fase sensora, como mostra a Figura 2.2.

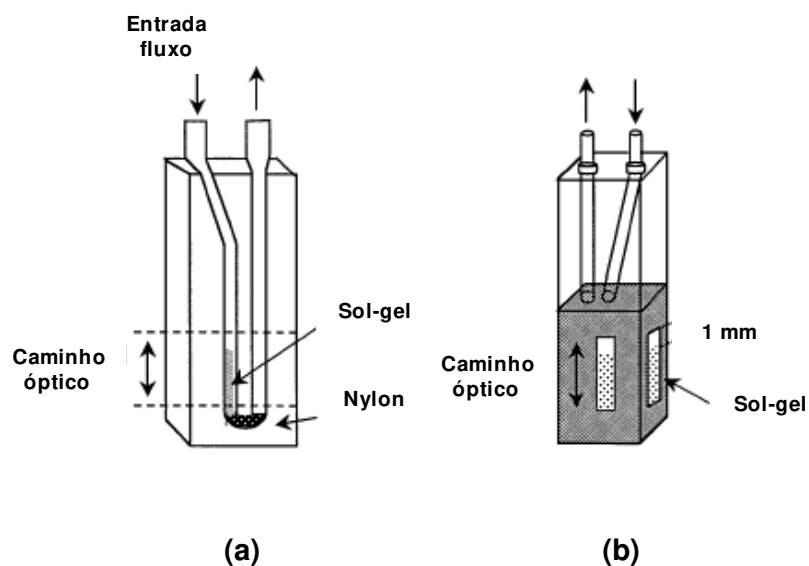


Figura 2.2. Esquema da célula de fluxo Hellma 176.52 empregada no empacotamento de sol-gel, (a) visão da secção e (b) visão frontal.

Para o empacotamento da fase sensora na célula, inicialmente colocou-se uma malha de Nylon fina na extremidade de saída de fluxo, conforme mostrado na Figura 2.2. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, uma suspensão do material (sol-gel ou MIP) em metanol foi colocada na entrada da célula e, então, aspirada com uma bomba peristáltica, sendo retida pela malha de nylon. Preencheu-se com a fase sensora $3/4$ do volume total da célula, garantindo que o feixe de radiação incidisse sobre as partículas.

Empacotada a fase sensora, diversos ciclos diretos e reversos com solução ácida foram realizados, a fim de acomodá-la na célula e iniciar as medidas.

Capítulo 3

*Avaliação dos reagentes
luminescentes ZOX,
 $[Ru(s2d)_2(bim)]^{2-}$ e bpySOH*

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. TECNOLOGIA SOL-GEL PARA IMOBILIZAÇÃO DE REAGENTES

Na aplicação em sensores, os indicadores e reagentes devem ser imobilizados em suportes adequados. Diversos são utilizados, dentre eles os vidros que são freqüentemente aplicados devido às características como estabilidade mecânica e transparência óptica. Vidros obtidos por sol-gel é uma alternativa interessante em aplicação de sensores (*Wolfbeis & Oehme, 1997*).

O método sol-gel permite o processamento de pós de vidros, cerâmicas, filmes finos e fibras a partir de soluções. Os precursores são misturados e materiais podem ser obtidos a temperaturas mais baixas que aquelas empregadas em métodos tradicionais de síntese. Uma das principais vantagens da tecnologia sol-gel é a possibilidade de preparar materiais híbridos orgânico-inorgânico (*Podbielska & Jarza, 2005*).

Durante o processo de síntese de um material sol-gel os fatores mais importantes que devem ser considerados são a natureza do precursor, catalisadores, solvente, pH, temperatura e condições de agitação (*Fagadar-Cosma et al., 2009*).

O material sol-gel mais popular é aquele à base de sílica, no qual o processo de produção compreende várias etapas. Primeiro, o precursor (TEOS ou TMOS, por exemplo) é misturado com solvente e catalisador adequados e agitado durante um período. Este processo leva à hidrólise das ligações Si—O—R. Esta reação de hidrólise pode ser catalisada por ácidos (HCl ou HF, por exemplo) ou bases (NH_4OH , NaOH, etc). A hidrólise, geleificação e os processos de envelhecimento e secagem ocorrem simultaneamente (*Podbielska & Jarza, 2005, Gupta & Chaudhury, 2007*).

A secagem a temperaturas não superiores a 100 °C leva à formação de “géis secos”, chamados xerogéis, que são materiais resistentes, transparentes e porosos. O tamanho dos poros depende de fatores como tempo e temperatura de hidrólise e do tipo de catalisador utilizado. O diâmetro dos poros está diretamente relacionado com a contração dos géis “molhados”. Durante o processo de

secagem o volume do gel diminui ainda várias vezes, o que é o principal motivo da quebra. A adição de pequenas quantidades de solventes orgânicos como dimetilformamida ou dimetilsulfóxido estabiliza os géis resultantes aumentando a sua resistência mecânica e melhorando sua transparência. O esquema do processo de formação de um sol-gel é apresentado na Figura 3.1 (*Podbielska & Jarza, 2005*).

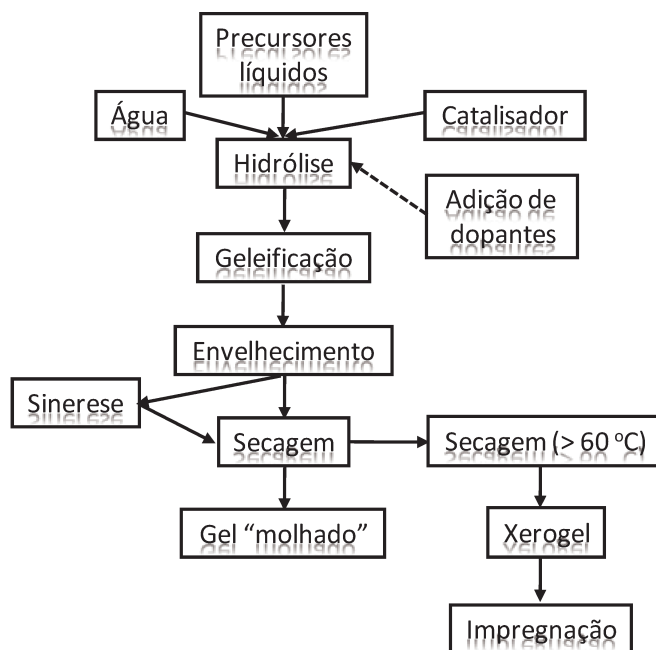


Figura 3.1. Representação esquemática das etapas de um processo sol-gel.

A boa reprodutibilidade, elevado rendimento, controle refinado, não utilização de solventes (exceto água e álcool) são fatores que fazem com que o processo sol-gel seja preferido quando comparado com outros processos úmidos podendo ser utilizado em escala industrial. É uma técnica que não requer instrumentação de custo elevado, é flexível em termos de geometria do substrato e pode ser explorada para revestimentos diferentes (*Podbielska & Jarza, 2005*).

A combinação de substâncias orgânicas e inorgânicas permite a obtenção de materiais com propriedades interessantes para uma ampla gama de aplicações. Híbridos orgânico-inorgânico foram denominados ORMOSILS (ORganically MODified SILicates, silicatos organicamente modificados), ORMOCERS (ORganically MODified CERamics, cerâmicas organicamente modificadas) e CERAMERS (CERamic polyMERS, polímeros cerâmicos) ou POLYCERAM (POLYmeric CERAMics, cerâmicas poliméricas) (*Podbielska & Jarza, 2005*).

Os materiais híbridos permitem combinar propriedades desejadas de polímeros orgânicos (elasticidade) com as de sólidos inorgânicos (dureza e resistência química). Estes materiais podem ser preparados de várias maneiras. A mais simples baseia-se na dissolução de moléculas orgânicas em um sol-gel líquido. A outra forma usa a impregnação de um gel poroso na solução orgânica. No terceiro tipo o precursor inorgânico ou já possui um grupo orgânico ou ocorrem reações em uma solução líquida para formar ligações químicas no gel híbrido. O processo sol-gel em si leva à formação de géis de misturas de reagentes líquidos (sóis) em temperatura ambiente. Envolve várias etapas: a evolução das redes inorgânicas, formação de suspensão coloidal (sol) e geleificação do sol para formar uma rede em uma fase contínua líquida (gel). A secagem dos géis obtidos, mesmo em temperatura ambiente, produz materiais parecidos com vidros chamados xerogéis (xero – seco).

As propriedades intrínsecas da matriz de sol-gel como, por exemplo, porosidade, área superficial, polaridade e rigidez dependem do processo de hidrólise e das reações de condensação, assim como é influenciada pela escolha dos precursores, razão molar entre água e precursor, solvente e co-solvente, pressão, temperatura, envelhecimento, secagem e condições de cura (*Gupta & Chaudhury, 2007*). Os materiais sol-gel são transparentes, porosos e estáveis mecanicamente, o que os fazem candidatos ideais para materiais ópticos (*Maruszewski et al., 1999*). Neste sentido, foram avaliadas distintas composições de sol-gel para imobilizar os reagentes luminescentes investigados neste trabalho.

3.2. AVALIAÇÃO DO REAGENTE LUMINESCENTE ZOX

3.2.1. CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE EM MEIO ORGÂNICO

O reagente luminescente ZOX (2-piridin-2-il-benzooxazol), cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 3.2, foi previamente sintetizado no *GSOLFA*.

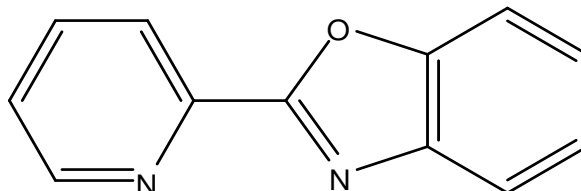


Figura 3.2. Estrutura molecular do reagente luminescente ZOX.

O reagente foi caracterizado a partir de seus espectros de absorção em meio orgânico (metanol), com máximo valor de absorbância em 302 nm e absortividade molar de $2,95 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O espectro de emissão do ligante neste meio apresentou máxima intensidade de fluorescência em 365 nm.

Experimentos preliminares realizados com este reagente direcionaram os estudos para a determinação de Cd(II) e Zn(II), metais que foram inicialmente avaliados. Para este fluoróforo, foram estudadas duas técnicas de imobilização, cujos resultados são apresentados na sequência.

3.2.2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO EMPREGADAS

Para a imobilização deste reagente, foram empregadas membranas de PVC e uma composição de sol-gel.

MEMBRANAS DE PVC

A imobilização de reagentes em membranas de PVC plastificadas é uma técnica empregada com grande êxito para a determinação de diversas espécies químicas. Os componentes utilizados na preparação do *coquetel* (200 mg em 2000 μL de THF) e as respectivas concentrações estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição da membrana de PVC avaliada na imobilização do ligante ZOX.

Componente	% (m/m)	Massa (mg)
ZOX	2,60	5,21
PVC	29,90	59,97
Plastificante ^a	66,44	133,27
Ionóforo Cd(II) ^b	1,07	2,14

^a Butirato de 10-hidroxidecila

^b N,N,N',N'-Tetrabutyl-3,6-dioxaoctanedi (tioamida)

Para a preparação das membranas utilizou-se 50 μL do *coquetel*, que foram depositados em dois suportes distintos: lâminas de vidro de 10 mm de largura e 20 mm de comprimento e *Mylar* (filme de poliéster, Dupont[®]) nas mesmas dimensões. Na avaliação destas membranas, foi utilizada uma célula de Teflon que continha uma extremidade para o encaixe das fibras ópticas (bifurcadas, diâmetro 20 mm)

em um acessório do espectrofluorímetro *Perkin Elmer LS 50*. A célula continha ainda, tubos de Tygon para a entrada e saída das soluções.

Na avaliação da fase sensora, utilizou-se uma solução de $\text{Cd}(\text{II})$ $2,41 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em soluções tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0, 7,0 e 9,0). Um condicionamento da membrana em cada tampão foi necessário (15 minutos), antes de iniciar os experimentos. Em cada caso, foram avaliados espectros de emissão da membrana, antes e após o contato com a solução de $\text{Cd}(\text{II})$. Nos três valores de pH analisados, observou-se que não houve estabilidade satisfatória da intensidade de fluorescência em solução tampão. Após o início do fluxo da solução de metal, observou-se que não houve mudanças significativas na intensidade de fluorescência, ou seja, a membrana não se comportou de maneira adequada para o metal em questão. Assim sendo, esta fase sensora foi descartada de futuros estudos.

SOL-GEL

A preparação deste material foi baseada no trabalho de Moreno (*Moreno, 1994*). O procedimento consistiu em adicionar em um béquer 5,0 mL de TMOS, 6,0 mL de metanol e 2,4 mL de água. Esta mistura foi submetida à agitação mecânica durante 5 minutos e a ela foram adicionados 1,2 mL de uma mistura que continha 13,41 mg de ZOX, 62,5 μL de NH_4OH $1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e 2,25 mL de metanol. Cobriu-se o béquer com um filme plástico deixando-o em repouso à temperatura ambiente. Quando iniciou o processo de formação do gel (três dias), a cobertura plástica foi perfurada para facilitar a evaporação dos solventes e a obtenção de um vidro com massa constante (15–20 dias). Uma vez obtido o vidro, este foi triturado e peneirado (100–150 μm) e lavado com solventes para avaliar a lixiviação do reagente imobilizado.

Para esta verificação, 20 mg do material foi suspenso em 2,0 mL de água deionizada e agitado durante 24 horas. Terminada a agitação, centrifugou-se para

a separação do sobrenadante, que foi empregado para a obtenção de espectros de emissão, com a finalidade de se observar a presença das bandas características do indicador. A partir destes espectros, verificou-se a ausência das bandas e, como consequência, a não ocorrência da lixiviação do ligante da matriz de sol-gel. Por esta razão, a fase sensora foi caracterizada na presença de íons $\text{Cd}(\text{II})$. Imobilizado, o ligante apresentou máxima intensidade de fluorescência em 415 nm, diferentemente daquela em solução (302 nm), devido à influência da matriz sol-gel. Para a avaliação da resposta da fase sensora na presença de distintos íons metálicos, foram empregadas soluções $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Cd}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ e $\text{Zn}(\text{II})$ para a obtenção de espectros de emissão após o fluxo por 45 minutos a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, conforme mostra a Figura 3.3.

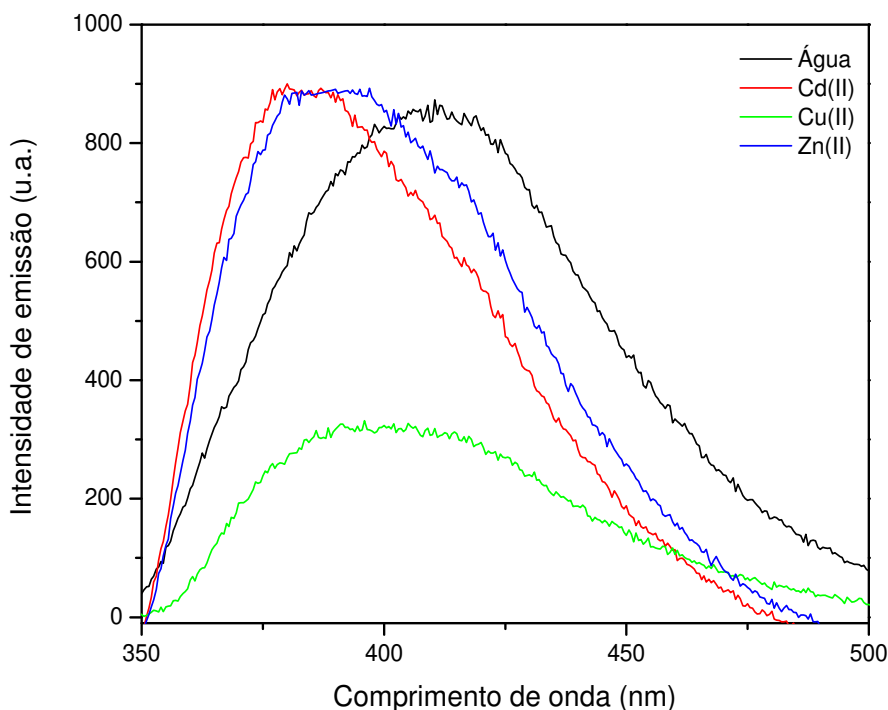


Figura 3.3. Espectros de emissão do material preparado por processo sol-gel na presença de diferentes metais. Comprimento de onda de excitação: 302 nm, fendas de emissão e excitação: 3,0 nm e velocidade de varredura: 200 nm min^{-1} .

Como pode ser observado, o ligante ZOX se comporta de maneira distinta na presença dos diferentes íons metálicos avaliados, apresentando valores de máximas intensidades em diferentes comprimentos de onda quando comparados com o espectro em água. Além disso, verifica-se que $\text{Cu}(\text{II})$ suprime de maneira bastante efetiva a emissão, enquanto $\text{Cd}(\text{II})$ e $\text{Zn}(\text{II})$ aumentam seu valor.

Com a finalidade de avaliar a resposta da fase sensora para íons $\text{Cd}(\text{II})$, realizou-se um experimento em função do tempo, no qual uma solução do metal $1,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi inserida durante 45 minutos e os espectros de emissão foram registrados a cada 5 minutos, como mostra a Figura 3.4.

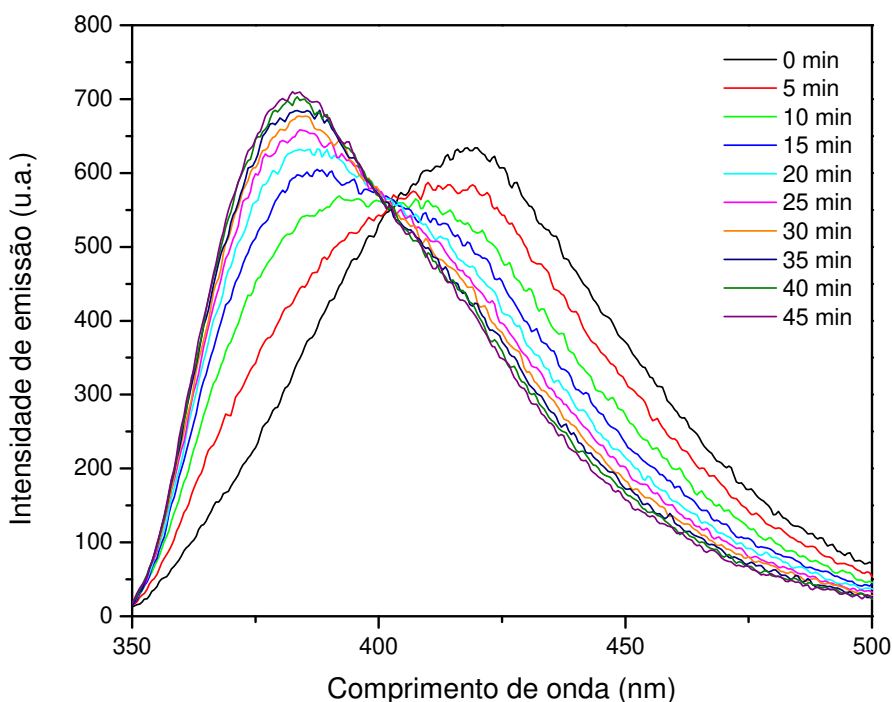


Figura 3.4. Espectros de emissão do sol-gel para $\text{Cd}(\text{II})$ $1,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Comprimento de onda de excitação: 302 nm, fendas de emissão e excitação: 3,5 nm e velocidade de varredura: 200 nm min^{-1} .

É possível verificar que ocorre um deslocamento dos máximos de emissão para a esquerda com o decorrer do tempo, quando comparado com os espectros na ausência de $\text{Cd}(\text{II})$. O comprimento de onda no qual se observa a máxima intensidade de emissão do ligante em água é igual a 420 nm (intensidade igual a

634 u.a.), após 45 minutos de inserção de metal, o máximo está em 383 nm (intensidade igual a 707 u.a.). Este comportamento da fase sensora é interessante e seria de grande valia, caso fosse possível regenerar o sinal analítico. Uma dificuldade encontrada no desenvolvimento de sensores para espécies metálicas é a regeneração da fase sensora, uma vez que se torna necessária a introdução de uma espécie capaz de deslocar o metal. Um agente complexante amplamente empregado em sensores é o EDTA que, neste caso, não foi capaz de deslocar o metal e, assim, foi necessário o uso de uma solução mais agressiva, HCl. Uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido foi empregada para regenerar a fase sensora e como não houve êxito, pode-se dizer que a resposta frente a íons Cd(II) é irreversível nestas condições, o que torna inviável a continuidade da avaliação deste ligante. Por esta razão, os estudos envolvendo este reagente luminescente foram encerrados.

3.3. AVALIAÇÃO DO REAGENTE LUMINESCENTE $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$

3.3.1. CARACTERÍSTICAS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Complexos de metais de transição luminescentes, como os de Ru(II), com diferentes grupos substituintes são promissores no desenvolvimento de sensores ópticos. Isso porque apresentam algumas propriedades desejáveis, como forte absorção na região visível do espectro, alta estabilidade fotoquímica, elevados tempos de vida (0,1–7 μs) e rendimentos quânticos (0,04–0,5) (Demas *et al.*, 1994; Moreno-Bondí *et al.*, 1998; Demas *et al.*, 2002; Orellana *et al.*, 1999). Além destas características, seus máximos de absorção estão em torno de 450 nm e de emissão em 590 nm, dependendo dos ligantes e do meio em que se encontram (McGaughey *et al.*, 2006).

Com base nestas propriedades, avaliou-se o complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$, previamente sintetizado no GSOLFA, com a finalidade de se obter uma fase sensora para íons metálicos. Sua estrutura molecular está apresentada na Figura 3.5.

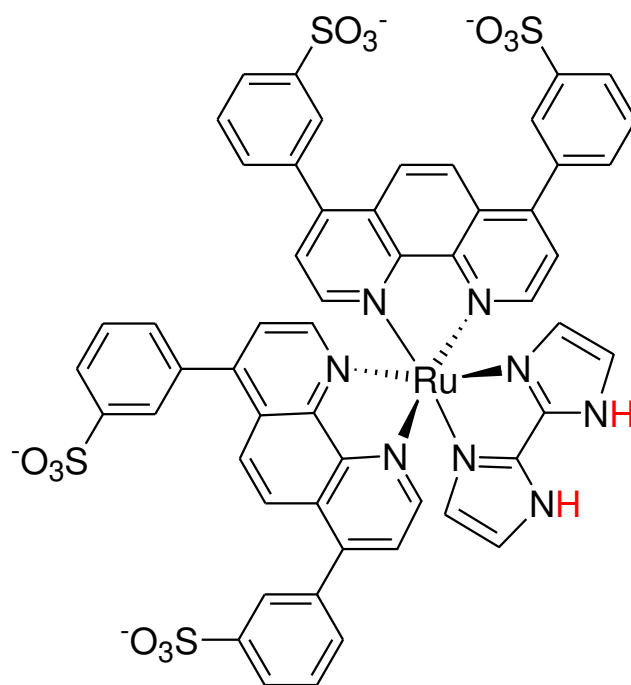


Figura 3.5. Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$, onde o grupo s2d corresponde a (1,10-fenantrolina-4,7-di-il)bis(benzenosulfonato) e bim: 2,2'-biimidazol.

3.3.2. CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE EM SOLUÇÃO

Assim como o ligante ZOX, este complexo de Ru(II) foi caracterizado em solução com a obtenção de espectros de absorção e emissão. Devido à elevada solubilidade em água, esta caracterização foi realizada em solução aquosa. Os espectros de absorção forneceram uma banda larga em torno em 495 nm, comprimento de onda empregado para o cálculo da absorvidade molar, que foi igual a $4,51 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Avaliou-se, ainda, o comportamento em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0, 5,6, 7,0 e 9,0). Para tal estudo, empregou-se soluções de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $2,20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparadas nestes valores de pH. Nestes meios, observou-se que o aumento de pH provocou uma diminuição brusca na intensidade de emissão do ligante.

Em estudos preliminares foi demonstrado que este reagente luminescente reage de maneira seletiva com íons Cu(II). Por esta razão, os testes iniciais apresentados no próximo item foram realizados com este metal.

3.3.3. ESTUDOS COM ÍONS Cu(II)

Foram obtidos os espectros de emissão do ligante na presença de $2,19 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu(II) nos mesmos valores de pH estudados anteriormente. Avaliando-se o comportamento do complexo em função do pH, observou-se que em meio ácido os átomos de nitrogênio do grupo biimidazol estão protonados enquanto em meio básico, desprotonados, o que provoca alterações nos espectros de emissão para Cu(II). Em pH 3,0, verificou-se que o aumento da concentração de metal provocou uma diminuição da intensidade de fluorescência, caracterizando um efeito de supressão. Em pH 9,0, por outro lado, ocorre a desprotonação do grupo biimidazol, o que pode favorecer a complexação do metal. O complexo apresentou baixa intensidade de emissão, o que pode sugerir

que o grupo biimidazol também seja um supressor de sua fluorescência. Verificou-se que em pH 5,6 ocorre uma maior variação da intensidade de emissão em função da concentração do metal. Por esta razão, este valor foi eleito para os experimentos futuros com este fluoróforo.

O mesmo experimento foi realizado para $\text{Cd}(\text{II})$ e $\text{Zn}(\text{II})$, mostrando nestes casos, mudanças menos pronunciadas nos espectros de emissão quando comparadas com $\text{Cu}(\text{II})$, o que indica que são supressores menos eficientes. Para exemplificar a resposta deste fluoróforo para íons $\text{Cu}(\text{II})$, a Figura 3.6 apresenta os espectros de emissão de uma solução de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $2,59 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações deste íon.

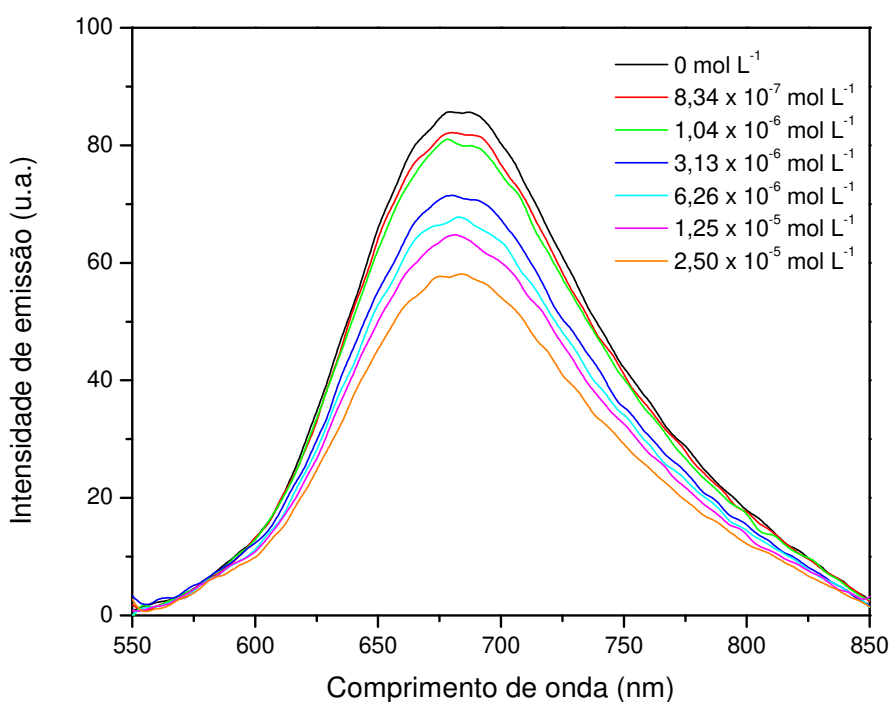


Figura 3.6. Espectros de emissão de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $2,59 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de $\text{Cu}(\text{II})$. Comprimento de onda de excitação: 490 nm, fendas de emissão e excitação: 15 e 20 nm, respectivamente e velocidade de varredura: 500 nm min^{-1} .

Observa-se que com o aumento da concentração de metal, ocorre uma diminuição da intensidade de emissão e o comprimento de onda no qual essa

variação é mais acentuada corresponde a 677 nm. Construindo-se uma curva analítica de calibração neste valor, tem-se que em solução a resposta do fluoróforo para Cu(II) é linear no intervalo de $8,34 \times 10^{-7} - 3,13 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Após a realização destes ensaios em solução, iniciou-se a avaliação de diferentes técnicas de imobilização do reagente, com a finalidade de se obter uma fase sensora estável, com elevado tempo de vida, e que possa ser utilizada para a caracterização de íons metálicos no desenvolvimento deste projeto.

3.3.4. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO EMPREGADAS

3.3.4.1. SOL-GEL

Inicialmente, foram preparadas matrizes sol-gel utilizando o agente precursor TMOS. Duas composições foram analisadas, uma denominada “rápida”, na qual o processo de geleificação se iniciou minutos após a adição de todos os componentes e outra “lenta”, cuja formação do gel tardou alguns dias. Esta segunda apresenta a vantagem de formação de poros mais bem definidos e, como consequência, geralmente oferece resultados mais satisfatórios que a anterior. A mistura reacional foi deixada em repouso à temperatura ambiente até que atingisse massa constante.

Para a preparação da composição denominada “sol-gel rápido” foram adicionados em um béquer 2,6 mL de tampão fosfato pH 7,4, 500 μL de TMOS e 200 μL de uma solução aquosa de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $4,65 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Levou-se o béquer ao ultra-som durante 1 minuto para favorecer a mistura dos componentes e após alguns minutos observou-se o início da formação do gel. Cobriu-se a extremidade do béquer com um plástico perfurado e deixou-se em repouso até atingir massa constante (15 dias), indicando que todo o solvente livre já tinha sido evaporado. Após atingir massa constante, triturou-se o vidro e separou-se as

partículas no intervalo de 100–150 μm , que foram estocadas em um frasco de vidro.

A coloração deste material após o preparo foi rosa claro e a concentração de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ igual a $7,29 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Antes de avaliar o comportamento da fase sensora, verificou-se se o complexo sofria lixiviação da matriz de sol-gel quando em contato com um fluxo de solução. Para isso, suspendeu-se uma determinada quantidade do sol-gel em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,6 e agitou-se durante 24 h. Após esse período, centrifugou-se a mistura e analisou-se o espectro de emissão do sobrenadante, que foi comparado com um espectro “branco” (solução tampão). Este espectro do sobrenadante apresentou a banda de emissão característica do complexo, indicando que o mesmo lixiviou-se da matriz de sol-gel. Por esta razão, este material não foi avaliado.

A composição do “sol-gel lento”, por sua vez, foi preparada a partir da mistura de 1,00 mL de TMOS, 1,25 mL de tampão fosfato pH 7,4, 60 μL de HCl $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e 40 μL de uma solução aquosa de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $4,65 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após a mistura de todos os componentes, cobriu-se o béquer com um filme plástico e, transcorrido alguns dias, iniciou-se o processo de formação do gel. Após 15 dias, a massa estava constante, triturou-se e peneirou-se o vidro no intervalo de tamanho de partículas de 100–150 μm .

Depois de preparado e triturado, a coloração deste sol-gel era rosa escuro, provavelmente devido à elevada concentração de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ nesta matriz, $1,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Assim como para a outra composição, seguiu-se o mesmo procedimento para avaliar a lixiviação do reagente da matriz. Verificou-se a partir do espectro de emissão do sobrenadante que ocorre pouca lixiviação do indicador e, por esta razão, esta composição foi adicionalmente avaliada. Os experimentos foram conduzidos em pH 5,6, valor no qual ocorre máxima emissão do ligante livre. Os espectros de excitação e emissão deste material em pH 5,6 são apresentados na Figura 3.7.

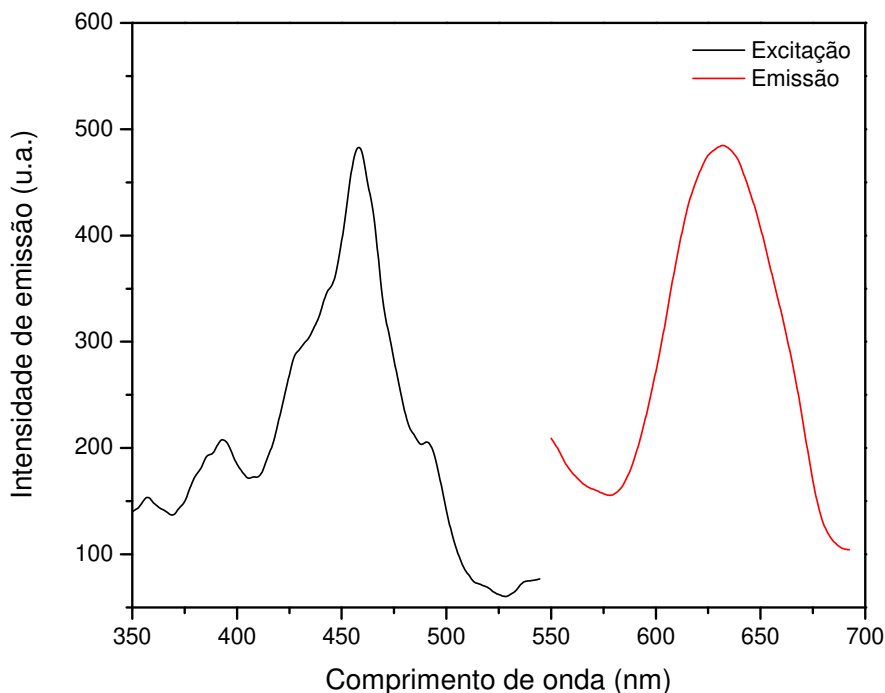


Figura 3.7. Espectros de excitação e emissão de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ imobilizado em pH 5,6. Espectro de excitação obtido com comprimento de onda de emissão de 635 nm e espectro de emissão obtido com comprimento de onda de excitação de 458 nm. Fendas de emissão e excitação: 15 nm e velocidade de varredura: 500 nm min⁻¹.

Observam-se as bandas características do complexo presentes nesta composição de sol-gel. Após a obtenção destes espectros, analisou-se seu comportamento na presença de Cu(II) em diferentes valores de pH (experimentos realizados em função do tempo). Os valores de pH analisados foram 3,0; 5,6; 7,0 e 9,0. Em todos os casos empregou-se uma solução de Cu(II) $8,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, preparada no respectivo tampão e para a regeneração da fase sensora utilizou-se uma solução EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.8.

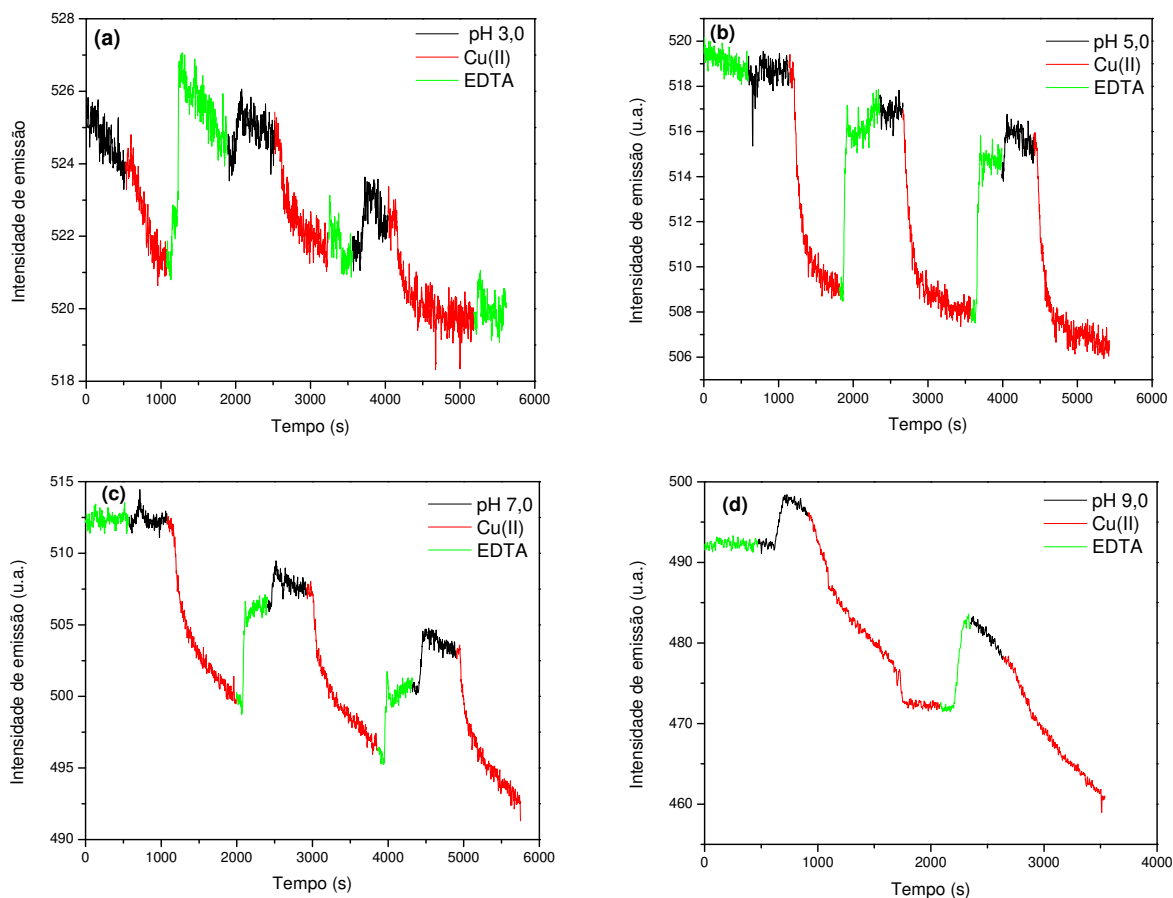


Figura 3.8. Intensidades de emissão em função do tempo para Cu(II) em diferentes valores de pH. Comprimento de onda de excitação: 458 nm, comprimento de onda de emissão: 635 nm. Fendas de emissão e excitação: 15 nm, sinal registrado a cada 2 s em: (a) pH 3,0. (b) pH 5,6. (c) pH 7,0. (d) pH 9,0.

Partindo destes resultados, observa-se que a resposta para o metal em pH 3,0 não é adequada, uma vez que há pouca variação na intensidade de emissão e, além disso, há muito ruído no sinal analítico. Em pH 5,6, por sua vez, a resposta é mais estável e reproduzível, embora a variação da intensidade de emissão ainda seja pequena (12 unidades). Por outro lado, em pH 7,0, verifica-se que o indicador sofre lixiviação da matriz de sol-gel devido à diminuição gradual da intensidade de emissão em função do tempo. E, finalmente, em pH 9,0 observa-se elevada lixiviação do complexo de Ru(II) do sol-gel.

A partir destas observações, pode-se dizer que em nenhum dos valores de pH avaliados o reagente se comporta de forma apropriada para que a fase sensora seja melhor avaliada. Por esta razão, foram encerrados os estudos com esta composição de sol-gel.

Outra formulação de sol-gel avaliada na imobilização do complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ foi baseada em trabalho proposto por Díaz-García e colaboradores (*Díaz-García et al., 2006*): (sol-gel MTMOS/TMOS/TEOS). As composições destes materiais estão apresentadas nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2. Composições das formulações de sol-gel baseadas em MTMOS, TMOS e APTEOS.

Sol-gel	MTMOS (%)	TMOS (%)	APTEOS ^a (%)
A	40	30	30
B	40	40	20
C	80	10	10
D	15	75	10
E	45	55	10
F	45	45	10
G	55	40	5
H	49	49	2

^a Reticulante

Tabela 3.3. Composições das formulações de sol-gel baseadas em MTMOS, TMOS, TEOS e APTEOS.

Sol-gel	MTMOS (%)	TMOS (%)	TEOS (%)	APTEOS (%)
I	33	33	33	1
J	50	25	25	1
K	25	25	50	1
L	25	50	25	1
M	75	12,5	12,5	1
N	12,5	75	12,5	1
O	12,5	12,5	75	1
P	40	30	30	1
Q	30	40	30	1
R	30	30	40	1
S	0	50	50	1

Antes de preparar o sol-gel com o indicador, foram preparadas as misturas dos agentes precursores e observou-se que apenas as composições **H**, **L** e **N** tardavam alguns minutos para que se iniciasse a formação do gel. As demais composições, por outro lado, se tornaram gel enquanto se misturavam os componentes. Assim, foram preparados as composições **H**, **L** e **N** utilizando-se uma solução de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As quantidades empregadas de cada componente são apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Volumes utilizados de MTMOS, TMOS, TEOS e APTEOS na preparação das composições H, L e N.

Sol gel	MTMOS (μL)	TMOS (μL)	TEOS (μL)	APTEOS (μL)
H	750	750	-	15
L	375	750	375	15
N	188	1125	188	15

Todas as composições continham, além dos precursores, 1140 μL de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, 1550 μL de etanol e 50 μL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Estas composições tardaram cerca de 10 dias para alcançar massa constante e após a obtenção do vidro, foram trituradas e peneiradas no intervalo de 100–150 μm .

Uma vez mais, realizou-se o experimento para verificar a lixiviação do indicador da matriz de sol-gel. Os materiais ficaram em contato com uma solução tampão pH 7,0 durante 24 h sob agitação e, após este período, centrifugou-se os sólidos e registraram-se os espectros de emissão dos sobrenadantes, que estão representados na Figura 3.9.

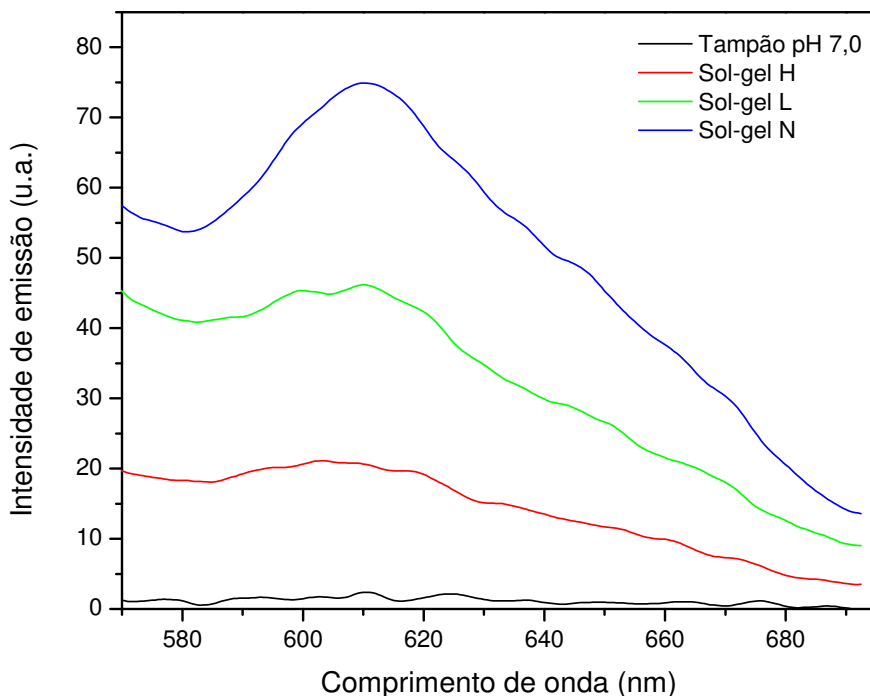


Figura 3.9. Espectros de emissão dos sobrenadantes das composições H, L e M de sol-gel. Comprimento de onda de excitação: 458 nm, fendas de emissão e excitação: 15 nm e velocidade de varredura: 500 nm min⁻¹.

A partir destes resultados, verifica-se que o complexo $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{bim})]^{2-}$ sofre lixiviação das três composições avaliadas. Comparando-se os resultados obtidos para as três composições, é observado que na H há menor lixiviação. E, por esta razão, esta composição foi melhor avaliada.

Antes de avaliar a resposta da fase sensora para os íons $\text{Cu}(\text{II})$, foram obtidos os espectros de emissão e excitação do sol-gel em solução tampão fosfato pH 5,6 e verificou-se a presença das bandas características do complexo $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{bim})]^{2-}$. O primeiro experimento realizado com esta fase sensora foi a avaliação de seu comportamento em soluções tampão de diferentes valores de pH (força iônica 0,02 mol L⁻¹) e, para tanto, utilizou-se uma solução de $\text{Cu}(\text{II})$ 1,03 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ preparada nos respectivos valores de pH. Para o registro do sinal analítico em função do tempo, empregou-se comprimento de onda de excitação

igual a 458 nm, de emissão igual a 635 nm e fendas de emissão e excitação iguais a 15 nm. Os resultados obtidos são apresentados na Fig. 3.10.

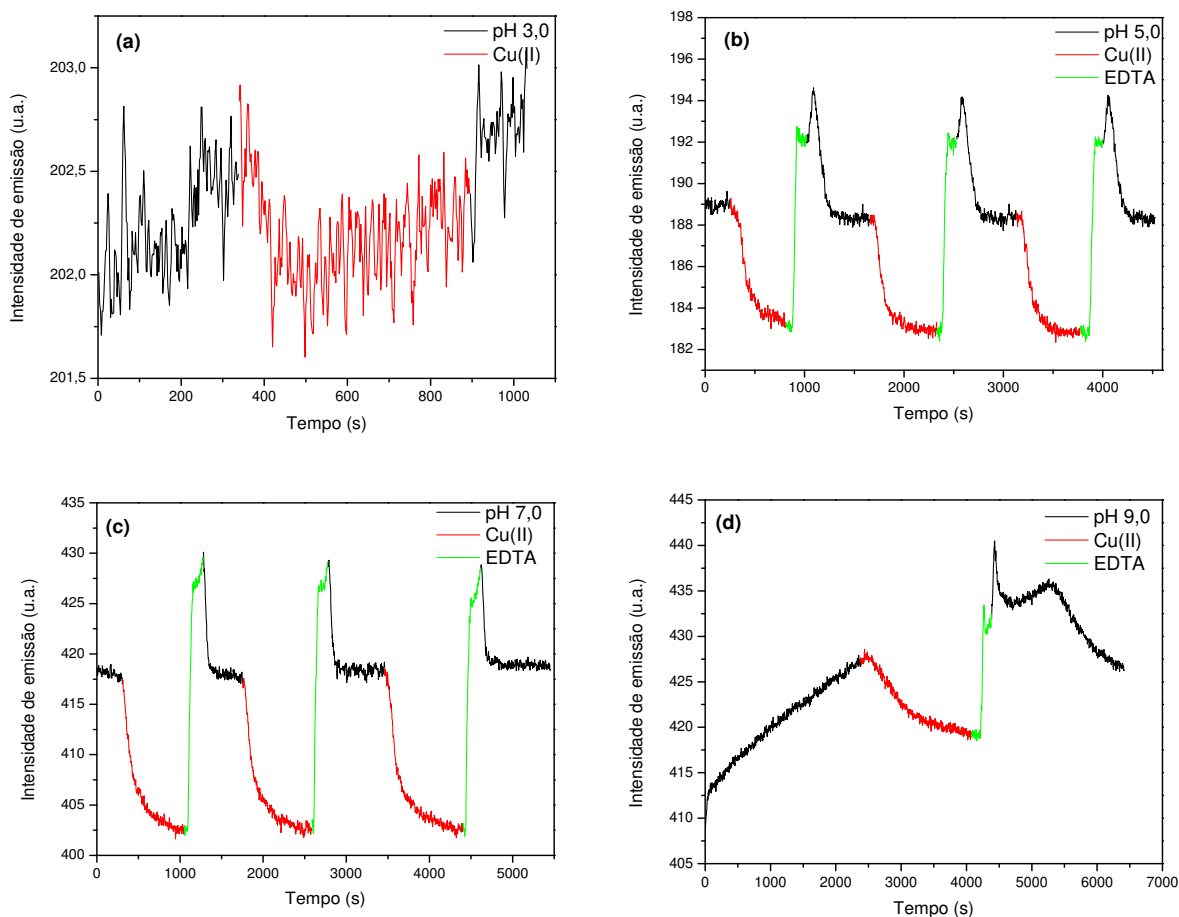


Figura 3.10. Intensidades de emissão em função do tempo para Cu(II) em diferentes valores de pH. Comprimento de onda de excitação: 458 nm, comprimento de onda de emissão: 635 nm. Fendas de emissão e excitação: 15 nm, sinal registrado a cada 2 s. (a) pH 3,0. (b) pH 5,6. (c) pH 7,0. (d) pH 9,0.

Observando-se os resultados obtidos em pH 3,0 verifica-se que não há resposta para o metal. Em pH 5,6, a resposta para íons Cu(II) é reproduzível, embora a variação de emissão de fluorescência entre a linha base e o metal pequena. Em pH 7,02, por outro lado, nota-se que a resposta desta fase sensora é adequada e a variação da intensidade de fluorescência é maior quando

comparada com aquela em pH 5,6. E, finalmente, em meio básico, observa-se que não há resposta satisfatória frente ao metal.

Devido ao fato do pH 7,0 ter apresentado os melhores resultados para a determinação dos íons $\text{Cu}(\text{II})$ $1,03 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, avaliou-se o efeito da força iônica da solução tampão para este valor de pH. Os valores empregados para tal estudo foram $5,0 \times 10^{-3}$; 0,01; 0,05 e 0,1 mol L^{-1} . Os parâmetros empregados nos experimentos em função do tempo foram: comprimento de onda de excitação: 458 nm, comprimento de onda de emissão: 635 nm, fendas de emissão e excitação: 15 nm e intervalo entre medidas de 2 s. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.11.

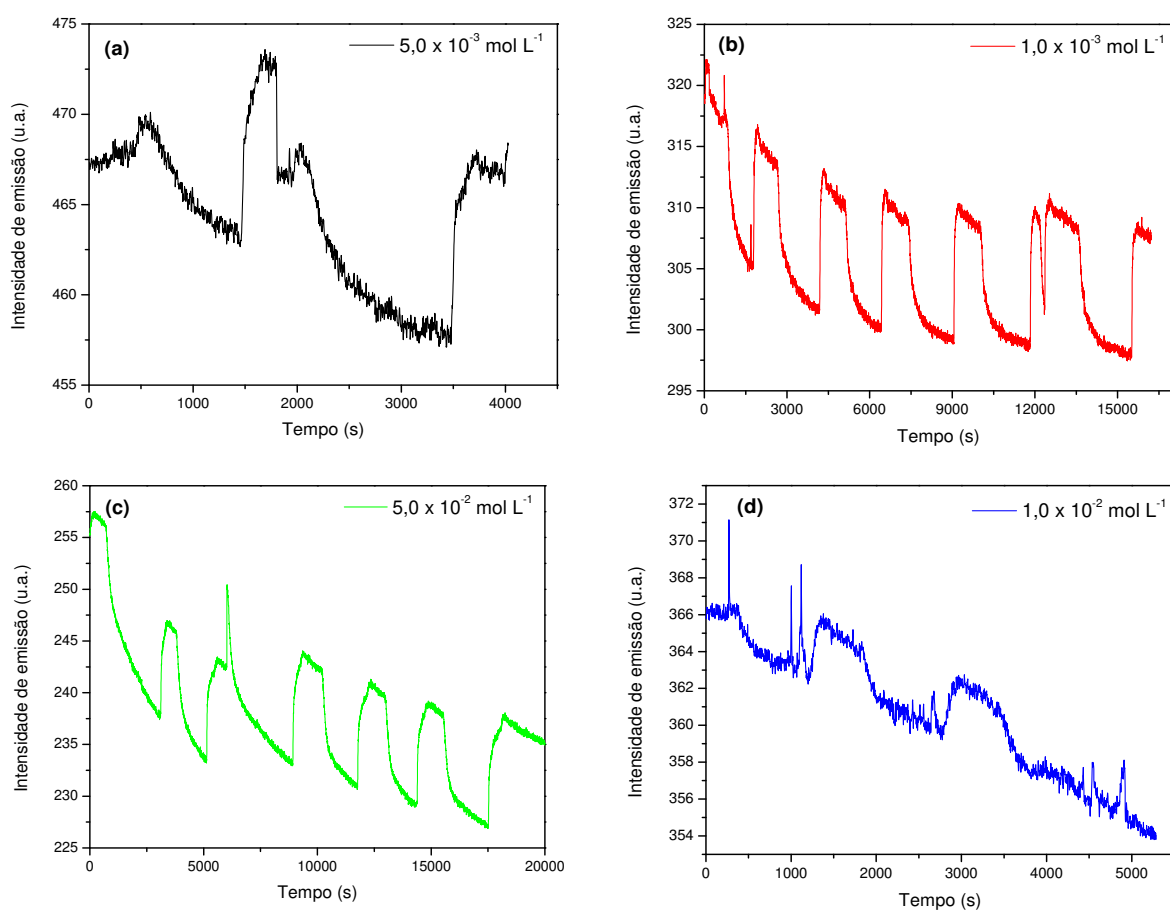


Figura 3.11. Intensidades de emissão em função da força iônica da solução tampão pH 7,0 para a resposta para $\text{Cu}(\text{II})$. Forças iônicas iguais a: (a) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Em todos os valores de força iônica avaliados, observa-se que a intensidade de fluorescência tende a diminuir e não retorna ao valor inicial, indicando que o indicador se lixivia do sol-gel. Verificou-se a partir destes gráficos que uma força iônica igual a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ é a que provoca uma maior diferença de intensidade entre a linha base (tampão) e a resposta para o analito (metal). Por outro lado, observa-se que mesmo neste valor ocorre lixiviação do reagente e, por esta razão, os estudos envolvendo esta fase sensora foram encerrados.

Outra composição de sol-gel proposta por Pagliaro (*Pagliaro et al., 2005*) foi preparada com a finalidade de verificar se o material em forma de filme fino responde de maneira satisfatória ao metal. Para a preparação desta fase sensora foram utilizados $750 \text{ }\mu\text{L}$ de TFP-TriMOS, $345 \text{ }\mu\text{L}$ de n-propil-TriMOS, $750 \text{ }\mu\text{L}$ de etanol e $40 \text{ }\mu\text{L}$ de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Separadamente, preparou-se uma solução aquosa de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $5,56 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, cuja concentração no sol-gel foi igual a $7,87 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Utilizou-se $80 \text{ }\mu\text{L}$ da mistura polimérica e $20 \text{ }\mu\text{L}$ da solução do complexo para a preparação de um filme. A técnica de deposição utilizada para esta composição foi *spin coating*, com diferentes velocidades de rotação (100, 500, 1000 e 2000 rpm) para a obtenção de filmes com diferentes espessuras. O suporte utilizado para tal deposição foi Mylar, um plástico rígido, em circunferências com o diâmetro exato da fibra óptica utilizada. Os filmes foram secos durante 24 h antes de serem utilizados. Para verificar a resposta desta fase sensora, utilizou-se uma solução de Cu(II) $2,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato pH 5,62 (força iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Para avaliar tal fase sensora junto ao espectrofluorímetro, utilizou-se uma célula de Teflon com conexões para a entrada e saída do fluxo de soluções e para o encaixe da fibra óptica.

Após a secagem dos filmes, verificou-se que aparentemente não apresentavam a coloração rosada característica do complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$, e que não havia nenhuma camada depositada, pois o filme formado era muito fino. Para verificar se estava depositado ou não o sol-gel, registrou-se espectros de excitação e emissão e verificaram-se as bandas características do complexo, com máximo de intensidade de emissão em 615 nm e excitação em 460 nm.

Para a avaliação da resposta desta fase sensora para íons $\text{Cu}(\text{II})$, realizou-se um experimento em função do tempo, no qual a concentração de $\text{Cu}(\text{II})$ analisada foi igual a $2,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para esta fase sensora, não houve resposta adequada para o analito, possivelmente porque o filme obtido é muito fino e, como consequência, contém pouca quantidade de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$, o que prejudica a sensibilidade desta fase sensora. Por esta razão, este sol-gel foi descartado de futuros ensaios.

Outra tentativa de obtenção de sol-gel na forma de filmes foi realizada empregando-se um ormosil, com o uso dos seguintes componentes MTriEOS, TEOS, NH_4OH e etanol. Foram utilizados como suportes placas de vidro (diâmetro igual a 10 mm) previamente ativadas. O procedimento para a ativação das placas de vidro consistiu em submetê-las a solução metanólica de KOH 10% durante 30 minutos. Após este período, foram lavadas com água deionizada e, em seguida, secas com um fluxo de N_2 e imersas em solução HCl 1 mol L^{-1} em um banho a 70°C durante 30 minutos. Novamente, foram lavadas com água deionizada e com acetona e secas com tolueno. Após limpas, foram utilizadas na preparação deste sol-gel. As soluções de ormosil foram preparadas utilizando várias relações entre os componentes mencionados anteriormente. A mistura contendo TEOS, MTriEOS e etanol foi levada ao ultra-som durante 10 minutos. Após a adição de NH_4OH (catalisador neste tipo de sol-gel) e $127 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (volume fixo nas três composições preparadas), a mistura foi novamente levada ao ultra-som durante 60 minutos. Foram preparadas três composições distintas e todas armazenadas à temperatura ambiente em frascos devidamente fechados durante 7 dias. Após este período, seria conveniente realizar a deposição do sol-gel nas placas de vidro previamente limpas para que pudessem ser secas a 70°C durante 24 h. As composições das 3 fases sensoras analisadas estão apresentadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Composições dos materiais ormosil preparados para a imobilização do reagente $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$.

Solução de partida	MTriEOS (μL)	TEOS (μL)	NH_4OH (μL)	EtOH (mL)
L1 ^a	118	265	500	4,2
L2 ^b	168	204	500	4,2
L3 ^c	219	142	500	4,2

^a 35% MTriEOS e 65% TEOs^b 50% MTriEOS e 50% TEOs^c 65% MTriEOS e 35% TEOs

Após sete dias de repouso das soluções, as mesmas ainda se encontravam líquidas e não em gel. O que foi realizado com estas fases sensoras foi depositá-las (50 μL) nas placas de vidro, que foram levadas à estufa a 40 °C durante 7 dias. Entretanto, não houve a formação do filme, ou seja, o ormosil ainda estava na forma líquida. Estas placas foram retiradas da estufa e mantidas à temperatura ambiente durante algumas semanas, porém ainda não se encontravam secas. Por esta razão, esta composição de sol-gel foi descartada.

Composições de sol-gel empregando o precursor TMOS foram preparadas baseando-se nos estudos de Moreno (*Moreno, 1994*). Uma das composições foi anteriormente preparada para o reagente ZOX. O procedimento para a preparação do sol-gel denominado “TMOS 1” consistiu na adição de 5,0 mL de TMOS, 6,0 mL de metanol e 2,4 mL de água em um béquer, que foi submetido à agitação mecânica durante 5 minutos. A esta mistura, adicionou-se 2,11 mg de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$, 4,6 mL de MeOH e 11 μL de NH_4OH $1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Cobriu-se o béquer com um filme plástico e o deixou em repouso à temperatura ambiente. Quando se iniciou o processo de formação do gel (3 dias), perfurou-se a cobertura plástica para facilitar a evaporação dos solventes e a obtenção de um vidro com massa constante (15–20 dias). Uma vez obtido o vidro, este foi triturado e peneirado no intervalo de 50–100 μm e lavado com solventes para verificar a

lixiviação da matriz de sílica. A concentração de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ no sol-gel foi $4,18 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Para a preparação da composição denominada “TMOS 2” foram adicionados em um béquer 1,0 mL de TMOS, 1,2 mL de metanol e 1,5 mL de água. Esta mistura foi agitada durante 5 minutos e em seguida foram adicionados 80 μL de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ $1,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, resultando em uma concentração no sol-gel de $1,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O procedimento de secagem e trituração do material foi o mesmo descrito anteriormente.

Uma vez mais, foram obtidos os espectros de emissão dos sobrenadantes destes materiais para avaliar se o complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ se lixiviava destas matrizes e verificou-se que em ambas as composições ocorreu lixiviação do reagente. Por essa razão, não se prosseguiu com a avaliação destas fases sensoras.

3.3.4.2. FILMES DE METACRILATO

Outra alternativa no desenvolvimento de filmes finos na imobilização do complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ foi o emprego de membranas de metacrilato. Duas formulações distintas foram preparadas, nas quais seus componentes e quantidades utilizados estão apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Composições das membranas de metacrilato preparadas para a imobilização do $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$.

Componente	Composição	
	Filme 1	Filme 2
MBAA (mg)	50	40
MAA ^a (μL)	50	-
MCA (mg)	35	-
HEMA (μL)	50	50
ABDV ^b (mg)	10	10
PFM (μL)	-	35
dipVBA (mg)	-	40
DMSO (μL)	200	200
$[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ (mg)	0,27	0,21
$[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ (mol L ⁻¹)	0,018	0,014

^a Monômero funcional

^b Iniciador

Depois de preparadas as misturas, utilizou-se 3,0 μL de cada composição para preparar uma membrana. Após o depósito sobre uma placa de vidro, colocou-se uma folha de Mylar sobre a membrana, que foi levada à estufa (60 °C) durante aproximadamente 8 h. Passado este período, retirou-se a folha de Mylar, para que a mesma pudesse ser analisada.

O filme 1 se apresentou bastante heterogêneo depois de preparado, com a presença de muitas bolhas em sua superfície. Por outro lado, o filme 2 se apresentou homogêneo e com coloração levemente vermelha. Para utilizar esta fase sensora foi necessário o uso de uma célula de medida de Teflon, contento orifícios para encaixar a placa de vidro e também a fibra óptica empregada. O espectro de emissão deste filme seco apresentou a banda característica do complexo em 612 nm. Quando o experimento foi realizado na presença de Cu(II),

esta fase sensora não respondeu adequadamente e, por esta razão, foi descartada de posteriores avaliações.

3.3.4.3. MEMBRANAS COMERCIAIS IMMOBILON

Uma grande dificuldade encontrada nas técnicas de imobilização do complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ foi neutralizar as 3 cargas negativas (grupos SO_3^-) presentes em sua estrutura. Acredita-se que é esta a razão pela qual nenhuma das imobilizações anteriores foi bem-sucedida. Desta maneira, uma última tentativa de trabalhar com este complexo foi imobilizá-lo de maneira física em membranas comerciais de Immobilon- Ny^+ . Estas membranas de nylon são carregadas positivamente, o que sugere que ocorrerá uma atração eletrostática entre seus grupos positivos e os grupos sulfonatos do complexo.

O procedimento para preparar estas membranas consistiu em pesar aproximadamente 1,0 mg de $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ e dissolvê-lo em 1,5 mL de água. Este volume foi separado em 3 porções de 500 μL e em cada frasco introduziu-se uma membrana de 0,7 cm de diâmetro. Agitaram-se os frascos durante 24 h para que o complexo se adsorvesse na membrana. Após este período, as membranas foram secas em estufa durante 1 h a 80 $^\circ\text{C}$. Através da coloração do sobrenadante (totalmente incolor), pode-se dizer que houve a adsorção total do indicador pela membrana. As medidas de fluorescência foram realizadas em uma célula de medidas, com o uso de um vidro do mesmo diâmetro da membrana para suportá-la e com o emprego de fibras ópticas bifurcadas.

Embora as membranas apresentassem coloração vermelha intensa e de não ocorrer lixiviação do reagente adsorvido, não se observaram respostas frente aos íons $\text{Cu}(\text{II})$. A única resposta observada neste caso foi em relação ao pH do meio, muito embora a resposta não seja adequada, visto que houve um aumento gradual na intensidade de emissão.

Após diversas tentativas de se imobilizar o complexo $[\text{Ru}(\text{s2d})_2(\text{bim})]^{2-}$ chegou-se à conclusão de que o mesmo não apresenta características adequadas para ser utilizado neste trabalho, ou seja, a presença das 3 cargas negativas influencia de maneira significativa o comportamento do reagente imobilizado. Além disso, a lixiviação observada em praticamente todas as estratégias avaliadas se deve ao fato de ser um complexo altamente solúvel em meio aquoso. As diversas técnicas de imobilização avaliadas não foram capazes de fornecer resultados satisfatórios para o propósito deste trabalho. O complexo responde a $\text{Cu}(\text{II})$, mas como pôde ser observado nos estudos iniciais em solução, a sensibilidade não é muito elevada. Desta forma, os estudos com este complexo de $\text{Ru}(\text{II})$ foram encerrados.

3.4. AVALIAÇÃO DO REAGENTE LUMINESCENTE bpySOH

3.4.1. CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE EM METANOL

Ligantes com grupos contendo átomos doadores de elétrons, como nitrogênio, apresentam grande afinidade para complexar íons metálicos. Com este propósito, avaliou-se o ligante (4-[2-4'-metil-[2,2']bipiridil-4-il]-vinil)-fenol, cuja estrutura é apresentada na Figura 3.12.

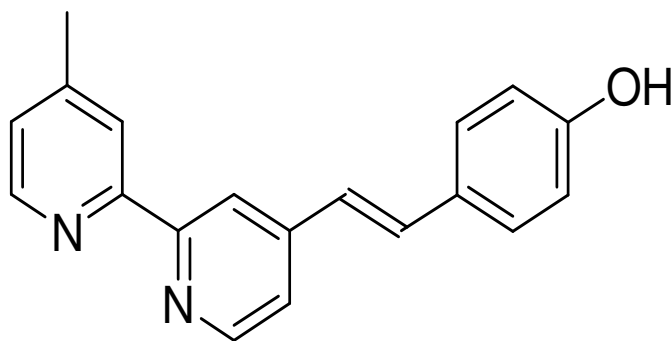


Figura 3.12. Estrutura do ligante bpySOH.

Sua massa molar é $288,34 \text{ g mol}^{-1}$, é solúvel em solventes orgânicos e, por esta razão, os estudos com este reagente foram realizados em metanol. Para a estimativa da absortividade molar através da curva analítica de calibração, foram obtidos espectros de absorção em diferentes concentrações. A Figura 3.13 apresenta a primeira réplica ($n=3$) para estes espectros e a curva analítica obtida em 336 nm e, por fim, a Figura 3.14, os espectros de emissão e excitação para as soluções utilizadas na construção desta curva.

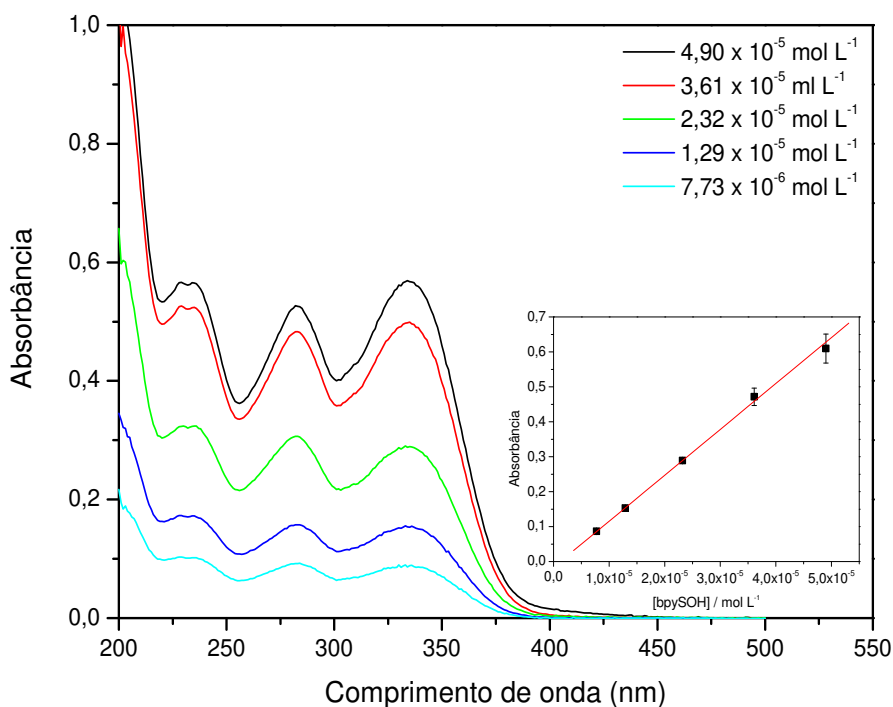


Figura 3.13. Espectros de absorção para diferentes concentrações de bpySOH em metanol a 25 °C e a respectiva curva analítica de calibração obtida em 336 nm.

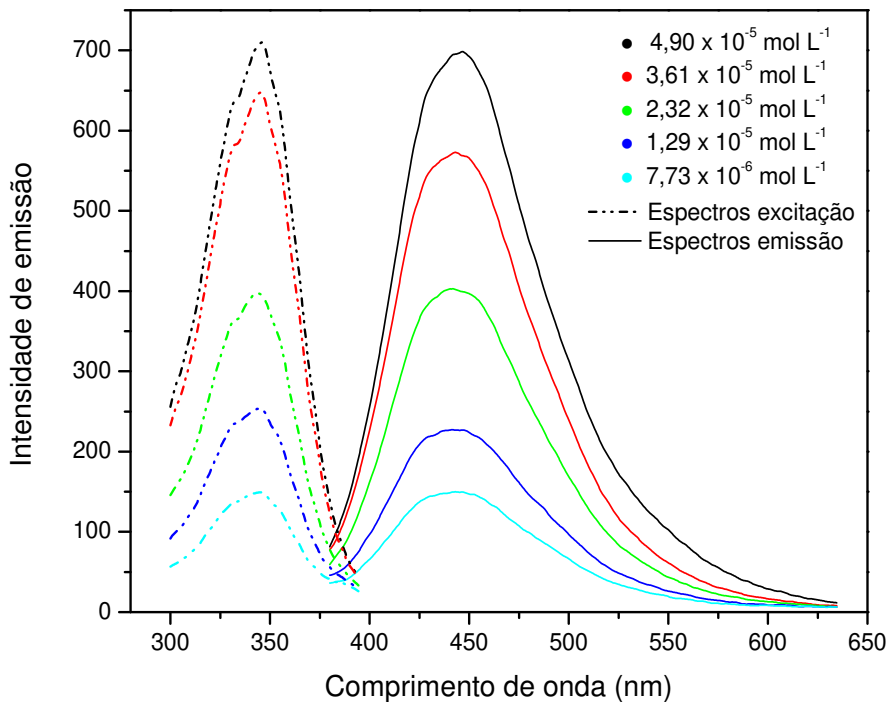


Figura 3.14. Espectros de excitação e emissão para soluções de bpySOH em metanol. Comprimento de onda de excitação: 336 nm, comprimento de onda de emissão: 440 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm e velocidade de varredura: 500 nm min^{-1} .

A partir dos espectros de absorção e da respectiva curva analítica, o valor da absortividade molar em 336 nm e a 25 °C calculado foi $1,29 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Observa-se, a partir dos espectros de emissão, que há uma relação linear de intensidade de emissão com a concentração do fluoróforo e, além disso, os espectros de excitação correspondem aos espectros de absorção.

Para calcular o valor do tempo de vida em função da concentração de bpySOH, soluções de diferentes concentrações do ligante foram preparadas e seus tempos de vida foram determinados empregando-se o espectrofluorímetro *Horiba Jobin Yvon Fluoromax 4* (equipado com fonte de diodo laser Horiba Nano-370 (700 ps, 370 nm, pulsos a 500 KHz). Os decaimentos de fluorescência foram medidos com uma janela de 200 ns (4096 canais) pelo acúmulo de 1000 pontos no pico. Os tempos de vida de emissão foram extraídos com ajustes exponenciais. Na Tabela 3.7 são apresentados os valores para as distintas concentrações avaliadas.

Tabela 3.7. Valores de τ para soluções de bpySOH de diferentes concentrações.

[bpySOH] (mol L^{-1})	τ (ns)
$1,24 \times 10^{-6}$	3,56
$3,01 \times 10^{-6}$	3,51
$6,02 \times 10^{-6}$	3,49
$1,24 \times 10^{-5}$	3,48
$3,00 \times 10^{-5}$	3,45
$6,01 \times 10^{-5}$	3,42

Observa-se que não há diferenças significativas entre os valores de tempo de vida em distintas concentrações de ligante.

Outro fator verificado foi a influência do oxigênio dissolvido, uma vez que sua presença pode afetar o tempo de vida de um fluoróforo. Para tal, uma solução de bpySOH em metanol foi preparada e seu valor de tempo de vida medido (3,45

ns). Em seguida, a solução foi mantida sob fluxo de argônio durante 20 minutos. Transcorrido este período, mediu-se novamente este parâmetro, cujo valor foi igual a 3,59 ns. Como pode ser verificado através destes valores, o oxigênio dissolvido não influencia este parâmetro e, assim, não se faz necessário o emprego de atmosfera inerte para a realização de experimentos com este ligante.

Para verificar o comportamento do reagente luminescente em outros solventes, além de metanol, soluções de bpySOH $3,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em tolueno, éter dietílico, diclorometano e acetonitrila, sendo que o ligante mostrou-se solúvel somente em acetonitrila. O tempo de vida do estado excitado neste solvente foi de 5,42 ns, contra 3,51 ns em metanol.

Um valor de tempo de vida maior significa uma maior estabilidade do estado excitado e isso pode ser justificado pelas propriedades do solvente empregado. Neste caso, tem-se que a acetonitrila é um solvente aprótico dipolar, enquanto que o metanol é anfiprótico. Devido a estas diferenças, o ligante comporta-se distintamente em cada solvente.

3.4.2. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES bpySOH–METAIS EM METANOL

3.4.2.1. SELETIVIDADE FRENTE A METAIS PESADOS

Para avaliar o comportamento do ligante na presença dos metais Cd(II), Cu(II), Hg(II), Ni(II) e Zn(II), foram preparadas misturas em metanol contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de bpySOH e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dos íons metálicos, ou seja, o dobro da concentração de ligante. Os espectros de absorção e emissão dos complexos metálicos estão apresentados nas Figuras 3.15 e 3.16.

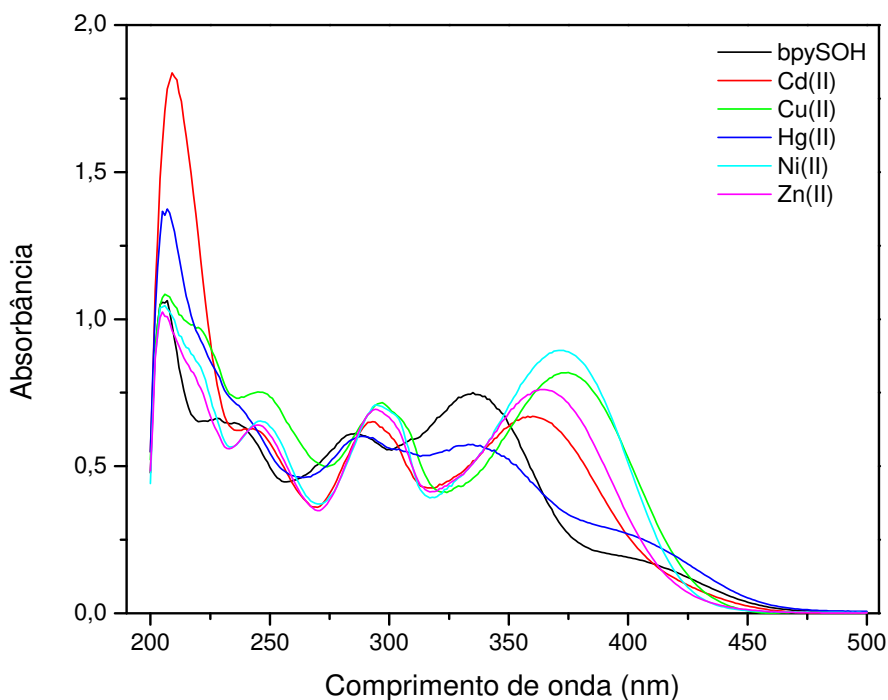


Figura 3.15. Espectros de absorção obtidos em metanol de uma solução de bpySOH na presença de diferentes metais pesados.

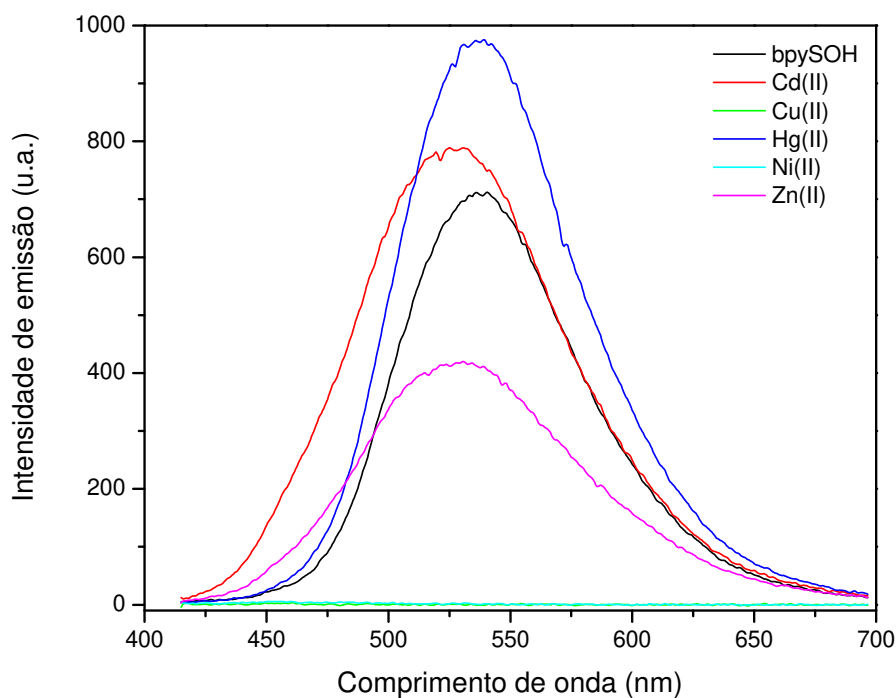


Figura 3.16. Espectros de emissão de bpySOH na presença de diferentes íons metálicos obtidos em metanol. Comprimento de onda de excitação: 336 nm, fendas de emissão e excitação: 6,0 nm e velocidade de varredura: 500 nm min⁻¹.

A partir dos espectros de absorção representados na Figura 3.15, verifica-se que aqueles referentes aos complexos metálicos são distintos quando comparados com o ligante livre. Para todos os íons metálicos é observado um deslocamento batocrômico em relação à banda de 336 nm, cuja extensão depende do íon.

Os perfis e intensidades dos espectros de emissão, ilustrados na Figura 3.16, são distintos dependendo do metal. Cd(II) e Hg(II) (metais moles) aumentam ligeiramente a intensidade de fluorescência do ligante, enquanto Zn(II), Cu(II) e Ni(II) (metais duros) atuam como supressores da fluorescência (os dois últimos íons apresentam um efeito significativo, com a intensidade de emissão atingindo um valor próximo a zero). Essas diferenças observadas nos dois tipos de espectros fazem do bpySOH um ligante apropriado para a determinação simultânea de íons metálicos.

De acordo com as distintas facilidades de redução dos íons metálicos investigados, uma transferência de elétron foto-induzida (*PET, photo-induced electron transfer*) do grupo bipyridina fenólico do ligante para o íon metálico coordenado, seria de se esperar particularmente eficiente para Hg(II), Cu(II) e Ni(II) (isto é, maior facilidade para reduzir íons). A coordenação de Hg(II) não leva à supressão da fluorescência em solução. Na ausência de um estudo fotoquímico mais detalhado (que não é o objetivo desta Tese), especula-se que nas condições experimentais da Figura 3.16, o grupo fenol redutor do fluoróforo bpySOH é totalmente coordenado para Hg(II), impedindo, com eficiência, o mecanismo de desativação PET. A coordenação do grupo fenol para os demais íons metálicos seria menos favorável e a coordenação pelo grupo bipyridina prevalece. A observância do mecanismo PET após a imobilização em sol-gel (como apresentado neste trabalho) suporta esta hipótese.

3.4.2.2. CÁLCULOS DAS ESTEQUIOMETRIAS DE COMPLEXAÇÃO COM OS ÍONS METÁLICOS

Diferentes são os métodos para o cálculo de estequiometria de complexos metálicos. Um comumente empregado é o *Método da Razão Molar*, que consiste em variar a concentração de metal, M , ou do ligante L , mantendo fixa a concentração do outro componente para a obtenção de espectros de absorção. Representam-se os valores de absorbância em um determinado comprimento de onda frente à relação C_M/C_L ou C_L/C_M , conforme seja L ou M que se mantém constante.

Nesta representação, observa-se um ponto no qual há uma mudança brusca na inclinação, que corresponde à máxima concentração de complexo que se pode formar para uma dada concentração de M e L . Este ponto coincidirá com a relação estequiométrica do sistema sempre que o complexo estiver pouco dissociado; no caso que tenha uma constante aparente de dissociação elevada, o ponto estequiométrico que corresponde à relação M/L ou L/M (segundo a série representada) se obtém por extrapolação das retas da curva até alcançar o ponto de intersecção dos dois intervalos. Para todos os íons metálicos, este foi o método empregado na estimativa da estequiometria de complexação.

Para o cálculo da estequiometria de complexação com Cd(II) com o emprego do método da razão molar, inicialmente variou-se a concentração de metal de 0 a 4,67 vezes a concentração de bpySOH, que foi mantida fixa em $3,51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros de absorção e a respectiva curva de absorbância *versus* C_M/C_L em 336 nm estão representadas na seqüência.

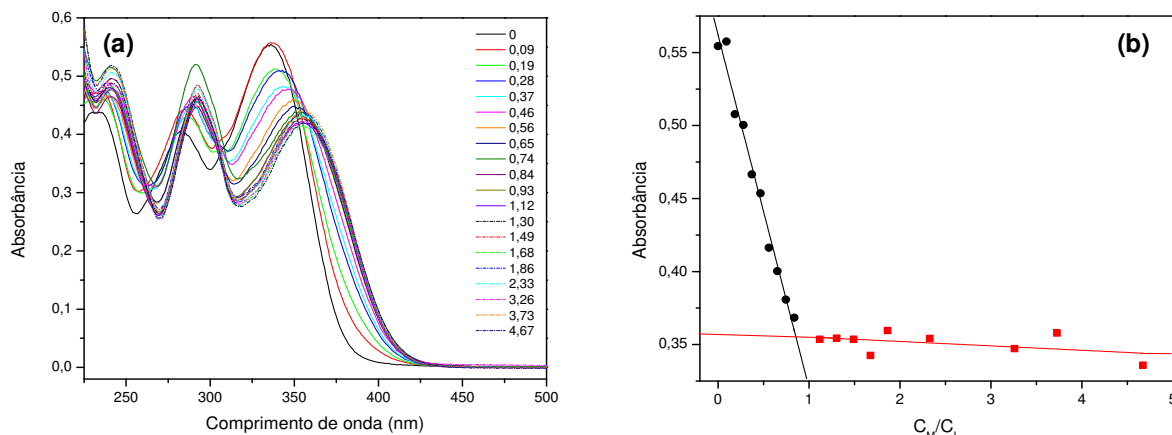


Figura 3.17. (a) Espectros de absorção para soluções de bpySOH $3,51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ contendo incrementos crescentes de Cd(II). **(b)** Variação da absorbância em função da relação $[\text{Cd(II)}]/[\text{bpySOH}]$ em 336 nm.

Como é possível observar através dos espectros apresentados na Figura 3.17 a, as bandas com maiores valores de absorbância correspondem a 284 e 336 nm, que foram empregadas no cálculo da estequiometria de complexação. Os resultados obtidos em 284 nm não forneceram informações adequadas, enquanto em 336 nm a estequiometria do complexo foi observada, uma vez que fica clara a formação de um complexo ML, pois o ponto de intersecção entre as duas retas é muito próximo de 1, como mostra a Figura 3.17 b. Assim sendo, a estequiometria de complexação para bpySOH:Cd(II) é de 1:1.

O experimento realizado com a variação da concentração de bpySOH e mantendo-se fixa a de Cd(II) ($3,04 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) não forneceu resultados satisfatórios, uma vez que foi observado um aumento contínuo nos valores de absorbância e, por essa razão, para os outros metais, realizou-se somente o experimento variando-se a concentração de metal e mantendo-se fixa a de bpySOH.

Para a determinação da estequiometria com Cu(II), variou-se a concentração de metal de 0 a 2,43 vezes a concentração de bpySOH, que foi mantida fixa e igual a $3,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Na Figura 3.18 estão representados os

espectros de absorção para diferentes relações $[\text{Cu}(\text{II})]/[\text{bpySOH}]$ e a variação de absorbância em função da relação C_M/C_L .

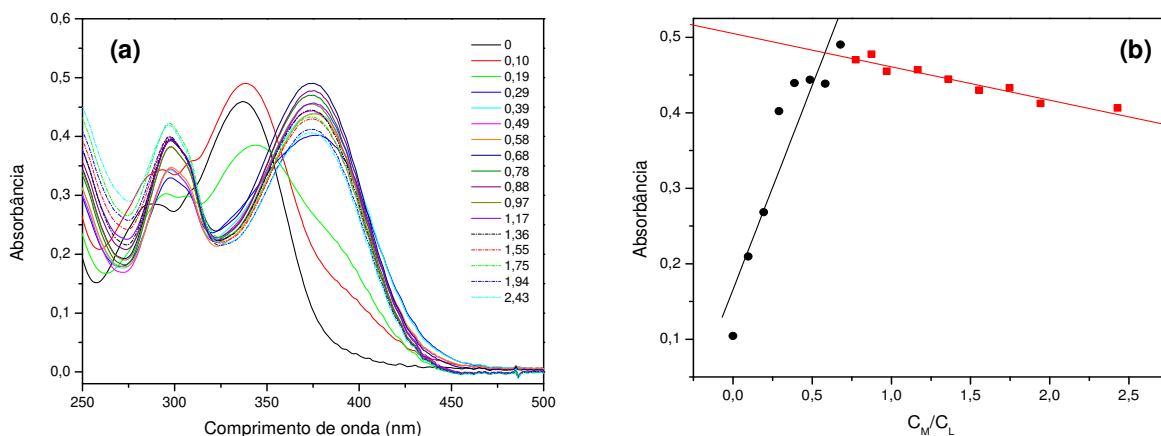


Figura 3.18. (a) Espectros de absorção para soluções de bpySOH $3,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ contendo incrementos crescentes de Cu(II). (b) Variação da absorbância em função da relação $[\text{Cu}(\text{II})]/[\text{bpySOH}]$ em 375 nm.

Observa-se que com o aumento da concentração de Cu(II), ocorre um deslocamento do comprimento de onda no qual há máxima absorção, de 336 nm para 375 nm, valor que foi empregado para o cálculo da estequiometria de complexação, como mostra a Figura 3.18 b. Observa-se que a intersecção das duas curvas se dá em uma relação C_M/C_L aproximadamente igual a 0,5, indicando a formação de um complexo bpySOH:Cu(II) com estequiometria 2:1.

Para o complexo de Hg(II), variou-se a concentração de metal de 0 a 2,11 vezes a de bpySOH. Os espectros de absorção e a curva que indica a estequiometria deste complexo estão representados na Figura 3.19.

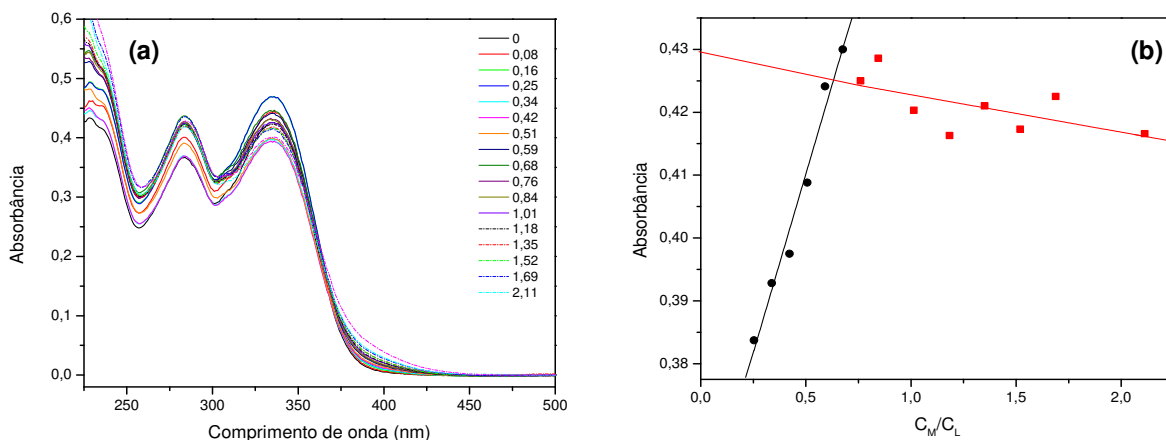


Figura 3.19. (a) Espectros de absorção para soluções contendo diferentes relações bpySOH/Hg(II). **(b)** Variação da absorbância com incrementos de Hg(II) a 284 nm, mantendo fixa a concentração de bpySOH em $3,54 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Como é possível observar através dos espectros de absorção, as bandas com maiores valores de absorbância correspondem a 284 e 336 nm, que foram empregados no cálculo da estequiometria de complexação. Os resultados obtidos em 336 nm não forneceram informações úteis, entretanto, em 284 nm, a estequiometria do complexo foi observada, como mostra a Figura 3.19 b. A intersecção entre as duas retas está em um valor de C_M/C_L igual a 0,5, o que corresponde a estequiometria do complexo bpySOH:Hg(II) igual a 2:1.

Realizando-se o mesmo experimento empregado para os metais anteriores e mantendo-se a concentração de bpySOH igual a $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, variou-se a concentração de Ni(II) de 0 a 2,43 vezes a de bpySOH. A seguir são apresentados os espectros de absorção e a curva absorbância em função de C_M/C_L .

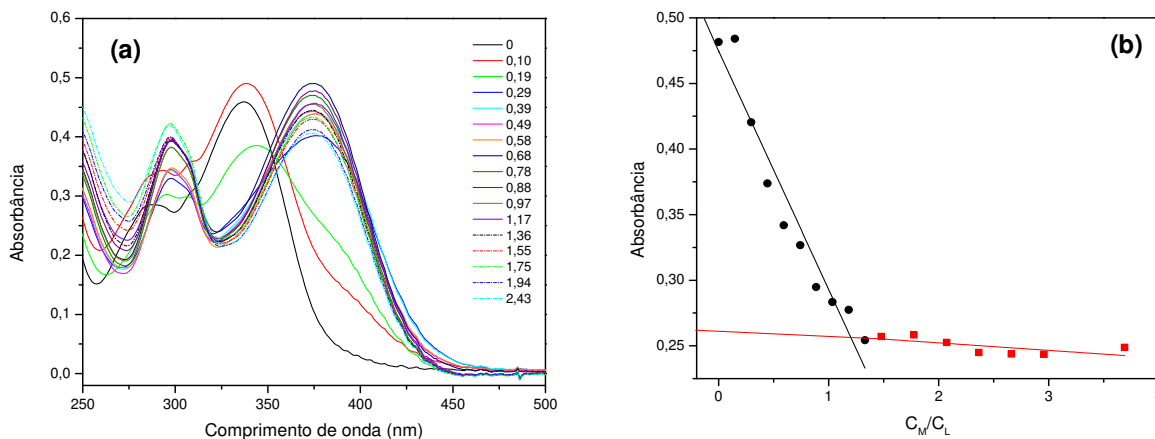


Figura 3.20. (a) Espectros de absorção para soluções contendo diferentes relações bpySOH/Ni(II). (b) Variação da absorbância com incrementos de Ni(II) a 335 nm, mantendo fixa a concentração de bpySOH em $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Para o complexo de Ni(II), o comportamento observado é similar àquele para Cd(II), ou seja, há a formação do complexo de estequiometria 1:1.

Para a determinação da estequiometria de complexação do Zn(II), variou-se sua concentração de 0 a 6,06 vezes a concentração do ligante, que foi mantida fixa em $3,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros de absorção e a respectiva curva absorbância *versus* C_M/C_L em 365 nm estão representadas na Figura 3.21.

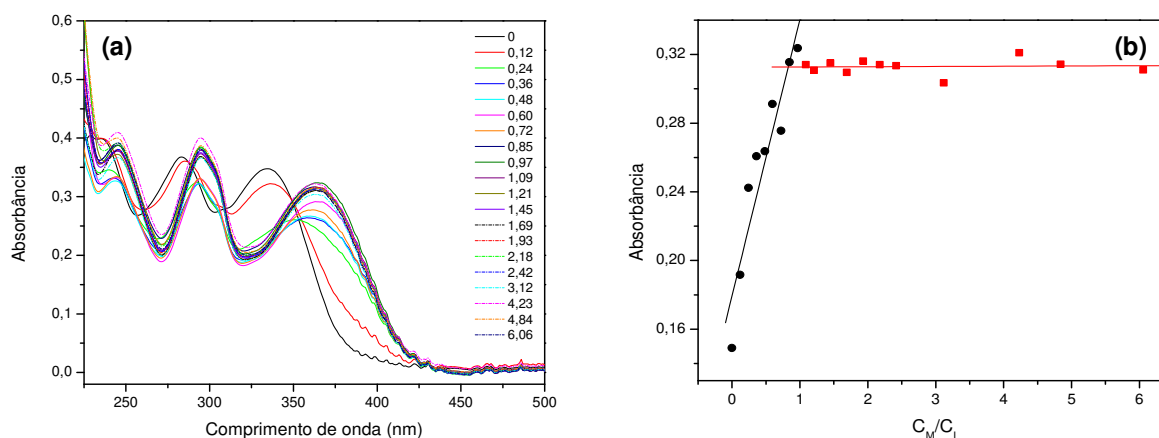


Figura 3.21. (a) Espectros de absorção para soluções contendo diferentes relações bpySOH/Ni(II). (b) Variação da absorbância com incrementos de Zn(II) a 365 nm, mantendo fixa a concentração de bpySOH em $3,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Através da Figura 3.21 b observa-se que a intersecção entre as duas retas ocorre em um valor de C_M/C_L aproximadamente igual a 1, o que indica a formação de um complexo bpySOH:Zn(II) com estequiometria 1:1. A Tabela 3.8 apresenta os valores de estequiometrias de complexação determinados para cada metal.

Tabela 3.8. Valores de estequiometria de complexação calculados para os complexos metálicos formados com bpySOH.

Metal	bpySOH:M(II)
Cd(II)	1:1
Cu(II)	2:1
Hg(II)	2:1
Ni(II)	1:1
Zn(II)	1:1

3.4.2.3. CÁLCULO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE

Para estes cálculos, empregaram-se os mesmos espectros de absorção apresentados anteriormente e foi utilizada uma ferramenta computacional Hyperquad 2006 (*Protonic Software, www.hyperquad.co.uk*). Hyperquad 2006 é um programa que fornece (i) um sistema para simular curvas de titulação e (ii) um sistema para fornecer diagramas de especiação. Os cálculos referem-se a equilíbrios em solução e não há restrições quando ao número de espécies que podem estar presentes ou o número de complexos que podem ser formados.

Os valores de constante de associação de cada complexo são apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Valores de constante de estabilidade dos complexos metálicos em metanol. ($[\text{bpySOH}] = 3,05 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Metal	K
Cd(II)	$7,44 \times 10^3$
Cu(II)	$2,79 \times 10^8$
Hg(II)	$1,98 \times 10^7$
Ni(II)	$1,21 \times 10^4$
Zn(II)	$3,88 \times 10^7$

Observa-se que os complexos de Cu(II) e Zn(II) são mais estáveis quando comparado com os demais, fato que será melhor explorado posteriormente. A estabilidade dos complexos metálicos obedece à série de Irving-Williams, que ordena as constantes de formação para os cátions M(II): $\text{Ni(II)} < \text{Cu(II)} > \text{Zn(II)}$. Essa ordem é relativamente insensível à escolha dos ligantes (*Shriver & Atkins, 2003*).

3.4.2.4. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COMPLEXOS METÁLICOS

Este experimento é de grande importância, uma vez que fornece informações sobre o tipo de desativação da fluorescência que ocorre com as reações de complexação.

O experimento foi realizado mantendo-se fixa a concentração de bpySOH em $3,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e incrementos de uma solução de metal $7,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados nesta solução e os perfis de tempo de vida obtidos. Os valores de tempo de vida foram determinados para Cu(II), Hg(II) e Zn(II) devido ao fato de experimentos preliminares indicarem que somente para estes metais a resposta da fase sensora baseada em sol-gel foi reversível. Verificou-se que os valores de

tempo de vida não são alterados com o aumento da concentração de metal, indicando que a supressão da intensidade de fluorescência decorrente da interação entre metal e ligante é do tipo estática. Na Tabela 3.10 são apresentados os valores de tempos de vida dos complexos metálicos.

Tabela 3.10. Valores de tempo de vida de fluorescência de bpySOH na presença de diferentes concentrações de metais.

[M(II)] (mol L ⁻¹)	τ (ns)		
	Cu(II)	Hg(II)	Zn(II)
0	3,67	3,65	3,98
$1,50 \times 10^{-6}$	3,63	3,68	3,95
$3,50 \times 10^{-6}$	3,64	3,63	3,96
$7,50 \times 10^{-6}$	3,71	3,84	3,90
$1,00 \times 10^{-5}$	3,69	3,76	4,05
$1,50 \times 10^{-5}$	3,73	3,61	4,17

Com estes experimentos, encerrou-se a avaliação das interações metal–bpySOH em solvente orgânico (metanol). A seguir serão apresentados os resultados obtidos na caracterização do ligante livre e dos complexos em meio aquoso tamponado.

3.4.3. CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE EM MEIO AQUOSO

O meio aquoso selecionado para a avaliação do comportamento do ligante em função do pH foi a solução tampão Britton-Robinson com força iônica igual a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de pH 2,0–12,0.

Os espectros de absorção e emissão (obtidos com comprimento de onda de excitação: 336 nm, fendas de emissão e excitação: 15 nm e velocidade de

varredura: 500 nm min^{-1}) de soluções de bpySOH $2,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparadas em cada valor de pH estão apresentados nas Figuras 3.22 e 3.23, respectivamente.

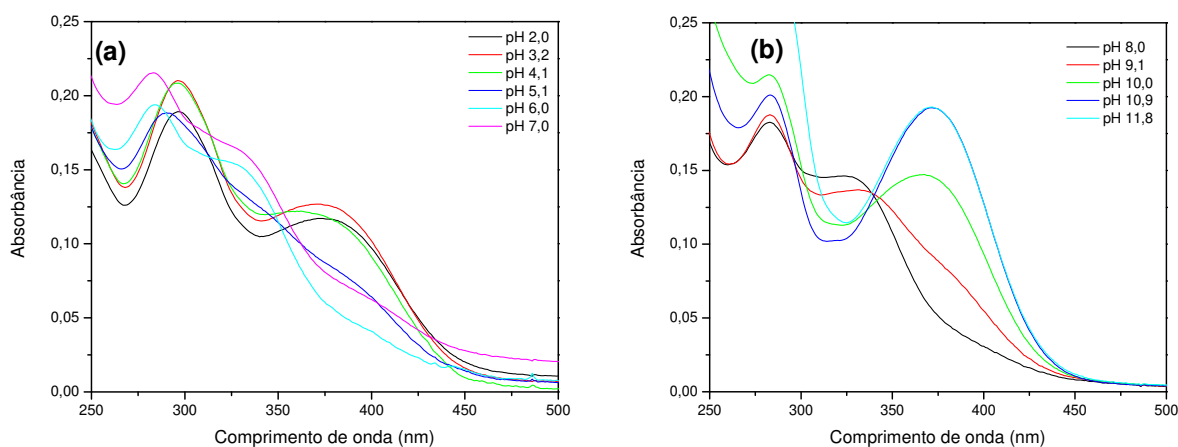


Figura 3.22. Espectros de absorção de bpySOH $2,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (solução tampão fosfato 20 mmol L^{-1}). (a) pH 2,0–7,0 e (b) 8,0–11,8.

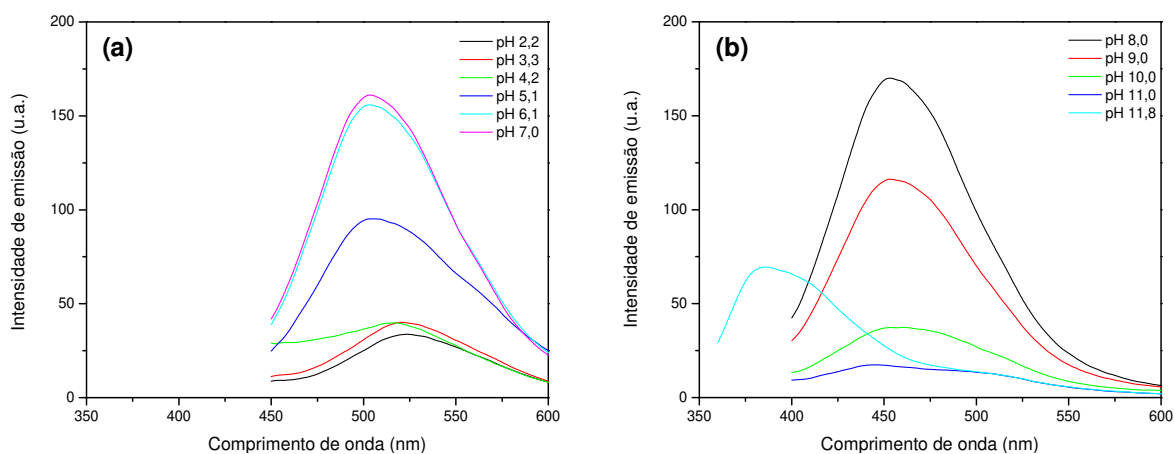


Figura 3.23. Espectros de emissão de bpySOH $2,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (solução tampão fosfato 20 mmol L^{-1}). (a) pH 2,2–7,0 e (b) 8,0–11,8.

Nos espectros de absorção pode-se observar que a banda em torno de 380 nm é praticamente constante até pH 4,0, apresentando um decréscimo até pH 8,0

e aumentando novamente em valores de pH maiores que 9,0. Além disso, é verificada a presença de dois pontos isobésticos, um que ocorre em valores de pH inferiores a 7,0 em torno de 350 nm e outro em valores acima de pH 8,0 em um comprimento de onda ligeiramente menor que 350 nm.

A Figura 3.23 mostra os espectros de emissão do ligante em função do pH obtidos com comprimento de onda de excitação de 336 nm. Há três conjuntos de bandas de emissão, com valores máximos em 523 nm (pH 2,2–4,2), 453 nm (pH 5,1–11,0) e 385 nm (pH 11,8), que são a consequência do estado de protonação da molécula do ligante. Uma discussão fotoquímica mais detalhada sobre este comportamento exigiria dados mais elaborados e está fora do objetivo deste trabalho.

Uma previsão das constantes de ionização do bpySOH foi realizada empregando-se o programa *MarvinSketch*. Foram obtidos valores de pKa de 9,50, 3,24 e 3,75. Portanto, o ligante deve estar desprotonado (eletricamente neutro) em solução tampão pH 7,0.

Como pode ser observado nos espectros de emissão, a intensidade de fluorescência é mais intensa no intervalo de pH 6,1–8,0. Desta forma, o valor 7,0 foi empregado para avaliar as interações com os íons metálicos.

Soluções de bpySOH de concentração $3,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em solução tampão fosfato 20 mmol L^{-1} de diferentes valores de pH e os valores de tempo de vida determinados estão resumidos na Tabela 3.11.

Tabela 3.11. Valores de tempo de vida para soluções de bpySOH em tampão fosfato 20 mmol L^{-1} de diferentes valores de pH.

pH	τ (ns)
2,0	4,04
3,0	4,36
4,0	4,47
5,0	4,80
6,0	4,92
8,0	5,99
12,0	7,06

A influência do pH já foi avaliada nos espectros de absorção e emissão do ligante bpySOH em experimento anterior e está relacionada com a estabilidade da molécula em meios ácido, neutro ou básico. A partir dos resultados apresentados na Tabela 3.11, observa-se um aumento no valor de tempo de vida do estado excitado com o aumento do pH, que pode ser decorrente à presença de espécies desprotonadas no estado excitado.

3.4.4. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES bpySOH–METAIS EM MEIO AQUOSO

Como apresentado anteriormente, a maior intensidade de emissão do ligante livre foi em pH 7,0, valor que será empregado para avaliar as interações com os íons metálicos estudados neste trabalho. Para todos os metais, as concentrações avaliadas foram iguais a $1,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $3,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se fixa a concentração de bpySOH igual a $3,05 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Na figura 3.24 são apresentados os espectros de absorção e emissão para as três concentrações de Cd(II) avaliadas. Os espectros de emissão foram obtidos com comprimento de onda de excitação: 336 nm, fendas de emissão e excitação: 15 nm e velocidade de varredura 500 nm min^{-1} .

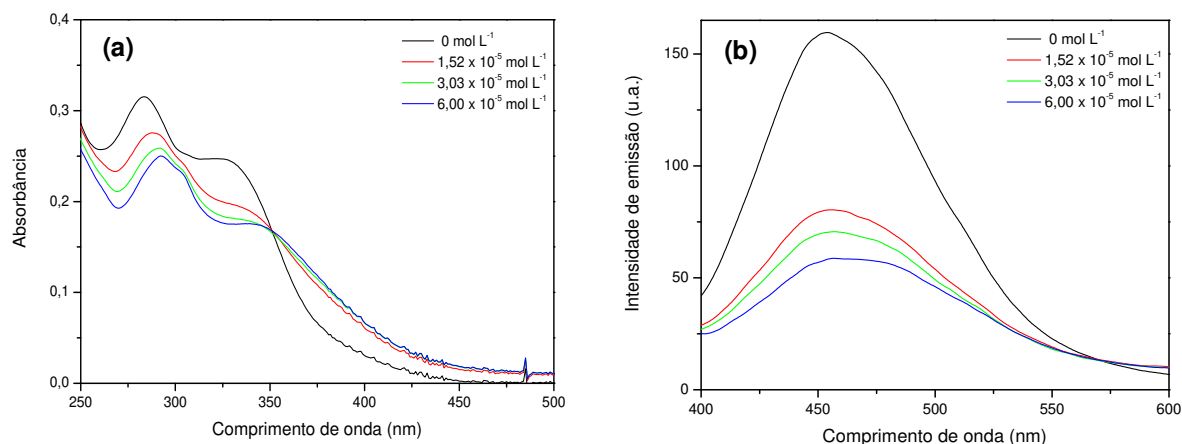


Figura 3.24. (a) Espectros de absorção e **(b)** emissão para diferentes concentrações de Cd(II) em solução tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7,0.

Os espectros de absorção apresentam um ponto isobéstico em 350 nm, indicando um equilíbrio entre as espécies presentes neste valor de pH. Os espectros de emissão, por sua vez, mostram que este metal é supressor da fluorescência do bpySOH.

Assim como para Cd(II), foram obtidos os espectros de absorção e emissão para Cu(II). As condições empregadas para o registro dos espectros de emissão foram as mesmas utilizadas para Cd(II). A Figura 3.25 apresenta estes espectros.

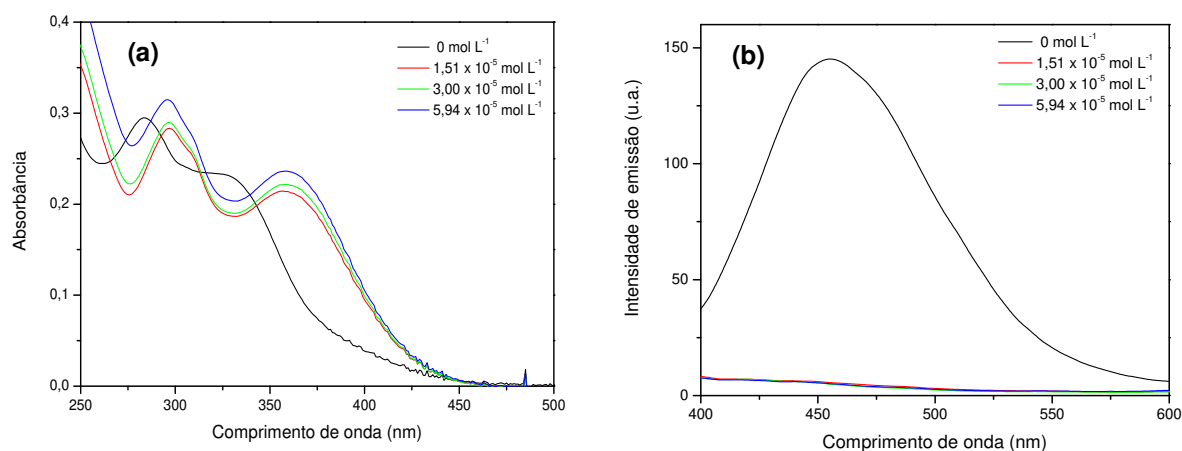


Figura 3.25. (a) Espectros de absorção e **(b)** emissão para diferentes concentrações de Cu(II) em solução tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7,0.

Os espectros de absorção apresentam uma banda em torno de 359 nm, que aumenta a sua absorbância com o aumento da concentração do metal. A presença de íons $\text{Cu}(\text{II})$ provoca a total supressão da fluorescência do ligante e, neste caso, observa-se que as curvas para as três concentrações estão praticamente sobrepostas.

Os espectros de absorção e emissão obtidos para $\text{Hg}(\text{II})$, por sua vez, estão representados na Figura 3.26.

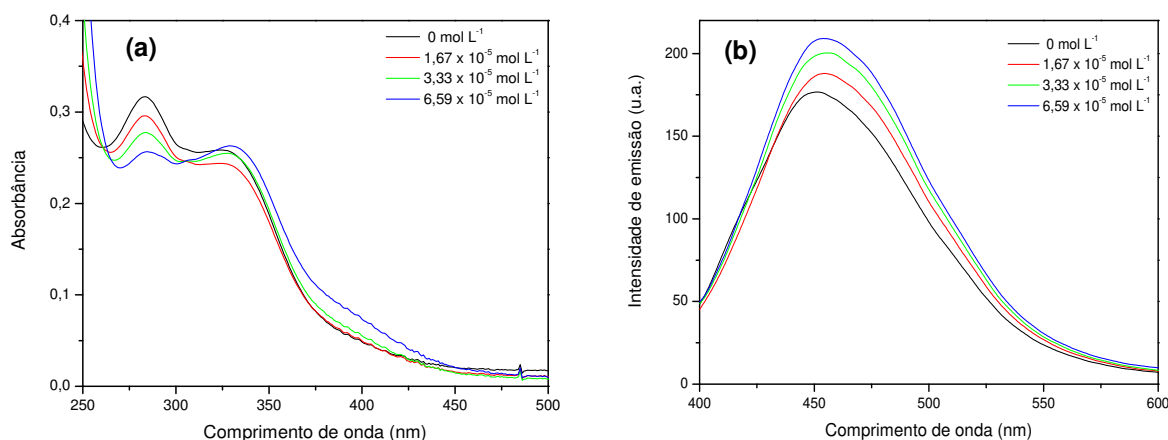


Figura 3.26. (a) Espectros de absorção e **(b)** emissão para diferentes concentrações de $\text{Hg}(\text{II})$ em solução tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7,0.

Os espectros de absorção mostram um aumento da intensidade da banda em torno de 336 nm com o aumento da concentração de metal. Os espectros de emissão, por sua vez, também apresentam um aumento da intensidade com o aumento da concentração de metal, indicando que $\text{Hg}(\text{II})$ não provoca supressão da fluorescência do ligante, comportamento observado em metanol e discutido anteriormente. A seguir, são apresentados os resultados obtidos para $\text{Ni}(\text{II})$.

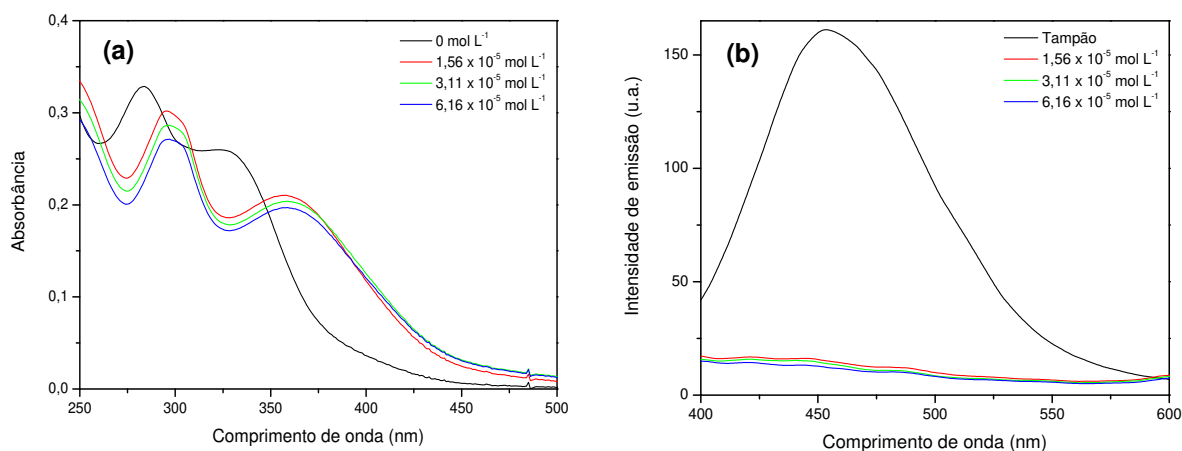


Figura 3.27. (a) Espectros de absorção e **(b)** emissão para diferentes concentrações de Ni(II) em solução tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7,0.

Observa-se através dos espectros de absorção uma banda em torno de 360 nm, indicando a formação do complexo. Observa-se ainda que a absorção aumenta com a concentração do metal. Os espectros de emissão, por sua vez, indicam uma supressão quase que completa da fluorescência do ligante para as três concentrações de metal analisadas, indicando a elevada sensibilidade para este metal.

Para finalizar a avaliação das interações entre bpySOH e metais pesados são apresentados, na Figura 3.28 os espectros de absorção e de emissão para Zn(II).

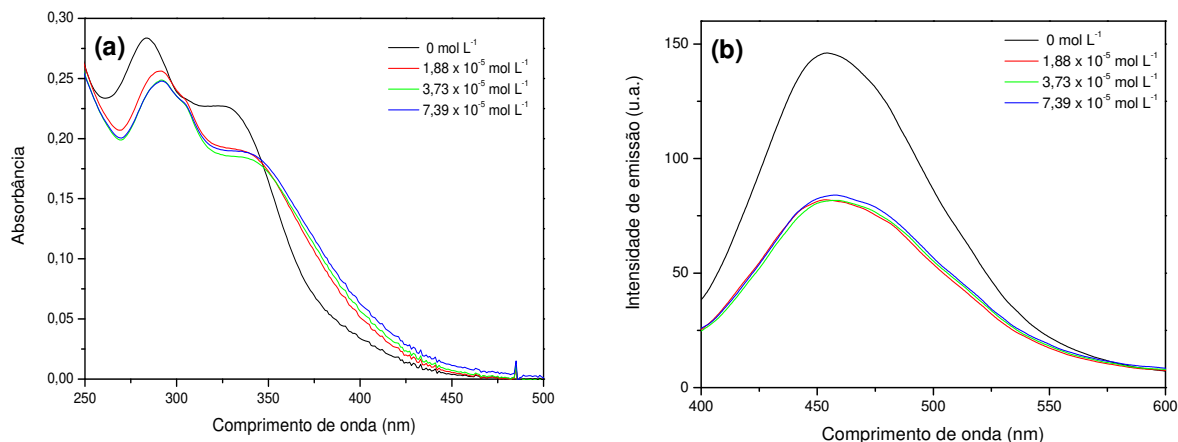


Figura 3.28. (a) Espectros de absorção e **(b)** emissão para diferentes concentrações de Zn(II) em solução tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7,0.

Para o complexo de Zn(II) observa-se, através dos espectros de absorção, uma banda em 340 nm, decorrente da formação do complexo. Através dos espectros de emissão, observa-se que o metal também é supressor da emissão do bpySOH, menos eficiente que Cu(II) e Ni(II), porém suprime de maneira significativa a fluorescência do ligante.

Após a realização destes experimentos com apenas três concentrações dos metais pesados, realizou-se o mesmo em um intervalo de concentração maior compreendendo $1,50 \times 10^{-7}$ a $6,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Através dos espectros de emissão, em um comprimento de onda fixo (455 nm, onde ocorrem maiores variações na intensidade de emissão de fluorescência), pôde-se estimar a faixa linear de resposta para cada metal em meio aquoso, como mostra a Figura 3.29.

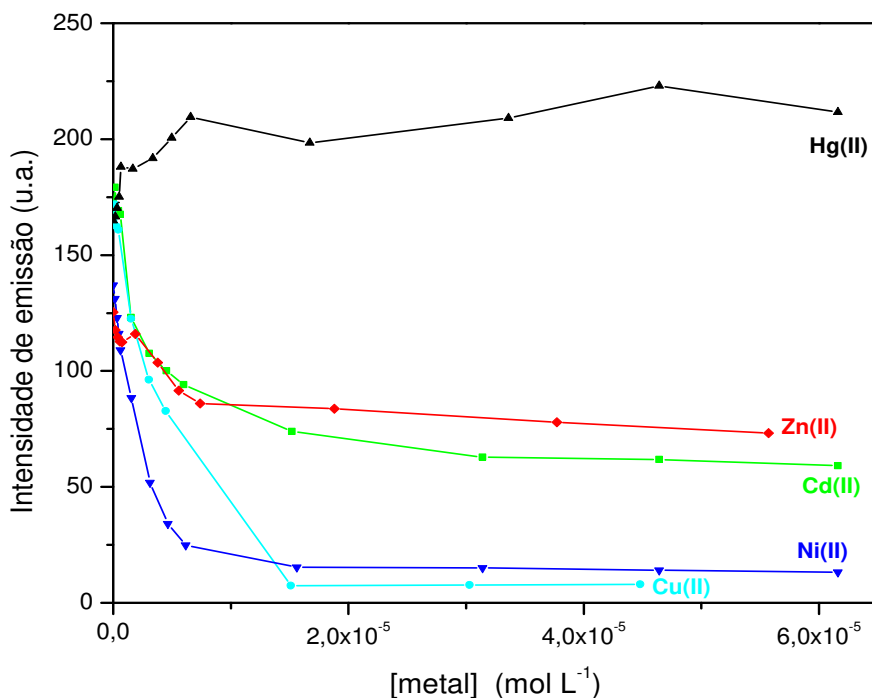


Figura 3.29. Variação da intensidade de emissão em função da concentração de metal em 455 nm empregando uma solução de bpySOH $3,05 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Dados obtidos em solução tampão fosfato 20 mmol L^{-1} pH 7,0.

A partir destas curvas, pode-se dizer que a faixa linear de resposta em meio aquoso para todos os metais é praticamente a mesma e igual a $1,50 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Este fato será importante para a caracterização da resposta da fase sensora, como será discutido posteriormente.

3.4.5. AVALIAÇÃO DE UMA FASE SENSORA BASEADA EM SOL-GEL

Assim como para os outros reagentes luminescentes estudados, avaliou-se uma composição de sol-gel proposta por Moreno (Moreno, 1994). O procedimento foi o mesmo descrito para ZOX e $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2\text{bim}]^{2-}$ e a concentração de bpySOH na matriz sol-gel foi igual a $3,20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A lavagem do material depois de

peneirado indicou que não houve lixiviação do ligante luminescente da matriz de sol-gel, o que resulta em uma eficiente interação entre o grupo —OH da estrutura do bpySOH e a rede de silicato da matriz de sol-gel.

A área superficial (SBET) do sol-gel foi determinada com absorção de nitrogênio baseada no método BET, fornecendo um valor de $470,4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Valores de diâmetro de poro de $17,8 \text{ Å}$ e de volume específico de poro de $0,21 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ foram obtidos, caracterizando o sol-gel como um material microporoso.

Os principais resultados obtidos com este material são apresentados na sequência.

3.4.5.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Uma etapa crucial para a obtenção de bons resultados com o sensor em desenvolvimento é o empacotamento da fase sensora. Aparentemente é uma etapa simples, como mencionado na Seção 2.8. Entretanto, diversos são os fatores que afetam este sistema e, portanto, o torna extremamente complexo do ponto de vista físico e químico. A granulometria da fase sensora foi devidamente controlada, pois se partículas muito menores que o tamanho estipulado ($100\text{-}150 \text{ mm}$) são inseridas na célula, as mesmas podem causar um aumento de pressão, provocando vazamentos ou até mesmo entupimento da célula. Além disso, a vazão deve ser baixa ($278 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$) para que haja mínima movimentação das partículas na célula, pois se o movimento for intenso, há a variação na intensidade de fluorescência e os resultados obtidos não são reprodutíveis. Além disso, deve-se tomar cuidado para que não entrem bolhas de ar na célula, uma vez que sua presença proporciona maiores ruídos e medidas errôneas dos valores de intensidade de fluorescência.

Desta forma, é importante frisar que este sistema, aparentemente simples, é delicado e inúmeros fatores afetam as medidas de intensidade de fluorescência

realizadas. Assim sendo, em todos os experimentos realizados nesta etapa do projeto, foram levados em consideração estes fatores.

Os experimentos empregando o sol-gel foram realizados no espectrofluorímetro Cary-Eclipse e as condições empregadas para o registro dos espectros de emissão, excitação e em função do tempo são apresentadas na Tabela 3.12.

Tabela 3.12. Condições empregadas no espectrofluorímetro Cary-Eclipse.

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda de excitação	410 nm
Comprimento de onda de emissão	515 nm
Fenda emissão	10 nm
Fenda excitação	10 nm
Filtro emissão	430-1100 nm
Filtro excitação	250-395 nm
Velocidade de varredura	600 nm min ⁻¹
Intervalo	1 nm
Tempo de integração	0,1 s
Voltagem Fotomultiplicadora	600 V

3.4.5.2. COMPORTAMENTO DO SOL-GEL EM DIFERENTES VALORES DE pH

Uma avaliação no intervalo de pH de 2,0–9,0 foi realizada com o bpySOH imobilizado, sem a presença de íons metálicos, para verificar a emissão de fluorescência nestes meios. A Figura 3.30 mostra os espectros de emissão em função do pH.

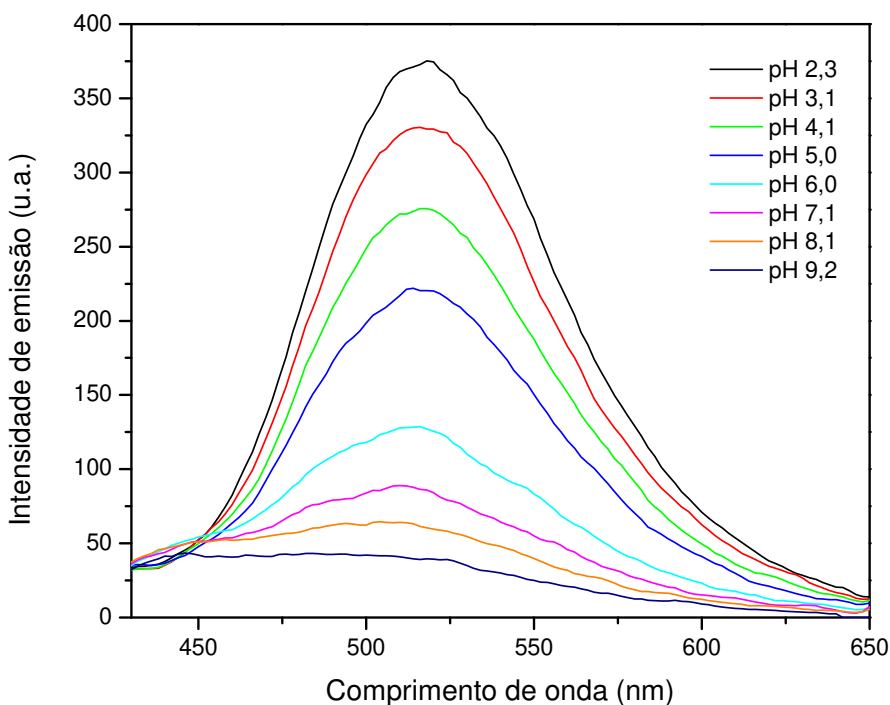


Figura 3.30. Variação da intensidade de emissão do sol-gel em função do pH da solução.

Observa-se que com o aumento do pH ocorre uma diminuição da intensidade de emissão do bpySOH imobilizado. Por outro lado, em valores de pH baixos, ocorre a protonação dos átomos de nitrogênio da estrutura do ligante bpySOH e, como consequência, não há a complexação com os íons metálicos. Desta maneira, escolheu-se o pH 5,0 para a reação com os metais.

Para ilustrar que este é um valor adequado para tais reações, avaliou-se a complexação de $\text{Hg}(\text{II})$ com concentração igual a $1,02 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em valores de pH iguais a 5,0, 7,0 e 9,0. Neste experimento verificou-se que a reação em pH 5,0 apresentou maior variação da intensidade de emissão (em função do tempo) quando comparado com os outros valores. A Figura 3.31 apresenta a variação de intensidade de emissão em função do tempo de reação em 515 nm, comprimento de onda máximo de emissão, para estes três valores de pH.

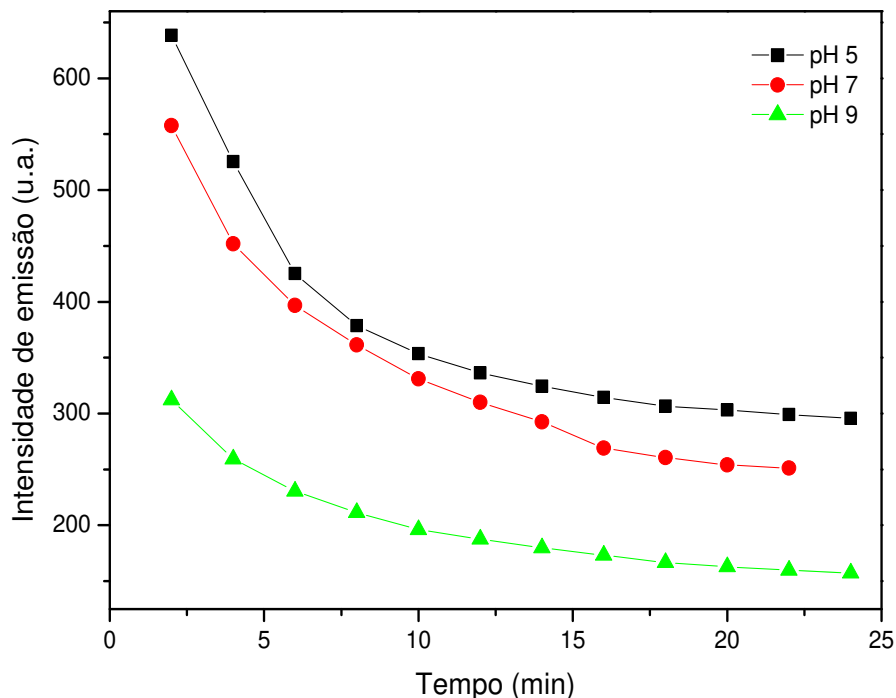


Figura 3.31. Variação da intensidade de emissão do reagente bpySOH imobilizado na matriz sol-gel em 515 nm em função do tempo de reação para $\text{Hg}(\text{II})$ $1,02 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ obtida em solução tampão fosfato 10 mmol L^{-1} .

De acordo com os resultados destes experimentos preliminares, fixou-se o valor de pH em 5,0 para a posterior avaliação da fase sensora na resposta frente aos íons de metais pesados.

Antes de iniciar as reações com os metais em fase sólida, foram obtidos espectros de emissão e excitação da fase sensora em pH 5,0 para a verificação dos comprimentos de onda máximos de emissão e excitação. Estes espectros são mostrados na Figura 3.32.

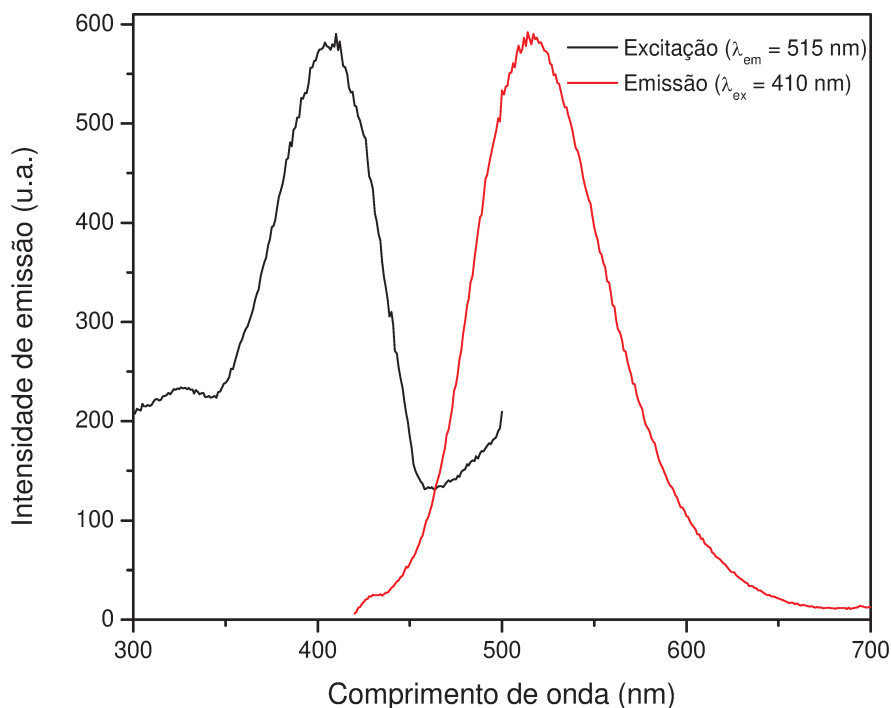


Figura 3.32. Espectros de excitação e emissão do bpySOH imobilizado no sol-gel medidos sob fluxo de solução tampão pH 5,0.

Os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação são iguais a 518 e 390 nm, respectivamente. Entretanto, a excitação em 410 nm (realizada neste experimento), não implica um deslocamento do comprimento de onda de máxima intensidade de emissão e sim no aumento ou diminuição do valor de sua intensidade. Comparando-se os valores obtidos com o ligante imobilizado com aqueles em solução (336 e 440 nm), observa-se um deslocamento destes valores que é causado pela imobilização do reagente. Muito embora ocorram esses deslocamentos de comprimento de onda, pode-se dizer que o ligante mantém suas propriedades fluorescentes quando imobilizado à matriz polimérica. Desta forma, fixaram-se os comprimentos de onda de emissão e excitação em 515 e 410 nm, respectivamente.

3.4.5.3. REGENERAÇÃO DO SINAL ANALÍTICO DA FASE SENSORA

Sensores ópticos para a determinação de metais pesados usualmente requerem o uso de uma espécie capaz de regenerar o sinal analítico após a inserção do analito. Comumente são utilizadas soluções de EDTA ou ácidos diluídos para tal finalidade. Neste trabalho foram avaliadas três soluções distintas: EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, H_3PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl ($0,1$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$). O uso de EDTA e H_3PO_4 não possibilitou a regeneração total do sinal analítico, diferentemente do HCl. Duas concentrações diferentes foram avaliadas com o intuito de preservar a fase sensora. Entretanto, o tempo de regeneração com HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (12 minutos) foi muito elevado quando comparado com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (2 minutos), inviabilizando as análises. Desta maneira, utilizou-se HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para a regeneração do sinal analítico.

3.4.5.4. RESPOSTA DA FASE SENSORA FRENTE A METAIS PESADOS

A faixa de concentração avaliada para cada metal foi baseada naquela obtida em solução (Seção 3.4.4). Para tal experimento, fixou-se o comprimento de onda de excitação em 410 nm e o de emissão em 515 nm e avaliou-se a intensidade do sinal de fluorescência em função do tempo (sinal registrado a cada 2 s). Além dos parâmetros mencionados na Tabela 3.12, os tempos de propulsão de cada solução foram ajustados para facilitar as determinações. Estes valores são expressos na Tabela 3.13.

Tabela 3.13. Tempos de bombeamento das espécies mencionadas para a determinação de metais pesados.

Espécie	Tempo (min)
Solução tampão pH 5,00 ^a	10
Metal ^b	5
HCl 0,1 mol L ^{-1c}	1

^a estabilização do sinal considerado como linha de base

^b resposta para o analito

^c regeneração do sinal analítico

Estudos preliminares indicaram que a interação entre o reagente luminescente bpySOH e os metais Cd(II) e Ni(II) é praticamente irreversível (ressaltando que o termo *irreversível*, neste caso, é utilizado com o sentido de regenerável). Notou-se que não foi possível regenerar a fase sensora com uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ e, desta maneira, tornou-se inviável seu emprego para a determinação de tais metais. Para este cátion metálico, pode ter havido precipitação com HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} , ânions provenientes da solução tampão fosfato utilizada. Um exemplo deste comportamento é apresentado na Figura 3.33, que mostra a resposta para Ni(II).

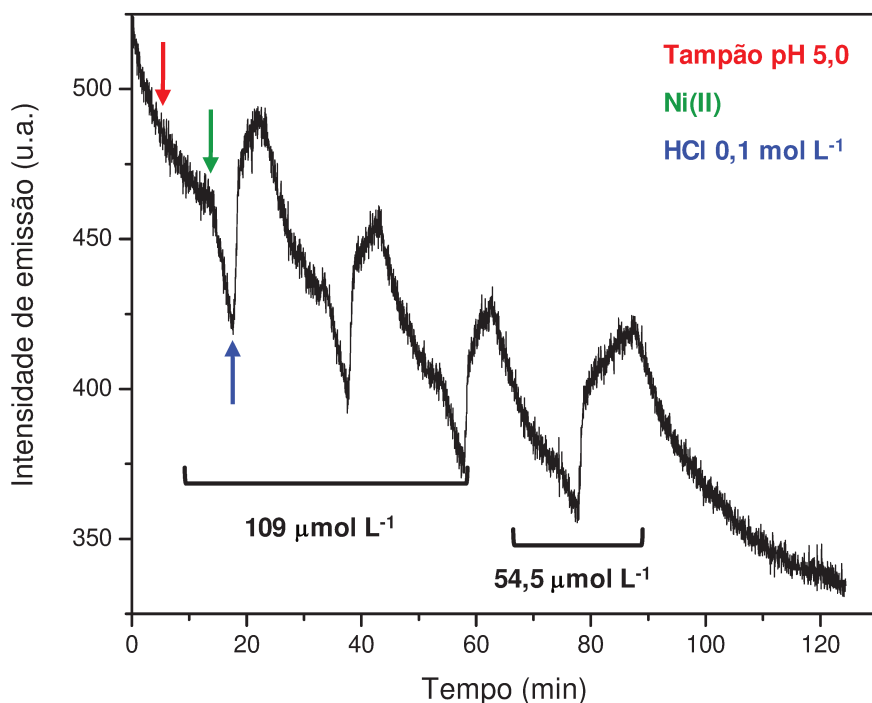


Figura 3.33. Curva de resposta para duas concentrações de Ni(II), indicando a irreversibilidade da fase sensora frente a este metal.

É possível verificar a partir desta curva que a resposta para Ni(II) é irreversível, uma vez que o emprego de HCl 0,1 mol L⁻¹ não foi capaz de regenerar o sinal analítico para a intensidade de emissão inicialmente obtida. Observa-se ainda, que a intensidade de emissão diminui constantemente indicando que o metal ficou retido na matriz sol-gel. O resultado obtido para Cd(II) foi similar a este e, desta maneira, não foi possível aplicar o sensor para a determinação destes metais.

Diferentemente de Cd(II) e Ni(II), a resposta da fase sensora para Cu(II) foi reversível e apresentou grande diferença de intensidade em função da concentração de metal, como pode ser observado a partir da sua curva de resposta representada na Figura 3.34.

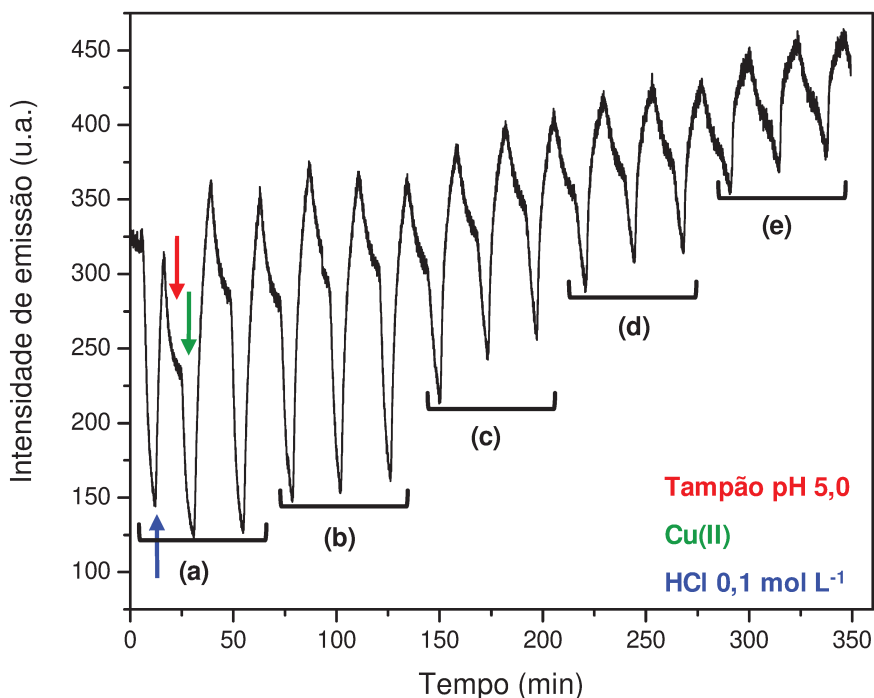


Figura 3.34. Curva de resposta da fase sensora frente a diferentes concentrações de Cu(II): (a) 99,3; (b) 49,7; (c) 9,93; (d) 4,97 e (e) 0,93 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Para esta curva foi possível obter duas formas de resposta: uma em função da diferença de intensidades para solução tampão (*branco*) e a amostra (*metal*) e outra em função da razão dos valores destas intensidades. Estes tipos de resposta ($I_0 - I$ e I_0/I) forneceram correções relacionadas com a possível lixiviação do reagente bpySOH imobilizado ou com pequenas quantidades de metal que não foram removidas da matriz (regeneração parcial da fase sensora). Além disso, a relação I_0/I obedece à equação de Stern-Volmer.

Observa-se ainda, uma boa repetibilidade do sinal analítico nas três medidas realizadas para cada concentração. A linha de base (sinal intermediário) não está estabilizada, devido ao fato do aumento excessivo da intensidade do sinal quando HCl 0,1 mol L⁻¹ é inserido na célula de medidas. Entretanto, o desvio padrão das medidas indica a estabilidade do sinal. As curvas $I_0 - I$ e I_0/I versus concentração de Cu(II) são apresentadas a seguir.

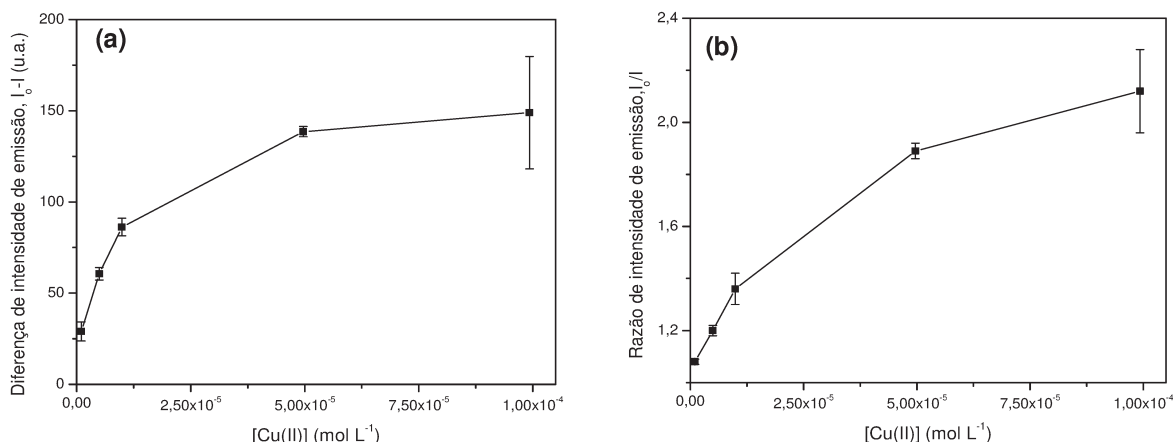


Figura 3.35. Respostas obtidas em função da concentração de Cu(II). **(a)** Diferença de intensidade, **(b)** razão de intensidade.

Comparando-se as respostas fornecidas pelos dois tipos de curvas, é possível verificar que a linearidade apresentada pela I_0/I é maior, devido ao fato da supressão de fluorescência obedecer à equação de Stern-Volmer (Lakowisky, 1999):

$$I_0/I = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0[Q]$$

Nesta expressão, I_0 é a intensidade de emissão do ligante livre, I é a intensidade após a supressão da fluorescência, K é a constante de supressão de Stern-Volmer, k_q é a constante de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de meia vida e $[Q]$ é a concentração do supressor, neste caso Cu(II). Como a supressão da fluorescência do ligante segue esta equação, deve-se considerar que a resposta dada por esta equação sempre será melhor que aquela da diferença.

Assim como para Cu(II), os resultados obtidos para Hg(II) indicaram boa resposta do sensor frente a diferentes concentrações do metal e medidas reprodutíveis em cada triplicata. A curva de resposta em função da concentração de metal é apresentada na Figura 3.36.

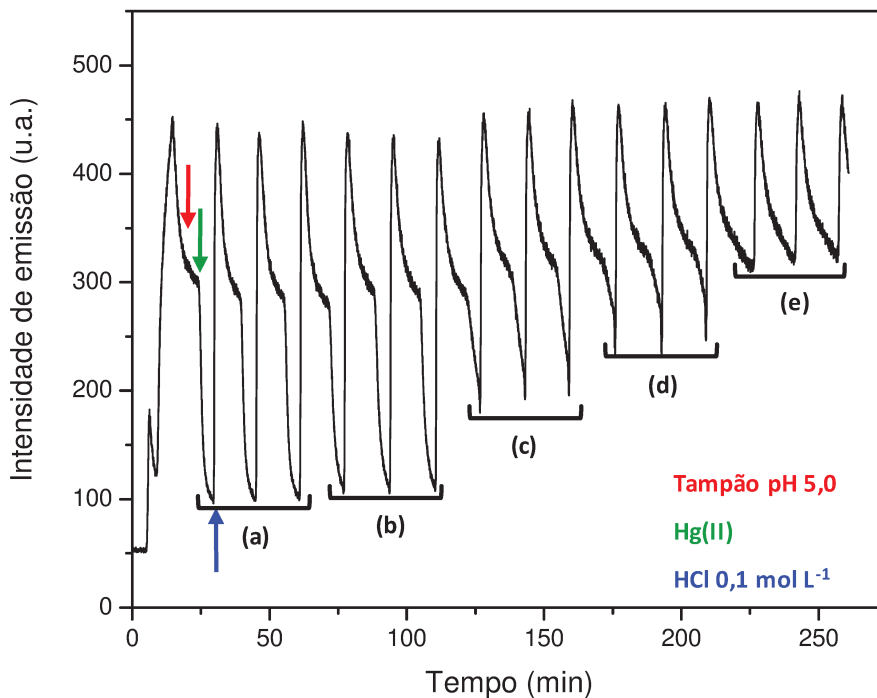


Figura 3.36. Curva de resposta para Hg(II). As concentrações avaliadas foram (a) 107, (b) 53,5, (c) 10,7, (d) 5,35, (e) 1,07 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As curvas de resposta em função da diferença e razão de intensidade estão na sequência.

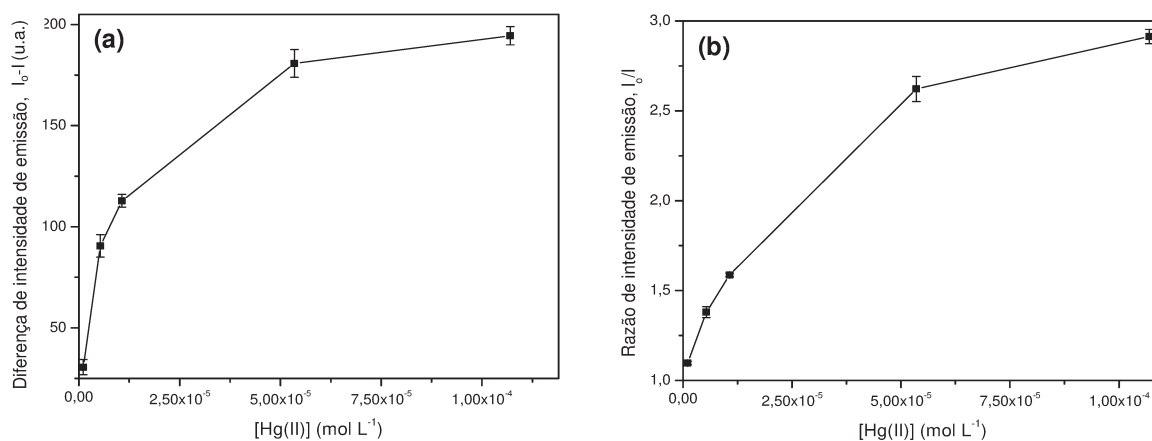


Figura 3.37. Respostas obtidas em função da concentração de Hg(II). (a) Diferença de intensidade, (b) razão de intensidade.

Uma vez mais é observado que a resposta em função da razão de intensidade é mais linear que aquela em função da diferença, como explanado anteriormente. Pode-se dizer ainda que a faixa de resposta é de aproximadamente $1,00$ a $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O mesmo experimento foi realizado com $\text{Zn}(\text{II})$ e sua resposta foi similar às anteriores, como pode ser observado através da Figura 3.38.

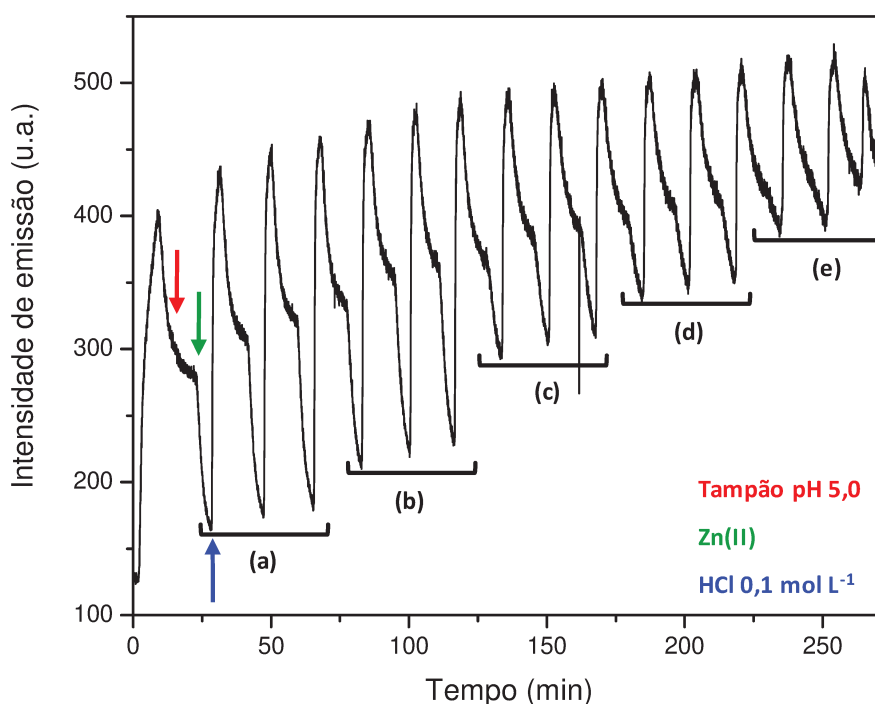


Figura 3.38. Curva de resposta para as diferentes concentrações de $\text{Zn}(\text{II})$: (a) 101 , (b) $50,5$, (c) $10,1$, (d) $5,05$ e (e) $1,01 \mu\text{mol L}^{-1}$.

É possível verificar que há um aumento na linha de base com o decorrer do tempo, que pode ser consequência de um possível condicionamento da fase sensora, por exemplo. Além disso, a diferença de intensidade entre a linha base e a resposta é praticamente constante para a triplicata, indicando boa repetibilidade das medidas. As curvas de resposta $I_0 - I$ e I_0/I em função da concentração de metal estão representadas na Figura 3.39.

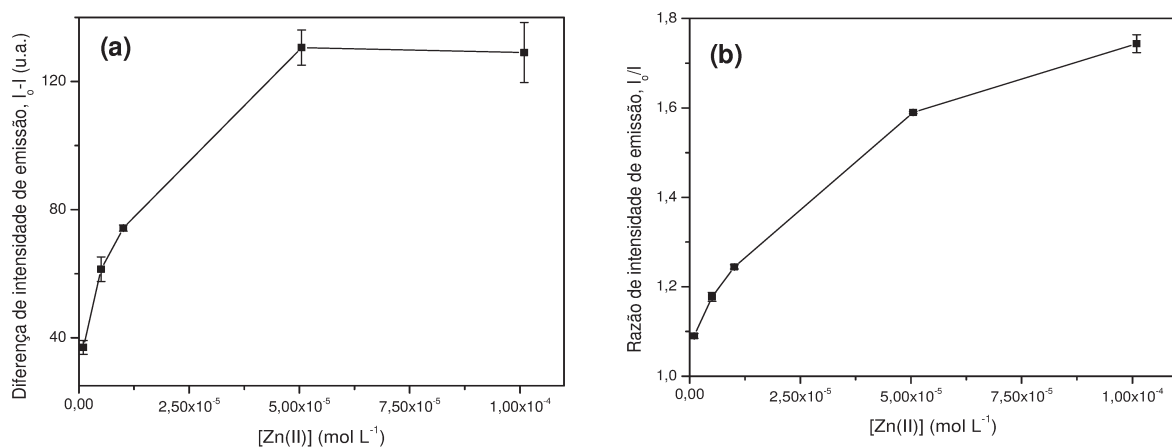


Figura 3.39. Respostas obtidas em função da concentração de Zn(II). **(a)** Diferença de intensidade, **(b)** razão de intensidade.

Para Zn(II), observa-se um intervalo de resposta de aproximadamente 1,0 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As barras de erros para estas concentrações são extremamente pequenas, sendo menores que o símbolo utilizado na construção da curva.

Comparando-se os dois tipos de respostas obtidos para os três metais avaliados, tem-se o seguinte comportamento:

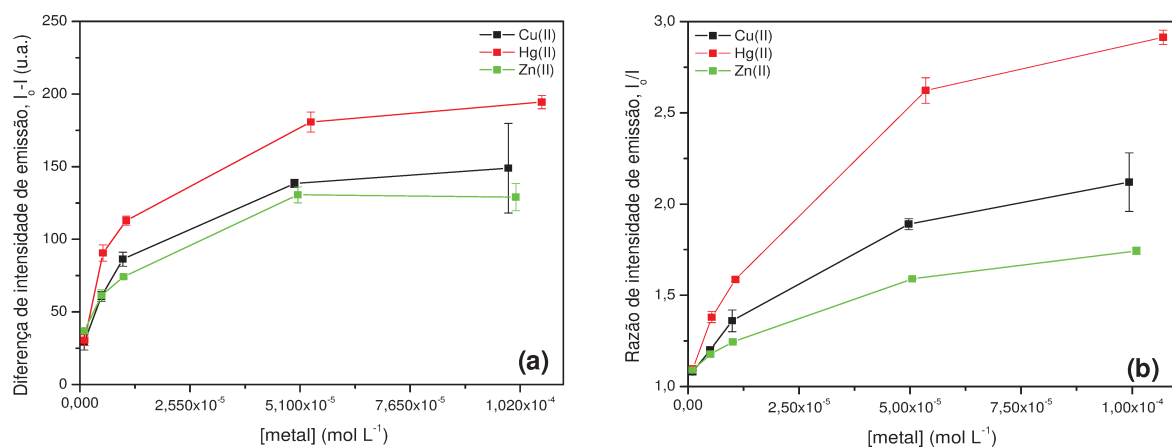


Figura 3.40. Respostas obtidas em função das concentrações de Cu(II), Hg(II) e Zn(II). **(a)** Diferença de intensidade, **(b)** razão de intensidade.

É possível verificar que a sensibilidade para $\text{Hg}(\text{II})$ é maior quando comparada com os outros metais. Observa-se ainda, que para concentrações próximas a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ há saturação do sinal de emissão para os três metais e, desta maneira, a faixa de resposta para os metais quando o reagente está imobilizado na matriz sol-gel é praticamente a mesma para os metais em solução, ou seja, de aproximadamente $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. É importante ressaltar que os experimentos para os três metais foram realizados com o mesmo sol-gel empacotado.

A partir destes resultados univariados, foram estimados valores de limite de detecção iguais a $8,9 \times 10^{-7}$, $4,7 \times 10^{-7}$ e $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ e $\text{Hg}(\text{II})$, respectivamente. Estes valores são menores que os limites estabelecidos pela legislação, exceto para $\text{Hg}(\text{II})$. Entretanto, deve-se mencionar que os resultados podem ser melhorados se o tempo empregado para a reação de complexação utilizado for maior que dez minutos.

Na sequência são apresentados os resultados obtidos de tempo de resposta para os íons metálicos.

3.4.5.5. TEMPO DE RESPOSTA ($t_{90\%}$)

A verificação deste parâmetro foi realizada fixando-se as concentrações dos íons metálicos em $25 \mu\text{mol L}^{-1}$. Durante alguns minutos foi inserida solução tampão pH 5,0 para a aquisição da linha base e, então, inseriu-se a solução de metal durante cerca de 3 horas. Os experimentos para os três metais foram realizados com um mesmo sol-gel empacotado. As curvas de intensidade de emissão normalizadas em função do tempo estão apresentadas na Figura 3.41.

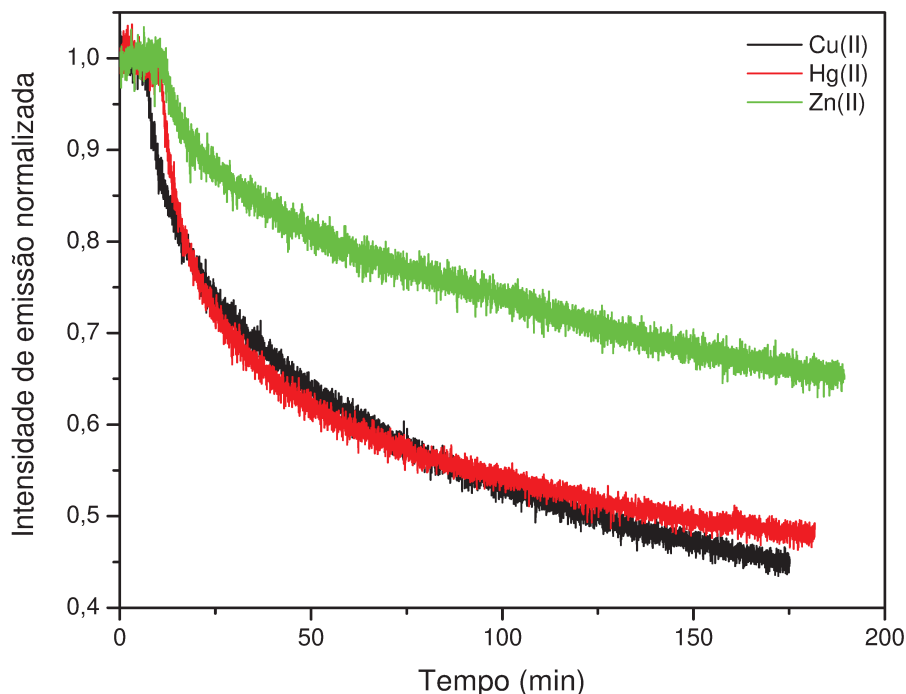


Figura 3.41. Intensidades de emissão normalizadas em função do tempo para Cu(II), Hg(II) e Zn(II) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Calculando-se $t_{90\%}$, ou seja, o tempo necessário para que a intensidade de emissão atinja 90% do sinal obtido para o analito, são obtidos os valores de 107, 88 e 114 min para Cu(II), Hg(II) e Zn(II), respectivamente. Observa-se ainda, através destas curvas, que a resposta é mais rápida e a sensibilidade é maior para Cu(II) e Hg(II) quando comparadas com Zn(II), possivelmente devido à maior estabilidade dos complexos de Cu(II) e Hg(II), de acordo com as constantes de formação. Além disso, é possível verificar que mesmo após três horas de reação não foi possível obter sinal constante, indicando que, com o avanço do tempo, pequenas quantidades de metal ainda reagem com o ligante livre. Terminada a caracterização da fase sensora frente aos íons metálicos, iniciaram-se os experimentos para a determinação simultânea de duas ou três espécies, cujos principais resultados serão discutidos a seguir.

3.4.6. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METAIS PESADOS

3.4.6.1. ASPECTOS GERAIS

A determinação simultânea de metais pesados em soluções aquosas foi realizada empregando-se a fase sensora previamente caracterizada e misturas binárias e ternária de Cu(II), Hg(II) e Zn(II). O intervalo de concentração empregado para cada metal foi aquele determinado em solução, ou seja, 2,50–50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Foram avaliadas duas estratégias de aquisição de dados, que serão abordadas a seguir.

3.4.6.2. ESTRATÉGIA 1

Nesta estratégia experimental, empregou-se o Planejamento Experimental Doehlert (*Ferreira & Teófilo, 2006; Cavalitto, 2003; Ferreira et al., 2004*) para a obtenção das concentrações das amostras do conjunto de calibração e previsão das misturas.

Foram avaliados diferentes conjuntos de dados (espectros de emissão (450–600 nm) com diferentes comprimentos de onda de excitação (390, 400 e 410 nm), espectros de excitação (300–480 nm) com distintos comprimentos de onda de emissão (505, 515 e 525 nm) e intervalos de tempo de reação (0–5 min)) com velocidade de varredura igual a 600 nm min^{-1} . Esses diferentes conjuntos de dados foram estudados com a intenção de verificar qual informação seria mais adequada para estimar a concentração das espécies metálicas. As Tabelas contendo as concentrações de cada espécie nas distintas misturas avaliadas, assim como a análise exploratória e um exemplo de modelo de calibração estão representados no Apêndice I desta Tese.

A estratégia de variar os comprimentos de onda de excitação/emissão foi utilizada com o objetivo de se aumentar o número de variáveis e, com isso,

adicionar informações relevantes para o conjunto de dados. É importante ressaltar que o emprego de comprimentos de onda distintos para excitação não interfere no comprimento de onda de máxima emissão e sim na intensidade dos espectros. Este procedimento, todavia, não forneceu informações adicionais úteis para a discriminação das espécies.

Por outro lado, o emprego de diferentes tempos de bombeamento da solução de metal proporcionou informações adicionais às misturas. Isso porque quanto maior este intervalo, maior é a quantidade de metal complexada pelo ligante imobilizado e, conseqüentemente, menor é a intensidade de emissão do ligante livre, parâmetro medido. Além disso, a cinética de reação de cada metal influencia de maneira significativa a resposta do sensor

Conforme discutido anteriormente, os espectros I_0/I fornecem melhores resultados quando comparados com aqueles I_0-I , pois a supressão da fluorescência do ligante pela reação com o metal obedece à equação de Stern-Volmer. Muito embora este fato tenha sido observado, foram avaliados além dos espectros de I_0/I , aqueles de I_0-I e os espectros brutos. Os espectros brutos não forneceram resultados satisfatórios, pois se fez necessário comparar o sinal obtido para cada amostra com uma referência (branco, tampão pH 5,0) e com os espectros brutos esta comparação não foi realizada. Os resultados mais relevantes foram aqueles obtidos com os espectros de I_0/I .

Observou-se que as respostas fornecidas para os tempos 0, 1 e 2 minutos de bombeamento da solução de metal estavam praticamente sobrepostas e, assim sendo, o intervalo utilizado foi de 2–5 min.

Um exemplo de conjunto de dados obtido é apresentado na Figura 3.42 para a mistura $\text{Hg(II)}-\text{Zn(II)}$.

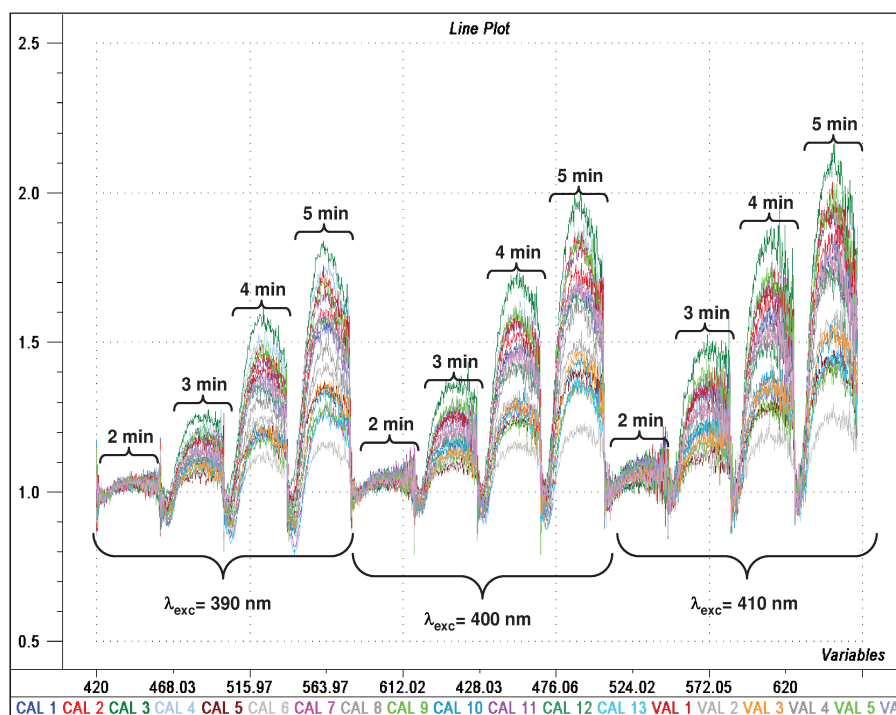


Figura 3.42. Conjunto de espectros de emissão para os diferentes comprimentos de onda de emissão para a mistura Hg(II)–Zn(II) no intervalo de tempo de reação de 2–5 minutos.

Este conjunto de dados é composto por 1392 variáveis, que correspondem aos espectros de emissão na faixa de 420–650 nm nos três comprimentos de onda de excitação e nos quatro valores de tempo de bombeamento empregados.

Para esta estratégia, observou-se que o ruído dos espectros brutos é muito elevado, o que prejudicou as etapas de calibração e previsão das concentrações de íons. Para contornar este problema, realizou-se um pré-processamento dos dados, uma vez que o tratamento inicial em dados brutos torna-se necessário. Isso se deve ao fato de que estes dados podem apresentar ruídos instrumentais, variações na linha de base ou diferenças em ordem de grandeza, por exemplo. Assim sendo, estas ferramentas são importantes para a remoção destas fontes de variação indesejáveis que podem comprometer os resultados posteriores (*Ferreira et al., 1999; Massart et al., 1997*).

Neste conjunto de dados foram utilizados os seguintes pré-tratamentos para a suavização dos espectros originais: filtros de média móvel, mediana móvel e Savitsky-Golay, todos com distintos valores de janelas. Além destes, foram empregadas também as técnicas de primeira derivada e transformada Wavelet.

O modelo de calibração utilizado foi o PLS (Regressão de Mínimos Quadrados Parciais, do inglês *Partial Least Squares Regression*). Este modelo de calibração é muito eficiente para tratar dados com ruídos experimentais, por exemplo. Em tal modelo, todas as variáveis relevantes são incluídas, implicando que a calibração pode ser conduzida de maneira eficiente mesmo na presença de interferentes. Sua base fundamental é a PCA (Análise de Componentes Principais, do inglês, *Principal Component Analysis*), que consiste em representar as variações presentes em muitas variáveis através de um número menor de fatores, denominados variáveis latentes. (Cunha Jr. et al., 2003).

Para a construção de tal modelo, utilizou-se a validação cruzada (*leave-one-out*) na elaboração do modelo de previsão. Esta técnica consiste em retirar uma amostra do conjunto de dados e construir um modelo em sua ausência. A amostra retirada é, então, testada como uma amostra de “validação” do modelo construído. Esse procedimento é realizado para todas as amostras do conjunto de calibração, sendo, então, construído um modelo de validação para este conjunto de calibração (Franco & Reche, 2009).

Em um determinado conjunto de dados, as amostras de validação devem ser bem representadas pelas amostras de calibração. Para tanto, alguns métodos são utilizados para diferenciar as amostras de calibração e validação, como por exemplo, algoritmo de projeções sucessivas (SPA, do inglês *Successive Projections Algorithm*) (Araújo et al., 2004) e o algoritmo de Kennard-Stone (Kennard & Stone, 1969). Para a construção deste modelo de calibração, fez-se uso da segunda técnica. Neste algoritmo, a primeira amostra selecionada é aquela que representa a maior distância em relação à amostra média. A segunda amostra será aquela que apresenta maior distância em relação à primeira e, assim, sucessivamente.

O uso de Transformada Wavelet, por sua vez, é de grande interesse na remoção de ruídos experimentais. Isso se deve à sua capacidade de representar simultaneamente as propriedades de tempo e frequência de um sinal analítico. Além disso, a sua natureza multidimensional possibilita a representação do sinal em várias escalas. Neste tipo de transformada a compressão dos sinais pode ser realizada com duas técnicas de limiarização: a Rígida (*Hard thresholding*) e Suave (*Soft thresholding*), que consistem em remover ou atenuar os coeficientes *wavelet* de pequena amplitude que possuem baixa relação sinal-ruído (José, 2008).

Embora as transformadas Wavelets sejam uma excelente alternativa para a remoção de ruídos espectrais, neste caso, a previsão das amostras em dados tratados com este pré-tratamento não forneceram bons resultados.

Além do algoritmo de Kennard-Stone e das transformadas Wavelets, foi avaliado também o algoritmo de projeções sucessivas (SPA, do inglês *Successive Projections Algorithm*) para a seleção das variáveis mais relevantes para o modelo. Entretanto, o emprego deste algoritmo não forneceu melhorias nos resultados.

Para todas as misturas, observou-se que os conjuntos de dados de espectros de excitação não forneceram bons resultados, apresentando valores de RMSEP elevados. Os diferentes métodos de pré-processamento empregados, por sua vez, não resultaram em melhorias significativas para as previsões das concentrações dos íons metálicos nas misturas.

Para finalizar, deve-se levar em conta que a velocidade de varredura empregada foi elevada, aumentando o ruído dos espectros. Além disso, elevou-se o intervalo de tempo de reação de cinco para dez minutos. Essas modificações são referentes à segunda estratégia avaliada, que será melhor discutida na sequência.

3.4.6.3. ESTRATÉGIA 2

Nesta etapa, foram avaliados espectros de emissão (420–650 nm) obtidos com comprimento de onda de excitação igual a 410 nm em um intervalo de tempo de reação de 0–10 min (espectros registrados a cada 2 min). Além disso, a velocidade de varredura foi diminuída de 600 nm min^{-1} para 120 nm min^{-1} , com o objetivo de diminuir o ruído dos espectros. Com o emprego desta estratégia experimental, os resultados obtidos melhoraram de maneira significativa quando comparados com aqueles obtidos anteriormente.

Assim como os resultados obtidos com a estratégia anterior, para todas as misturas foi realizada uma análise exploratória com a finalidade de se extrair informações acerca do comportamento e da influência das amostras nos modelos de calibração. Para todas as misturas avaliadas, o modelo de calibração utilizado foi o PLS.

Na Tabela 3.14 são apresentadas as principais diferenças em cada estratégia empregada

Tabela 3.14. Parâmetros empregados nas duas estratégias avaliadas para a determinação simultânea de metais pesados em águas empregando o sol-gel e técnicas de calibração multivariada.

Parâmetro	Estratégia 1	Estratégia 2
Planejamento	Doehlert	Composto Central
Espectros avaliados	Excitação e emissão	Emissão
Tempo de reação (min)	0–5	0–10
λ de excitação (nm)	390, 400, 410	410
Velocidade de varredura (nm min^{-1})	600	120

As concentrações de cada espécie metálica nas distintas misturas assim como exemplos de modelos de calibração e análise exploratória dos dados estão representados no Apêndice II desta Tese.

Para a construção dos modelos de calibração e previsão da mistura Cu(II)–Hg(II) foram preparadas 26 amostras no intervalo de concentração de 2,50 a 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Com a finalidade de se ilustrar os dados obtidos para esta mistura, os espectros I_0/I para todas as amostras são apresentadas na Figura 3.43.

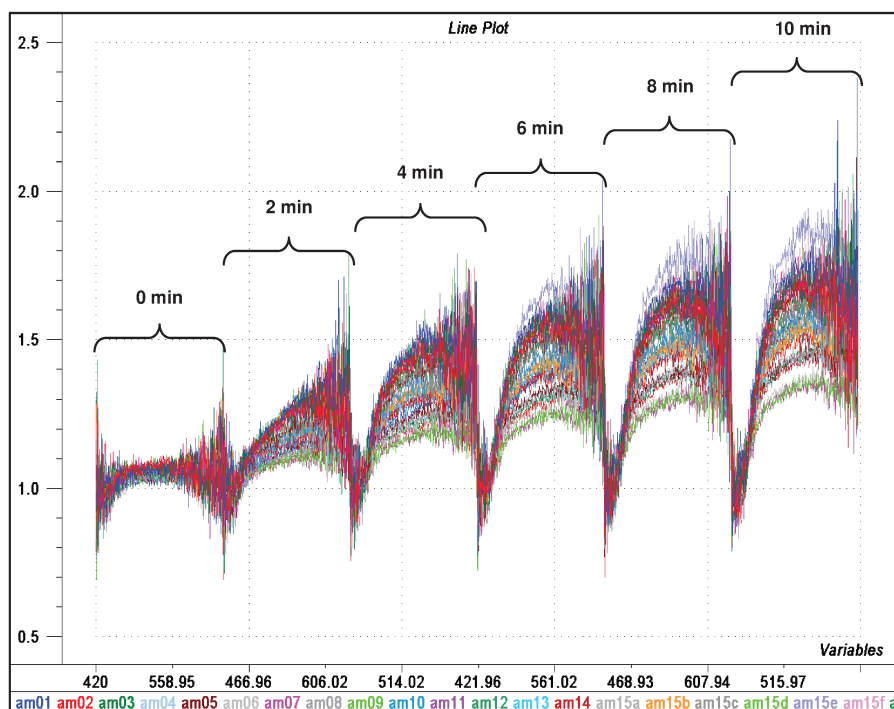


Figura 3.43. Espectros de I_0/I obtidos para a mistura Cu(II)–Hg(II) no intervalo de tempo igual a 0–10 minutos, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$ e velocidade de varredura 120 nm min^{-1} .

Observando-se todas as amostras não é possível verificar a diminuição no ruído dos sinais; entretanto, isto é possível se observarmos uma única amostra, como apresenta a Figura 3.44. Para comparar este fato, na Figura 3.45 estão os espectros para uma amostra da mesma mistura preparada com os parâmetros da estratégia 1.

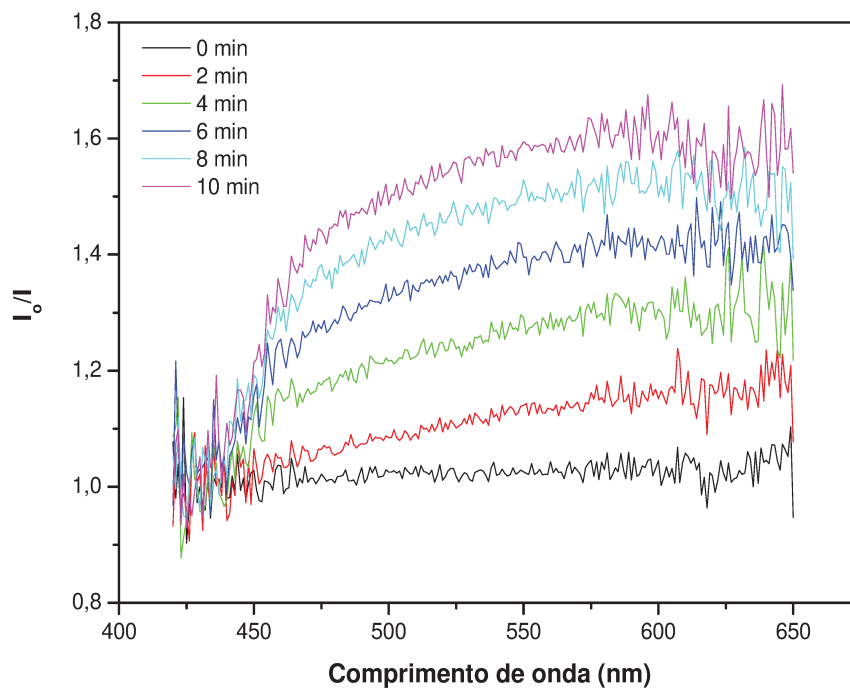


Figura 3.44. Espectros I_0/I para a amostra contendo $11,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) e $17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II) obtidos com os parâmetros da estratégia 2.

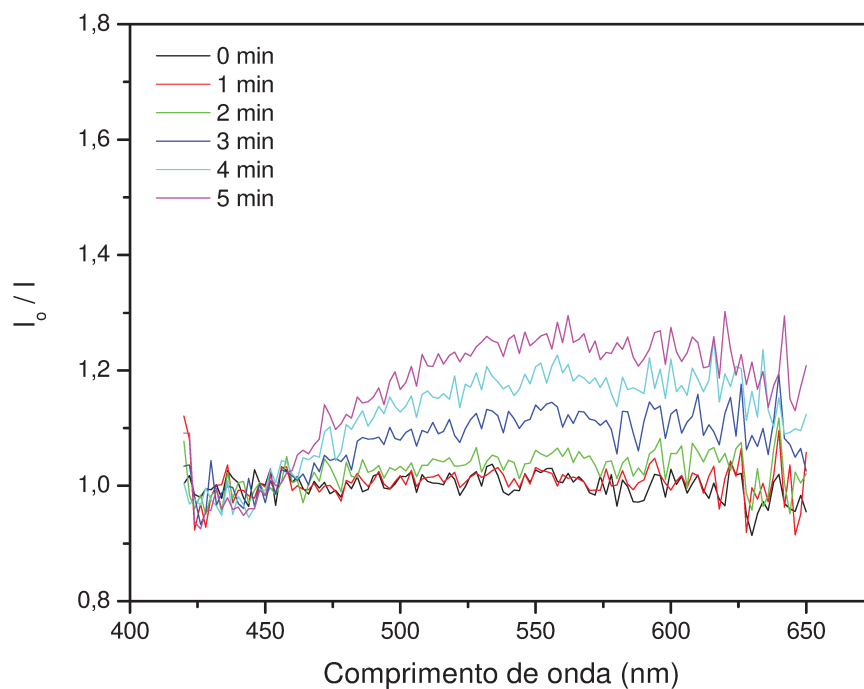


Figura 3.45. Espectros I_0/I para a amostra contendo $10,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) e $2,67 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II) obtidos com os parâmetros da estratégia 1.

Comparando-se estes dois conjuntos de espectros, observa-se que o ruído da Figura 3.44 é menor e isto se deve à diminuição da velocidade de varredura. Muito embora o ruído seja menos pronunciado, foi necessário atenuá-lo com o uso das distintas técnicas de pré-processamento dos espectros: média móvel, mediana móvel e filtros de Savitsky-Golay com diferentes janelas.

Com o emprego destas técnicas foi possível diminuir de maneira significativa o ruído dos espectros e, assim, prever de maneira satisfatória a concentração de cada metal nas misturas. A seguir são apresentados os resultados das previsões para cada metal comparando-se com os resultados anteriormente obtidos.

Tabela 3.15. Valores previstos e esperados para as concentrações de Cu(II) na mistura Cu(II)–Hg(II).

[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$					
Estratégia 1 ^a			Estratégia 2 ^b		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)
15,1	21,9	45,0	17,3	16,8	-2,9
7,53	12,3	63,3	17,3	17,0	-1,7
17,6	16,6	-5,7	11,5	11,0	-4,3
32,6	22,0	-32,5	3,39	3,68	8,6
30,1	13,7	-54,5	11,5	11,3	-1,7
27,6	16,7	-39,5	34,6	34,7	0,3
5,02	17,5	249	34,6	34,2	-1,2

^a espectros I_0/I suavizados com filtro Savitsky-Golay (janela = 25 pontos) seguido de 1^a derivada, 464 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, intervalo de 2–5 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = $1,91 \mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0/I suavizados com média móvel (janela = 31 pontos), 1386 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, intervalo de 0–10 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = $0,46 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 3.16. Valores previstos e esperados para as concentrações de Hg(II) na mistura Cu(II)–Hg(II).

[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$					
Estratégia 1 ^a			Estratégia 2 ^b		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)
25,1	26,5	5,6	5,16	5,41	4,8
15,1	26,1	72,8	15,5	15,5	0,0
15,0	25,2	68,0	3,06	3,18	3,9
30,1	24,2	-19,6	10,3	10,2	-0,9
20,1	21,5	7,0	23,7	24,0	1,3
35,1	24,8	-29,3	31,0	30,8	-0,6

^a espectros I_0/I não suavizados, 1392 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 390, 400$ e 410 nm, intervalo de 2–5 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = $1,44 \mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0/I suavizados com média móvel (janela = 31 pontos), 1386 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, intervalo de 0–10 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$.

É possível observar através dos resultados obtidos para as duas estratégias que aquela que forneceu melhores previsões para as concentrações de Hg(II) foi a segunda, uma vez que os valores de erro relativo e RMSEP foram menores. A partir dos resultados obtidos para Cu(II), observa-se que os valores previstos de sua concentração com a segunda estratégia, assim como para Hg(II), são mais próximos daqueles esperados, além de um valor de RMSEP baixo e erros relativos menores que 9,0% para a previsão de todas as amostras.

Com estes resultados, pode-se dizer que o sensor em desenvolvimento é uma ferramenta útil para a determinação simultânea destes metais em águas.

A próxima mistura avaliada foi aquela contendo diferentes concentrações de Cu(II) e Zn(II). Os valores de concentração medidos e previstos com os modelos de calibração multivariada empregados são apresentados a seguir.

Tabela 3.17. Valores previstos e esperados para as concentrações de Cu(II) na mistura Cu(II)–Zn(II).

[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$					
Estratégia 1 ^a			Estratégia 2 ^b		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)
30,1	32,5	8,0	5,76	7,93	37,7
30,1	27,2	-9,6	11,5	12,6	9,6
17,6	19,3	9,7	11,5	12,2	6,1
11,3	10,0	-11,5	23,0	23,4	1,7
15,1	16,4	8,6	28,8	28,3	-1,7
25,1	22,4	-10,7	34,6	35,4	2,3

^a espectros I_0/I não suavizados, 1392 variáveis (λ_{exc} = 390, 400, 410 nm, intervalo de 2–5 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = 2,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0/I suavizados com média móvel (janela = 41 pontos), 693 variáveis (λ_{exc} = 410 nm, intervalo de 6–10 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = 1,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos com as duas estratégias forneceram bons resultados. Entretanto, o valor de RMSEP obtido para a segunda foi menor. Através dos resultados apresentados na Tabela 3.18, observa-se que a previsão de Zn(II) com o emprego da segunda estratégia foi mais satisfatória, visto que os erros relativos são consideravelmente baixos, assim como o valor de RMSEP.

Tabela 3.18. Valores previstos e esperados para as concentrações de Zn(II) na mistura Cu(II)–Zn(II).

[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$					
Estratégia 1 ^a			Estratégia 2 ^b		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)
5,00	11,8	136	19,7	18,1	-8,1
15,0	13,5	-10,0	11,5	11,5	0,0
7,50	17,9	139	5,76	6,25	8,5
1,98	14,7	642	15,0	17,0	13,3
27,5	19,2	-30,2	28,8	28,0	-2,8
30,0	22,8	-24,0	26,5	24,5	-7,6

^a espectros I_0/I suavizados com filtro Savitsky-Golay (janela = 25 pontos), 1392 variáveis (λ_{exc} = 390, 400, 410 nm, intervalo de 2–5 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = $9,45 \mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0-I suavizados com média móvel (janela = 21 pontos), 1155 variáveis (λ_{exc} = 410 nm, intervalo de 2–10 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = $1,38 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Uma vez mais, pode-se verificar que os resultados obtidos para esta mistura são satisfatórios, evidenciando a aplicabilidade desta fase sensora. Na seqüência são apresentados os resultados obtidos para a ultima mistura binária, Hg(II)–Zn(II).

Tabela 3.19. Valores previstos e esperados para as concentrações de Hg(II) na mistura Hg(II)–Zn(II).

[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$					
Estratégia 1 ^a			Estratégia 2 ^b		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)
25,3	29,8	17,8	10,3	10,1	-1,9
2,65	1,69	-36,2	5,16	4,84	-6,2
10,7	9,83	-8,1	20,6	22,2	7,8
26,7	25,1	-6,0	25,8	25,6	-0,8
16,0	13,0	-18,7	31,0	30,7	-1,0

^a espectros I_0/I suavizados com média móvel (janela = 11 pontos), 1392 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 390, 400, 410 \text{ nm}$, intervalo de 2–5 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = $1,34 \mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0/I suavizados com média móvel (janela = 31 pontos), 924 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, intervalo de 2–10 min), 1 variável latente, RMSEP = $0,94 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Observa-se para Hg(II) que as previsões das concentrações obtidas com o emprego da segunda estratégia forneceram menores valores de erros relativos e RMSEP, enquanto os erros relativos obtidos com a primeira estratégia foram elevados, porém o valor de RMSEP foi satisfatório. Os valores de previsão das concentrações de Zn(II), por sua vez, apresentados na Tabela 3.20, foram satisfatórios para ambas as estratégias experimentais avaliadas, muito embora o valor de RMSEP fosse menor com o emprego da primeira estratégia.

Tabela 3.20. Valores medidos e previstos das concentrações de Zn(II) na mistura Hg(II)–Zn(II).

[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$					
Estratégia 1 ^a			Estratégia 2 ^b		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)
27,5	31,2	13,4	11,5	11,2	-2,6
12,8	11,2	-12,5	5,76	6,60	14,6
15,3	14,7	-3,9	17,3	18,2	5,2
17,9	15,5	-13,4	28,8	27,0	-6,2
30,7	35,1	14,3	17,3	16,6	-4,0
28,1	28,8	2,5	40,3	35,5	-11,9

^a espectros I_0/I suavizados com média móvel (janela = 11 pontos), 1212 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 390, 400, 410 \text{ nm}$, intervalo de 2–5 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = $1,12 \mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0/I não suavizados, 924 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, intervalo de 4–10 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = $3,32 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para a mistura ternária, os resultados obtidos com a primeira estratégia não foram satisfatórios (valores de RMSEP maiores que $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), assim não serão comparados com a segunda. A Tabela 3.21 mostra os resultados obtidos para a previsão da concentração das três espécies metálicas nas amostras.

Tabela 3.21. Valores medidos e previstos das concentrações dos metais na mistura ternária.

[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1\text{a}}$			[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1\text{b}}$			[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1\text{c}}$		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro (%)
11,9	13,9	16,8	12,9	14,6	13,2	14,4	16,3	13,2
19,0	18,2	-4,2	12,9	13,5	4,6	31,7	28,7	-9,5
26,1	27,1	3,8	28,4	27,2	-4,2	23,1	22,0	-4,8
26,0	27,0	3,8	28,3	29,9	5,6	40,3	38,4	-4,7

^a espectros I_0/I suavizados com filtro Savitsky-Golay (janela = 35 pontos), 907 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, intervalo de 4–10 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = 1,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0/I suavizados com filtro de mediana móvel (janela = 41 pontos), 693 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, intervalo de 6–10 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = 2,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

^c espectros I_0/I suavizados com média móvel (janela = 41 pontos), 693 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, intervalo de 6–10 min), 2 variáveis latentes, RMSEP = 2,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

É possível observar, a partir destes resultados que, apesar da elevada complexidade do sistema envolvendo a determinação simultânea de 3 espécies, o processamento matemático dos dados foi capaz de prever a concentração de todos os metais, com valores de RMSEP baixos e erros relativos menores que 17% para todas as amostras.

Para encerrar a determinação simultânea dos metais pesados com o uso desta fase sensora, fez-se necessário avaliar amostras reais, como será apresentado na sequência.

3.4.6.4. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METAIS PESADOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS MINERAIS

Finalmente, o sensor foi aplicado para a determinação de Cu(II) e Hg(II) em amostras de águas minerais naturais com o intuito de comprovar seu desempenho analítico. Devido ao fato de não haver água contaminada com quantidade suficiente dos metais pesados, as amostras (*Crystal, Indaiá, Schin, São Lourenço e Bonafont*) foram fortificadas com diferentes quantidades de Cu(II) e Hg(II) para serem determinadas suas concentrações com o sensor em desenvolvimento. Os resultados obtidos e expressos na Tabela 3.22 demonstram o desempenho analítico da fase sensora para a determinação de íons de metais pesados em águas.

Tabela 3.22. Valores medidos e previstos de Cu(II) e Hg(II) nas amostras de águas minerais naturais contaminadas com estes metais.

Cu(II) ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a			Hg(II) ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^b		
Esperada	Prevista	Erro (%)	Esperada	Prevista	Erro(%)
14,3	13,4	-6,3	10,1	16,3	61,4
28,2	30,4	7,8	29,7	28,3	-4,7
4,89	7,96	62,8	15,1	14,4	-4,6
26,7	25,9	-3,0	28,3	27,1	-4,2

^a espectros I_0/I suavizados com filtro Savitsky-Golay (janela = 41 pontos), 1135 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, intervalo de 2–10 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = 4,09 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

^b espectros I_0/I suavizados com filtro de Savitsky-Golay (janela = 41 pontos), 1135 variáveis ($\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, intervalo de 2–10 min), 3 variáveis latentes, RMSEP = 2,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Através destes resultados, pode-se considerar que o desempenho do sensor óptico baseado no reagente luminescente bpySOH é evidente, uma vez

que foi possível determinar a concentração dos metais em amostras reais, como aquelas discutidas neste trabalho.

3.4.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego do reagente luminescente bpySOH possibilitou a obtenção de bons resultados na determinação simultânea de metais pesados empregando o reagente imobilizado em uma matriz sol-gel.

Com estas observações, fica evidente a aplicabilidade do sensor em amostras reais para determinar contaminação de águas de rios, por exemplo.

Capítulo 4

*Avaliação do reagente
luminescente bpySOMA*

4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR, MIP_s

A impressão molecular é uma técnica de molde direcionado que permite o desenho e síntese de materiais com sítios de recepção bem definidos para ampla variedade de compostos químicos e bioquímicos (Denizli *et al.*, 2007; Moreno-Bondi *et al.*, 2008). Um esquema simplificado desta técnica é representado na Figura 4.1 (Widstrand *et al.*, 2006).

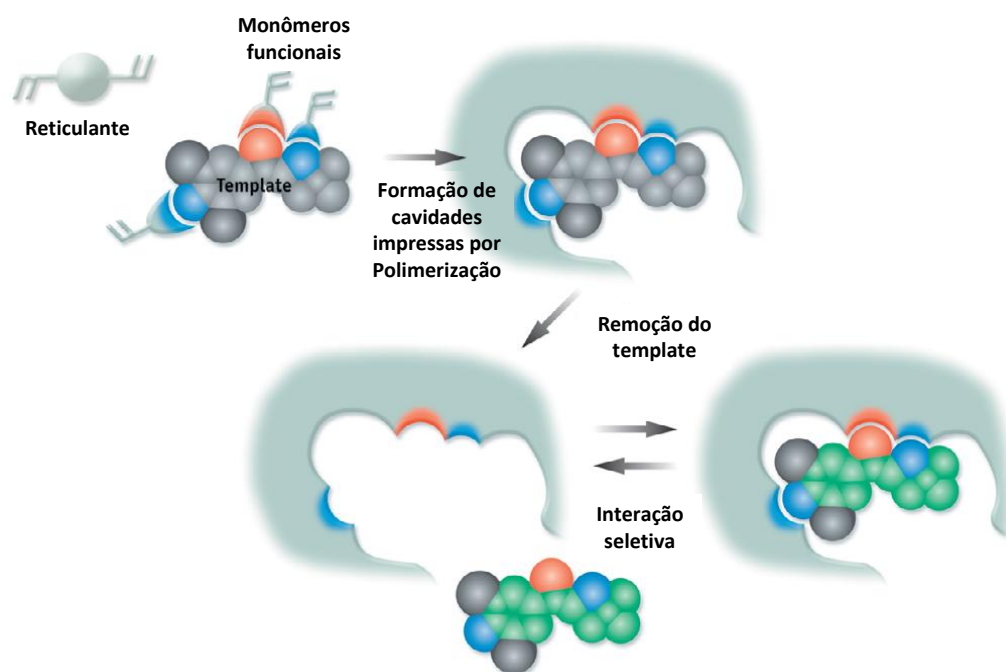


Figura 4.1. Esquema geral do princípio da técnica de impressão molecular.

O molde (*template*, molécula pequena, macromolécula biológica ou microorganismo) interage com um monômero polimerizável que contém grupos funcionais complementares ou elementos estruturais do molde, através de ligações covalentes reversíveis, a partir das quais a molécula-alvo é facilmente removida. Além deste tipo de interação, o molde também pode interagir com o

monômero através de métodos não covalentes, que incluem as interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas ou coordenação com um centro metálico. A interação deve ser reversível, de modo que o molde possa ser removido do polímero, além de poder ligar-se novamente ao sítio específico de reação (*Moreno-Bondi et al., 2008*).

Os complexos de pré-polimerização são combinados com um reticulante, um iniciador e um solvente, que é responsável pela geração de poros no material, permitindo a difusão do analito aos sítios específicos de reação. A polimerização pode ser iniciada térmica ou fotoquimicamente a baixas temperaturas, dependendo das características do *molde* (*Moreno-Bondi et al., 2008*).

A polimerização fixa a posição relativa dos monômeros funcionais ao redor do molde, devido à formação de ligações químicas entre as moléculas de monômeros e de reticulante. Após a remoção do molde, com o emprego de solventes adequados para a sua extração, uma rede tridimensional é obtida apresentando tamanho complementar, forma e distribuição de seus grupos funcionais. Dessa maneira, moléculas do analito podem se ligar novamente a essa rede com elevada seletividade (*Moreno-Bondi et al., 2008; Murray et al., 1997*).

Os materiais produzidos através desta técnica são conhecidos como MIP (do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*) e são facilmente preparados, estáveis, baratos e capazes de reconhecer moléculas-alvo seletivamente (*Singh et al., 2007; Díaz-García et al., 2006*).

De acordo com Wulff e Sarhan (*Murray et al., 1997*), os MIP devem apresentar as seguintes características:

- a) A cavidade da geometria e o arranjo do grupo de ligação devem ser preservados após a retirada do molde.
- b) As cavidades devem apresentar flexibilidade suficiente para permitir rápida absorção e liberação do *molde*, havendo um compromisso com a quantidade de reticulante empregada, uma vez que este diminui a flexibilidade da molécula.
- c) Os materiais poliméricos devem ser química e mecanicamente estáveis, permitindo, assim, sua regeneração e reutilização.

Além destas características, é importante mencionar a importância do solvente utilizado na mistura de polimerização, uma vez que sua escolha pode afetar significativamente as propriedades físicas dos polímeros, como área superficial e tamanho de poros. Ademais, a polaridade dos solventes influencia no desempenho dos MIP, como seletividade, especificidade e habilidade de reconhecimento (*Rao et al., 2006*).

Os MIP apresentam várias aplicações (*Moreno-Bondi et al., 2008; Al-Kindy et al., 2002*) como separações quirais e sensores químicos. Alguns destes polímeros são utilizados para a preparação de materiais sensíveis a íons metálicos e são conhecidos como IIP_s (*Ion Imprinted Polymers*, ou polímeros de íons impressos) (*Rao et al., 2006*). A síntese de polímeros com ligantes ou monômeros complexantes que apresentam propriedades fluorescentes e/ou cromogênicas permite a construção de sensores seletivos para íons metálicos.

A dificuldade em desenvolver sensores com polímeros impressos reside em encontrar um sítio sensível por meio de reconhecimento químico que pode ser acoplado ao sinal de transdução. Os dois principais métodos utilizados para a transdução do sinal analítico em sensores iônicos são baseados em técnicas eletroquímicas e espectroscópicas. A síntese de polímeros exibindo ligações seletivas de um cátion específico envolve a formação de cavidades equipadas com agentes complexantes dispostos de tal maneira a corresponder à carga, número de coordenação, geometria de coordenação e tamanho do cátion alvo. A combinação da seletividade de impressão e de transdução pode resultar em sensores que reconhecem exclusivamente os analitos alvo e não espécies interferentes (*Rao et al., 2006*).

Devido a estas dificuldades, poucos são os trabalhos envolvendo MIP para a determinação de íons metálicos. Díaz-García et al. (2002) propuseram o desenvolvimento de um MIP para a determinação de Al(III). Para tal, empregou-se reagente fluorescente Morin, conhecido por formar complexos fluorescentes com íons metálicos em solução. Quando imobilizado em suportes sólidos, o reagente exibe elevada seletividade para Al(III). Para a preparação do MIP empregou-se ácido metacrílico (monômero funcional), dimetacrilato de etileno glicol (reticulante),

AIBN (iniciador da polimerização), diclorometano, tolueno e acetonitrila (solventes porogênicos, i. e. para a geração de poros) e o complexo Al–morin como molde. A polimerização foi realizada termicamente (60° C) durante 18 h. Partículas entre 80–160 μm foram obtidas e utilizadas como fase sensora. As medidas de fluorescência foram realizadas empregando-se comprimentos de onda de excitação e emissão iguais a 450 e 535 nm, respectivamente. O MIP apresentou elevada seletividade para Al(III) quando comparado com outros íons metálicos, sugerindo que a natureza do íon metálico, o raio iônico e a estequiometria metal–morin foram parâmetros importantes no reconhecimento iônico. O limite de detecção foi igual a 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valor de mesma ordem de grandeza daqueles obtidos com sensores ópticos e sistemas de fluxo. O sensor é reversível e seletivo para Al(III).

Murray e colaboradores (*Murray et al., 1997*) desenvolveram um sensor óptico fluorescente para Pb(II), empregando um complexo de Pb(II)-benzoato de metil-3,5-divinil (DVMB) como molde. A preparação da fase sensora envolveu uma reação de copolimerização *in situ* de 3% do complexo Pb(II)–DVMB (2% DVB) em uma superfície de fibra óptica vinilizada. O metal foi removido da matriz polimérica com água e metanol, seguida de uma solução de EDTA. O sensor apresentou linearidade no intervalo de 70 a $70 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Desta maneira, é evidente que o emprego de MIP para a imobilização de reagentes sensíveis a íons metálicos é de grande importância e interesse.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de fases sensoras para a determinação simultânea de metais pesados em águas empregando reagentes luminescentes. Com isso, torna-se necessário imobilizar estes reagentes em diferentes suportes. Com estas informações, sintetizou-se, a partir do bpySOH, seu derivado bpySOMA, para posterior preparação de MIP. A reação de síntese e os resultados obtidos para a sua caracterização estão na sequência.

4.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO REAGENTE LUMINESCENTE bpySOMA

O procedimento de síntese consistiu em dissolver 40 mg (0,139 mmol) de bpySOH em 2,0 mL de dimetilformamida em um balão de duas bocas de 25 mL. Em seguida foram adicionados 57,7 μ L de trietilamina (3 equivalentes: 0,417 mmol) e borbulhou-se argônio durante 10 minutos. A seguir, adicionou-se 25 mL de anidrido metacrílico (1 equivalente + 20% em excesso: 0,17 mmol) e manteve-se a agitação sob atmosfera de argônio durante 18 h. Evaporou-se a dimetilformamida a 50° C e purificou-se por cromatografia em coluna de sílica com uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH (40:1, v/v) como eluente. Concentrou-se o solvente em rota-evaporador e foram obtidos 40 mg de um sólido de coloração amarela (rendimento 80%). O esquema da reação que descreve a síntese do derivado bpySOMA (2-metileno de ácido butírico-4-[2-(4'-metil-[2,2'] bipyridil-4-il)-vinil]-fenil éster) é apresentada na Figura 4.2.

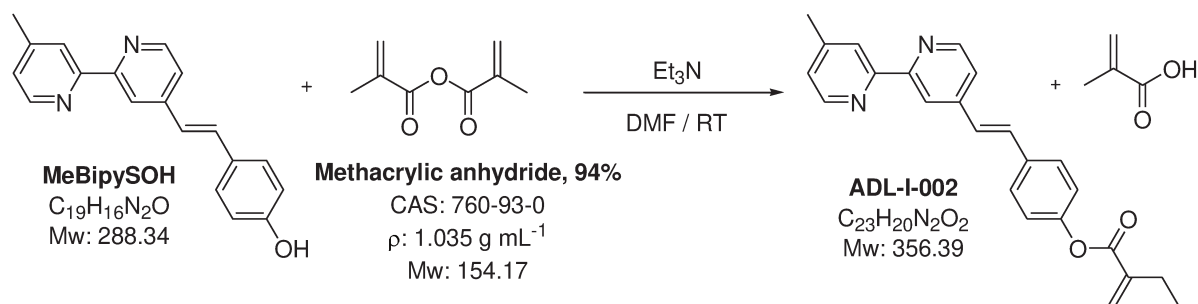


Figura 4.2. Esquema da reação de síntese da reagente luminescente bpySOMA.

Para caracterizar o produto obtido, foram avaliados seus espectros de ¹H-RMN e de massas. O experimento para a obtenção do espectro de ¹H-RMN foi realizado em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear *Bruker Avance DPX300* com frequência de 300 MHz e em CDCl₃. O espectro de ¹H-RMN

é apresentado na Figura 4.3 e a interpretação dos seus resultados está na seqüência:

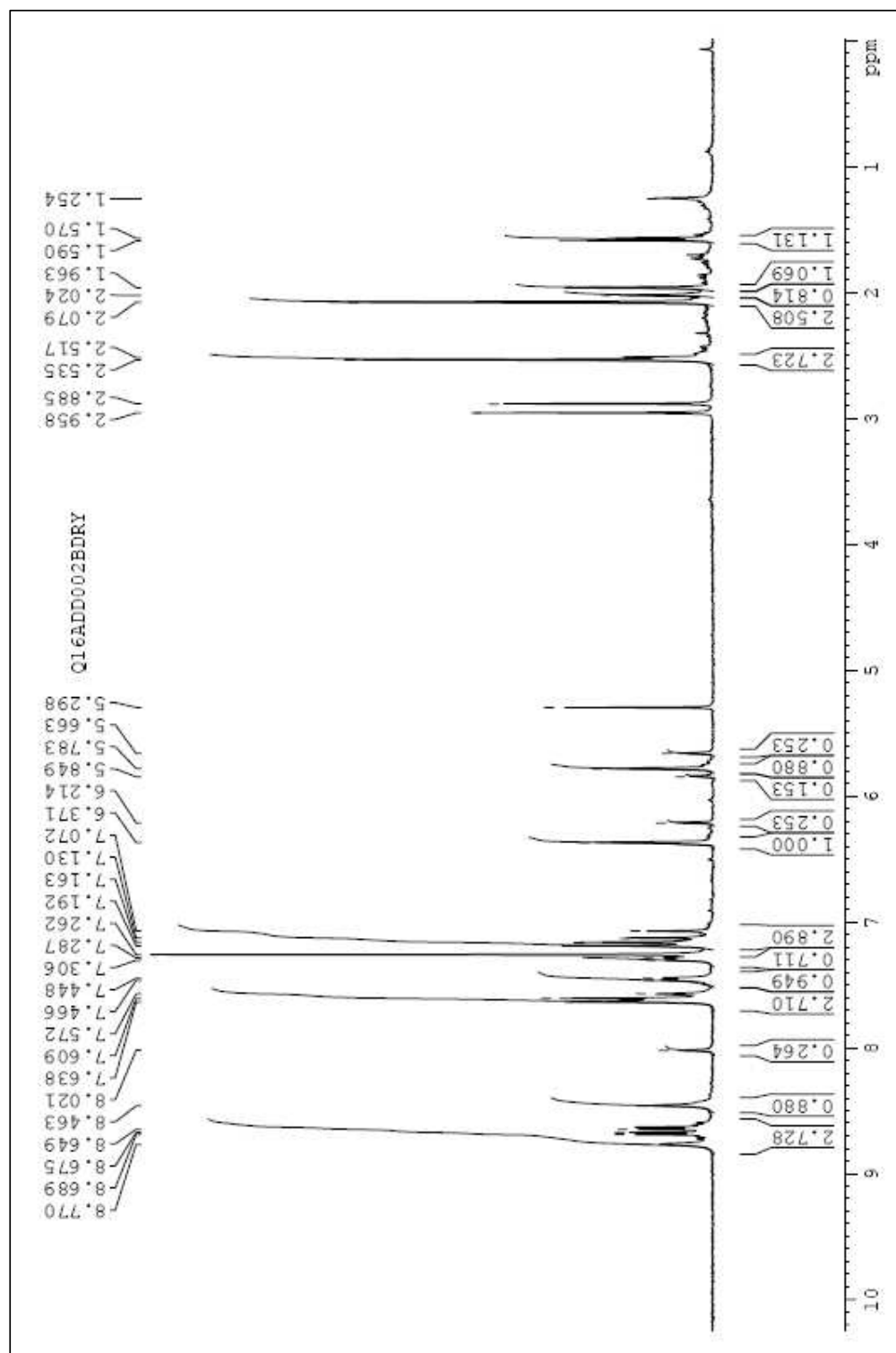


Figura 4.3. Espectro de ^1H -RMN do reagente luminescente bpySOMA.

A interpretação deste espectro envolve a análise dos ambientes químicos ao redor de cada átomo de hidrogênio da estrutura do bpySOMA e, a partir dos valores de constantes de acoplamento obtidas, pode-se atribuí-los aos seguintes grupos funcionais: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 2.08 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 2.53 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 5.78 (1H, s, $=\text{CH}$ metacrilato), 6.37 (1H, s, $=\text{CH}$ metacrilato), 7.10 (1H, d, $J=16.37$ Hz, $=\text{CH}$), 7.18 (2H, d, $J=8.48$ Hz, ArH), 7.30 (1H, d, $J=5.26$ Hz, ArH), 7.46 (1H, d, $J=5.11$ Hz, ArH), 7.57-7.64 (3H, m), 8.46 (1H, s, ArH), ca. 8.64 (1H, d, $J=5.40$ Hz, ArH), ca. 8.68 (1H, d, $J=5.26$ Hz, ArH), 8.77 (1H, s, ArH) ppm.

Para finalizar a caracterização da síntese do reagente bpySOMA, foi obtido um espectro de massas em metanol. A fonte utilizada foi ESI, com polaridade positiva e o resultado obtido foi uma média de 14 espectros. A Figura 4.4 mostra esse espectro contendo o íon molecular.

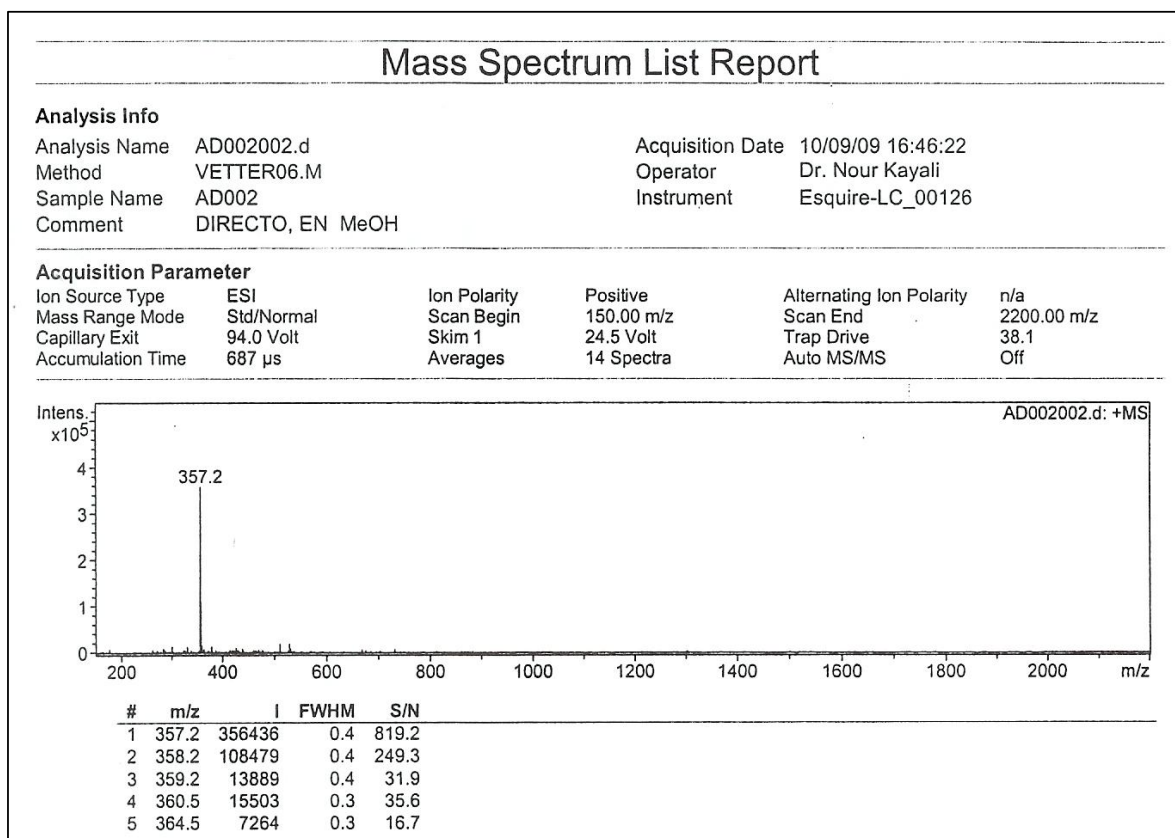


Figura 4.4. Espectro MS do reagente luminescente bpySOMA.

Através deste espectro, observa-se a presença do íon molecular de m/z igual a 357,2 que corresponde a $[M + H]^+$, sendo que M é igual à massa molar do bpySOMA, ou seja, $356,39 \text{ g mol}^{-1}$.

Terminada a caracterização da síntese, iniciou-se a caracterização do reagente luminescente, como aquela realizada com o bpySOH e, em seguida, foram avaliadas as interações com os metais.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO REAGENTE LUMINESCENTE EM SOLUÇÃO

O reagente luminescente bpySOMA também se mostrou solúvel em metanol e, neste solvente, foram obtidos espectros de absorção e emissão, que estão apresentados na Figura 4.5.

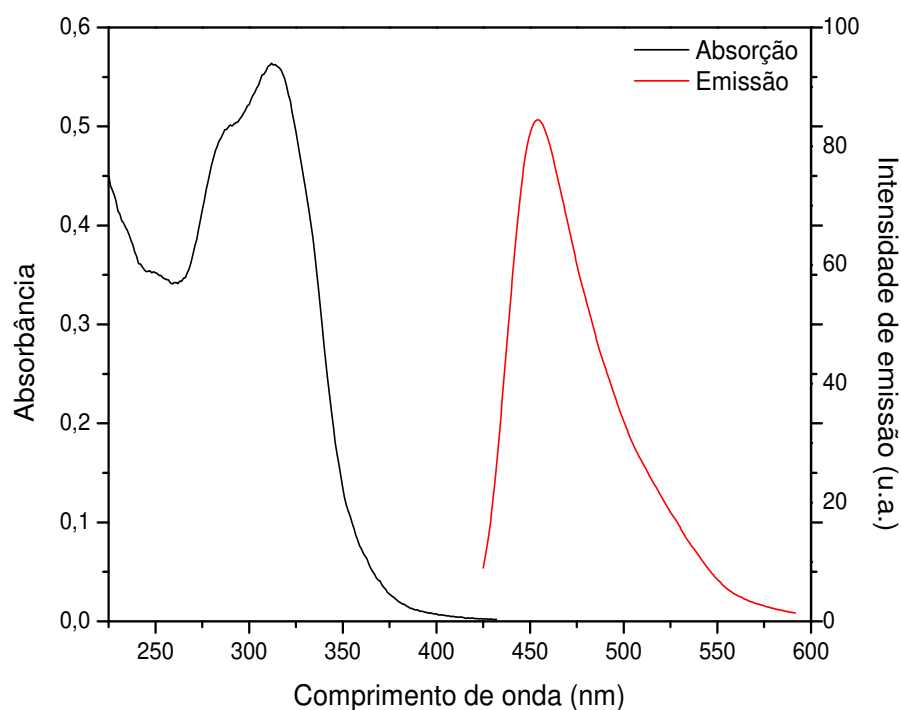


Figura 4.5. Espectros de absorção e emissão de uma solução $3,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de bpySOMA em metanol. Para o espectro de emissão: Comprimento de onda de excitação: 313 nm, fendas de emissão e excitação: 15 e 20 nm e velocidade de varredura: 500 nm min^{-1} .

Através do espectro de absorção observa-se que as bandas de maiores intensidades são em 313 e 285 nm e, comparando-se estes valores com as bandas de bpySOH, verifica-se que há um deslocamento de aproximadamente 20 nm para a região do ultravioleta. Em relação ao espectro de emissão, verifica-se que o comprimento de onda no qual há máxima intensidade de emissão de fluorescência é igual a 455 nm.

Assim como para bpySOH, soluções contendo $2,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (absorção e emissão) e $3,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (tempo de vida) foram preparadas em solução tampão fosfato 20 mmol L^{-1} em diferentes valores de pH para avaliar o comportamento do bpySOMA nestes meios. Os espectros de absorção e emissão para os distintos valores de pH estão representados nas Figuras 4.6 e 4.7, respectivamente.

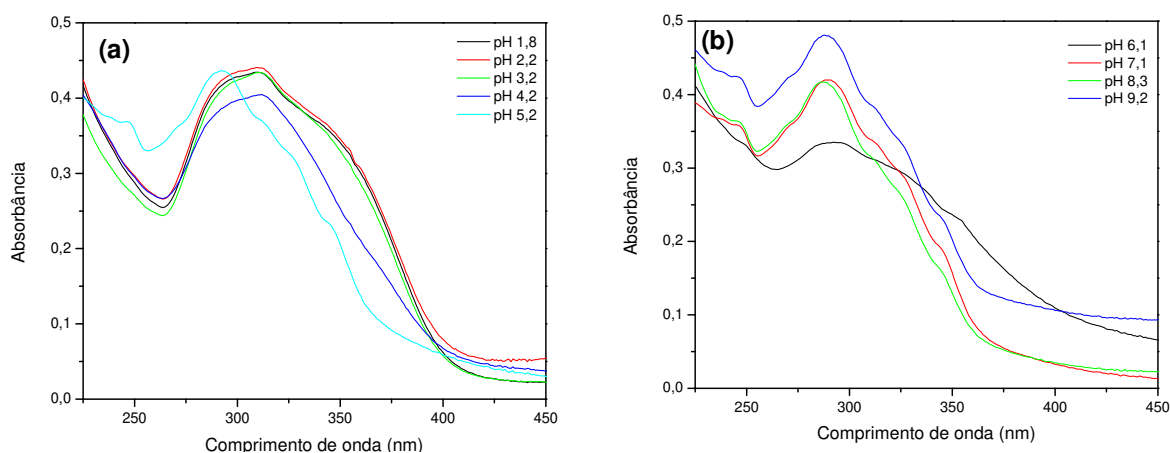


Figura 4.6. Espectros de absorção de bpySOMA $2,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. (a) pH 1,8–5,2 e (b) pH 6,1–9,2.

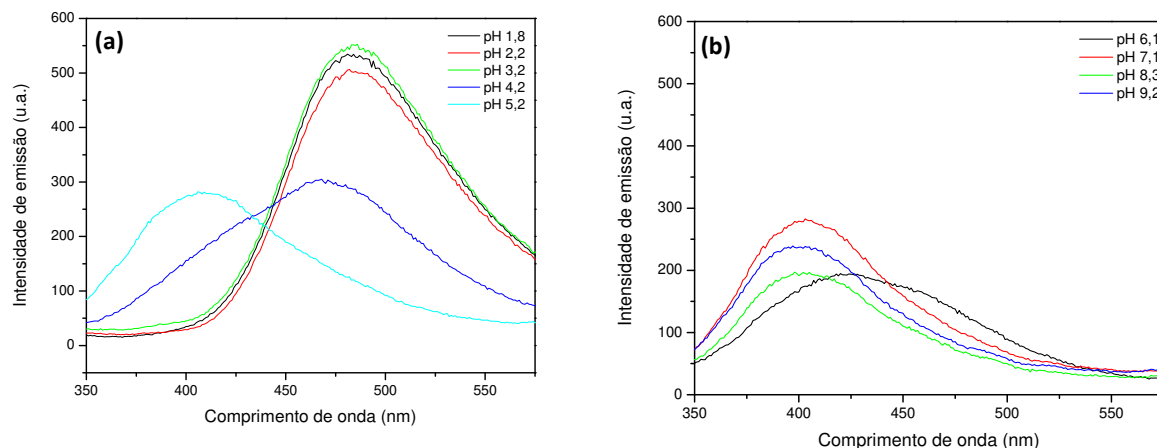


Figura 4.7. Espectros de emissão de bpySOMA $2,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. **(a)** pH 1,8–5,2 e **(b)** pH 6,1–9,2. (Comprimento de onda de excitação: 310 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm, velocidade de varredura: 600 nm min^{-1}).

Observando-se os espectros de absorção, pode ser verificado que a partir de pH 5,2 há um deslocamento da banda de máximo valor de absorbância para a esquerda e com o aumento do pH a intensidade dessa banda aumenta. Nota-se que os espectros são bastante distintos dependendo do valor de pH no qual foi preparada a solução do reagente luminescente, indicando possíveis protonação e desprotonação de sua estrutura.

Os espectros de emissão, por sua vez, também apresentam diferenças significativas em função do pH do meio. Até pH 3,2 observa-se certa similaridade das curvas, com máximos de intensidade de emissão de fluorescência ocorrendo em 485 nm. Em pH 4,2 é possível verificar uma brusca diminuição da intensidade de emissão e um alargamento da banda e a partir de pH 7,1 o comprimento de onda onde se observa máxima intensidade de emissão é igual a 400 nm. Esse comportamento se deve às emissões das formas protonadas e desprotonadas do reagente luminescente, assim como ocorreu com o bpySOH, discutido anteriormente.

Para finalizar a caracterização do comportamento do ligante em função do pH são apresentados a seguir, os valores de tempo de vida do estado excitado em função deste parâmetro.

Tabela 4.1. Valores de tempo de vida do estado excitado em função do pH para bpySOMA $3,53 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

pH	τ (ns)
2,0	0,16
3,0	0,10
4,0	2,99
5,0	3,48
6,0	3,08
7,0	3,83
8,0	4,71
9,0	5,18
10,0	4,30
11,0	5,36
12,0	4,93

Embora haja algumas discrepâncias nos resultados obtidos, verifica-se que, de maneira geral, com o aumento do pH há um aumento no valor do tempo de vida do estado excitado.

O ligante bpySOMA se mostrou solúvel em todos os solventes avaliados: tolueno, diclorometano, éter dietílico, acetonitrila e metanol. Os espectros de emissão são apresentados a seguir.

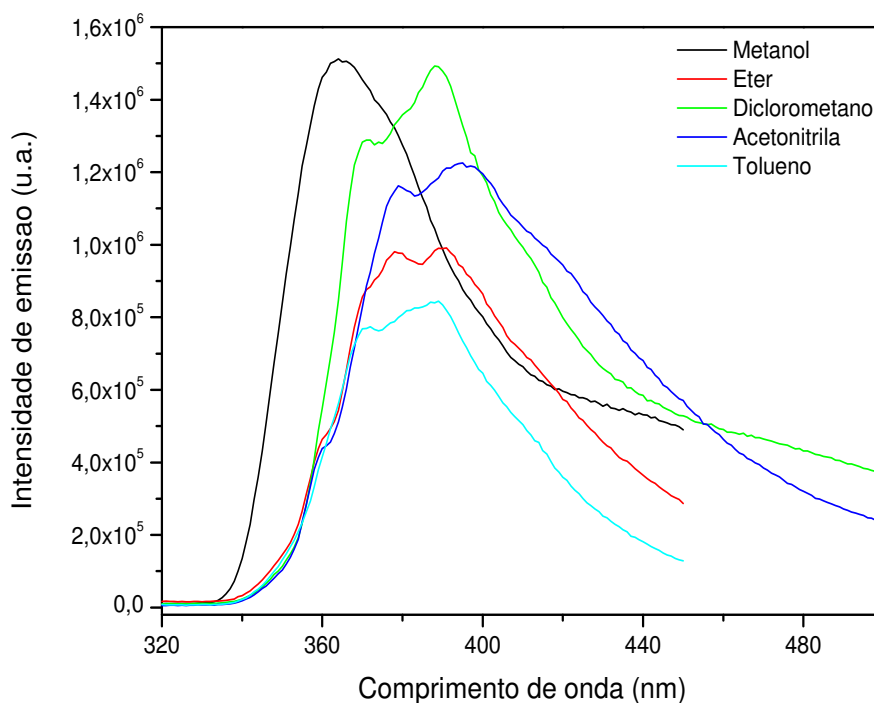


Figura 4.8. Espectros de emissão do reagente bpySOMA $3,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ obtidos em diferentes solventes. Comprimento de onda de excitação: 293 nm, fendas de emissão e excitação: 4nm.

A partir destes espectros, observa-se que aquele obtido em metanol é o mais distinto. Isso se deve ao fato de se tratar de um solvente anfiprótico, diferentemente dos outros solventes, apróticos, que apresentam perfis semelhantes.

4.4. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES bpySOMA–METAIS EM METANOL

Assim como para o bpySOH, foram preparadas soluções dos íons metálicos Cd(II), Cu(II), Fe(III), Hg(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para observar o comportamento dos complexos frente aos espectros de absorção e emissão na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de bpySOMA.

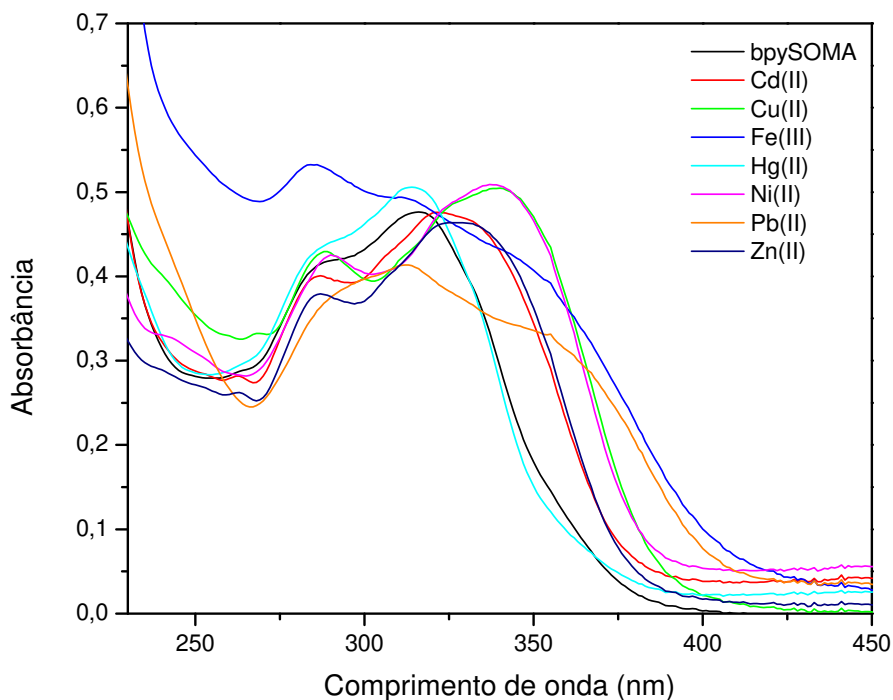


Figura 4.9. Espectros de absorção de bpySOMA na presença de distintos íons metálicos.

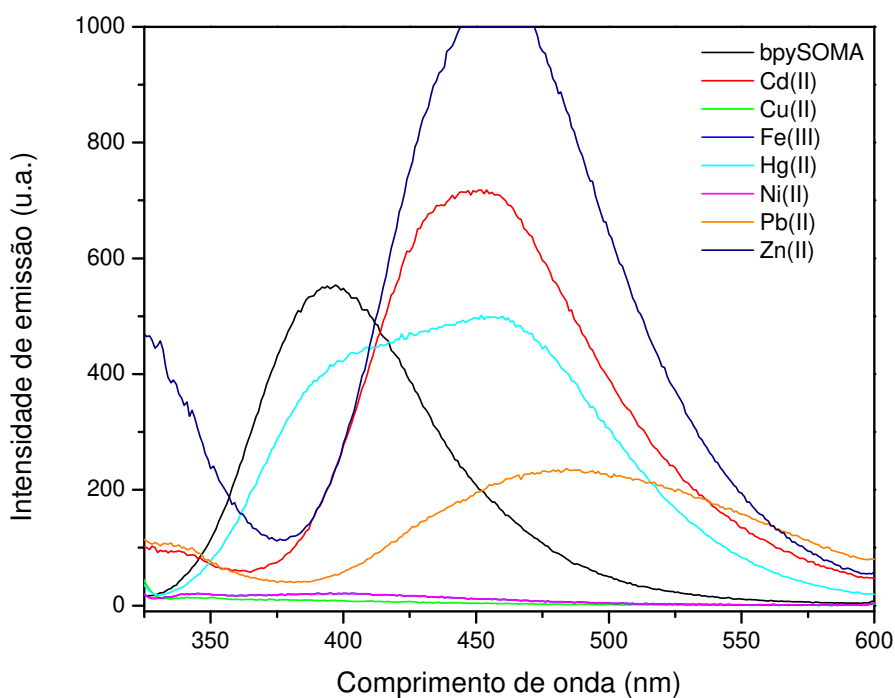


Figura 4.10. Espectros de emissão de bpySOMA na presença de diferentes metais pesados. Comprimento de onda de excitação: 310 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm, velocidade de varredura: 600 nm min⁻¹.

Os espectros de absorção apresentam diferenças significativas para os distintos complexos metálicos. Na ausência de íon metálico, a banda de máximo valor de absorbância está localizada em 315 nm. Os espectros dos complexos de Cu(II) e Ni(II) são semelhantes, com máxima absorção em 340 nm. O espectro do complexo de Hg(II) é bastante similar ao espectro do bpySOMA livre, com um ligeiro aumento no valor da absorbância em 315 nm. Os espectros dos complexos de Cd(II) e Zn(II), por sua vez, apresentam máximo valor de absorbância em 325 nm, ou seja, estão deslocados para a direita em relação ao ligante livre. Para o complexo de Pb(II), nota-se uma diminuição no valor da absorbância em 315 nm. E, por fim, o complexo de Fe(III) apresenta um comportamento distinto dos metais avaliados, sem uma banda de absorção de máximo bem definida. Isso porque o íon Fe(III) pode ter sofrido hidrólise nestas condições experimentais.

Observando-se os espectros de emissão apresentados na Figura 4.10, pode-se verificar que os complexos influenciam de maneira diferenciada a emissão do bpySOMA. O reagente livre apresenta valor máximo de emissão em 395 nm, enquanto os complexos de Cu(II), Fe(III) e Ni(II) suprimem totalmente sua emissão. O complexo de Cd(II) apresenta intensidade de emissão maior que a do bpySOMA e seu máximo ocorre em 450 nm. Hg(II) provoca supressão da emissão do ligante e seu complexo apresenta uma banda larga em 430 nm. Pb(II), por sua vez, também é um supressor da intensidade de emissão do bpySOMA, apresentando uma banda larga em torno de 485 nm. E, finalmente, o complexo de Zn(II) provoca um aumento na intensidade de emissão do ligante. Experimentos realizados com os mínimos valores de abertura de fenda foram realizados, ainda assim houve saturação do sinal. Seu espectro apenas ilustra que é um forte agente que aumenta a emissão do ligante livre. Terminada esta caracterização dos complexos metálicos em solução, foram realizados experimentos para o cálculo das constantes de estabilidade e estequiometria de complexação, apresentados a seguir.

4.4.1. CÁLCULO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS METÁLICOS

Foram calculadas as constantes de estabilidade e as estequiometrias dos complexos de Cu(II), Hg(II) e Zn(II), uma vez que se acreditou que estes metais forneceriam os melhores resultados, como observado com bpySOH.

O procedimento empregando o software *Hyperquad 2006* foi o mesmo adotado para o bpySOH. A seguir serão apresentados os espectros de absorção para os três complexos avaliados.

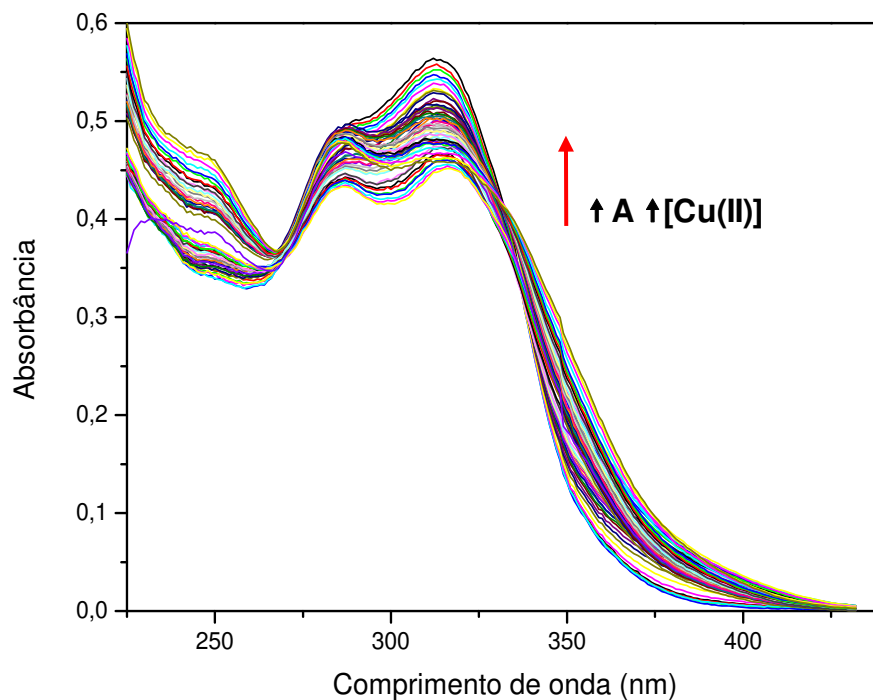


Figura 4.11. Espectros de absorção para o complexo Cu(II)—bpySOMA, onde A corresponde à absorbância.

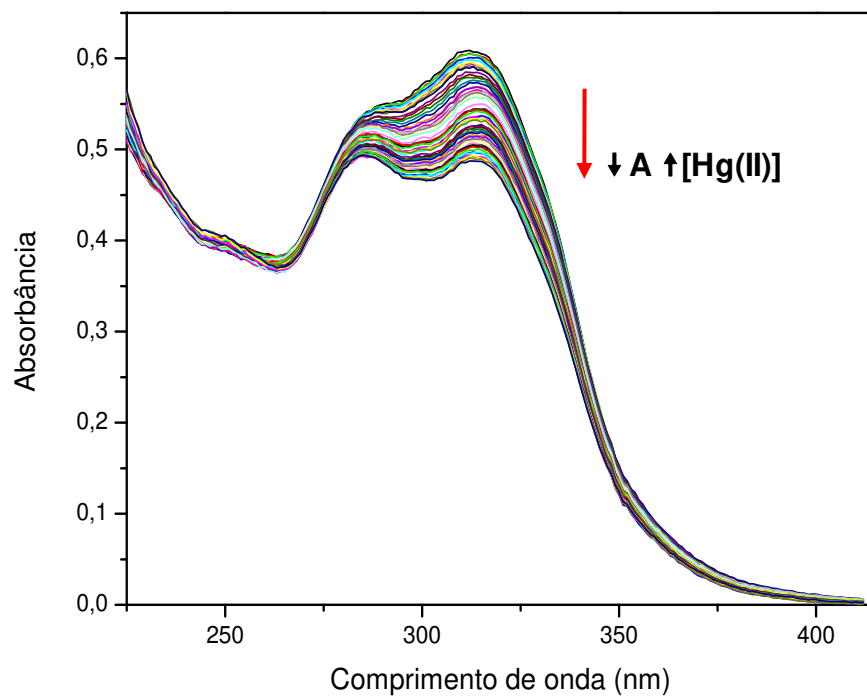


Figura 4.12. Espectros de absorção para o complexo Hg(II)–bpySOMA, onde A corresponde à absorbância.

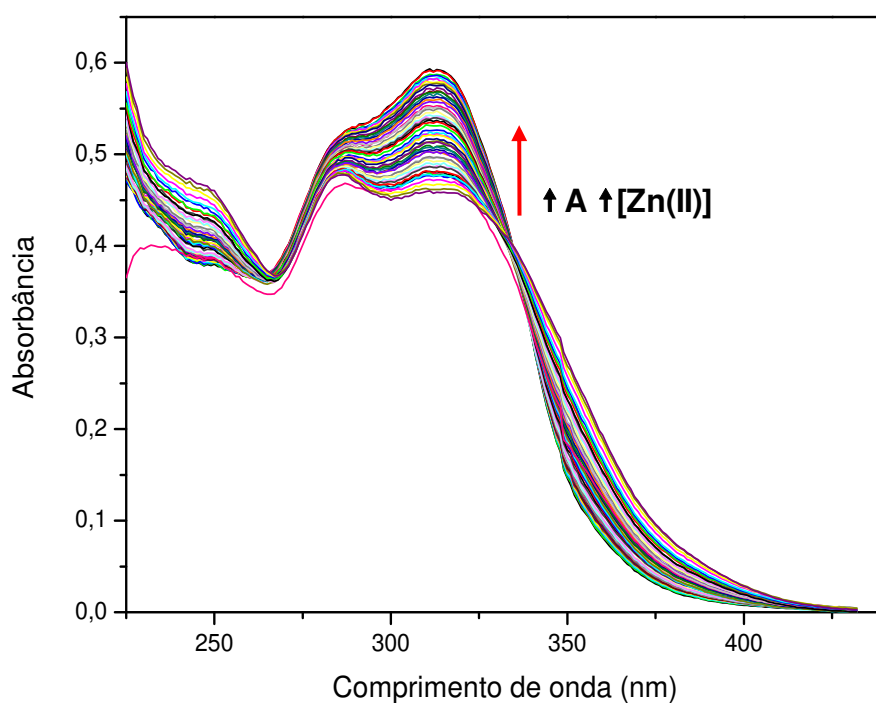


Figura 4.13. Espectros de absorção para o complexo Zn(II)–bpySOMA, onde A corresponde à absorbância.

Observa-se que a formação do complexo de Cu(II) (Figura 4.11) não implica no surgimento de outra banda de absorção e sim, na diminuição da intensidade da banda em 313 nm. Verifica-se, ainda, a presença de um ponto isobéstico em 330 nm e diferenças nos espectros em função da concentração de metal, indicando a formação do complexo entre Cu(II) e bpySOMA. Na Figura 4.12 na qual foram apresentados os espectros de absorção para o complexo de Hg(II), observa-se que para este metal ocorre diminuição da intensidade em 313 nm com o aumento da concentração de metal. Verifica-se, ainda, que não há ponto isobéstico. Para o complexo de Zn(II), cujos espectros estão na Figura 4.13, nota-se um ponto isobéstico em 335 nm e, uma vez mais, uma diminuição da intensidade da banda em 313 nm. A partir destes espectros e com o emprego do programa *Hyperquad 2006* foram calculadas as constantes de estabilidade destes complexos e suas estequiometrias. Os valores determinados são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Constantes de estabilidade e estequiometrias dos complexos com o ligante bpySOMA.

Metal	K	bpySOMA:M(II)
Cu(II)	$2,04 \times 10^8$	2:1
Hg(II)	$7,42 \times 10^9$	2:1
Zn(II)	$5,34 \times 10^3$	1:1

A partir destes valores, pode-se verificar que para o ligante bpySOMA o complexo mais estável é aquele para Hg(II), seguido de Cu(II) e, uma vez mais, o complexo de Zn(II) é o menos estável dentre os três. Outro parâmetro que pôde ser calculado com este programa foi a estequiometria de complexação e verificou-se que apresentam as mesmas estequiometrias dos complexos com bpySOH.

4.5. TÉCNICA DE IMOBILIZAÇÃO EMPREGADA

Empregou-se um MIP para encapsular este reagente, uma vez que, como mencionado anteriormente, esta técnica oferece inúmeras vantagens, principalmente para o desenvolvimento de materiais seletivos a um determinado analito. A composição avaliada foi seletiva a Cu(II), uma vez que utilizou-se um sal de cobre na sua síntese. Além do MIP, sintetizou-se também o NIP, ou seja, o polímero não impresso, contendo todos os componentes da mistura, exceto o analito (sal de Cu(II)) para comprovar a seletividade do MIP. A seguir são apresentadas as concentrações utilizadas de cada componente empregadas na síntese.

Tabela 4.3. Composição empregada para a síntese do MIP de bpySOMA e Cu(II).

Componente	n (mmol)	Quantidade
bpySOMA	$12,3 \times 10^{-3}$	4,38 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	$6,15 \times 10^{-3}$	1,53 mg
HEMA ^a	30,7	3,73 mL
Acrilamida ^a	14,05	1,00 g
AMH ^{a,b}	1,33	250 µL
Iniciador ^c	0,39	100 mg
Metanol	123,45	5,00 mL

^a monômeros funcionais

^b 3-(acriloloxi)-2- metacrilato de hidroxipropila

^c 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona

O procedimento para a preparação do MIP consistiu em acrescentar todos os reagentes, sob agitação, em um béquer e, após a total homogeneização, adicionou-se o iniciador, para que comesçasse a polimerização do material. A reação foi conduzida em um reator contendo 2 lâmpadas de luz negra (365 nm) de 15 W de potência cada uma. O reator foi mantido em uma câmara fria a 4 °C durante 18 h. Transcorrido este período, observou-se que as colorações do MIP

(vermelha) e NIP (amarela) foram bastante distintas, o que sugere diferenças nas suas redes poliméricas, por exemplo. Em seguida, os materiais foram lavados com HCl 0,1 mol L⁻¹ para a remoção de componentes que não polimerizaram e, principalmente, para a remoção dos íons Cu(II) do MIP. Após essa lavagem com ácido, foram lavados com água deionizada, secos em estufa a 50° C durante 4 h, triturados e peneirados (100–150 µm) para então serem empacotados na célula de medidas. A Fig. 4.14 apresenta uma fotografia dos materiais após a polimerização, após as etapas de lavagem e trituração para ilustrar as diferentes colorações do MIP e NIP em cada etapa da síntese.

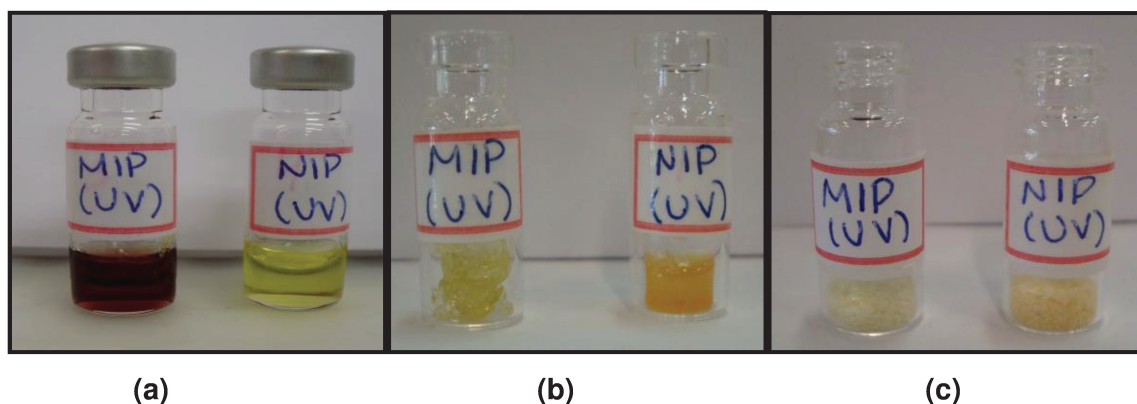


Figura 4.14. Fotografia dos materiais MIP e NIP para a imobilização do bpySOMA. **(a)** Após a reação de polimerização. **(b)** Após a lavagem com ácido e água e **(c)** depois de triturados.

4.5.1. AVALIAÇÃO DO MIP E DO NIP

Com o reagente imobilizado, realizou-se o procedimento de registrar espectros de emissão em função do pH durante 10 minutos para verificar o comportamento do ligante imobilizado em diferentes meios. As Figuras 4.15 e 4.16 apresentam os resultados obtidos nesse experimento.

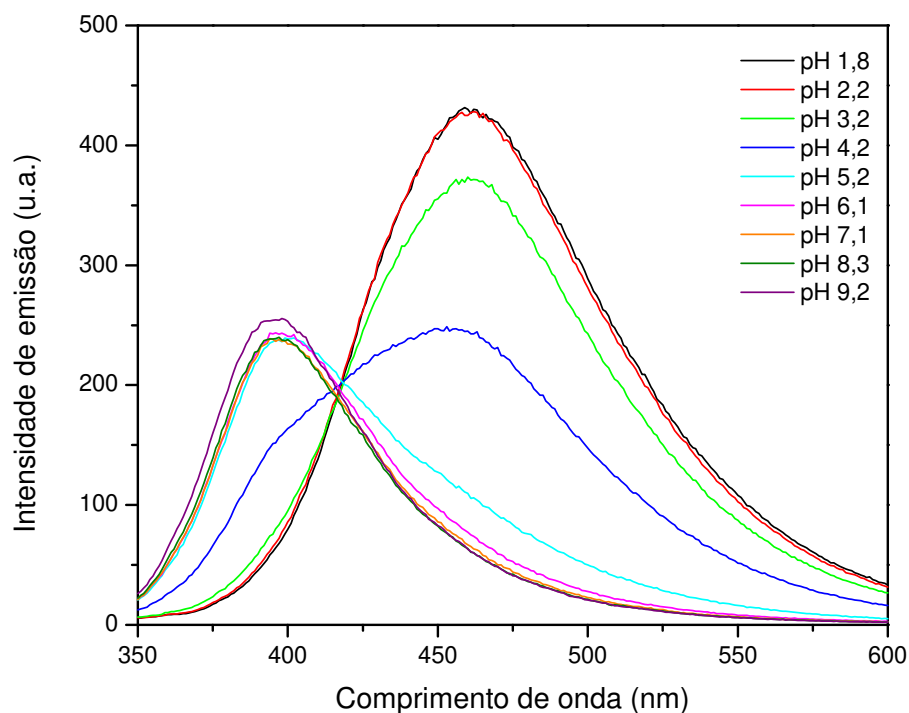


Figura 4.15. Espectros de emissão do MIP em solução tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH. Comprimento de onda de excitação: 330 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm e velocidade de varredura: 600 nm min⁻¹.

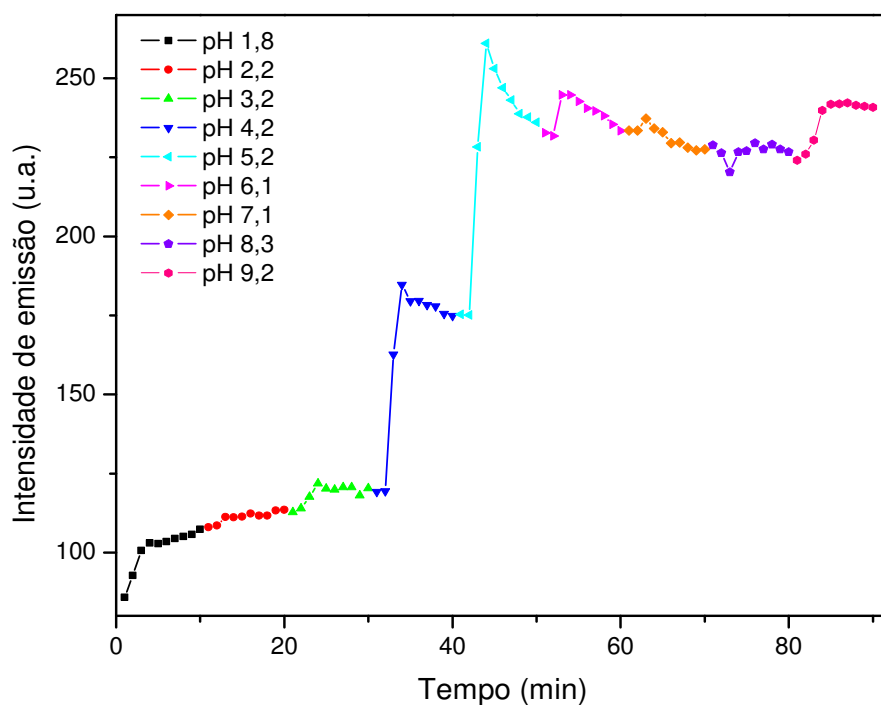


Figura 4.16. Variação da intensidade de emissão do MIP em diferentes valores de pH em função do tempo medida em 405 nm.

A partir da Figura 4.15 observa-se que em meio ácido, a banda de máxima emissão está localizada em 460 nm. Com o aumento do valor do pH e a partir de pH 5,0 esse máximo de intensidade se desloca para a esquerda (400 nm). Esse deslocamento se deve à protonação e desprotonação do reagente luminescente. A Figura 4.16, por sua vez, mostra a variação da intensidade de emissão com o pH em função do tempo.

Como calculado para o bpySOH, os valores de pKa dos grupos N do bpySOMA foram idênticos ao primeiro.

Inicialmente realizou-se uma varredura em diferentes valores de comprimento de onda de excitação para verificar em qual ocorre máxima emissão de fluorescência. Este valor corresponde a 330 nm, que foi empregado como comprimento de onda de excitação do material, como mostra a Figura 4.17 em solução tampão pH 5,0.

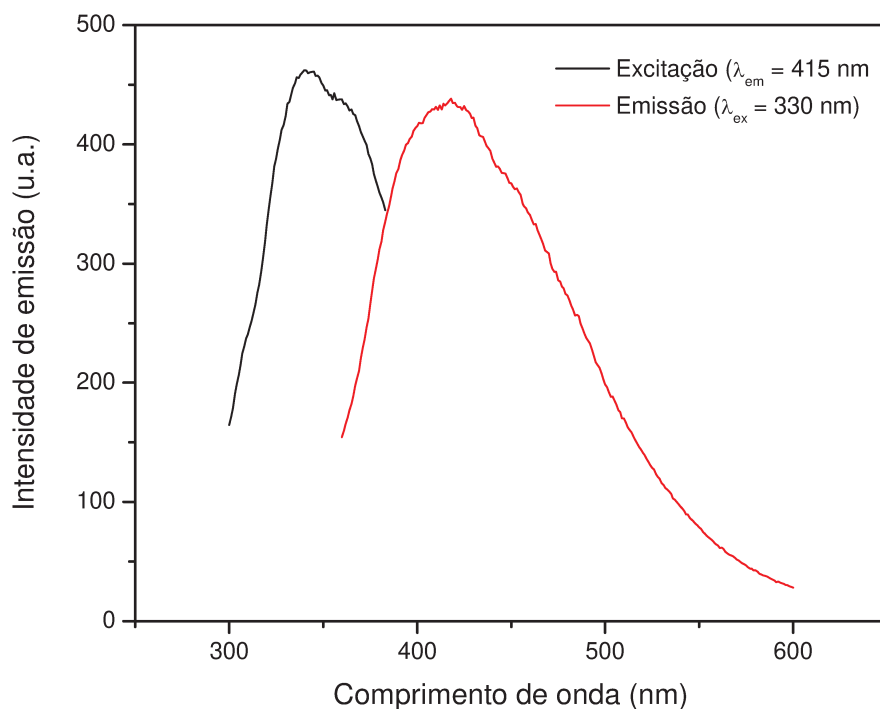


Figura 4.17. Espectros de excitação e emissão do MIP em solução tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 5,0. Comprimento de onda de excitação: 330 nm, comprimento de onda de emissão: 415 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm e velocidade de varredura: 600 nm min⁻¹.

A partir destes espectros, observa-se que o comprimento de onda no qual há máxima intensidade de emissão de fluorescência é 415 nm, quando o material é excitado em 330 nm. Uma vez mais, assim como para o bpySOH, observa-se um deslocamento nos valores de comprimentos de onda de máximas intensidades de emissão e excitação devido à imobilização do reagente.

Assim como para o sol-gel, empregou-se uma solução de ácido clorídrico para a regeneração do sinal analítico após a interação da fase sensora com os íons de metais pesados. Para esta avaliação, utilizou-se uma solução de Cu(II) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e soluções de HCl 0,1; 0,05 e 0,01 mol L^{-1} . A curva de resposta apresentada na Figura 4.18 mostra a regeneração para estas três concentrações utilizadas.

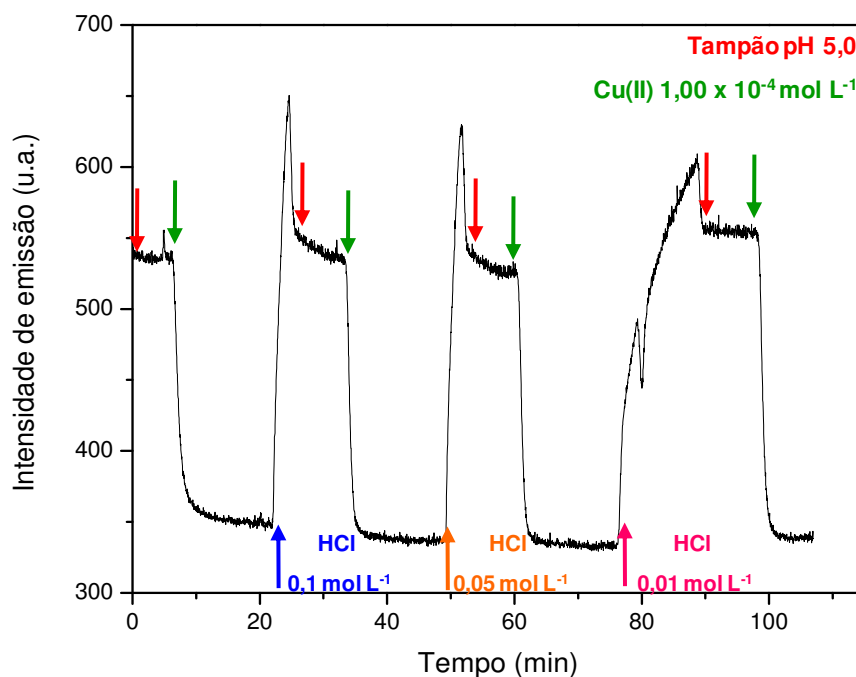


Figura 4.18. Curva de resposta para Cu(II) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ empregando soluções de HCl de diferentes concentrações para regenerar o sinal analítico da fase sensora. Comprimento de onda de excitação: 330nm, comprimento de onda de emissão: 415 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm e sinal registrado a cada 2 segundos.

Como pode ser verificado a partir desta curva, os tempos necessários para a regeneração do sinal quando são empregadas soluções de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ são praticamente os mesmos (2 minutos), diferentemente de HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, para qual são necessários 12 minutos para que se regenere o sinal analítico. Dessa maneira, será utilizada nos próximos experimentos como solução regeneradora HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

O pH da solução tampão fosfato foi avaliado com a intenção de se verificar em qual valor ocorrem maiores diferenças de intensidade de emissão e melhor resposta para os íons metálicos. Para tal, foram empregadas soluções tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com valores de pH iguais a 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0. A resposta foi avaliada para uma solução de Cu(II) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ empregando HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ para a regeneração do sinal analítico. As curvas para os valores de pH analisados são apresentadas na Figura 4.19.

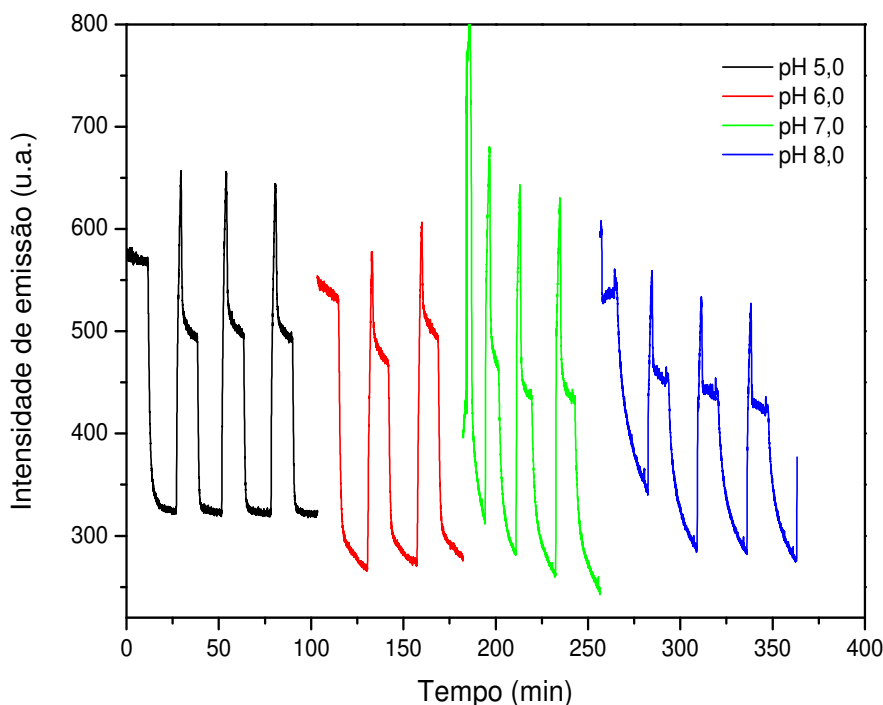


Figura 4.19. Resposta da fase sensora para Cu(II) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções tampão fosfato de diferentes valores de pH. (Mesmos parâmetros da Figura 4.15).

Verifica-se que em pH 5,0 a resposta é mais estável quando comparada com os outros valores. A diferença de intensidade de emissão entre a linha base (solução tampão) e o metal é praticamente a mesma e pelo fator da estabilidade mencionado anteriormente, escolheu-se pH 5,0 para posteriores avaliações. Em soluções tampão com valores de pH 7,0 e 8,0 pode ocorrer uma competição entre a reação de complexação do íon metálico e sua precipitação. Por esta razão, observa-se que a estabilidade do sinal analítico neste meio é menor, quando comparada com aquela obtida em meio ácido.

A força iônica da solução tampão fosfato também foi estudada e para tal foram avaliadas três concentrações em pH 5,0: 0,010; 0,025 e 0,050 mol L⁻¹. A Figura 4.20 representa as curvas de resposta para Cu(II) 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ preparada nestas concentrações da solução tampão.

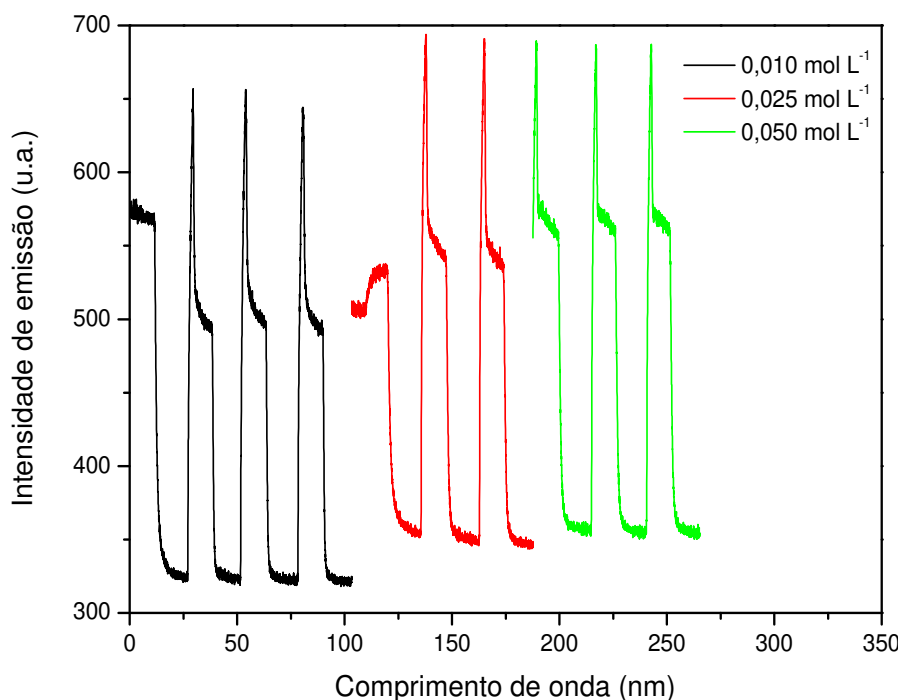


Figura 4.20. Resposta da fase sensora para Cu(II) 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em soluções tampão fosfato pH 5,0 de diferentes valores de força iônica. (Mesmos parâmetros da Figura 4.15).

No estudo da força iônica, pode-se verificar que a solução tampão com concentração de 0,050 mol L⁻¹ apresenta maior capacidade de tamponamento e, por esta razão, ela será empregada nos estudos posteriores.

4.5.2. RESPOSTA DO MIP E DO NIP PARA Cu(II)

As respostas das curvas analíticas do MIP e do NIP têm como finalidade comprovar a seletividade do polímero impresso frente ao não impresso para o analito de interesse, nesse caso íons Cu(II). Para este estudo, foram preparadas soluções de Cu(II) no intervalo de 1,00–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o sinal analítico foi registrado em função do tempo. As medidas foram realizadas em duplicata e a seguir são apresentados os resultados obtidos para o MIP e NIP, respectivamente.

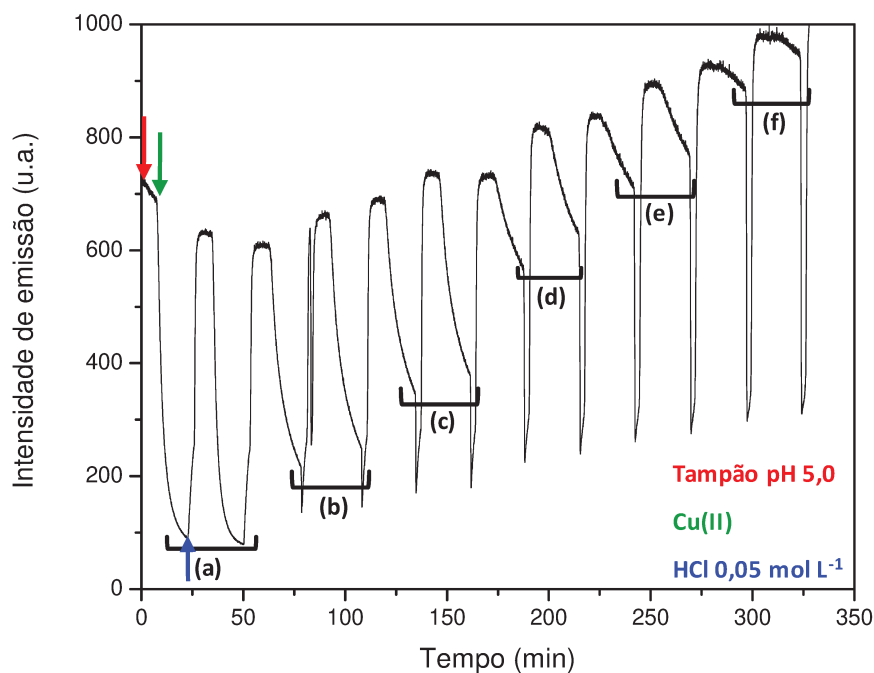


Figura 4.21. Curva analítica de resposta do MIP para diferentes concentrações de Cu(II): (a) 61,3, (b) 12,3, (c) 6,13, (d) 1,23, (e) 0,61 e (f) 0,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

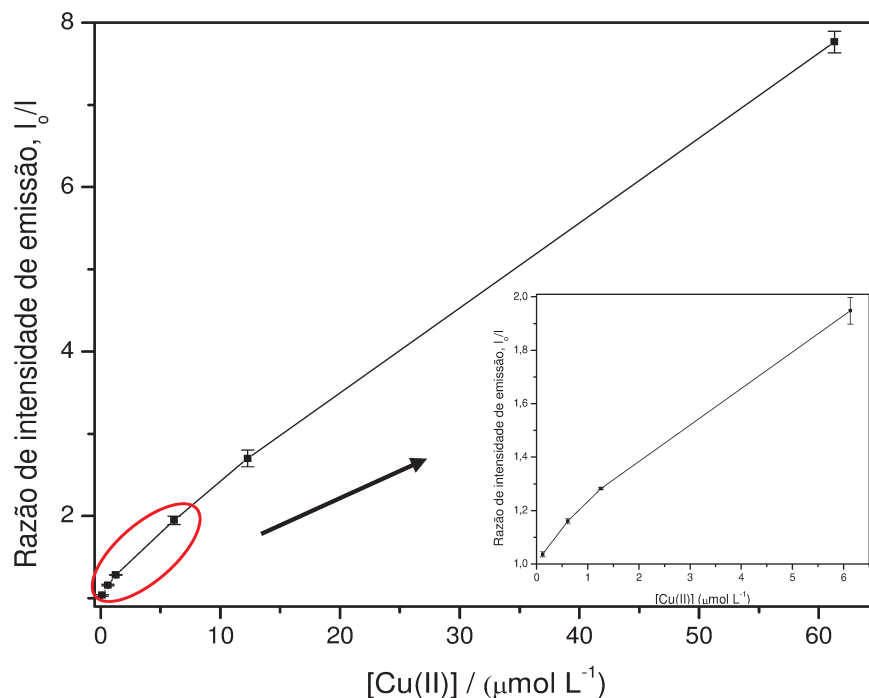


Figura 4.22. Curva de razão de intensidades em função da concentração de Cu(II) obtida para o MIP.

Como pode ser observado a partir da Figura 4.21, para o MIP a regeneração do sinal analítico com HCl 0,05 mol L⁻¹ não proporcionou um aumento da intensidade de emissão, e sim sua diminuição. Além disso, nota-se um aumento crescente da intensidade correspondente a linha de base, fato que pode ser devido às irregularidades no tamanho das partículas, como discutido anteriormente para o sol-gel de bpySOH.

Muito embora haja essas dificuldades na execução do experimento, observa-se que a resposta da fase sensora para íons Cu(II) é satisfatória, proporcionando um intervalo de resposta amplo, sendo possível determinar concentrações muito baixas do metal. Assim sendo, pode-se dizer que a fase sensora apresenta excelente desempenho para a determinação de Cu(II). A seguir são apresentados os resultados obtidos para o NIP.

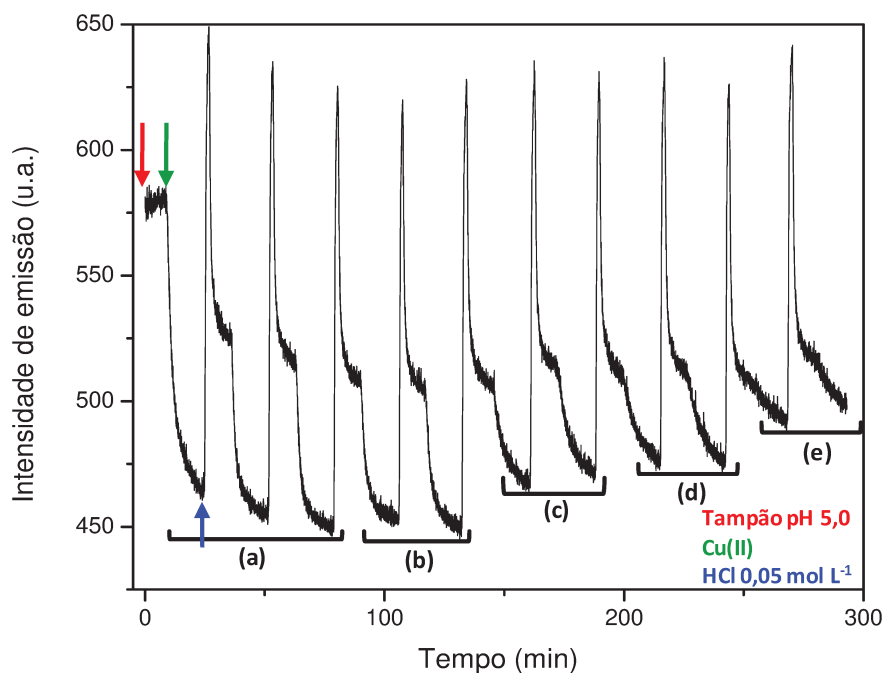


Figura 4.23. Curva analítica de resposta do NIP para diferentes concentrações de Cu(II): (a) 111, (b) 57,0, (c) 11,5, (d) 5,55 e (e) 1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

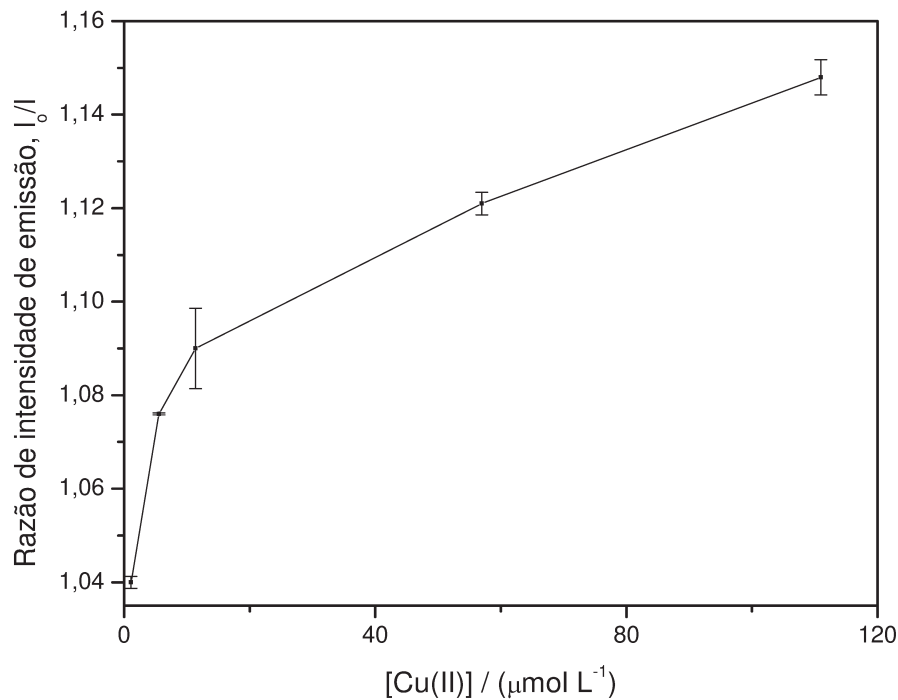


Figura 4.24. Curva de razão de intensidade em função da concentração de Cu(II) obtida para o NIP.

Para o NIP, por sua vez, a regeneração forneceu um aumento do sinal e observa-se resposta razoável para as diferentes concentrações de metal analisadas. Através da curva de intensidade de emissão em função da concentração, pode-se notar que a resposta não é linear e os valores de razão não são tão elevados como para o MIP. Comparando-se esta curva para o MIP e o NIP tem-se o seguinte comportamento:

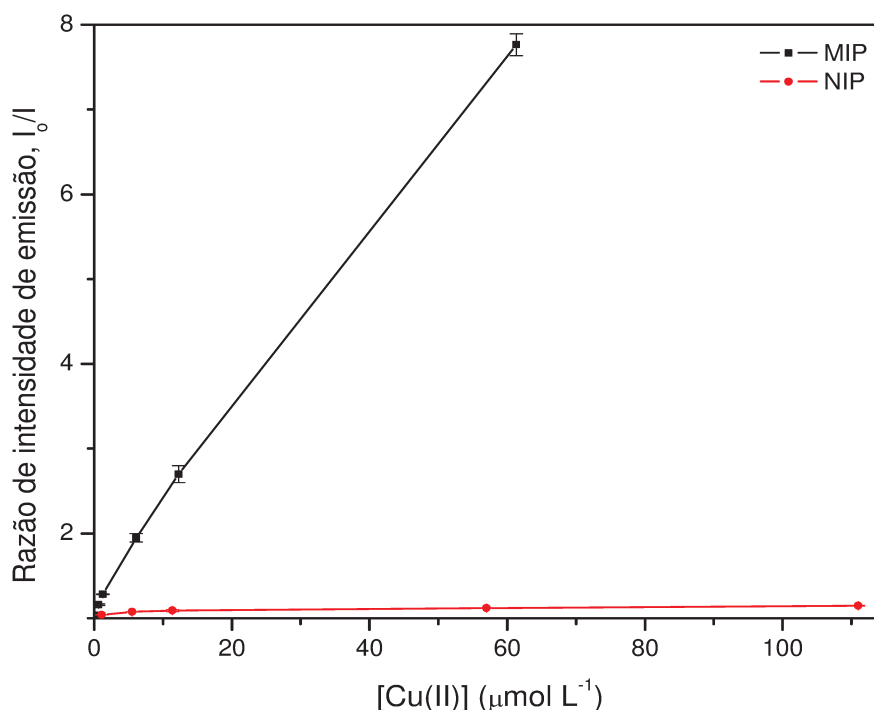


Figura 4.25. Comparação da resposta obtida para MIP e NIP na avaliação de diferentes concentrações de Cu(II).

Comparando-se as respostas fornecidas pelo MIP e NIP fica claro que a sensibilidade para o polímero impresso é maior que aquela para o polímero não impresso, indicando o sucesso da síntese e da aplicação deste material para a determinação de íons Cu(II). Terminada essa etapa da caracterização, foram avaliadas as respostas para outros metais pesados, como é apresentado a seguir.

4.5.3. SELETIVIDADE FRENTE A METAIS PESADOS

Muito embora o MIP preparado seja seletivo para íons Cu(II) , é necessário avaliar a seletividade do material para outros metais pesados. Para tal estudo, foram avaliadas as respostas para Cd(II) , Fe(III) , Hg(II) , Ni(II) , Pb(II) e Zn(II) , todos preparados em solução tampão pH 5,0 e com concentração igual a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foram avaliados três ciclos de resposta e o resultado apresentado na Figura 4.26 é uma média das diferenças de intensidade em tampão e na presença do metal.

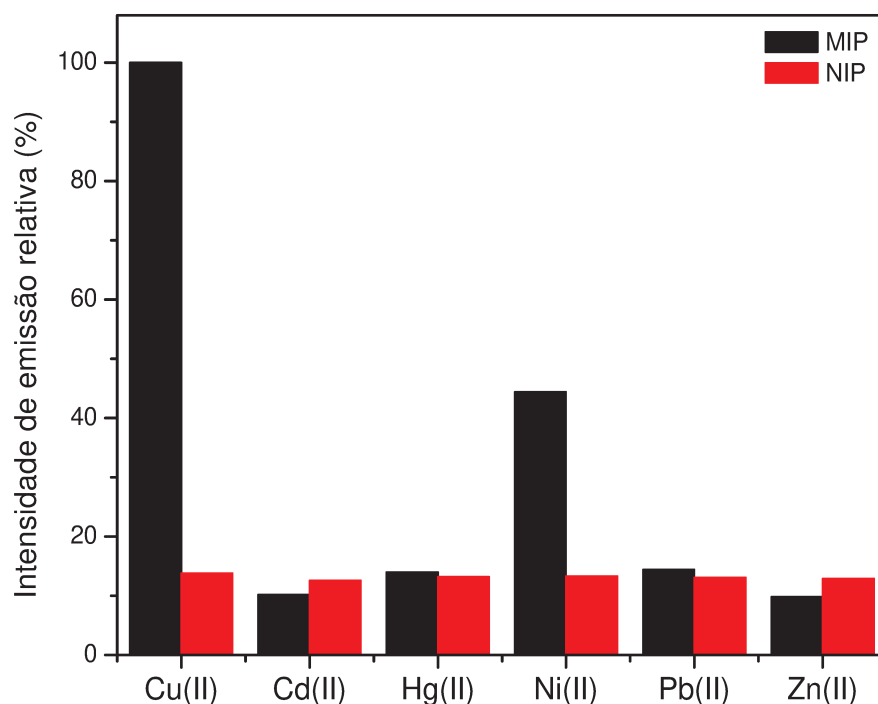


Figura 4.26. Resposta do MIP e NIP para diferentes íons metálicos com concentrações iguais a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Nota-se que o MIP responde de maneira similar para todos os metais analisados, exceto para Ni(II) , cuja resposta é elevada. Além disso, é importante mencionar que não foi possível avaliar a resposta para íons Fe(III) , uma vez que houve formação de precipitado na solução tampão pH 5,0 impossibilitando seu

estudo. Terminada esta avaliação, o MIP sintetizado foi empregado para a determinação de íons Cu(II) em uma amostra real, como será discutido a seguir.

4.5.4. APLICAÇÃO DO MIP NA DETERMINAÇÃO DE Cu(II) EM AMOSTRA DE ÁGUA DE TORNEIRA

Foram empregadas amostras de água de torneira fortificadas com diferentes concentrações de Cu(II), assim como realizado para o sol-gel. Para comprovar o desempenho do sensor, seus resultados foram comparados com aqueles obtidos com a técnica de Espectroscopia de Absorção Atômica por Chama (*FAAS, Flame Absorption Atomic Spectroscopy*). O modelo do espectrômetro empregado foi *AAAnalyst 400 (Perkin Elmer)* com o uso de uma lâmpada de Cu(II) (324,75 nm).

O procedimento adotado para a obtenção dos dados foi realizar a análise em função do tempo, empregando, como anteriormente um valor de tempo fixo e igual a 15 minutos para cada amostra, cuja análise foi realizada em triplicata.

Os valores de concentração de Cu(II) determinados com o sensor e com a técnica de FAAS estão expressos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Valores de concentração de Cu(II) obtidos com o emprego do sensor fluorimétrico e com FAAS para amostras de água de torneira fortificadas com o íon metálico.

[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$ adicionada	[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$		Erro (%)
	FAAS	Sensor	
0,01	1,58	1,65	+4,43
5,2	6,80	6,08	-10,6
14,2	12,6	9,60	-23,8
3,2	4,76	2,00	-58,0

Como é possível observar através destes resultados, o desempenho do sensor, comparado com a técnica de referência, deve ser melhorado para que o mesmo possa ser empregado em outros tipos de amostras. Se o tempo de injeção da amostra for maior que 15 minutos (valor empregado), pode-se esperar que os resultados melhorem de maneira significativa. Realizando-se o teste t de Student, tem-se que, no intervalo de 95% de confiança, os valores determinados por FAAS e pelo sensor não são significativamente diferentes.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

5.1. CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho permite concluir que o uso de reagentes luminescentes para a determinação simultânea de metais pesados em águas apresenta diversos aspectos positivos em sua aplicação.

Desta maneira, pode-se concluir que todas as atividades realizadas neste trabalho forneceram informações adequadas quanto à caracterização de reagentes luminescentes em solução, suas interações com íons de metais pesados e sua imobilização em diferentes suportes.

O reagente ZOX apresentou interação com íons Cd(II). Imobilizado em membranas de PVC, foi observado que não houve resposta para o íon metálico. Imobilizado em uma matriz sol-gel, a interação foi verificada, entretanto, a resposta para Cd(II) foi irreversível, fato que não é desejável para a aplicação de sensores ópticos. Por esta razão, não foram avaliadas outras fases sensoras com este reagente luminescente.

Para o reagente luminescente $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_2(\text{bim})]^{2-}$, por sua vez, verificou-se que o mesmo apresentou elevada afinidade por íons Cu(II). Distintas foram as composições de sol-gel avaliadas, entretanto nenhuma delas forneceu resultados satisfatórios como fase sensora, visto que ocorreu lixiviação de praticamente todas as composições. Esta lixiviação se deve ao fato da estrutura do complexo de Ru(II) apresentar três grupos SO_3^- , polares, com elevada solubilidade em água. Assim sendo, fases sensoras baseadas neste reagente tampouco foram profundamente avaliadas.

O reagente luminescente bpySOH, por outro lado, se mostrou adequado para a determinação simultânea de metais pesados em águas. Isto porque suas interações em solução com diferentes íons são distintas, apresentando perfis de absorção e emissão diferentes além de estequiometrias de complexação e constantes de estabilidade dos complexos metálicos. Quando imobilizado, não sofreu lixiviação da matriz sol-gel na qual foi encapsulado, preservando distintos comportamentos com os metais avaliados.

A determinação simultânea de metais pesados forneceu resultados satisfatórios com baixos valores de RMSEP, indicando que os métodos de calibração multivariada foram eficientes. Além disso, o sensor desenvolvido foi capaz de determinar de maneira eficiente a concentração de duas espécies metálicas em amostras reais de águas naturais.

A síntese do derivado bpySOMA ocorreu de maneira satisfatória para que o mesmo pudesse ser incorporado em um MIP para a determinação de íons Cu(II). A fase sensora mostrou-se altamente seletiva para este metal, quando comparado seu desempenho para com outros metais e, além disso, o sucesso da síntese do MIP foi comprovado quando se comparou as respostas para MIP e NIP.

5.2. PERSPECTIVAS

As perspectivas decorrentes da realização deste trabalho se resumem em sintetizar MIP para outras espécies metálicas de interesse ambiental, podendo ser aplicados como um arranjo de sensores para a determinação de distintos íons simultaneamente. Além disso, uma perspectiva e desafio é o desenvolvimento de filmes finos empregando MIP e sol-gel, visto que estas fases sensoras apresentam inúmeras vantagens quando comparadas com fase sensora sólida (em partículas), como aquelas desenvolvidas neste trabalho. E, finalmente empregar técnicas quimiométricas para aumentar a robustez de sensores fluorimétricos.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, M.C.U.; Filho, H.A.D.; Galvão, R.K.H.; Silva, E.C.; Saldanha, T.C.B.; José, G.E.; Pasquini, C.; Raimundo Jr.; I.M.; Rohwedder, J.J.R.; *Chemom. Intel. Lab. Syst.* **2004**, *72*, 83–91.

ARAÚJO, M.C.U.; Saldanha, T.C.B.; Neto, B.B.; Chame, H.C.; *Anal. Lett.* **2000**, *33*, 1187–1202.

BLANCO, M.; Coelho, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Redón, M.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4477–4483.

BOS, M.; van der Linder, W. E.; *Analyst* **1993**, *118*, 323–328.

CAVALITTO, S.F.; *Tese de Doutorado*, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, **2003**.

CUNHA JR., A.P.; Cunha, V.P.P.; Silveira Jr.; L., Matin; A.A.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 850–854.

DEMAS, J.N.; Rowe, H.M.; Xu, W.; DeGraff, B.A.; *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 167–173.

DEMAS, J.N.; Xu, W.; McDonough, R.C.; Langsdorf, B.; DeGraff, B.A.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4133–4141.

DENIZLI, A.; Andaç, M.; Mirel, S.; Şenel, S.; Say, R.; Ersöz, A.; *Int. J. Biol. Macromolec.* **2007**, *40*, 159–166.

DÍAZ-GARCÍA, M.E.; Al-Kindy, S.; Badía, R.; *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 1763–1774.

DÍAZ-GARCÍA, M. E.; Guardia, L.; Badía, R.; *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1822–1829.

DUAN, C.; Wu, D.; Huang, W.; Lin, Z.; He, C.; Wu, S.; Wang, D.; *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 7190–7201.

ENSAFI, A.A.; Far, A.K.; Meghdadi, S.; *Sens. Actuators B* **2008**, *133*, 84–90.

ENSAFI, A.A.; Fouladgar, M.; *IEEE Sens. J.* **2008**, *8*, 347–353.

FAGADAR-COSMA, E.; Enache, C.; Vlascici, D.; Fagadar-Cosma, G.; Vasile, M.; Bazylak, G.; *Mater Research Bull* **2009**, *44*, 2186–2193.

FERREIRA, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 724–731.

FERREIRA, M.M.C.; Teófilo, R.E.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 338–350.

FERREIRA, S.L.C.; Santos, W.N.L.; Quintella, C.M.; Neto, B.B.; Bosque-Sendra, J.M.; *Talanta* **2004**, *63*, 1061–1067.

FRANCO, D.W.; Reche, R.V.; *Quim. Nova*, **2009**, *32*, 332–336.

FREITAS, M.B.; Brilhante, O.M.; Almeida, L.M.; *Cad. Saúde Pública* **2001**, *17*, 651–660.

GRAVRILENKO, N.A.; Saranchina, N.V.; Mokrousov, G.M.; *J. Anal. Chem.* **2007**, *62*, 832–836.

GUPTA, R.; Chaudhury, N. K.; *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2387–2399.

HERNÁNDEZ, O.; Jiménez, F.; Jiménez, A.I.; Arias, J.J.; *Analyst* **1996**, *121*, 169–172.

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_1469.pdf (acessada em 03/2009)

http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf (acessada em 11/2010).

IZQUIERDO, A.; López-Cueto, G.; Medina, J.F.R.; Ubide, C.; *Quim. Anal.* **1998**, *17*, 67–74.

JAFFREZIC-RENAULT, N.; Benounis, M.; Halouani, H.; Lamartine, R.; Dumazet-Bonnamour, I.; *Mat. Sci. Eng. C* **2006**, 26, 364–368.

JOSÉ, G.E.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, **2008**.

KRÄMER, R.; Kovbasyuk, L.; *Inorg. Chem. Comm.* **2006**, 9, 586–590.

KENNARD, R.W.; Stone, L.A.; *Technometrics* **1969**, 11, 137–148.

LAKOWISKY, J.R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy* **1999**, Plenum Publishers, New York.

LIARUANGRATH, S.; Leelasattarakul, T.; Rayanakorn, M.; Liawruangrath, B.; Oungpipat, W.; Youngvises, N.; *Talanta* **2007**, 72, 126–131.

MARUSZEWSKI, K.; Jasiorski, M.; Salamon, M.; Strek, W.; *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 314, 83–90.

McGAUGHEY, O.; Ros-Lis, J. V.; Guckian, A.; McEvoy, K.; McDonagh, C.; MacCraith, B. D.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, 570, 15–20.

MASSART, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, S.J.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J.; *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Parte B*, Elsevier, Amsterdam, **1997**.

MOLINA-DÍAZ, A.; García-Reyes, J.F.; Ortega-Barrales, P.; *Anal. Sci.* **2007**, 23, 1179–1183.

MORENO, J.M.B; *Tese de Doutorado*, Universidad Complutense de Madrid, Espanha, **1994**.

MORENO-BONDI, M. C.; Navarro-Villoslada, F.; Benito-Peña, E.; Urraca, J. L.; *Current Anal. Chem.* **2008**, 4, 316–340.

MORENO-BONDI, M.C.; Orellana, G.; Xavier, M.P.; Fresnadillo, D.G.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 5184–5189.

- MUÑOZ, E.; Palmero, S.; García-García, M.A.; *Talanta* **2002**, 57, 985–992.
- MOORE, J.W.; Ramamoorthy, S.; *Heavy Metals in Natural Waters* **1984**, Springer-Verlag New York Inc.
- MULLER-ACKERMANN, E.; Panne, U.; Niessner, R.; *Anal. Methods Instrum.* **1995**, 2, 182–189.
- MURRAY, G. M.; Jenkins, A.; Bzhelyansky, A.; Uy, O. M.; *Johns Hopkins Apl Technical Digest* **1997**, 18, 464–472.
- NARAYANASWAMY, R.; Raimundo Jr., I.M.; *Sens. Actuators B* **2003**, 90, 189–197.
- ORELLANA, G.; Fresnadillo, D.G.; Marazuela, M.D.; Moreno-Bondi, M.C.; *Langmuir*, **1999**, 15, 6451–6459.
- PAGLIARO, M.; Bukowski, R.M.; Ciriminna, R.; Bright, F.V.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2670–2672.
- PODBIELSKA, H.; A.U. Jarza; *Bull Polish Acad Sci.* **2005**, 53, 261–271.
- RAO, T.P.; Kala, R.; Daniel, S.; *Anal. Chimi. Acta* **2006**, 578, 105–116.
- REN, S.; Gao, L.; *Spectrochim Acta A* **2005**, 61, 3013–3019.
- SHI, X.; Bower, J.J.; Leonard, S.S.; *Molec. Cell. Biochem.* **2005**, 279, 3–15.
- SHRIVER, D.F.; Atkins, P.W., *Química Inorgânica* **2003**, Artmed Ed. S.A., Porto Alegre.
- SINGH, B.; Bagheek, A.; Boopathi, M.; Pandey, P.; Mahato, T.H.; Gutch, P.K.; Sekhar, K.; *Biosensors Biolec.* **2007**, 22, 3326–3334.

STEINBERG, I.M.; Wolfbeis, O.S.; Lobnik, A.; *Sens. Actuators B* **2003**, 90, 230–234.

SUZUKI, K.; Mikami, D.; Ohki, T.; Yamaji, K.; Ishihara, S.; Cittero, D.; Hagiwara, M.; *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5726–5733.

VALEUR, B.; *Molecular Fluorescence – Principles and Applications* **2002**, WILEY-VCH, Weinheim.

WIDSTRAND, C.; Yilmaz, E.; Boyd, B.; Billing, J.; Rees, A.; *Molecularly Imprinted Polymers: A New Generation of Affinity Matrices*, Reprinted from *American Laboratory News*, October **2006**.

WOLFBEIS, O.; Oehme, I.; *Mikrochim. Acta* **1997**, 126, 177–192.

Apêndice I

AI.1 CONCENTRAÇÕES DAS ESPÉCIES METÁLICAS EMPREGADAS NA ESTRATÉGIA 1

Nas Tabelas a seguir são apresentadas as concentrações de cada espécie metálica nas misturas empregando os parâmetros descrito na Tabela AI.1 para a determinação simultânea de metais pesados em águas usando o sensor fluorimétrico (bpySOH) desenvolvido nesta Tese.

Tabela AI.1 Parâmetros empregados nas primeira estratégia avaliada para a determinação simultânea de metais pesados em águas empregando o sol-gel e técnicas de calibração multivariada.

Parâmetro	Estratégia
Planejamento	Doehlert
Espectros avaliados	Excitação e emissão
Tempo de reação (min)	0–5
λ de excitação (nm)	390, 400, 410
Velocidade de varredura (nm min ⁻¹)	600

Tabela AI.2. Concentrações de Cu(II) e Hg(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura binária.

Amostra	[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1*	23,80	18,80
2	35,10	23,90
3	27,10	45,20
4	10,50	45,20
5	2,51	23,90
6	10,6	2,51
7	27,10	2,50
8	12,60	35,10
9	12,60	10,00
10	22,60	10,00
11	22,60	35,10
12	0,00	45,20
13	35,10	0,00
14**	18,80	23,80
15	15,10	40,20
16	7,53	25,10
17	17,60	15,10
18	32,60	15,10
19	30,10	30,10
20	27,60	20,10
21	5,02	35,10

* amostra realizada em 5 replicatas

** amostra realizada em triplicata

Tabela AI.3. Concentrações de Cu(II) e Zn(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura binária.

Amostra	[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1*	20,90	20,80
2	18,90	35,00
3	35,10	27,00
4	18,90	2,50
5	2,51	10,50
6	2,51	27,00
7	32,50	10,50
8	27,60	12,50
9	7,53	12,50
10	27,60	22,50
11	7,53	22,50
12	35,00	0,00
13	0,00	35,00
14	30,10	5,00
15	30,10	15,00
16	17,60	7,50
17	11,30	1,98
18	15,10	27,50
19	25,10	30,00
20	12,60	32,50

* amostra realizada em triplicata

Tabela AI.4. Concentrações de Hg(II) e Zn(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura binária.

Amostra	[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1*	25,30	19,20
2	25,40	35,80
3	50,00	27,60
4	48,10	10,80
5	25,40	2,56
6	2,67	10,70
7	2,65	27,50
8	36,70	12,80
9	10,70	12,80
10	10,70	23,00
11	37,30	23,00
12	48,00	0,00
13	0,00	35,80
14	42,50	15,30
15	26,70	7,67
16	16,00	17,90
17	16,00	33,20
18	32,00	30,70
19	21,30	28,10
20	3,73	5,11

* amostra realizada em triplicata

Tabela AI.5. Concentrações de Cu(II), Hg(II) e Zn(II) para a determinação simultânea destas espécies em mistura ternária.

Amostra	[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Zn (II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1*	19,00	24,00	19,00
2	19,00	24,20	35,00
3	18,90	45,00	26,90
4	34,90	31,00	2,50
5	19,00	24,00	11,00
6	18,90	2,50	11,00
7	2,50	16,50	11,00
8	18,90	2,50	27,00
9	2,50	16,50	27,00
10	18,90	45,00	11,00
11	2,50	38,10	19,00
12	34,90	31,00	11,00
13	35,00	9,53	19,00
14	0,00	0,00	34,90
15	0,00	35,00	0,00
16	34,90	0,00	0,00
17	7,49	17,50	15,00
18	32,50	19,60	21,50
19	4,98	12,50	29,40
20	2,50	2,51	2,50
21	7,47	2,50	4,99
22	17,50	7,52	25,00
23	4,98	7,50	2,50
24	2,49	5,00	7,49

* amostra realizada em triplicata

AI.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS DA MISTURA Cu(II)–Zn(II).

A seguir são apresentados os principais resultados das etapas de análise exploratória e calibração multivariada com os dados de espectros de emissão da mistura Cu(II)–Zn(II).

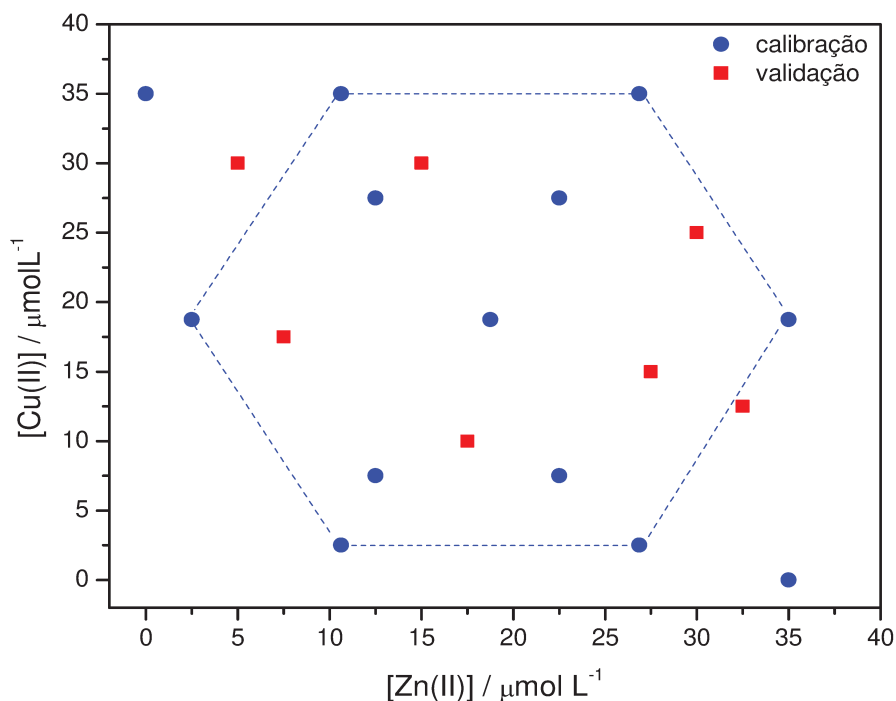


Figura AI.1. Desenho Doehlert para a construção do conjunto de amostras de calibração e previsão para as amostras da mistura Cu(II)–Zn(II).

Com o emprego deste planejamento experimental foram preparadas as distintas amostras de calibração e previsão das concentrações das espécies metálicas nas misturas.

Na sequência é ilustrado o gráfico de variância residual em função do número de variáveis latentes para o modelo de calibração em construção.

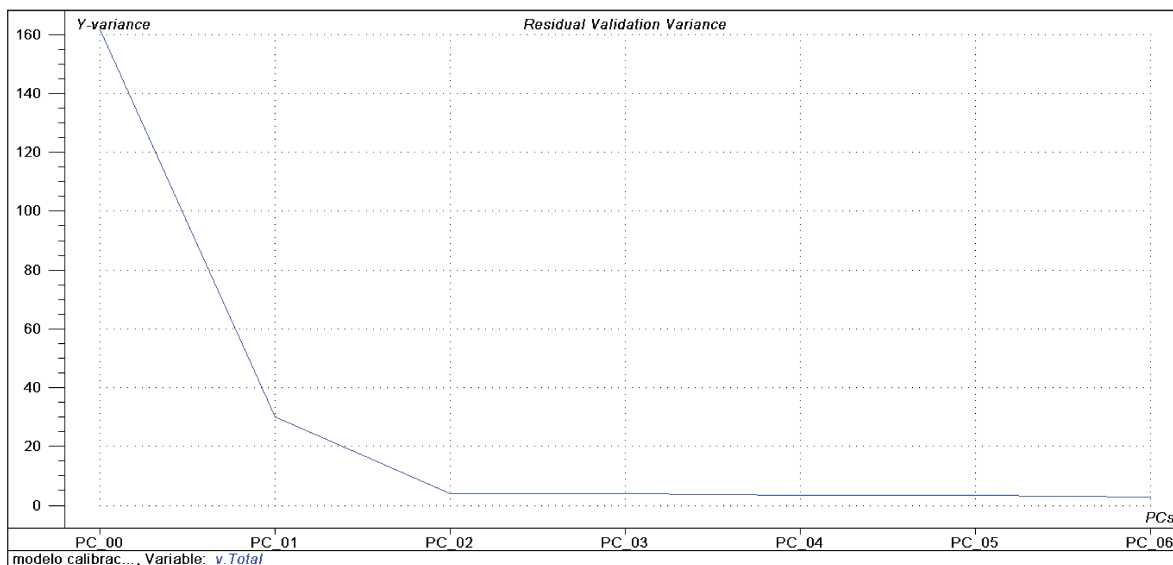


Figura AI.2. Gráfico de variância residual em y *versus* número de PC (variáveis latentes). (t = 2–5 min, λ_{exc} = 390, 400 e 410 nm, espectros I_o/I não suavizados).

A partir deste gráfico, podem ser obtidas informações quanto ao número de variáveis latentes que são capazes de fornecer informações sobre o modelo de calibração. Para Cu(II), duas variáveis latentes são suficientes para explicar a maior variância explicada para o modelo e, além disso, este número de variáveis latentes fornece o menor erro para o modelo.

A Figura AI.3 mostra o modelo de calibração e validação calculados para Cu(II) na mistura em questão.

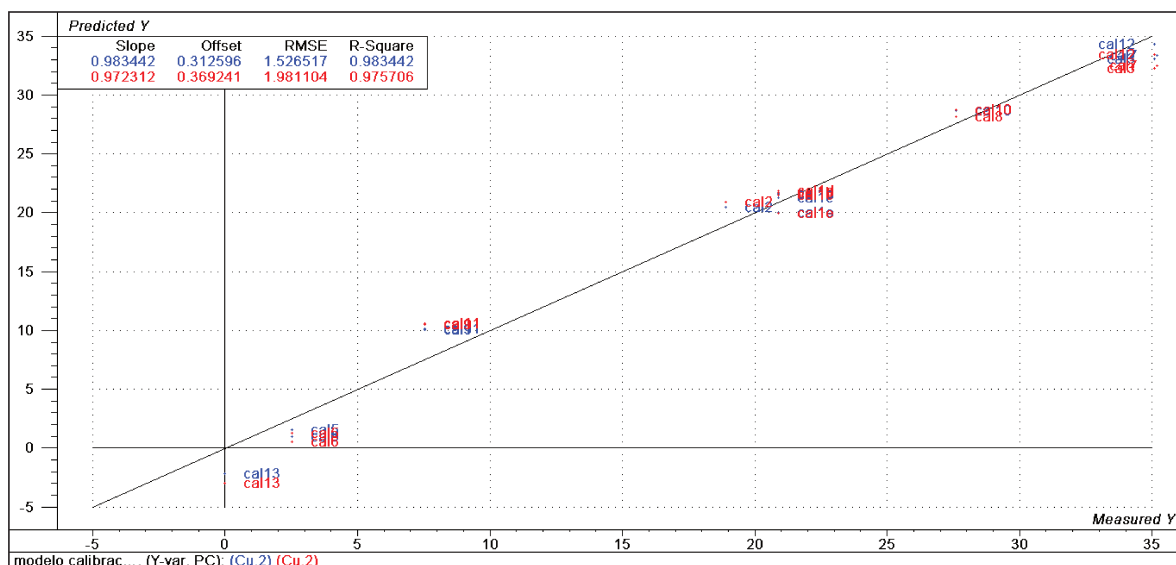


Figura AI.3. Modelo de calibração calculado através de PLS para a posterior previsão da concentração de Cu(II). Em azul, dados referentes à calibração e em vermelho, à validação interna. ($t = 2-5$ min, $\lambda_{exc} = 390, 400$ e 410 nm, espectros I_0/I não suavizados).

A partir destas curvas, pode-se obter informações quanto ao modelo de calibração calculado. Neste modelo para Cu(II), foram empregadas duas variáveis latentes para a sua construção e os valores de RMSEC e RMSEV calculados foram $1,52$ e $1,98 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, indicando que trata-se de um bom modelo para a posterior previsão da concentração desta espécie metálica, como mostra a Figura AI.4.

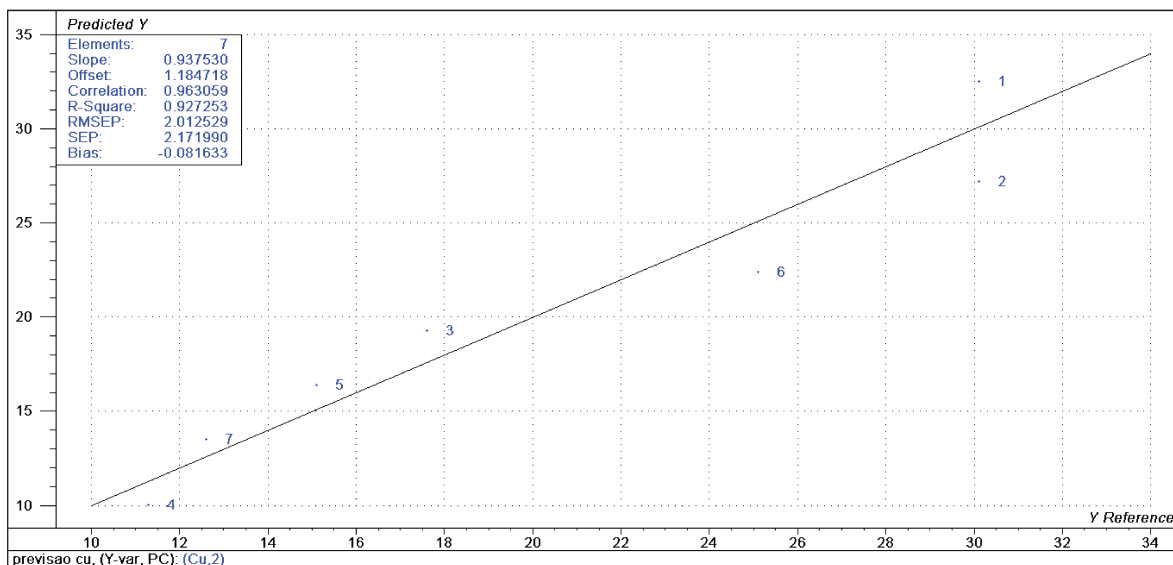


Figura A1.4. Previsão da concentração das amostras de Cu(II) na mistura Cu(II)–Zn(II). (t = 2–5 min, λ_{exc} = 390, 400 e 410 nm, espectros I_o/I não suavizados).

Observa-se boa previsão da concentração de Cu(II) empregando os parâmetros da estratégia 1.

Essa análise exploratória e construção de modelos de calibração para posterior previsão da concentração de metais nas amostras foi realizada para todas as misturas e estratégias avaliadas.

Para não repetir informações qualitativas, no próximo apêndice, são apresentadas somente as concentrações de cada metal nas distintas misturas avaliadas.

Apêndice II

AII.1 CONCENTRAÇÕES DAS ESPÉCIES METÁLICAS EMPREGADAS NA ESTRATÉGIA 2

Neste Apêndice são apresentas as concentrações das espécies metálicas empregadas nas distintas misturas avaliadas.

Tabela AII.1. Parâmetros empregados na segunda estratégia avaliada para a determinação simultânea de metais pesados em águas empregando o sol-gel e técnicas de calibração multivariada.

Parâmetro	Estratégia
Planejamento	Composto Central
Espectros avaliados	Emissão
Tempo de reação (min)	0–10
λ de excitação (nm)	410
Velocidade de varredura (nm min ⁻¹)	120

Tabela AII.2. Concentrações de Cu(II) e Hg(II) em cada amostra desta mistura.

Amostra	[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	11,5	17,6
2	5,76	15,5
3	17,3	5,16
4	19,7	10,3
5	17,3	15,5
6	11,5	3,06
7	3,39	10,3
8	11,5	10,3
9	5,76	5,16
10	23,0	13,3
11	23,0	28,0
12	28,8	25,8
13	28,8	15,5
14	17,3	15,5
15*	23,0	20,6
16	31,2	20,6
17	14,9	20,6
18	17,3	25,8
19	42,6	31,0
20	40,3	25,8
21	40,3	36,1
22	34,6	31,0
23	28,8	36,1
24	34,6	23,7
25	34,6	38,2
26	26,5	31,0

* replicata

Tabela AII.3. Concentrações de Cu(II) e Zn(II) em cada amostra desta mistura.

Amostra	[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	19,7	11,5
2	17,3	5,76
3	5,76	17,3
4	11,5	19,7
5	17,3	17,3
6	3,40	11,5
7	11,5	3,40
8	11,5	11,5
9	5,76	5,76
10	15,0	23,0
11	31,1	23,0
12	28,8	28,8
13	17,3	28,8
14*	23,0	23,0
15	23,0	31,0
16	23,0	15,0
17	28,8	17,3
18	34,5	42,5
19	28,8	40,3
20	40,3	40,3
21	34,6	34,6
22	40,3	28,8
23	26,5	34,5
24	42,5	34,5
25	34,5	26,5

* replicata

Tabela AII.4. Concentrações de Hg(II) e Zn(II) em cada amostra desta mistura.

Amostra	[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	17,6	11,5
2	15,5	5,76
3	5,16	17,3
4	10,3	19,7
5	15,5	17,3
6	3,06	11,5
7	10,3	3,39
8	10,3	11,5
9	5,16	5,76
10	13,3	23,0
11	28,0	23,0
12	25,8	28,8
13	15,5	28,8
14*	15,5	17,3
15	20,6	23,0
16	20,6	31,2
17	20,6	14,9
18	25,8	17,3
19	31,0	42,6
20	25,8	40,3
21	36,1	40,3
22	31,0	34,6
23	36,1	28,8
24	23,7	34,6
25	31,0	26,5

* replicata

Tabela AII.5. Concentrações de cada metal nas amostras da mistura ternária.

Amostra	[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Hg(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[Zn(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	11,9	25,8	14,4
2	23,7	12,9	14,4
3	11,9	12,9	28,8
4	4,73	5,15	5,75
5	4,74	20,6	5,76
6	19,0	5,16	5,76
7	19,0	20,7	5,77
8	4,74	5,16	23,0
9	4,76	20,7	23,1
10	19,0	5,18	23,1
11*	19,0	20,6	23,0
12	11,9	12,9	14,4
13	26,1	15,5	31,7
14	26,1	41,4	31,7
15	14,2	28,4	31,7
16	30,8	28,4	31,7
17	26,1	28,4	17,3
18	26,1	28,4	46,2
19	19,0	36,2	23,1
20	33,2	20,7	23,1
21	33,2	36,1	23,0
22	19,0	20,7	40,4
23	19,0	36,1	40,3
24	33,2	20,6	40,3
25	33,2	36,2	40,4
26	26,0	28,3	31,6

* replicata