

5

Otimizações experimentais e instrumentais para maximização do sinal fosforescente

A partir dos estudos das características fosforescentes dos 7 compostos selecionados (DBT, BNT, BTF, CB, 78BQ, 79DMBA e DBA), os parâmetros experimentais e instrumentais críticos para a observação da fosforescência foram otimizados utilizando um procedimento univariado, almejando-se encontrar sinais mais intensos e condições mais favoráveis para as determinações desses analitos em amostras complexas.

O método de otimização univariada é classificado como um método seqüencial, sendo também conhecido como método clássico de pesquisa, método do fator único ou estratégia “um-fator-de-cada-vez” (EIRAS; CUELBAS; de ANDRADE, 1994). Neste método, fixam-se os fatores que estão sendo estudados em um certo nível, menos um deles. Este último é então variado até que se encontre a melhor resposta, passando então esta condição a ser fixada e um novo fator sofre variação. O processo se repete até que todos os fatores tenham sido adequados para fornecer a melhor resposta.

No desenvolvimento do processo de otimização univariado, um ciclo de variações não é suficiente para definir precisamente o ótimo. Assim, deve-se efetuar tantos ciclos quantos forem necessários até observar-se que não ocorre melhora no resultado da medição.

Este tipo de procedimento é provavelmente o método de otimização mais comum em química, porém, segundo vários autores (EIRAS; CUELBAS; de ANDRADE, 1994; BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003) o método de otimização univariada não garante que a região ótima seja localizada. O ótimo não será alcançado se a superfície de resposta contiver cristas (curvas de nível elípticas que podem ocorrer na topografia da superfície de resposta). Este erro é comum nos sistemas químicos, onde além da interdependência de fatores, a localização do ótimo real pelo método univariado depende dos valores iniciais escolhidos para as variáveis a serem otimizadas (interação significativa entre fatores). Nesse caso, a otimização multivariada é recomendada.

Em métodos de calibração multivariada duas ou mais respostas instrumentais são relacionadas com a propriedade de interesse. Esses métodos

possibilitam análises mesmo na presença de interferentes e determinações simultâneas. Isso faz com que, modelos de calibração multivariada sejam uma alternativa quando métodos univariados não podem ser aplicados.

Como na calibração univariada, a primeira etapa da construção do modelo de calibração multivariada trata da aquisição de respostas instrumentais para uma série de padrões (amostras de calibração), em que o valor da propriedade de interesse é conhecido. As respostas instrumentais para as amostras de calibração são arranjadas em uma matriz $X_{(i \times j)}$ e os valores de referência da propriedade de interesse em um vetor $y_{(i \times 1)}$, onde “i” é o número de amostras e “j” o número de variáveis (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003).

Para que o método de otimização multivariada tenha sucesso, inicialmente, o comportamento independente de cada um dos fatores do sistema químico deve ser perfeitamente conhecido pois a escolha dos valores iniciais das variáveis que influenciam a resposta (intensidade de emissão fosforescente, no caso desse trabalho) é uma etapa crucial no planejamento dos experimentos e o objetivo principal será descobrir quais os valores (níveis) dos fatores (variáveis) que produzem a maior resposta possível. Segundo BRUNS (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003), mesmo que a aplicação da otimização multivariada se dê inicialmente, é preciso que se conheça os valores iniciais das variáveis. Da mesma forma, quando MONTGOMERY (1991) indica um procedimento para o planejamento e para a análise dos resultados, sugere que se faça o reconhecimento e definição do problema, que em grande parte depende da experiência já adquirida no estudo de processos semelhantes, que se escolha as variáveis (fatores de influência) e as faixas de valores em que essas variáveis serão avaliadas, definindo-se o nível específico (valor) que será empregado em cada ensaio, verificando-se como essas variáveis serão controladas nos níveis escolhidos e como eles serão medidos. A avaliação intensiva de diversas variáveis pode ser necessária quando o estudo encontra-se em seus estágios iniciais e não se detém uma experiência anterior, exigindo a avaliação das variáveis em diversos níveis. Ainda nesta linha, MONTGOMERY (1991) recomenda que o conhecimento técnico específico, não estatístico sobre o problema deve ser usado.

Assim, este trabalho optou pela otimização univariada dos parâmetros experimentais (tempo de purga, quantidade do sal de átomo pesado e de surfactante) e instrumentais (tempo de abertura do detector, tempo de retardo do detector, velocidade de varredura e banda espectral de passagem), já que não

se dispunha de informações prévias que orientassem uma abordagem multivariada.

Inicialmente foram otimizadas a banda espectral de passagem, a velocidade de varredura e o tempo de purga. A otimização foi realizada por meio da comparação dos sinais fosforescentes obtidos usando apenas um dos compostos de interesse em uma mesma concentração, pois o efeito destes parâmetros no sinal fosforescente independe da natureza do analito e de sua quantidade.

A velocidade de varredura indica o tempo de duração para obtenção de um espectro, e, conseqüentemente é o tempo que a radiação, de comprimento de onda característico, interroga a amostra. Quanto mais lenta a velocidade de varredura, maior esse tempo de interrogação. Como o sinal fosforescente emitido por comprimento de onda é um resultado médio, sendo maior o tempo de interrogação (menor velocidade de varredura) menor o ruído no espectro. Assim, foram estudadas velocidades de varredura iguais a 200 nm min⁻¹ (velocidade baixa), 600 nm min⁻¹ (velocidade média) e 1200 nm min⁻¹ (velocidade alta). Como esperado, o espectro varrido em 1200 nm min⁻¹, mostrou um sinal com maior ruído. Já os espectros obtidos utilizando-se 200 e 600 nm min⁻¹ foram bastante semelhantes, com melhor perfil das bandas. Assim, optou-se pela velocidade intermediária de 600 nm min⁻¹ por permitir um tempo de análise (incluindo as varreduras das bandas de excitação e de emissão) relativamente rápido.

A banda de passagem espectral (s'), é o parâmetro que indica a faixa de comprimentos de onda (ou frequência) da radiação de excitação que incide na amostra e atinge o detector em um determinado momento. Esse parâmetro é dado pelo produto entre a dispersão linear recíproca do monocromador (R_d) e a largura das fendas de entrada e saída do instrumento (W).

O R_d representa o número de intervalos de comprimentos de onda (em nm) contido em cada unidade de intervalo de distância do plano focal do sistema óptico (em mm). Como R_d é constante e característico para cada instrumento, o parâmetro só pode ser mudado pela variação da largura da fenda (em mm). Assim, quatro valores de s' (2,5; 5; 10 e 15 nm), obtidos pela variação do tamanho da fenda, foram testados. O parâmetro influencia drasticamente as características do espectro, alterando a intensidade e a largura das bandas espectrais (dada pela largura na metade da intensidade da banda, $\Delta\lambda$). Observou-se que para 2,5 e 5 nm tem-se espectros com maior nível de ruído e menor intensidade de sinal do que aquele observado quando se usa 10 nm de

banda espectral de passagem. Para valores de 15 nm, não se observa ganho significativo em termos de intensidade. O parâmetro $\Delta\lambda$ pode ser relevante do ponto de vista da resolução espectral durante a análise de amostras complexas. Assim, um valor de 10 nm foi selecionado para os estudos subseqüentes.

Com relação ao tempo de purga da amostra com nitrogênio, tempos iguais a 1, 2, 3, 4 e 5 min foram testados, sendo que a partir de 2 min de fluxo de N_2 na vazão fixa de 2 L min^{-1} não foram observadas grandes variações na intensidade dos sinais. Assim, este tempo foi o escolhido para garantir a ausência da interferência do oxigênio na fosforescência dos analitos de interesse.

Assim, na otimização dos demais parâmetros experimentais e instrumentais para os 7 compostos de interesse deste trabalho, utilizou-se um tempo de purga com nitrogênio de 2 minutos, fendas de excitação e de emissão de 10 nm e uma velocidade de varredura igual a 600 nm min^{-1} .

Conforme já demonstrado, o efeito externo do átomo pesado foi crucial na indução ou amplificação da fosforescência dos analitos. Uma vez que o átomo pesado atua aumentando a velocidade do cruzamento entre os estados excitados de diferentes multiplicidades, incrementando a população no estado excitado tripleto, a magnitude da amplificação do sinal fosforescente será dependente da quantidade do sal de átomo pesado depositada no substrato. Assim, a otimização desse parâmetro experimental torna-se necessária. Quantidades abaixo da quantidade ótima dos sais de átomo pesado presentes no substrato podem não induzir fosforescência no analito de interesse, ou induzi-la fracamente. Por outro lado, quantidades acima da ótima podem provocar um efeito filtro que atenua a radiação de excitação que interroga o analito, diminuindo o sinal fosforescente observado (RODRIGUEZ; GARCIA; FERRERA, 1995).

Desta forma, neste estudo, 5 μL das soluções dos analitos em concentrações fixas ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram depositados em substrato sólido (celulose), nos quais foram previamente aplicados 5 μL de soluções de sais dos átomos pesados apropriados em diversas concentrações.

Modificadores de superfície, principalmente surfactantes, têm sido utilizados para melhorar as interações entre o analito, o íon de átomo pesado e a celulose. O surfactante pode melhorar o contato entre o íon de átomo pesado e o analito, amplificando o efeito externo que ocasiona a mudança de multiplicidade do estado excitado. Além disso, o surfactante pode melhorar a rigidez do analito no substrato e impedir que o mesmo se infiltre por demais nas porosidades do papel, ficando indisponível para ser interrogado pela radiação de excitação. O

efeito causado pelo surfactante tem se mostrado bastante dependente de sua quantidade no local onde o analito é aplicado. Por outro lado, uma grande quantidade de surfactante pode levar a queda do sinal fosforescente, pois dificultará a interação entre o átomo pesado e o analito. Alguns átomos pesados tais como Tl(I) e iodeto, também têm se mostrado mais sensíveis a esse efeito do que outros íons (RODRIGUEZ; GARCIA; FERRERA, 1995).

Para tal estudo, soluções dos analitos em concentrações fixas ($5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram depositadas no substrato sólido (celulose), que por sua vez foi previamente tratado com concentrações variadas (5 µL) de soluções de SDS (de 0,01 a 0,2 mol L⁻¹) e com 5 µL da solução de sal de átomo pesado apropriado.

O tempo de abertura do detector define a quantidade de radiação que será adquirida por pulso de excitação, sendo também, nesse caso, associado ao sinal de fundo medido. Assim, a otimização desse parâmetro deve considerar a relação sinal-sinal de fundo. O tempo de abertura foi variado de 0,01 a 9 ms, mantendo-se fixa a concentração de analito depositada no substrato e utilizando-se condições experimentais otimizadas (solução vetora de analito, quantidade de sal de átomo pesado e de SDS).

O tempo de retardo é aquele escolhido para que o detector inicie a aquisição do sinal luminescente após o pulso de excitação. No caso da fosforescência, a escolha desse tempo implica na maximização da razão entre o sinal fosforescente e o sinal de fundo, pela minimização dos ruídos relacionados à fluorescência da matriz da amostra, do substrato e do próprio analito, além do ruído de espalhamento (principalmente a segunda ordem da radiação de excitação). Assim, diversos tempos de retardo foram estudados mantendo-se os outros parâmetros, previamente otimizados, fixos. Tempos de retardo entre 0,01 e 3 ms foram testados.

5.1

Otimizações experimentais e instrumentais para maximização do sinal fosforescente do DBT, do BNT e do BTF

Para o DBT, o melhor resultado de indução de fosforescência foi obtido com TlNO₃ na presença do SDS, como modificador de superfície. Assim, a quantidade de TlNO₃ foi otimizada utilizando substratos previamente tratados com 5 µL de SDS 0,07 mol L⁻¹ (100 µg) e de 5 µL de DBT $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (46 ng) previamente preparado em etanol. Soluções de TlNO₃ de concentrações

entre $0,01$ e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (13 a $332 \text{ }\mu\text{g}$ de TINO_3) foram depositadas no substrato e a fosforescência induzida monitorada. Os resultados são mostrados na Figura 14, onde se observa um sinal máximo com o uso de solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($50 \text{ }\mu\text{g}$) do sal de átomo pesado. Esse comportamento pode ser considerado um pouco incomum pois, em geral, o efeito do TINO_3 é aumentado proporcionalmente até $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ($332 \text{ }\mu\text{g}$), que é uma concentração que normalmente não provoca efeito filtro. Uma queda brusca de sinal é observada com o uso de concentrações mais elevadas. Vale a pena mencionar que quantidades maiores que $332 \text{ }\mu\text{g}$ de TINO_3 não foram testadas pois essa é a maior quantidade que se pode obter a partir da deposição de $5 \text{ }\mu\text{L}$ de solução (solubilidade limite de solução de TINO_3 é $0,25 \text{ mol L}^{-1}$). Optou-se, também, pela abordagem de apenas uma aplicação de $5 \text{ }\mu\text{L}$ ao invés de aplicações múltiplas e seqüenciais para o aumento de massa de sal depositado.

A concentração de SDS foi, em seguida, otimizada usando substratos tratados com $5 \text{ }\mu\text{L}$ de soluções de SDS entre $0,01$ e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (14 a $360 \text{ }\mu\text{g}$ de SDS), que foram usados para a medição de sinais fosforescentes de DBT. Verificou-se que não houve variação significativa de sinal com a variação da quantidade de SDS presente (Figura 14). Não houve modificações significativas dos comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão com relação àqueles obtidos na etapa inicial do trabalho ($246/443 \text{ nm}$).

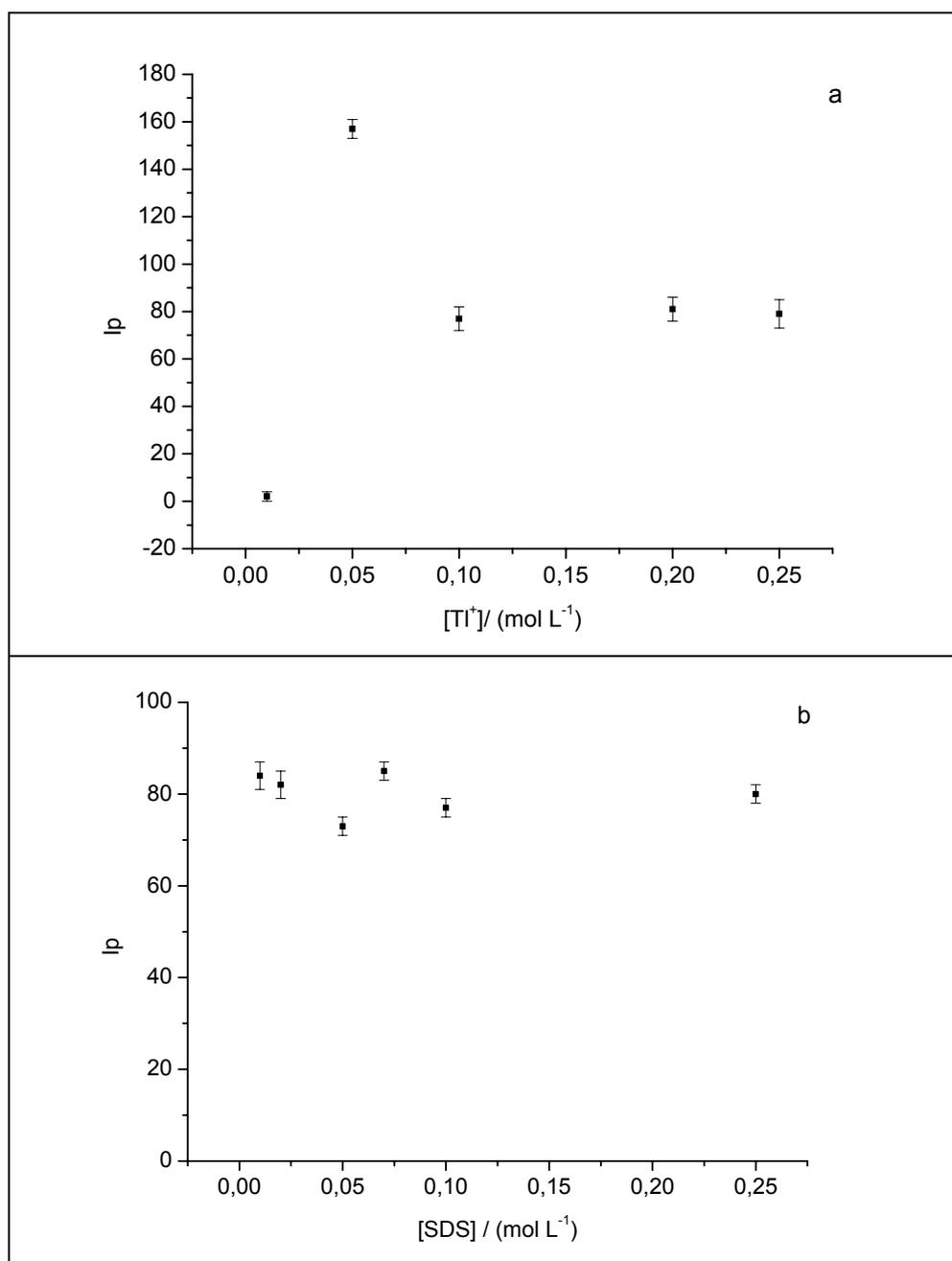


Figura 14: Efeito da concentração de solução de $TiNO_3$ no sinal fosforescente do DBT (46 ng) em etanol e na presença de 100 μg SDS (a) e efeito da concentração de solução de SDS no sinal fosforescente do DBT (46 ng) em etanol e na presença de 67 μg de $TiNO_3$ (b).

Os estudos prévios mostraram que, para o BNT, a condição que combinou o uso de SDS e $TiNO_3$ foi capaz de induzir fosforescência. Assim, todos os demais parâmetros experimentais foram fixados com exceção da quantidade de $TiNO_3$ que foi variada de 13 a 333 μg (5 μL de soluções entre 0,01 a 0,25 mol L⁻¹ que é o limite da solubilidade do $TiNO_3$). A Figura 15 mostra o comportamento

do sinal fosforescente medido a 273/545 nm em função da concentração do sal de átomo pesado.

Observa-se que a fosforescência do BNT é maior quando a quantidade máxima do sal (333 µg ou 5 µL de solução de TlNO_3 0,25 mol L⁻¹) é depositada no substrato. Como apenas uma aplicação de 5 µL de solução foi utilizada, essa foi a quantidade do sal de átomo pesado escolhida para as otimizações subsequentes.

Como já explicado anteriormente, em algumas circunstâncias, a eficiência da melhoria da interação entre átomo pesado e o analito depende da quantidade do modificador que pode permitir uma melhor aproximação entre esses dois componentes. Porém, aumento indevido da concentração de SDS pode criar um efeito pré-filtro que é prejudicial ao sinal do analito. A Figura 15 mostra a otimização desse parâmetro, onde percebe-se que a fosforescência do BNT permanece constante até a utilização da concentração de 0,02 mol L⁻¹ de SDS (29 µg), sendo observado, a partir daí, efeito pré-filtro para maiores quantidades de surfactante. Assim, uma adição de 5 µL de SDS 0,01 mol L⁻¹ (14 µg) foi escolhida para a modificação de superfície.

Para o BTF, os melhores resultados foram obtidos com TlNO_3 e com $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ambos na presença do SDS como modificador de superfície. As otimizações foram conduzidas apenas com o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ como indutor de fosforescência, já que esta é uma condição experimental pouco comum que infere vantagens do ponto de vista da seletividade das determinações.

Como anteriormente descrito, a quantidade de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ foi otimizada utilizando substratos contendo 100 µg de SDS onde 33 ng de BTF (5 µL de solução de BTF $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ previamente preparadas em etanol) foram depositados. Soluções de concentrações de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ entre 0,07 e 0,5 mol L⁻¹ (115 a 823 µg do sal) foram colocadas no substrato e a fosforescência induzida foi monitorada após a secagem dos mesmos. Os resultados são mostrados na Figura 16 onde se observa que o sinal máximo foi obtido com 414 µg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (uso de solução 0,25 mol L⁻¹ do sal de átomo pesado). Uma queda de sinal é observada com o uso de quantidades mais elevadas, provavelmente devido a um efeito filtro que bloqueia a radiação de excitação.

A concentração de SDS foi em seguida otimizada usando a quantidade ótima de sal de átomo pesado. Na Figura 16 verifica-se um aumento brusco de sinal, com máximo obtido com 29 µg de SDS (5 µL de solução 0,02 mol L⁻¹). A adição de soluções mais concentradas de SDS implicaram em queda de sinal devido, provavelmente, ao efeito filtro.

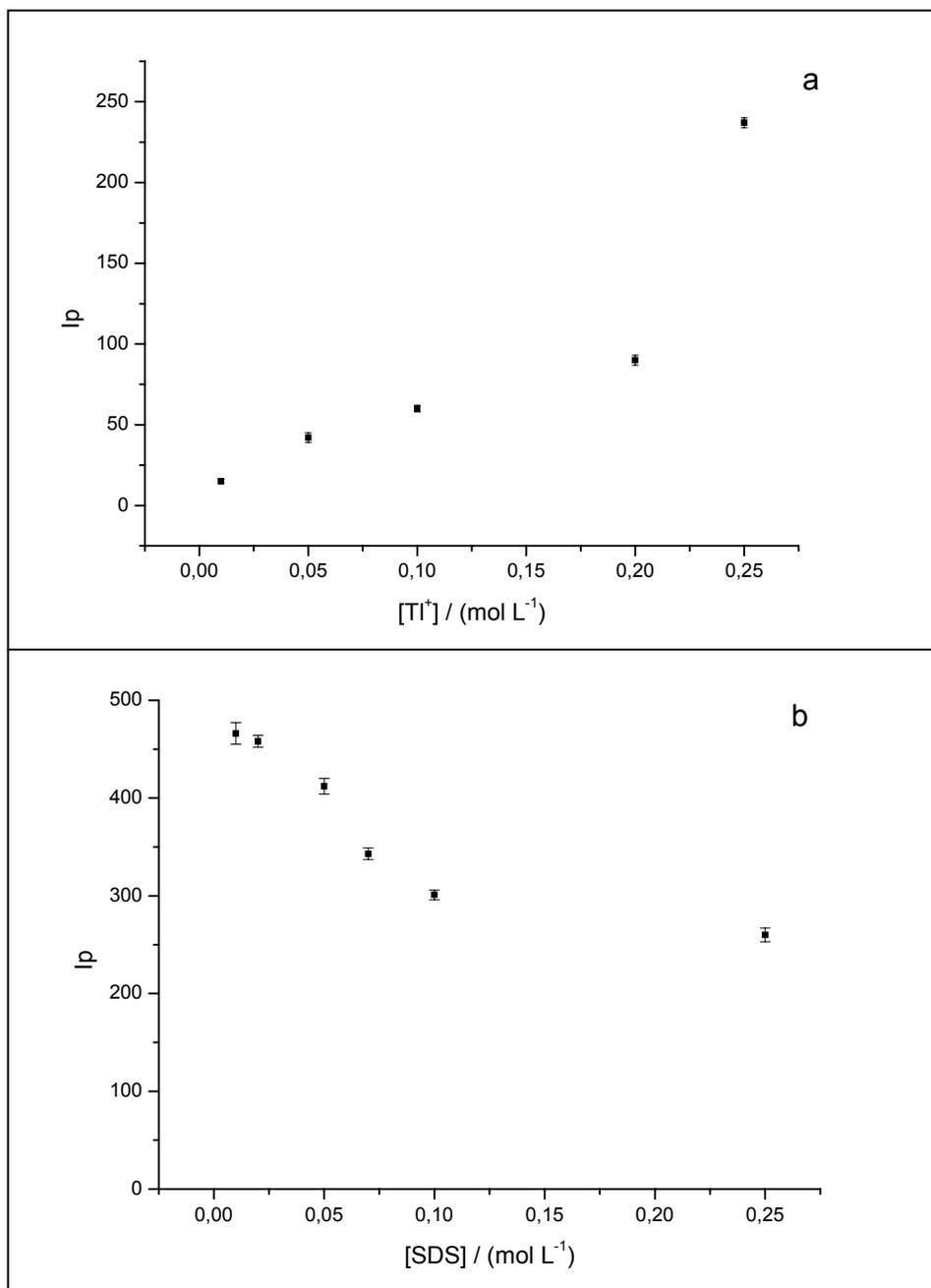


Figura 15: Efeito da concentração de TINO₃ no sinal fosforescente do BNT (58 ng) em etanol e na presença de 100 µg de SDS (a) e efeito da concentração de solução de SDS no sinal fosforescente do BNT (58 ng) em etanol e na presença de 333 µg de TINO₃ (b).

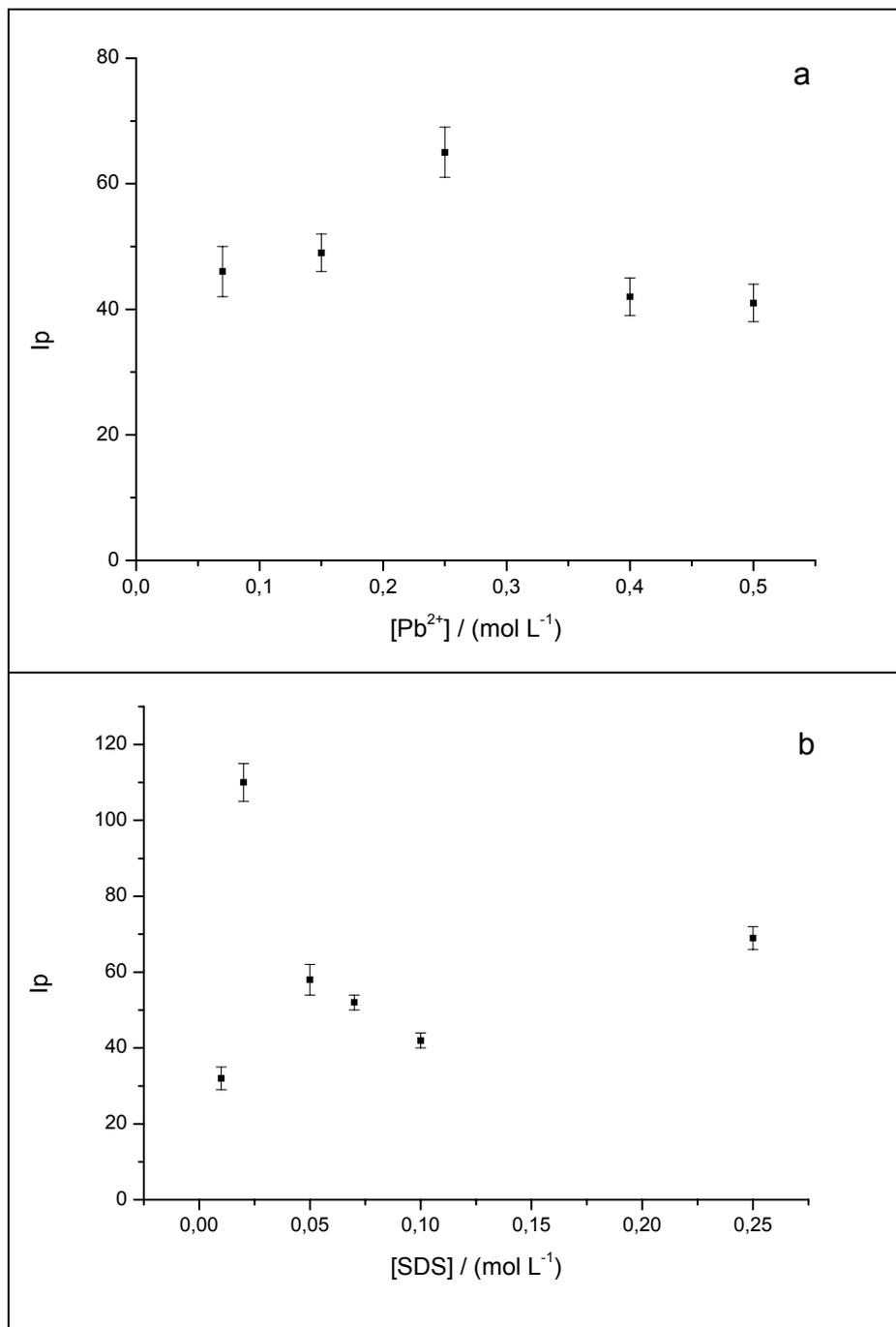


Figura 16: Efeito da concentração de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no sinal fosforescente do BTf (33 ng) em etanol e na presença de 100 μg de SDS (a) e efeito da concentração de solução de SDS no sinal fosforescente do BTf (33 ng) em etanol e na presença de 414 μg $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (b).

Como mencionado, o tempo de abertura do detector define a quantidade de radiação que será adquirida por pulso de excitação. Como esperado, o aumento do tempo de abertura do detector acarreta um aumento na intensidade

do sinal adquirido (de 0,01 a 9 ms) até o limite de 9 ms, quando o aumento do sinal de fundo provoca a queda do sinal fosforescente líquido até o seu completo desaparecimento (15 ms). Assim, o tempo de abertura escolhido foi aquele de máxima emissão fosforescente e que, em todos os casos (DBT, BNT e BTF) verificou-se tratar de 9 ms (Figura 17).

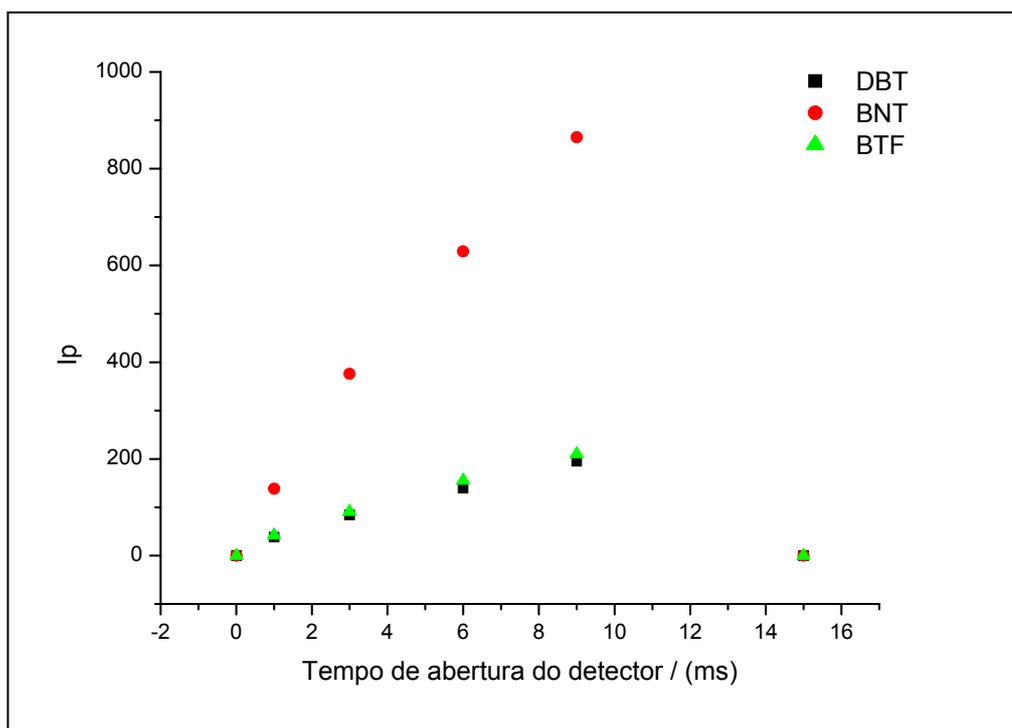


Figura 17: Curvas de otimização do sinal fosforescente do DBT, BNT e BTF ($5 \mu\text{L}$ de solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo de abertura do detector. AP e SDS conforme otimizações anteriores. Tempo de retardo de 3 ms.

Ainda considerando-se os parâmetros relacionados com a detecção temporal da radiação, temos que o tempo de retardo da abertura do detector é aquele que determina o momento exato em que o detector começa a aquisição do sinal luminescente após o pulso de excitação. No caso da fosforescência, a escolha desse tempo implica na maximização do sinal fosforescente e na minimização dos ruídos de emissão rápida. Assim, diversos tempos de retardo foram estudados mantendo-se os parâmetros previamente otimizados fixos. A Figura 18 mostra o comportamento do sinal obtido para os três compostos sulfurados, sendo que no primeiro ponto (0,05 ms) existe grande influência do ruído da segunda ordem da radiação de excitação. Assim, o uso de tempos de retardo iguais ou superiores a 0,1 ms eliminou o problema associado a esse

ruído. Como pode ser visto na Figura 18, o tempo de retardo de 0,1 ms foi aquele que proporcionou sinais mais intensos e, por isso, foi utilizado em todas as determinações subsequentes.

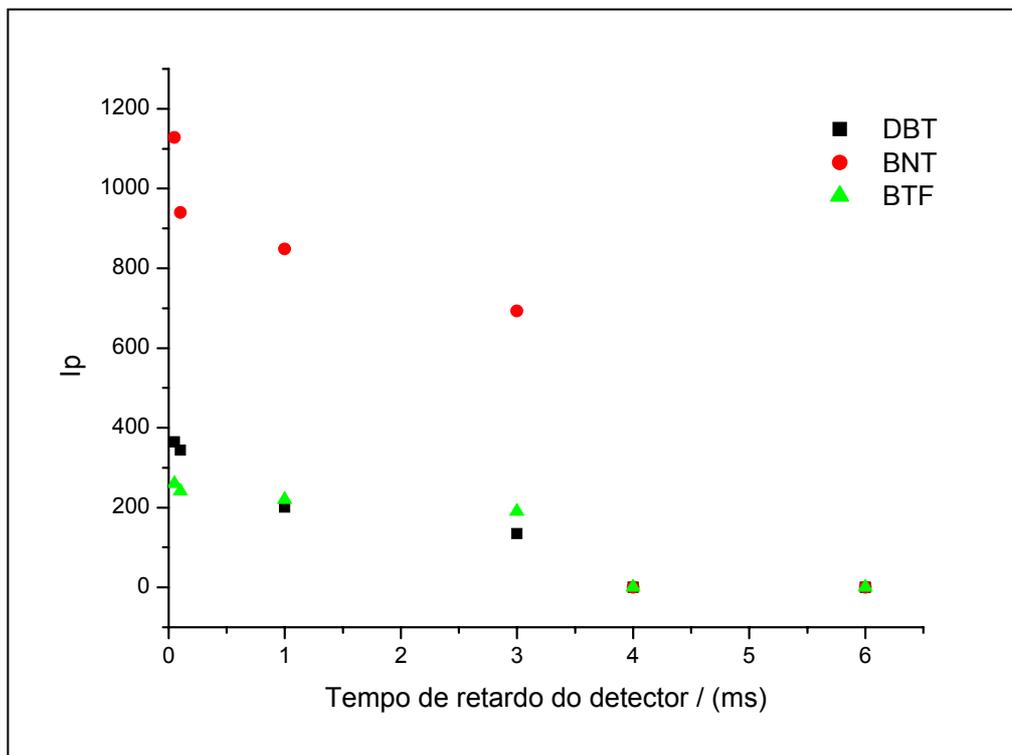


Figura 18: Curvas de otimização do sinal fosforescente do DBT, BNT e BTF (5 μL de solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo de retardo do detector. AP e SDS conforme otimizações anteriores. Tempo de abertura do detector de 9 ms.

Um resumo das condições experimentais e instrumentais adotadas para a maximização do sinal fosforescente do DBT, do BNT e do BTF é mostrado na Tabela 11. O formato dos espectros obtidos nessas condições não diferem significativamente (em termos de perfil) daqueles obtidos anteriormente, sofrendo apenas incremento na intensidade do sinal fosforescente.

Tabela 11: Condições experimentais e instrumentais otimizadas para o DBT, para o BNT e para o BTF.

Parâmetro	Condição otimizada		
	DBT	BNT	BTF
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	236 / 474	274 / 545	263 / 534
Tempo de purga, (minutos)	2	2	2
meio	etanol	etanol	etanol
Sal de AP (mol L ⁻¹) (massa de AP em µg)	TiNO ₃ 0,05 (67)	TiNO ₃ 0,25 (333)	Pb(NO ₃) ₂ 0,25 (414)
SDS (mol L ⁻¹) (massa de SDS em µg)	SDS 0,07 (100)	SDS 0,01 (14)	SDS 0,02 (29)
Tempo de retardo, (ms)	0,1	0,1	0,1
Tempo de abertura do detetor, (ms)	9	9	9

5.2

Otimizações experimentais e instrumentais para maximização do sinal fosforescente do CB, da 78BQ, da 79DMBA e da DBA

O sal que mais favoreceu o aumento de sinal fosforescente do CB foi o iodeto de potássio. Desta forma, a quantidade de KI foi otimizada utilizando-se substratos contendo 42 ng de CB (5 µL de CB 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹). Soluções de concentrações de KI entre 0,25 e 2 mol L⁻¹ (entre 207 e 1660 µg) foram depositadas no substrato e a fosforescência monitorada após 2h de secagem em dessecador a vácuo. O resultado pode ser visto na Figura 19. A presença de SDS não provocou incremento de sinal em nenhuma das massas adicionadas no substrato.

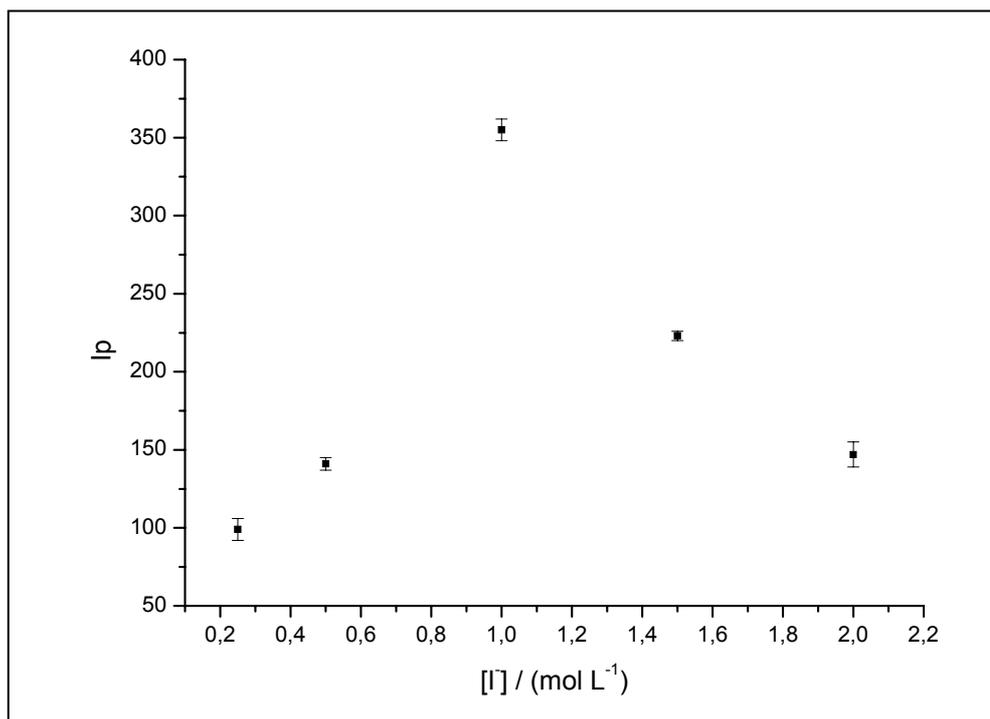


Figura 19: Efeito da concentração de solução de KI no sinal fosforescente do CB (42 ng) preparado em etanol.

Conforme estudos anteriores, o sal de átomo pesado que mais favoreceu o aumento de sinal fosforescente da 78BQ foi o AgNO_3 . Quantidades de nitrato de prata entre 8,5 e 850 μg (5 μL de soluções com concentrações entre 0,01 e 1 mol L^{-1}) foram depositadas no substrato e a fosforescência de 45 ng de 78BQ (5 μL de solução de 78BQ $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foi monitorada após 2h de secagem. O resultado é mostrado na Figura 20, onde se percebe claramente que a quantidade máxima de prata (850 μg ou 5 μL de solução 1,0 mol L^{-1}) induziu o sinal fosforescente mais intenso. Maiores quantidades de prata não foram testadas, pois adotou-se nesse trabalho o procedimento de adição única de solução de átomo pesado. Adicionalmente, a presença de diferentes quantidades de SDS não proporcionou melhora significativa em termos de intensidade de sinal.

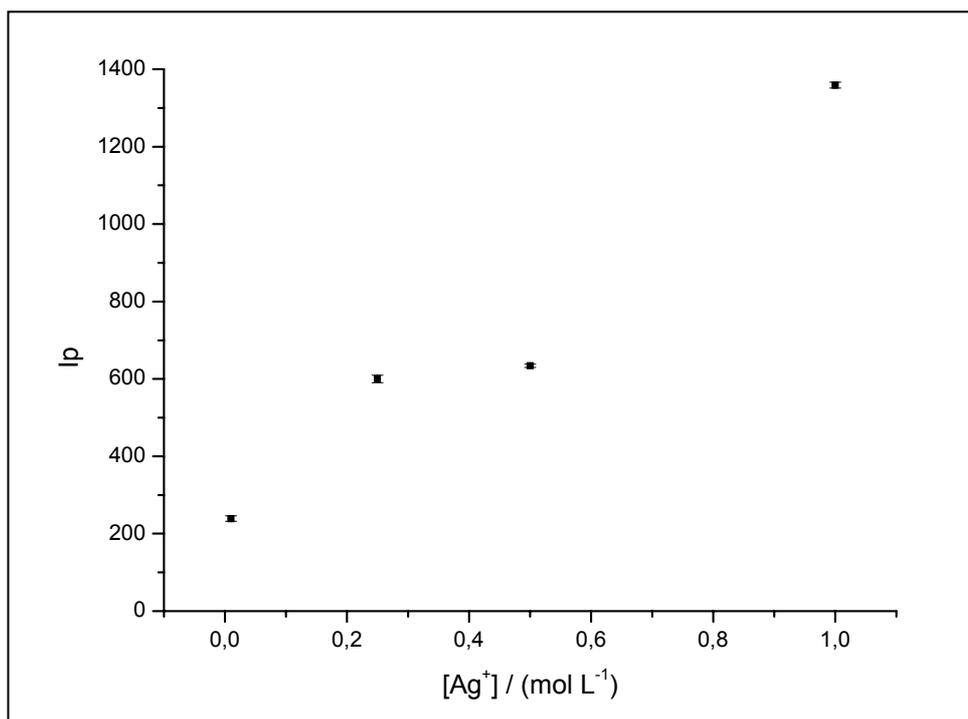


Figura 20: Efeito da concentração de solução de AgNO_3 no sinal fosforescente da 78BQ (45 ng) em etanol.

De acordo com os estudos preliminares, o sinal fosforescente da 79DMBA foi mais intenso quando a solução desse analito foi previamente exposta à radiação UV por 30 minutos e, em seguida, depositada em substratos contendo TlNO_3 na ausência de SDS. Desta forma, massas do sal entre 13 e 332 μg (5 μL de soluções de nitrato de tálio em concentrações entre 0,01 e 0,25 mol L^{-1}) foram depositadas no substrato e a fosforescência induzida monitorada após a secagem dos mesmos. Os resultados são mostrados na Figura 21, onde se observa que maior intensidade de sinal foi obtida com o uso de solução de sal de átomo pesado 0,1 mol L^{-1} (133 μg de TlNO_3).

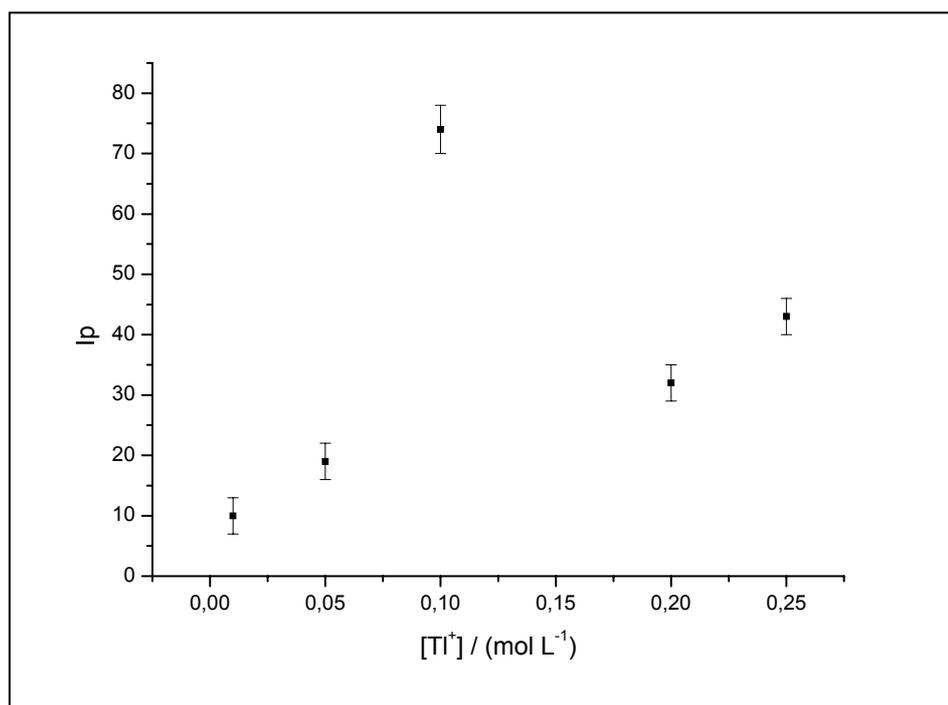


Figura 21: Efeito da concentração de $TiNO_3$ no sinal fosforescente da 79DMBA (64 ng) preparada em etanol e tratada por 30 minutos com radiação UV.

Com relação ao DBA, a indução de fosforescência foi mais eficiente na presença de $AgNO_3$ e sem o uso de surfactante. Assim, o sinal fosforescente de 45 ng de DBA preparada em etanol/ HNO_3 (concentração final de HNO_3 igual a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) foi mais intenso na presença de $850 \mu\text{g}$ de $AgNO_3$ ($5 \mu\text{L}$ de solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ do sal). O resultado é mostrado na Figura 22, onde se observa um máximo com o uso de solução de AP $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Assim como para os demais compostos nitrogenados, o sinal fosforescente não variou significativamente quando utilizou-se adições simples de SDS em várias concentrações ($0,01$ a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$).

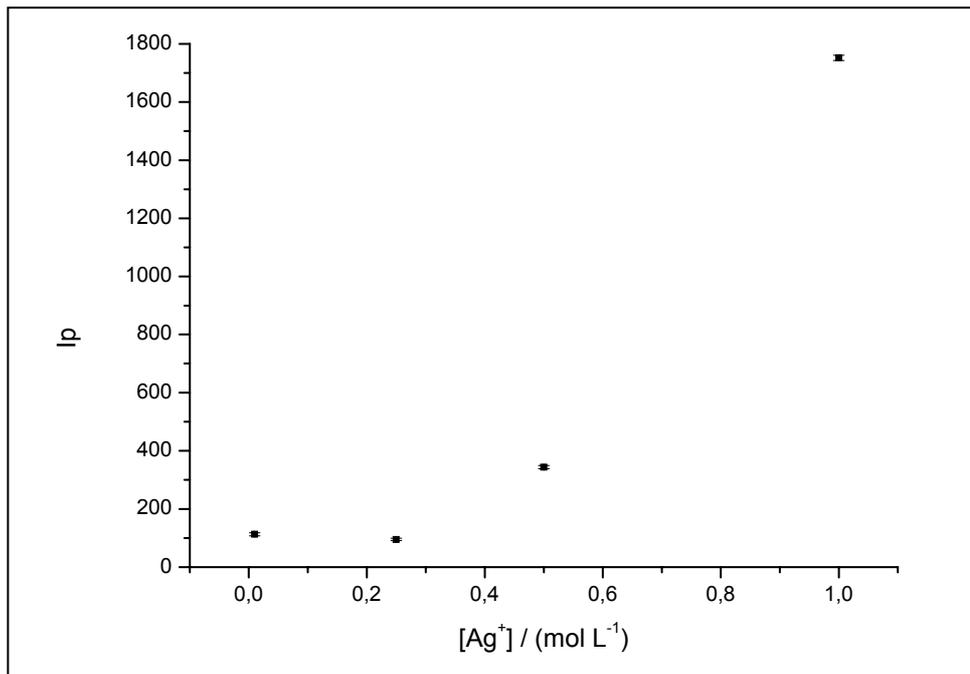


Figura 22: Efeito da concentração de AgNO_3 no sinal fosforescente da DBA (45 ng) em meio HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Os parâmetros relacionados com a detecção temporal da radiação fosforescente emitida pelos quatro compostos estudados são mostrados nas Figuras 23 e 24. Assim como para os compostos sulfurados, observou-se sinal mais intenso com o tempo de abertura do detector de 9 ms. O tempo de retardo de 0,1 ms proporcionou o melhor resultado, apesar de ficar claro que tempos de retardo de até 3 ms também produzem sinais bastante intensos.

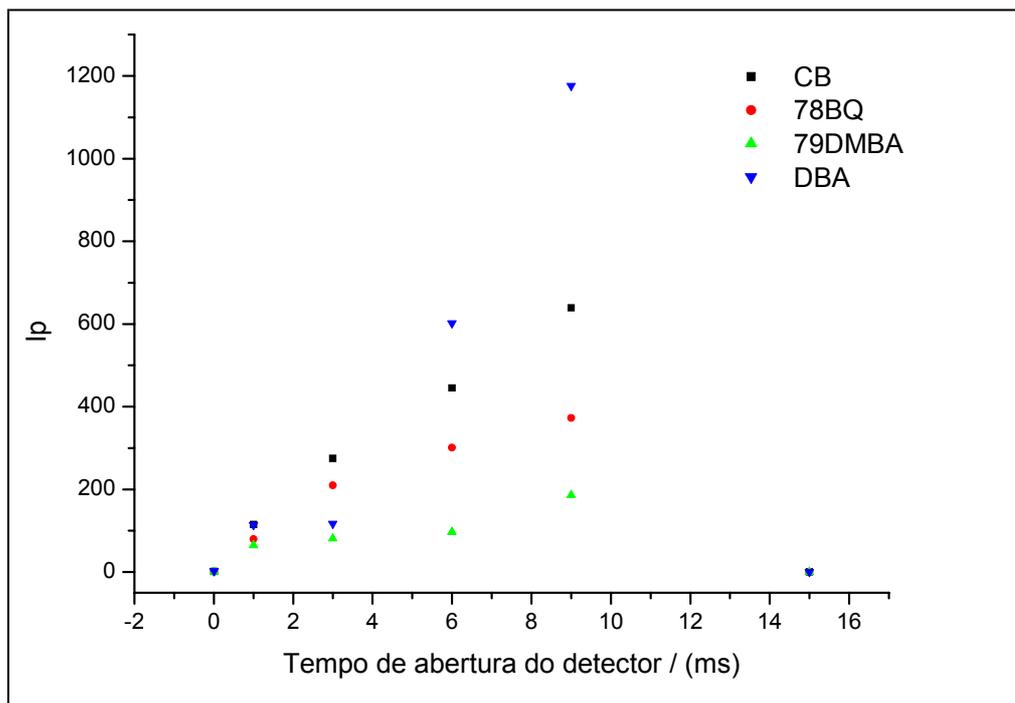


Figura 23: Curvas de otimização do sinal fosforescente do CB, da 78BQ, da 79DMBA e da DBA ($5 \mu\text{L}$ de solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo de abertura do detector. AP conforme otimizações anteriores. Tempo de retardo de 3 ms.

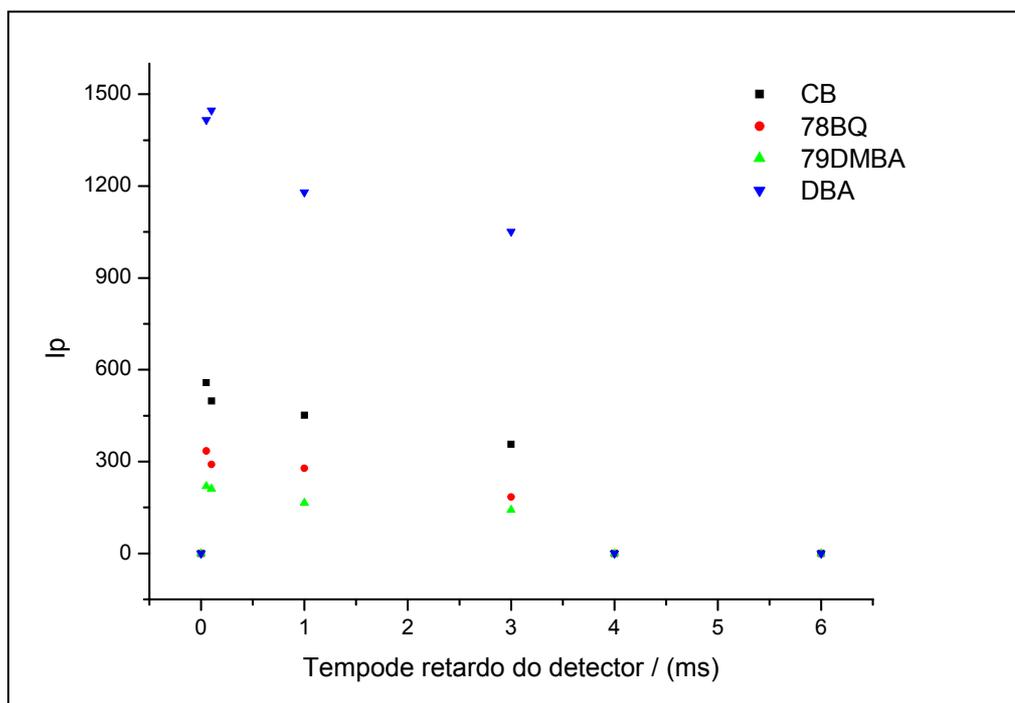


Figura 24: Curvas de otimização do sinal fosforescente do CB, da 78BQ, da 79DMBA e da DBA ($5 \mu\text{L}$ de solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo de retardo do detector. AP conforme otimizações anteriores. Tempo de abertura do detector de 9 ms.

Um resumo das condições experimentais e instrumentais adotadas para a maximização do sinal fosforescente dos quatro compostos nitrogenados é mostrado na Tabela 12. Vale ressaltar que os espectros obtidos nessas condições não diferem significativamente (em termos de perfil) daqueles obtidos anteriormente, sofrendo apenas incremento na intensidade do sinal fosforescente.

Tabela 12: Condições experimentais e instrumentais otimizadas para o CB, para a 78BQ, para a 79DMBA e para a DBA.

Parâmetro	Condição otimizada			
	CB	78BQ	79DMBA	DBA
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	248/438	266/505	284/595	302/546
Tempo de purga, (minutos)	2	2	2	2
meio ^a	etanol	etanol	etanol	ácido
Sal de AP (mol L ⁻¹) (massa de AP em µg)	KI 1,0 (829)	AgNO ₃ 1,0 (850)	TINO ₃ 0,1 (133)	AgNO ₃ 1,0 (850)
SDS	---	---	---	---
Tempo de irradiação com luz UV (minutos)	---	---	30	---
Tempo de retardo, (ms)	0,1	0,1	0,1	0,1
Tempo de abertura do detetor, (ms)	9	9	9	9

^a meio ácido refere-se a solução preparada em HNO₃ 0,5 mol L⁻¹.