Abel José Assunção Duarte

Licenciado em Engenharia Química (I.S.E.P.)

# Modelação da Resposta de Sistemas Sensores Ópticos Fluorescentes para pH, Mg(II), Al(III) e Zn(II)

Departamento de Química

Faculdade de Ciências do Porto

Porto

2003

Abel José Assunção Duarte

Licenciado em Engenharia Química (I.S.E.P.)

# Modelação da Resposta de Sistemas Sensores Ópticos Fluorescentes para pH, Mg(II), Al(III) e Zn(II)

Dissertação para Mestrado em Química

Departamento de Química

Faculdade de Ciências do Porto

Porto

2003

# Objectivo

O objectivo deste trabalho é iniciar o estudo para a concepção de sensores químicos de fluorescência de reduzidas dimensões – optrodes - para monitorizar, em tempo real, catiões em soluções (no ambiente, estudos de fisiologia, etc.).

À parte do problema óptico e electrónico desta tecnologia (fonte de radiação, detector e como introduzir e recolher a luz no sistema – fibras ópticas), a concretização do optrode passa pela funcionalidade da química do agente responsável pelo fenómeno da fluorescência - fluoróforo. Como tal, é necessário: (i) identificar os sistemas fluorescentes; (ii) estudar o comportamento físico-químico do fluoróforo em solução e quando imobilizado num suporte sólido; (iii) estudar a sua selectividade e sensibilidade para o(s) catião(ões); (iv) modificar e/ou sintetizar novos fluoróforos tornando-os mais selectivos, insolúveis no meio da monitorização e (v) modificar as suas energias de excitação e emissão para que se possam ajustar à tecnologia existente permitindo eliminar o sinal de fundo fluorescente do ultravioleta (deslocamento para o infravermelho).

Por fim, modelar o sinal da fluorescência tirando proveito deste originar dados de segunda ordem – a resposta é uma representação tridimensional no espaço das variáveis comprimento de onda de excitação (Ex) e comprimento de onda de emissão (Em). A modelação é feita com o recurso a métodos quimiométricos de decomposição das matrizes de dados a vectores, segundo cada dimensão, cujo produto matricial reproduz a matriz de dados original – decomposição trilinear – através do PARAFAC e o ajuste a equações matemáticas do tipo funções distribuição normal de probabilidades multivariadas sem interacção – HiperGaussianas.

# Resumo

A identificação dos sistemas ópticos de fluorescência é a descrição das condições físicas em que o sistema apresenta fluorescência, como por exemplo, o ligando, catião, solvente, comprimentos de onda, etc.. Perante um sistema apresentando fluorescência é necessário proceder à sua caracterização, que passa por optimizar, ou preferencialmente, modelar as variáveis físico-química e foto-física, assim como, estudar a selectividade e sensibilidade destes sistemas para as espécies químicas objecto de estudo. Este conhecimento permite identificar os factores que são passíveis de ser modificados (por exemplo alterar a estrutura química do ligando responsável pela fluorescência) de modo a tornar o método mais robusto e, simultaneamente, se possível, deslocar as características foto-físicas para comprimentos de onda de menor energia. Todos estes tópicos são demasiado ambiciosos para serem todos tratados no tempo disponibilizado para o trabalho de Mestrado.

Nesta dissertação estão descritos, essencialmente, os resultados da pesquisa e caracterização de alguns sistemas ópticos de fluorescência em solução, e, inevitavelmente, o tratamento matemático dos dados que permitiram tirar algumas conclusões quanto às propriedades físico-químicas e foto-físicas dos sistemas fluorescentes em solução para catiões. Estudou-se os seguintes sistemas fluorescentes, em solução, compostos por:

- o ligando morin que, em solução aquosa, forma complexos fluorescentes com o $Al^{3+}$ a diferentes valores de pH e com força iónica ajustada.
- o ligando BTC-5N que, em solução aquosa, forma complexos fluorescentes com o catião $Zn^{2+}$ a diferentes valores de pH e com força iónica ajustada.
- o ligando 8-hidroxiquinolina (8-HQ) que, em meio aquoso, forma complexos com o $Al^{3+}$ e após extracção para clorofórmio apresenta características fluorescentes.
- o ligando 8-HQ que, em meio etanólico (com vestígios de água), forma complexos fluorescentes com o $Mg^{2+}$.
- o ligando N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina (BSED) que, em meio N,N-dimetilformamida (com vestígios de água), forma complexos fluorescentes com o $Mg^{2+}$.
- a molécula 8- hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato de sódio (HOPSA) que, em meio aquoso, apresenta fluorescência na forma ácida e básica – indicador de pH.

- a molécula 5(6)-carboxinaftofluoresceína (CONF) que, dissolvido em DMF e usado em meio aquoso, apresenta fluorescência na forma ácida e básica – indicador de pH.

Nestes sistemas foi possível modelar os máximos da intensidade de fluorescência (IF) nas matrizes de dados da IF em função das variáveis comprimento de onda de excitação (Ex) e comprimento de onda de emissão (Em) - matrizes de excitação-emissão MEE$^s$. É nestes máximos (propriedades foto-físicas) que se pode relacionar a IF (ou uma outra relação matemática da IF) com a concentração total do catião em estudo – perfis de concentração.

Realizaram-se algumas tentativas de imobilização de ligandos, mas nenhuma foi conclusiva.

A ideia subjacente à sintetização e/ou modificação química é de a partir de um ligando fluorescente, a 8-HQ que é considerado o segundo maior complexante a seguir ao ácido etildiaminotetraacético (EDTA), torná-lo mais selectivo, através de reacções de substituição e/ou adição. Como a energia de excitação decresce (aumento do Ex) com o aumento da estrutura planar desta molecula, então o tornar os 8-HQ derivados mais selectivos significa deslocar o sistema para o infravermelho/visível. Apenas se realizou a síntese da benzo[f]-8-hidroxiquinolina e usou-se, também o sistema 4-hidroxiacridinol (ou benzo[b]-8-hidroxiquinolina) com o $Al^{3+}$ (que não apresenta fluorescência), embora os resultados não constem neste trabalho por terem sido inconclusivos, ficando só a informação que esta área já foi iniciada.

O segundo maior destaque deste trabalho foi o tratamento do sinal. Modelaram-se todas as MEE$^s$ dos diferentes sistemas de fluorescência, usando duas metodologias quimiométricas: o ajuste a funções matemáticas do tipo HiperGaussiana (HG) e a decomposição em espectros puros (vectores segundo cada uma das dimensões Ex e Em cujo produto matricial reproduz a MEE original), através do método quimiométrico multivariado PARAFAC (PARallel FACtor analysis). A finalidade destes ajustes é a obtenção de perfis de concentração para posterior calibração e determinação das constantes condicionais (ou específicas, se, no ajuste for possível descriminar os diferentes fenómenos associados ao mecanismo químico). A parte da modelação foi realizada até à obtenção dos perfis de concentração.

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer a orientação do Professor Doutor Joaquim C. G. Esteves da Silva.

À Doutora Cristina Delarue-Matos do Instituto Superior de Engenharia do Porto, por me ter, felizmente, obrigado a realizar este trabalho, assim como, facilitado a actividade de aprendizagem. Ainda no I.S.E.P., onde trabalho, a todas as pessoas que me têm permitido aprender – colegas e alunos.

Às pessoas com quem, ao longo destes dois anos, convivi no laboratório do Professor Doutor Esteves da Silva: o Professor Esteves, a Joana, o João e o Rui.

À minha Avó
À minha mãe
Às minhas irmãs: Adelina, Alzira, Angelina e Maria José
À minha mulher
À minha filha

Não poderia deixar de agradecer às $\sqrt{2 \cdot \pi \cdot \sigma^2} \cdot \exp\left(\frac{(12645{,}669-A)^2}{2 \cdot \sigma^2}\right)$ pessoas do mundo que directa ou indirectamente influenciaram e, principalmente, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Na expressão bastante modificada da "distribuição normal de probabilidades", A é o corrente ano e $\sigma$ é o ano de nascimento do Carl Gauss.

"[...] **315.** 3° caso. Suponhamos, por exemplo, o numero 887503929. A sua raiz cubica tem tres algarismos (n° 310), isto é, unidades, dezenas e centenas; mas todo o numero composto de tres algarismos póde dividir-se em duas partes, a primeira das quaes seja formada pelas centenas e dezenas, formando um grupo de dezenas e a segunda pelo algarismo das unidades portanto, representando por $a$ o numero das dezenas da sua raiz e por $u$ o algarismo das unidades, será $(10a+u)$ a raiz procurada; e, se representarmos por $R$ o resto da operação, se o houver, teremos

$$88503929=(10a+u)+R=(10a)^3+3(10a)^2\,u+3(10a)\,u^2+\,u^3+R.$$

Ora, é sabido que $(10a)^3$, cubo das dezenas, produz pelo menos unidades de mil e estas só pódem existir em 887503 unidades de mil ou 887503000, onde devem tambem existir unidades de mil, que possam provir das outras partes. Separando, pois, os tres primeiros algarismos da direita por um ponto e extrahindo a raiz cubica a 887503, obteremos as dezenas da raiz procurada. Com effeito, como $a$ representa a raiz cubica do maior cubo contido em 887503, teremos

$$a^3<887503<(a+1)^3.$$

Multiplicando por 1000 ou 103 (n° 142), vem

$$a^3x10^3<887503x10^3<(a+1)^3\ x10^3$$

ou

$$(ax10)^3<887503000<[10(a+1)]^3.$$

Ora, $a^3$ e $(a+1)^3$, cubos de dous numeros inteiros e consecutivos, diferem entre si em mais de uma unidade (n° 276), logo, multiplicados por 1000 ou $10^3$, differirão em mais de uma unidade de mil ou 1000 unidades simples; portanto se a 887503 ajuntarmos 929, numero menor que 1000, teremos ainda

$$(10a)^3<887503929<[10(a+1)]^3.$$

Estas relações provam que o maior numero, cujo cubo está contido em 887503929, é pelos menos $10a$, mas não é $10(a+1)$. A raiz cubica de 887503929 contém, pois, pelo menos $a$ dezenas, mas não contém $a+1$; portanto o numero das dezenas da raiz é $a$, por defeito. Para as acharmos, temos de extrahir a raiz cubica de 887503. E, como este numero tem 6 algarismos, applicaremos o processo indicado no 2.° caso, o que nos dá 96 para a raiz e 2767 para o resto.

| | |
|---|---|
| 887 503 | 96 |
| 729 | 24 3 |
| 158 503 | 1 62 |
| 155 736 | 3 6 |
| 2 767 | 25 95 6 |
| 2 767 | 6 |
| | 155 73 6 |

Conhecidas as 96 dezenas da raiz cubica de 887503929, facilmente encontraremos o algarismo das unidades, applicando o mesmo raciocinio que no 2.°caso, para a determinação do mesmo algarismo. Assim,

| | | |
|---|---|---|
| 887 503 329 | 961 | |
| 729 | 243 | 276 48 |
| 158 503 | 162 2 | 288 |
| 155 6 | 36 | 1 |
| 2 767 929 | 259 56 | 276 768 1 |
| 2 767 681 | 6 | |
| 248 | 1557 36 | |

Vê-se, pois, que a raiz cubica de 887503929, com um erro inferior a uma unidade, é 961, sendo 248 o resto. [...]"

João S. F. Figueirinhas, "Tratado Elementar de Arithmetica", 1894, Livraria de Magalhães & Moniz, Porto.

Ao Senhor Engenheiro Serafim

# Índice

Objectivo i

Resumo iii

Agradecimentos v

Índice vii

Abreviaturas xiii

1 Introdução 1

1.1 O fenómeno de fluorescência 1

1.2 Sensores químicos de fluorescência 3

1.3 Sistemas de fluorescência 4

1.3.1 Ligando Morin 6

1.3.2 Ligando 8-hidroxiquinolina 7

1.3.3 Ligando BTC-5N 11

1.3.4 Ligando N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina 11

1.3.5 Ligando 8- hidróxipireno-1,3,6-trisulfonato de sódio 12

1.3.6 Ligando 5(6)-carboxinaftofluoresceína 14

1.4 Sensores ópticos de fluorescência - "optrodes" 14

1.4.1 Deslocação da fluorescência para a região do infravermelho e selectividade para os catiões 15

1.4.2 Imobilização 18

1.5 Bibliografia 18

2 Procedimento experimental 23

2.1 Reagentes 23

2.2 Soluções 25

2.3 Equipamento 28

2.4 Software 28

2.5 Controlo do pH 28

2.6 Sistemas ligando-catião 29

2.6.1 Sistema Morin-$Al^{3+}$ 29

2.6.2 Sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$ 30

2.6.3 Sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ 31

2.6.4 Sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$ 32

2.6.5 Sistema BSED-$Mg^{2+}$ 32

2.6.6 Sistema HOPSA-$H^{+}$ 34

2.6.7 Sistema CONF-$H^{+}$ 34

2.7 Imobilização de sensores químicos 34

2.7.1 8-HQ em filme de PVC 34

2.7.1 HOPSA em filme de PVC 35

2.7.1 CONF em filme de PVC 35

3 Modelação 37

3.1 A ordem de aquisição dos dados 37

3.2 Perfil de concentração 41

3.3 Modelação a funções matemáticas (Gaussianas) 44

3.3.1 Espectros de Ex ou Em como curvas de Gauss univariadas 44

3.3.2 Perfis de concentração nos espectros de Ex ou Em 48

3.3.3 MEE como curvas de Gauss bivariadas 51

3.4 PARAFAC – Formas puras 60

3.4.1 PARAFAC aplicado às MEE (a 2 dimensões) 60

3.4.2 Critérios de avaliação 66

3.4.3 PARAFAC a n dimensões 68

3.5 Curvas de calibração e constantes condicionais 74

4 Resultados experimentais 75

4.1 Sistema Morin-$Al^{3+}$ 76

4.1.1 MEE 76

4.1.2 MEE como curvas de Gauss bivariadas 78

4.1.3 MEE decompostos em espectros puros 80

4.1.4 Reprodução das $MEE^s$ 82

4.1.3 Comentários dos resultados 85

4.2 Sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$ 87

4.2.1 MEE 87

4.2.2 MEE como curvas de Gauss bivariadas 89

4.2.3 MEE decompostos em espectros puros 91

4.2.4 Reprodução das $MEE^s$ 93

4.2.5 Comentários dos resultados 97

4.3 Sistema HQ-$Al^{3+}$ 98

4.3.1 MEE 98

4.3.2 MEE como curvas de Gauss bivariadas 100

4.3.3 MEE decompostos em espectros puros 102

4.3.4 Reprodução das $MEE^s$ 103

4.3.5 Comentários dos resultados 105

4.4 Sistema HQ-$Mg^{2+}$ 107

4.4.1 MEE 107

4.4.2 MEE como curvas de Gauss bivariadas 109

4.4.3 MEE decompostos em espectros puros 112

4.4.4 Reprodução das MEE$^s$ 112

4.4.5 Comentários dos resultados 115

4.5 Sistema BSED-$Mg^{2+}$ 117

4.5.1 MEE 117

4.5.2 MEE como curvas de Gauss bivariadas 119

4.5.3 MEE decompostos em espectros puros 121

4.5.4 Reprodução das MEE$^s$ 121

4.5.5 Comentários dos resultados 125

4.6 Sistema HOPSA-$H^+$ 126

4.6.1 MEE 126

4.6.2 MEE como curvas de Gauss bivariadas 128

4.6.3 MEE decompostos em espectros puros 129

4.6.4 Reprodução das MEE$^s$ 130

4.6.5 Comentários dos resultados 134

4.7 Sistema CONF-$H^+$ 136

4.7.1 MEE 136

4.7.2 MEE como curvas de Gauss bivariadas 138

4.7.3 MEE decompostos em espectros puros 140

4.7.4 Reprodução das MEE$^s$ 141

4.7.5 Comentários dos resultados 144

4.8 Bibliografia 146

5 Conclusões e prespectivas 147

5.1 Sistemas de fluorescência 147

5.2 Tratamento de dados 148

5.3 Optrodes 149

5.4 Perspectivas 150

# Abreviaturas

| | |
|---|---|
| **(x;y)** | Ponto no espaço da MEE quando se irradia o sistema com um comprimento de onda de x nm e se lê o sinal com radiação devolvida ao comprimento de onda y nm, o ponto no espaço (Ex;Em) é (x;y) |
| **8-HQ** | 8-hidroxiquinolina |
| **BSED** | N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina |
| **$C_{10}OH$** | 1-decanol |
| **CHQ** | Diaza-18-coroa-6 ligado a dois 5-cloro-8-hidroxiquinolina-7-il |
| **CONF** | 5(6)-carboxinaftofluoresceína |
| **DMF** | N,N-dimetilformamida |
| **DOS** | Dioctil sebacato |
| **Em** | Comprimento de onda de emissão em nm |
| **Ex** | Comprimento de onda de excitação em nm |
| **Fit** | Percentagem de ajuste no modelo de PARAFAC |
| **HG** | Hipergaussiana, expressão da curva de Gauss modificada para mais do que 1 dimensão (variável) |
| **HOPSA** | 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato de sódio |
| **IF** | Intensidade de fluorescência em unidades relativas de fluorescência |
| **MEE** | Matriz de excitação-emissão |
| **NOE** | 2-nitrofenil octil éter |
| **PARAFAC** | PARAllel FACtor analysis, decomposição vectorial de um conjunto de dados a n dimensões em formas – factores - (vectores segundo cada dimensão), de cujo produto matricial se obtém os dados originais. |
| **PVC** | Policloreto de vinil |
| **$R^2_{Gaussiana}$** | Parâmetro de avaliação do ajuste não linear dos dados a Gaussianas |
| **Xval** | Percentagem de ajuste no modelo de PARAFAC de parte dos dados em relação ao todo |

# 1 - Introdução

## 1.1 - O fenómeno de fluorescência

A luminescência é a capacidade da matéria em emitir luz na região do visível, infravermelho (IV) e/ou ultravioleta (UV). Mas para emitir radiação electromagnética é necessário fornecer energia à matéria e consoante o tipo de energia fornecida podemos ter quimioluminescência, electroluminescência, termoluminescência, etc. e, se a fonte de energia é a própria luz, denomina-se de fotoluminescência.

A fluorescência é um caso particular da fotoluminescência. Quando a matéria absorve, ou é excitada, energia luminosa, a determinado comprimento de onda (comprimento de onda de excitação, Ex) e se observa a emissão, espontânea ou (e) quase instantânea (inferior a $10^{-6}$ s), de radiação a um comprimento de onde superior (comprimento de onda de emissão, Em), este fenómeno é denominado de fluorescência. Existe, ainda, a fosforescência que é o mesmo fenómeno mas retardado no tempo, o tempo entre a excitação e a emissão pode ser na ordem dos segundos ($10^{-4}$ a $10^{2}$ s) [1].

Qualquer molécula, ou ião, fluorescente tem dois espectros característicos: o espectro de excitação e o espectro de emissão. O espectro de excitação é algo idêntico ao espectro de absorção, as diferenças prendem-se a artefactos instrumentais, e são obtidos fazendo a recolha da intensidade de fluorescência (IF) ao longo da gama de Ex, isto para um Em fixo. Os espectros de emissão, também denominados de espectros de fluorescência, são obtidos excitando a molécula com determinado Ex e recolhe-se a IF ao longo da gama de Em.

A Fig. 1.1 é a representação (por simulação) do espectro de fluorescência do sulfato de quinina em solução 0,1 mol/L de ácido sulfúrico quando a solução é excitada com luz monocromática de 320 nm. O pico a 320 nm de Em é a dispersão de primeira ordem (Em=Ex), este pico corresponde a quantidades de luz que é desviada para o detector, por exemplo reflexão (efeito de Tyndall) e por fotões que, embora tenham excitado a molécula, a sua reemissão é suficientemente rápida (na mesma ordem da absorção, $10^{-15}$ s) para que não se observe perda de energia (dispersão de Rayleigh). O

fenómeno da dispersão de Rayleigh também se verifica ao Em do dobro do de excitação, ou seja quando Em é o dobro do Ex, na Fig.1.1 corresponde ao pico de 640 nm, denominando-se dispersão de segunda ordem. Existem picos, também de dispersão mas de muito menor intensidade, que ocorrem nas proximidades, tanto superior como inferior, das dispersões da primeira e segunda ordem. Estas bandas satélites acontecem quando os electrões excitados sofrem acréscimos ou reduções de energia devido, por exemplo, aos acoplamentos vibracionais - efeito de Raman (Fig. 1.1 bandas a 360 e 720 nm). Por fim, temos o pico a 450 nm de Em que corresponde à fluorescência do composto. Se o Ex de 320 nm e Em de 450 nm corresponderem aos respectivos comprimentos de onda onde se verifique o máximo de IF, então através da expressão matemática $10^7 \cdot \left( \frac{1}{Ex} - \frac{1}{Em} \right)$ origina o valor de 9028 $cm^{-1}$ (com Ex e Em em nm) que é característico do sistema fluorescente, e que é denominado desvio de Stokes [1].

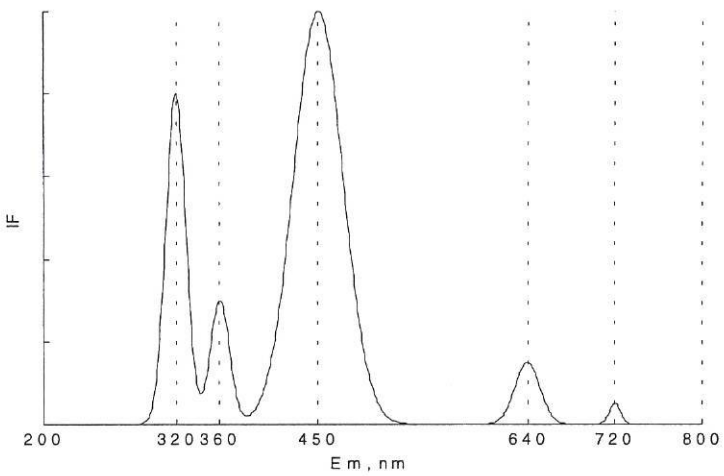



Fig. 1.1 – Representação simulada do espectro de emissão do sulfato de quinina em 0,1 mol/L de $H_2SO_4$, ao Ex de 320 nm. Apenas se representou os picos mais significativos.

A colecção de todos os espectros de emissão, recolhidos numa gama de Ex, são as matrizes de excitação-emissão (MEE) e a sua representação 3D permitem a visualização do sinal de IF nas diferentes zonas do plano (Ex;Em), Fig. 1.2.a. A representação bidimensional das linhas de igual valor de IF, no plano (Ex;Em), permite definir três zonas distintas: uma correspondente ao Ex inferior ao Em (plano abaixo da linha de dispersão de primeira ordem, origina desvios de Stokes negativos) e uma outra correspondente ao Ex superior ao dobro do Em (plano acima da linha de dispersão de

segunda ordem, origina desvios de Stokes superiores a $\frac{10^7}{2 \cdot Ex}$), o sinal recolhido nestas duas zonas não corresponde a fluorescência. A área do plano acima da dispersão de primeira ordem e abaixo da dispersão de segunda ordem (desvios de Stokes entre 0 e $\frac{10^7}{2 \cdot Ex}$) é onde o fenómeno de fluorescência ocorre (Fig. 1.1.b). Nesta zona é onde se encontra as elipses correspondentes ao sinal de fluorescência, centrada em (Ex;Em) igual a (320;450) nm.

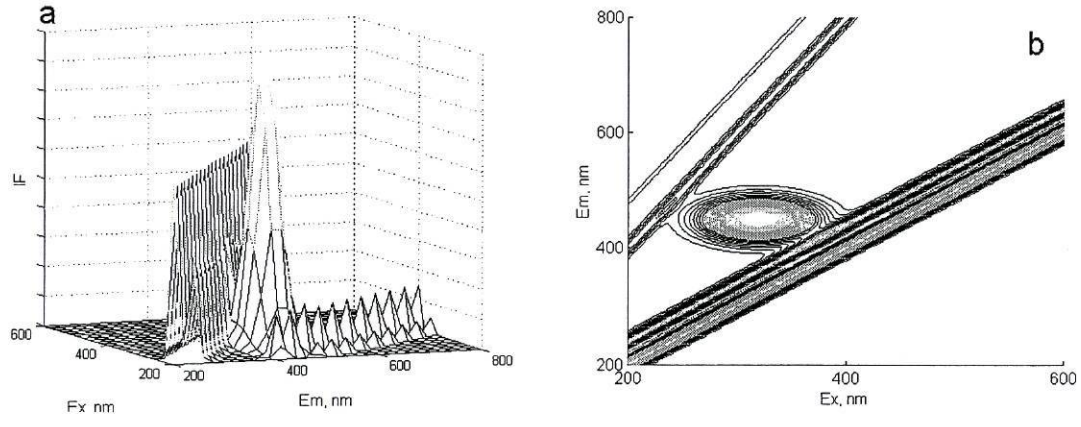



Fig. 1.2 – Representação simulada da MEE do sulfato de quinina em 0,1 mol/L de $H_2SO_4$: **a)** 3D e **b)** diagrama de contornos em que cada linha corresponde a IF de igual valor.

## 1.2 – Sensores químicos de fluorescência

A propriedade de fluorescência é restrita a um número relativamente pequeno de compostos, moléculas ou iões, sendo principalmente compostos aromáticos contendo oxigénio ou azoto em substituição de carbonos no(s) anel(eis) [1]. Como tal, é possível identificar e mesmo dosear estes compostos em misturas complexas como o soro, urina e constituintes moleculares ou iónicos do plasma celular [2].

Um sensor químico de fluorescência é o uso de um destes compostos que, através de uma reacção química, torna possível identificar ou quantificar um qualquer analíto. A característica fluorescente pode ser de um dos reagentes e/ou de um dos produtos [3].

O simples facto de só algumas famílias de compostos terem a propriedade de fluorescência torna o método, por si só, bastante específico ou selectivo, e além disso, mesmo que dois compostos absorvam ao mesmo comprimento de onda é pouco provável que emitam ao mesmo comprimento de onda, então, um sistema de

fluorescência , ao contrário da maioria dos métodos de espectroscopia, é caracterizado pela dependência simultânea do Ex e do Em (propriedades fotoquímicas). Além ou por causa disso, as fluorometrias são das metodologias mais sensíveis [1], por exemplo o catião alumínio forma um complexo fluorescente com o salicilideno-*o*-aminofenol com uma sensibilidade de 0,3 p.p.b..

As limitações da fluorescência como ferramenta analítica é a forte dependência do fenómeno com os factores experimentais [1], sendo os principais: A temperatura - normalmente provoca a diminuição da IF em cerca de 1% por cada °C de incremento, podendo chegar a 5% no caso do triptofano e da rodamina B. A existência de impurezas que causam diminuição da IF (sendo o oxigénio dissolvido, principalmente em solução, o mais dramático, embora existem outros como os halogenetos). A força iónica reduz a IF porque, de uma forma geral, qualquer ião em solução aumenta a absorção de radiação com o aumento da concentração, logo diminui a energia disponível com que as moléculas ou iões são excitados. O pH do meio condiciona a protonação dos compostos fluorescentes ou, mesmo, a disponibilidade de certas espécies químicas (hidrólises dos catiões). O solvente estabelece ligações com o soluto, que podem ser desde a formação de soluto-complexos, o caso dos hidroxocomplexos em meio aquoso, até às pontes de hidrogénio. Como o tipo de ligação com o solvente influencia directamente a energia dos compostos é óbvia a sua dependência com o fenómeno da fluorescência [4,5].

## 1.3 – **Sistemas de fluorescência**

No caso particular do nosso trabalho, o sensor químico de fluorescência é um ligando (L) que reage com um catião metálico (M) em solução dando origem a um complexo (LM). Neste trabalho optou-se por chamar complexo independentemente do número de coordenação do ligando assim como o número de ligações estabelecidas entre o ligando e o catião. Esquematicamente, o equilíbrio químico é traduzido por (não significando que a estequiometria seja unitária):

$$L + M \Leftrightarrow LM \qquad \text{[eq1.1]}$$

em que só o L e/ou LM têm a propriedade de fluorescência. O sistema absorve energia radiante ao comprimento de onda de excitação i, $\frac{h \cdot c}{Ex_i}$ onde $h$ é a constante de Planck

($6{,}626 \cdot 10^{-34}$ Js) e $c$ a velocidade da luz no vácuo ($2{,}998 \cdot 10^{8}$ $ms^{-1}$), segundo o mecanismo:

$$L + \frac{h \cdot c}{Ex_1} \rightarrow L^* \qquad \text{[eq1.2]}$$

e/ou

$$LM + \frac{h \cdot c}{Ex_2} \rightarrow LM^* \qquad \text{[eq1.3]}$$

onde $X^*$ é o composto excitado e na fluorescência emite luz com energia correspondente ao comprimento de onda de emissão i, $\frac{h \cdot c}{Em_i}$:

$$L^* \rightarrow L + \frac{h \cdot c}{Em_1} \qquad \text{[eq1.4]}$$

e/ou

$$LM^* \rightarrow LM + \frac{h \cdot c}{Em_2} \qquad \text{[eq1.5]}$$

isto sempre com a energia de excitação, $\frac{h \cdot c}{Ex_i}$, superior à energia de emissão, $\frac{h \cdot c}{Em_i}$, logo Em é superior a Ex.

Há três situações possíveis: Só L é fluorescente, o mecanismo formado com a [eq1.2] e [eq1.4], logo observa-se uma diminuição da IF com o aumento da concentração de LM, normalmente por adição do catião, e diz-se que o catião provoca a extinção da fluorescência no sistema ("quenching"). Se só LM é fluorescente, o mecanismo composto pelas [eq1.3] e [eq1.5], observa-se um incremento da IF com o aumento da concentração de catião, então o catião é promotor da fluorescência no sistema ("enhancement"). Por fim, ambas as espécies são fluorescentes, o mecanismo é composto pelas [eq1.2], [eq1.3], [eq1.4] e [eq1.5], então o aumento da concentração do catião vai provocar incremento da IF, na zona da MEE centrado em ($Ex_2$;$Em_2$), e extinção na zona da MEE centrado em ($Ex_1$;$Em_1$).

## 1.3.1 – **Ligando Morin**

O morin é uma flavona de origem vegetal, que se pode extrair da *Artocarpus Integrifolia* e *Toxylon Pomiferum* por exemplo, mas pode ser obtida por síntese [6] cujo nome sistemático é 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Fig. 1.3).

Forma complexos com um grande número de catiões, entre os quais o $Al^{3+}$. A biografia reporta sistemas morin-$Al^{3+}$, em metanol [7], em isobutil-metil-cetona após extração de mistura de etanol–metanol-água [8,9] e em meio aquoso [10], por exemplo, tendo todos propriedades fluorescentes.

Em meio aquoso o ácido pentaprótico morin apenas apresenta uma protólise significativa, comportando-se como um ácido monoprótico ($pK_a$ = 5,04) [10]. E forma complexos com o catião $Al^{3+}$ com estequiometrias 1:1 e 1:2 e/ou 1:3 ($Al^{3+}$:morin), sendo a forma 1:1 o complexo predominante nas condições de baixa concentração de morin (cerca de $10^{-3}$ mol/L) [7-10] (Fig. 1.4).

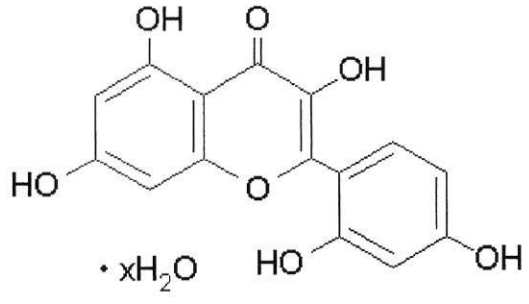



Fig. 1.3 – Estrutura química do morin, $H_5C_{15}H_5O_7 \cdot xH_2O$.

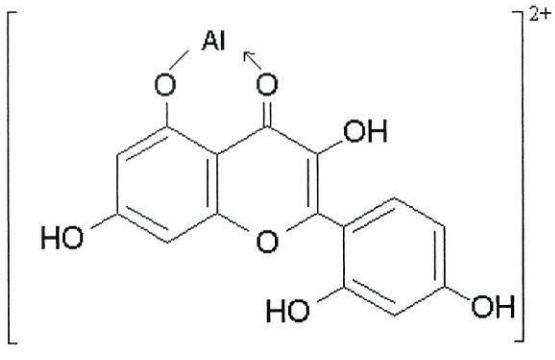



Fig. 1.4 – Estrutura química do complexo 1:1, $[AlH_4C_{15}H_5O_7]^{2+}$ [6].

Refira-se, ainda, que, dependendo do valor de pH, na estequiometria de formação do complexo 1:1, encontra-se, para além do complexo $[AlH_4C_{15}H_5O_7]^{2+}$ (Fig. 1.4), o $[Al(HO)H_4C_{15}H_5O_7]^{+}$ e o $[Al(HO)_2H_4C_{15}H_5O_7]$ [10] devido às hidrólises do catião $Al^{3+}$ (Fig. 1.6).

Pavelka [12] refere o uso do morin no teste de identificação do catião alumínio como sendo o mais sensível, teste esse efectuado em meio aquoso neutro ou ligeiramente ácido no qual o complexo precipita na forma coloidal e é caracterizado pela sua fluorescência de cor verde.

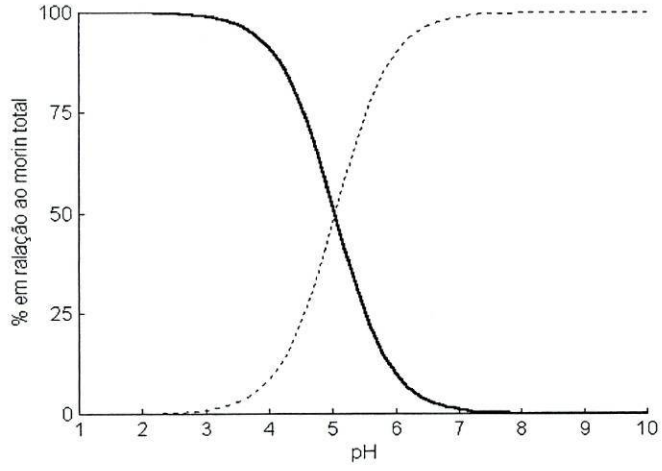



Fig. 1.5 – Diagrama de distribuição do ácido morin, em meio aquoso, considerando apenas a primeira protólise. Linha cheio é a espécie morin e a tracejado o morin desprotonado no hidróxido da posição 5.

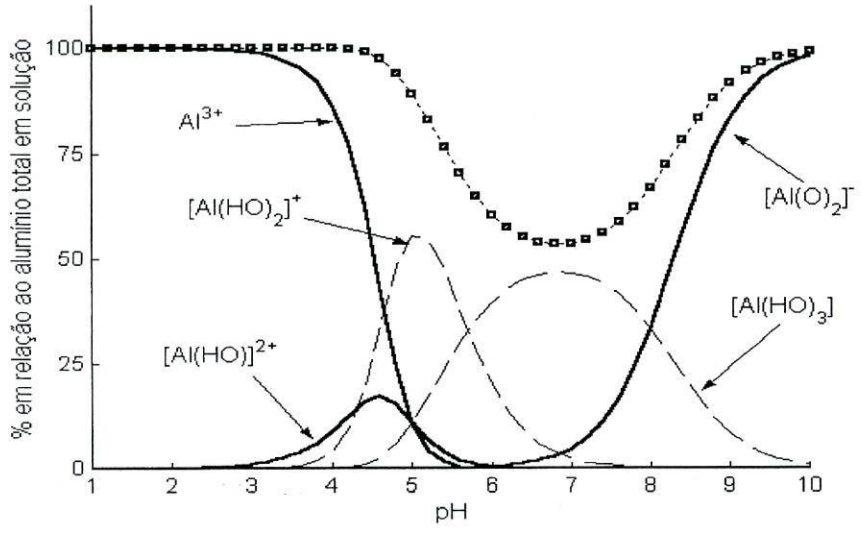



Fig. 1.6 – Diagrama de distribuição do catião alumínio, em meio aquoso, considerando apenas as hidrólises mais significativas [11]. A linha com quadrados é a representação do alumínio total em solução, ou seja, o que falta para os 100% está na forma de precipitado gelatinoso $Al_2O_3 \cdot 3H_2O$ – hidróxido de alumínio insolúvel.

## 1.3.2 – **Ligando 8-hidroxiquinolina**

A 8-hidroxiquinolina, 8-HQ, (vulgarmente conhecida na química analítica como oxina ou, simplesmente, quinolinol) é uma benzopiridina com um grupo hidróxido na posição 8 (Fig. 1.7).

A obtenção da 8-HQ por condensação do o-aminofenol com a acetilacetona é reportada desde o século XIX [13]. O seu principal uso é, desde então, como agente de

complexação de um grande número de catiões metálicos em que a maioria é bastante insolúvel em meio aquoso. O ligando é tão pouco específico [14] que, como método analítico, é necessário recorrer a técnicas de separação [15], mascarar os catiões não em estudo [15], ou então usar derivados da 8-HQ que sejam selectivos [14,16,17].

A 8-HQ, em solução aquosa, comporta-se como um ácido fraco no grupo OH da posição 8, $pK_{a(OH/O^-)}$ = 9,89, e tem, também, caracter básico fraco associado ao azoto substituto do carbono no anel piridímico, $pK_{a(NH^+/N)}$ = 5,13 [18,19] (Fig.1.8). A valores de pH inferiores a 5 predomina a forma catiónica e para valores superiores a 10 a forma aniónica é a predominante. Não se incorporou na Fig. 1.8 a espécie dimerizada da 8-HQ (Fig. 1.9) porque o seu valor, para solução aquosa, não vem mencionado na bibliografia, mas em solução de n-heptano, em concentrações superiores a $10^{-6}$ mol/L, 92% da 8-HQ encontra-se na forma de $(8\text{-HQ})_2$, a constante de dimerização, neste meio, é de $7{,}0\text{x}10^7$ [18].

Em meio etanólico, álcool etílico absoluto, o $pK_{a(OH/O^-)}$ vale 14,3 e o $pK_{a(NH^+/N)}$ é 6,3 [4].

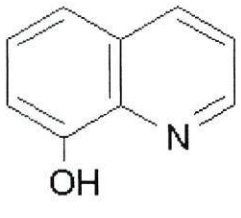



Fig. 1.7 – Estrutura química da 8-HQ.

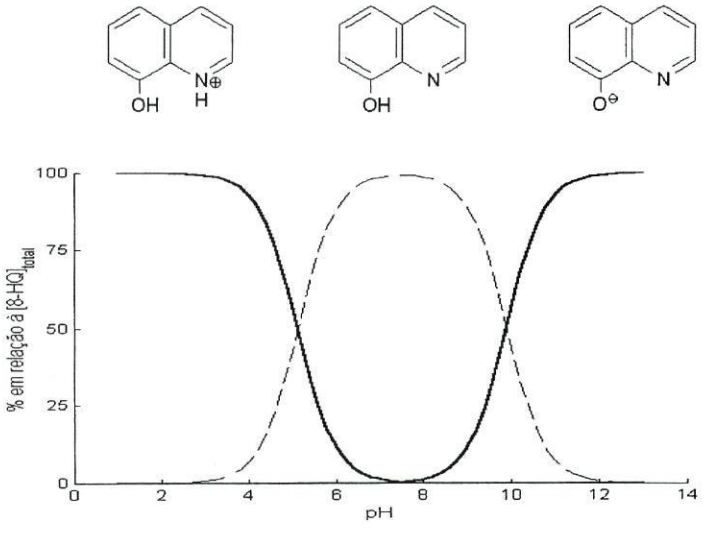



Fig. 1.8 – Diagrana de distribuição das três espécies tautoméricas da 8-HQ. Não se considerou a forma do dímero $(8\text{-HQ})_2$.

É na forma de anião que a 8-HQ se liga ao catião metálico (formando os 8-hidroxiquinolinatos) (Fig. 1.10) ou porque já se encontra nesta forma ou então o catião metálico substitui o hidrogénio na reacção de complexação e consequente acidificação do meio.

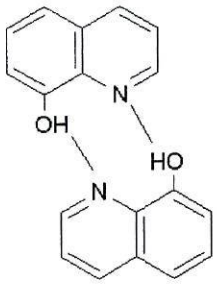



Fig. 1.9 – Estrutura química do dímero da 8-HQ.

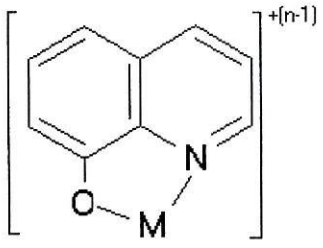



Fig. 1.10 – Estrutura química do complexo de 8-HQ com o catião $M^{n+}$, estequiometria 1:1.

A maioria dos estudos efectuados com complexos fluorescentes de 8-HQ e catiões metálicos são feitos em meios não aquosos [4,5,20-22] devido à baixa solubilidade em meio aquoso e à IF ser maior em meios não aquosos. Os métodos mais sensíveis de identificação/doseamento de catiões é a obtenção do complexo em meio aquoso e posterior extracção para um meio, imiscível em água, em que a solubilidade é maior, logo maior quantidade de complexo fluorescente [23].

A reacção completa com a $Al^{3+}$ será na proporção de três 8-HQ para cada catião alumínio ficando, também, preenchido todos os seus números de coordenação (6), visto a 8-HQ ser bidentada. E é nesta forma que se vai encontrar o sal, pouco solúvel em água, de tri-8-hidroxiquinolinato de alumínio ($Al(8\text{-}HQ)_3$).

A quantidade de espécies de complexos que se podem formar com estes dois constituintes é grande, Ohnessorge [4] refere a existência de 9 espécies químicas que se formam no sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ em álcool etílico absoluto, para além do complexo $[Al(etOH)_6]^{3+}$ (onde etOH é o etanol e usamos o $etO^-$ para o correspondente etanol desprotonado da sua autoprotólise) não fluorescente, refere a existência de 7 complexos todos passíveis de serem medidos por fluorescência em zonas do plano (Ex;Em) diferentes (Tabela 1.1).

O número de combinações cresce exponencialmente se, a este sistema, adicionar-se uma pequena quantidade de um outro ligando muito conhecido da química do catião alumínio – a água [11]. A incorporação de moléculas de água na estrutura dos complexos faz com que a IF diminua, daí se usar preferencialmente meios não aquosos. Soroka [24], por exemplo, demonstra que para o sistema 8-HQS-$Al^{3+}$ (8-HQS é um derivado da 8-HQ bastante mais solúvel em água, ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico) em misturas de água e N,N-dimetilformamida (DMF) a IF decresce com o aumento da quantidade de água no sistema (Fig. 1.11).

Tabela 1.1- Propriedades ópticas dos complexos 8-hidroxiquinolinato de alumínio em etanol absoluto ao Ex de 365 nm, adaptado de [4]. Nesta tabela o Q é a 8-HQ na forma desprotonada (Fig. 1.10), o etOH o álcool etílico e o $etO^-$ o álcool etílico desprotonado.

| espécie | Em $_{máximo}$, nm* | IF |
|---|---|---|
| $AlQ_3$ | 512 | 0,31 |
| $[Al_2Q_4(etOH)(etO)]^+$ | 510 | 0,30 |
| $[ALQ_2(etOH)_2]^+$ | 500 | 0,86 |
| $[Al_2Q_4(etOH)_2]^{2+}$ | 503 | 0,33 |
| $[Al_2Q_2(etOH)_3(etO)_3]^+$ | 508 | 0,22 |
| $[Al_2Q_2(etOH)_6]^{4+}$ | 507 | 0,09 |
| $[ALQ(etOH)_4]^{2+}$ | 500 | 0,7 |

* Valor relativo dos máximos da IF.

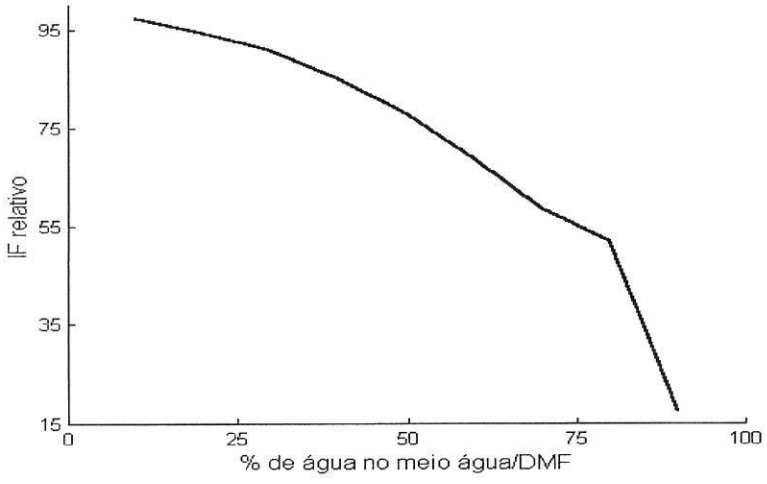



Fig. 1.11 – Extinção da IF com o aumento da quantidade de água no meio água/DMF (% em volume) para o sistema fluorescente 8-HQS-$Al^{3+}$. Adaptado de [24].

A reacção completa com o catião magnésio é na proporção de dois 8-HQ para cada catião magnésio [23], originando (provavelmente) o di-8-hidroxiquinolinato de magnésio dihidratado ($Mg(8\text{-}HQ)_2 \cdot 2H_2O$) [20]. No entanto, em estudos efectuados com o sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$, Ghasemi [5] chegou à mesma conclusão quanto à estequiometria, se o meio for acetonitrilo ou acetona, conseguindo apenas determinar a primeira constante de formação em metanol com estequiometria de 1:1.

A bibliografia refere o uso da 8-HQ, em meio não aquoso, para a determinação do catião magnésio em misturas complexas por fluorimetria, soro e urina [25,26], nada referindo quanto aos aspectos químicos do sistema. Para o mesmo catião do soro e

urina, mas agora em meio aquoso, Klein [27] e Schachter [28] usam o derivado sulfónico da 8-HQ (ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónica) cujos complexos são solúveis.

### 1.3.3 – **Ligando BTC-5N**

O BTC-5N (Fig. 1.12) é uma substância desenvolvida pela Molecular Probes [2] usada em fisiologia para a identificação e/ou quantificação de catiões como o $Cd^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Ba^{2+}$ e o $Pb^{2+}$, por exemplo, no interior de células vivas. O seu uso em fisiologia deve-se ao carácter não fluorescente dos complexos formados com os principais catiões existentes nas células: o $Ca^{2+}$ e o $Mg^{2+}$ [2]. Outros catiões como o $Al^{3+}$, $Bi^{3+}$, $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Ni^{2+}$ e o $Mn^{2+}$ formam complexos com o BTC-5N que são não fluorescentes ou cuja IF é desprezável, logo não são interferentes.

O complexo formado entre o BTC-5N e o $Zn^{2+}$ é bastante fluorescente em solução aquosa [2].

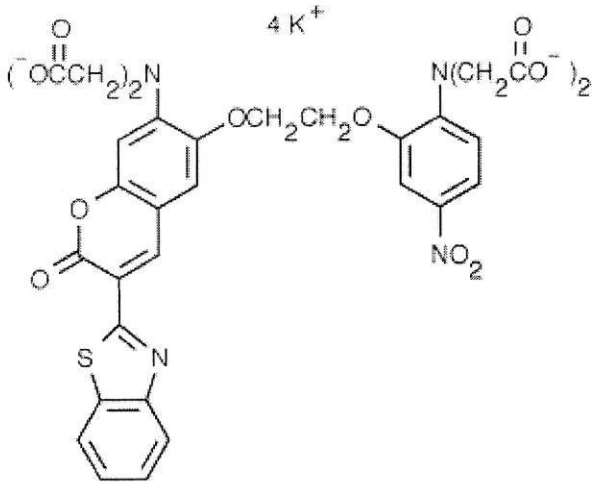



Fig. 1.12 – Estrutura química do BTC-5N na forma de sal tetrapotássico.

### 1.3.4 – **Ligando N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina**

O BSED (Fig. 1.13) é um o,o'-dihidroxazo não fluorescente que forma complexos com um grande número de catiões ($Al^{3+}$, $Mg^{2+}$, $Zn^{2+}$, $In^{3+}$, por exemplo) com propriedades fluorescentes ou em que, pelo menos, se obtém soluções coloridas [29].

A complexação com o catião magnésio faz-se através dos oxigénios dos dois grupos OH e os azotos dos dois grupos amina (Fig. 1.14) [30], resultando uma estequiometria de 1:1 (BSED:$Mg^{2+}$) [31].

Todas estas referências ([29-31]) usam o sistema em DMF, porque a água provoca extinção da fluorescência, por incorporação de moléculas de água nos complexos ou simplesmente devido ao efeito do solvente (Fig. 1.15).

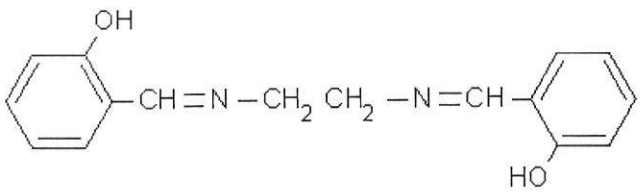



Fig. 1.13 – Estrutura química do BSED.

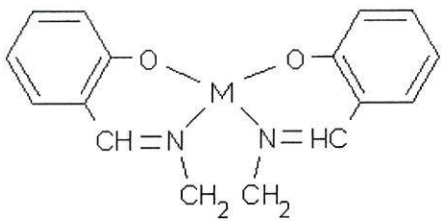



Fig.1. 14 – Estrutura química do complexo BSED-Metal.

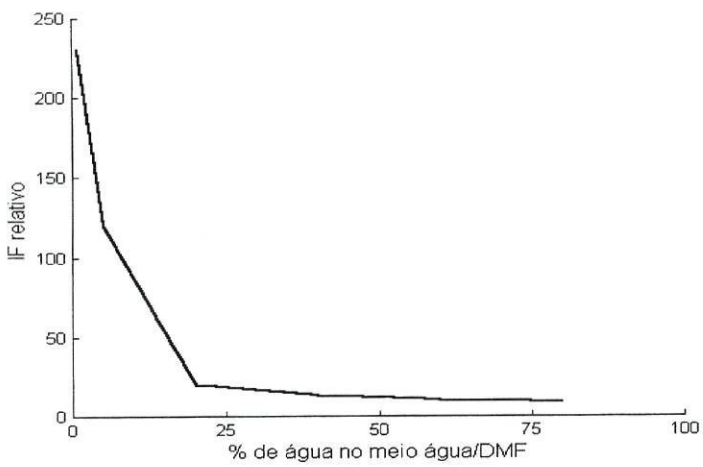



Fig. 1.15 – Extinção da IF com o aumento da quantidade de água no meio água/DMF (% em volume) para o sistema fluorescente BSED-$Mg^{2+}$. Adaptado de [31].

## 1.3.5 – **Ligando 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato de sódio**

O HOPSA foi introduzido nos sistemas fluorescentes devido às propriedades fluorescentes distintas quer da forma ácida (HOPSA, Fig. 1.16, no par (405;520)) quer da forma desprotonada ($OPSA^-$, Fig. 1.17, no par (470;520)), segundo o esquema [32]:

$$\begin{array}{ccc} HOPSA^* & \xleftrightarrow{pK_a=1,4} & H^+ + OPSA^{-*} \\ \updownarrow F_1 & & F_2 \updownarrow \\ HOPSA & \xleftrightarrow{pK_a=7,3} & H^+ + OPSA^- \end{array}$$

onde a espécie X* é a forma excitada, F1 é a fluorescência relativa à HPOSA completamente protonada e F2 à fluorescência da forma desprotonada. O facto de possuir duas constantes de acidez distintas (para o HOPSA o $pK_a$ = 7,3 e para o HOPSA excitado o $pK_a$ = 1,4), permite o uso desta substância para duas gamas distintas de valores de pH, 6,5 a 8,5 e 0,5 a 2,5, respectivamente, [32].

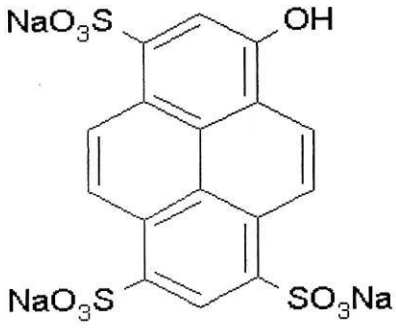



Fig. 1.16 – Estrutura química da HOPSA.

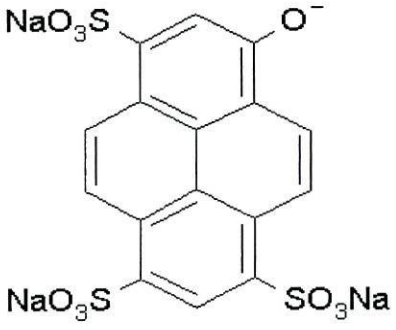



Fig. 1.17 – Estrutura química do HOPSA desprotonado, $OPSA^-$.

Zhujun [32] usa este sistema imobilizado num suporte sólido para monitorização do pH em fisiologia, atribuindo o par (Ex;Em) de (405;520) para a forma ácida ($F_1$ - embora a forma básico também seja excitada a este comprimento de onda) e (470;520) para a forma básica ($F_2$ - sendo esta energia bastante selectiva, a forma ácida não é excitada a 470 nm). No mesmo estudo é referida a grande dependência da IF com a temperatura (a IF decresce 1,1% por cada incremento de °C a 25°C e 1,7% a 35°C) e a força iónica, é natural que o pH (o antilogaritmo da actividade do $H^+$) nos valores de 7 (concentração próxima de $10^{-7}$ mol/L do catião $H^+$) seja muito influenciada pela presença, em grandes quantidades, de outros iões (Fig. 1.18).

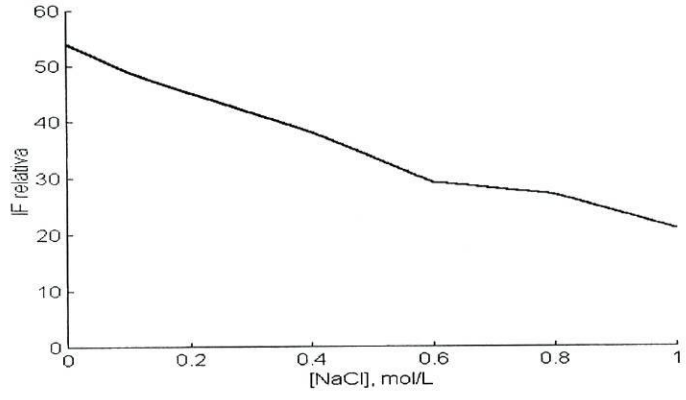



Fig. 1.18 – Efeito da adição de cloreto de sódio na IF no sistema HOPSA-H+ imobilizado. Adaptado de [32].

### 1.3.6 – **Ligando 5(6)-carboxinaftofluoresceína**

A CONF é um indicador fluorescente de pH para a zona neutra, $pK_a$ = 7,62 ± 0,003 [33], que usa baixas energias de fluorescência – indicador do vermelho-próximo. Em meio aquoso par (Ex;Em) onde se verifica o máximo de IF vai ser de (510;572) para a forma ácida (Fig. 1.19) e (602;670) para a forma desprotonada da CONF.

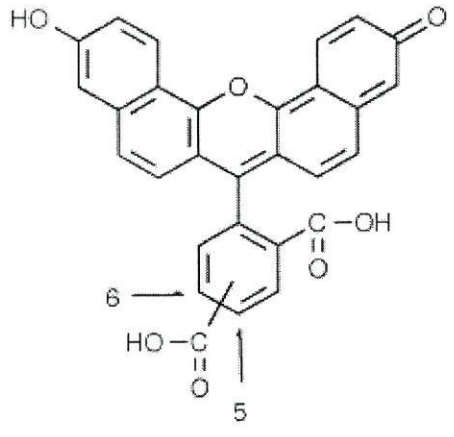



Fig. 1.19 – Estrutura química da CONF.

Song [34] usa o sistema CONF-$H^+$ imobilizado referindo linearidade e tempos de resposta curtos (de 1 a 400 ms) no intervalo estreito de valores pH entre 7-8, com uma precisão de ± 0,03 de pH em amostras fisiológicas como por exemplo no soro, embriões de rato ou tampões fisiológicos Earle e Tyrode.

## 1.4 – **Sensores ópticos de fluorescência - "optrodes"**

A necessidade de monitorizar quimicamente células e tecidos vivos, juntamente com a necessidade de ter respostas "instantâneas" em aplicações relacionadas com a medicina e mais recentemente a monitorização ambiental com equipamentos portáteis, levou, de 30 anos a esta parte, a um grande desenvolvimento das nanotecnologias. A electroquímica teve, nos denominados microeléctrodos, um forte desenvolvimento principalmente na últina década do século XX. Buhlmann [35] refere que em 1990 mais de 7000 artigos foram publicados sobre eléctrodos de iões-selectivos (ISEs – ion-selective electrodes). Os sensores químicos de fluorescência (optrode – do inglês **opt**ic elect**rode**) surgem na sequência dos ISEs com duas particularidades: é possível monitorizar analítos sem carga [35-38] e, como são fluorescentes, podem ser bastante

específicos. Por exemplo, Prodi [39] relata o uso de um derivado da 8-HQ o diaza-18-coroa-6 ligado a dois 5-cloro-8-hidroxiquinolina-7-ilo (CHQ) que forma um complexo com o $Mg^{2+}$ e com mais nenhum outro catião alcalino ou alcalino-terroso. Simultaneamente, os optrodes são sensíveis - Winkler [40] refere o uso de sistemas fluorescentes para catiões, com famílias de ligandos por exemplo da 8-HQ, tendo todos uma sensibilidade na ordem dos p.p.b..

Um optrode é, basicamente, uma membrana sólida constituída por um sensor químico de fluorescência que é imobilizado, normalmente, por um polímero. Esta membrana é, então, posta em contacto com a solução que contem o analíto e fazendo incidir radiação luminosa ($R_{Ex}$) sobre o conjunto, este irá emitir radiação ($R_{Em}$) a qual é canalizada para um detector. Devido ás reduzidas dimensões do optrode (na ordem das unidades ou poucas dezenas de μm) o transporte da luz é feito mediante fibras ópticas. Na Fig. 1.20 encontra-se um esquema simplificado do uso dos optrodes, adaptado, por exemplo, de Kurihara [41] ou Doong [42].

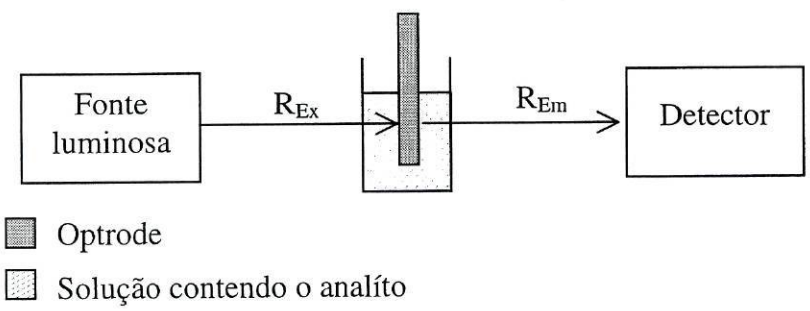



Fig. 1.20 – Esquema de montagem para um optrode. $R_{Ex}$ é a radiação de excitação e $R_{Em}$ a radiação de emissão.

## 1.4.1 – Deslocação da fluorescência para a região do infravermelho e selectividade para os catiões

O trabalho teve como principal ligando a 8-HQ por ser um agente complexante bastante geral - é o segundo maior agente de complexação depois do EDTA, cujos complexos são bastante insolúveis em água mas não o são em meios não aquosos, possuindo características fluorescentes [1,4,5,15,20,21,23,25,43-45], se bem que o seu derivado sulfonado, ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico, para além de formar com catiões complexos solúveis em água, apresente características fluorescentes na maioria desses complexos [1,24,27,28,46-48].

O facto da 8-HQ ser complexante para um grande número de catiões não é factor que abone em favor da selectividade para os catiões e, além disso, os complexos solúveis não são os mais indicados para estarem imobilizados numa membrana pois, no seu funcionamento, vão estar em contacto com soluções aquosas, o que facilita a transferência de sensor/complexo para o meio a monitorizar. Interessa, então, usar ou sintetizar derivados da 8-HQ insolúveis em água e o mais selectivos possíveis para os catiões - o ideal seria um derivado da 8-HQ para cada catião.

Inicialmente a estratégia parecia acoplar mais anéis aromáticos tendo como base um "núcleo" poderoso de complexação – a 8-HQ. As benzohidroxiquinolinas, obtidas através da condensação de Skraup [49] ou por qualquer outro mecanismo [50-55], parecem ser um forte candidato. O 4-acridinol (8-hidroxibenzo[b]quinolina se quisermos pôr o nome com evidencia para o "núcleo" 8-HQ, Fig. 1.21) forma, também, complexos com um grande número de catiões [56] e demonstra alguma selectividade. Forma complexos fluorescentes com os catiões $Mg^{2+}$ e $Zn^{2+}$ mas o complexo com o $Al^{3+}$ não é fluorescente mesmo em DMF [57]. Albert [53] demonstrou que a maioria dos complexos dos benzo substituídos da 8-HQ com catiões são solúveis em água, por exemplo a 5-hidroxibenzo[f]quinolina (Fig. 1.22), forma complexos solúveis com os catiões $Ca^{2+}$ e $Mg^{2+}$.

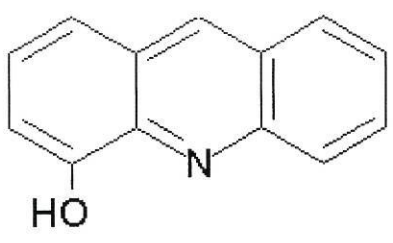



Fig. 1.21 – Estrutura química do 4-hidroxiacridina (4-acridinol).




Fig. 1.22 – Estrutura química da 5-hidroxbenzo[f]quinolina.

O acréscimo de um anel aromático faz com que o ligando adquira ou mantenha (a estrutura molecular continua a ser planar), por si só, as características fluorescentes e mesmo fosforescentes [58], a benzo[f]quinolina tem um máximo de IF no par (346;365) e fosforescência no par (349;504). Isto sugere que o aumento do número de anéis torna a dissipação de energia da molécula por outros mecanismos que não a fluorescência,

talvez a explicação para o facto do complexo 4-acridinol com o $Al^{3+}$ não ser fluorescente (a redução de energia foi tão drasticamente diminuída que o comprimento de onda de emissão associado deslocou-se para além do IV, acima de 900 nm).

Outro modo de promover este deslocamento e, simultaneamente, tentar conseguir maior selectividade, é acoplar radicais deixando o "nucleo" 8-HQ, ou derivados simples, disponível para a complexação. Diaz [59], no seu artigo de revisão das 1,10-antraquinonas, refere precisamente esta ideia mas usa a adição 8-HQ como radical auxiliar para tornar as antraquinonas mais selectivas. Winkler [40] descreve o mecanismo de obtenção da (a que o autor chamou de) merocianina, Fig. 1.23, a partir de um derivado da 8-HQ. Referiu, ainda, as propriedades complexantes e fluorigénicas da merocianina assim como a dos produtos intermediários.

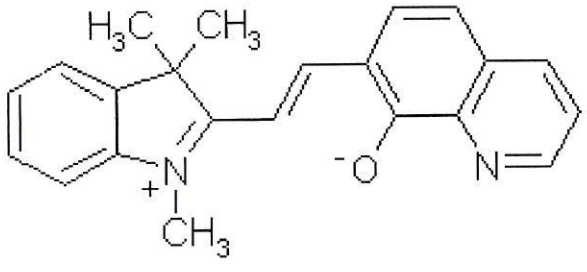



Fig. 1.23 – Estrutura química da merocianina [40].

Uma outra linha de investigação são as diaza-18-coroa-6 duplamente substituídas com derivados clorados da 8-HQ (Fig. 1.24 por exemplo). Para o catião $Mg^{2+}$ o ligando diaza-18-coroa-6 ligado a dois 5-cloro-8-hidroxiquinolina-7-ilo (CHQ) forma um complexo fluorescente e nenhum catião alcalino e alcalino-terrosos interfere neste sistema [39], embora forme complexos fluorescentes com o $Hg^{2+}$ [60]. Mas muitas outras diaza-18-coroas-6 ligadas estão em estudo [61,62] mostrando-se bastantes selectivas [63]. Metodologias analíticas, que usam estes compostos, encontram-se entre os métodos mais sensíveis [64].

A química dos corantes (indicadores de catiões) no infravermelho [65] é uma fonte de moléculas capazes de satisfazer estas exigências porque, selectivamente, complexão catiões cujos complexos participam em sistemas fluorescentes.

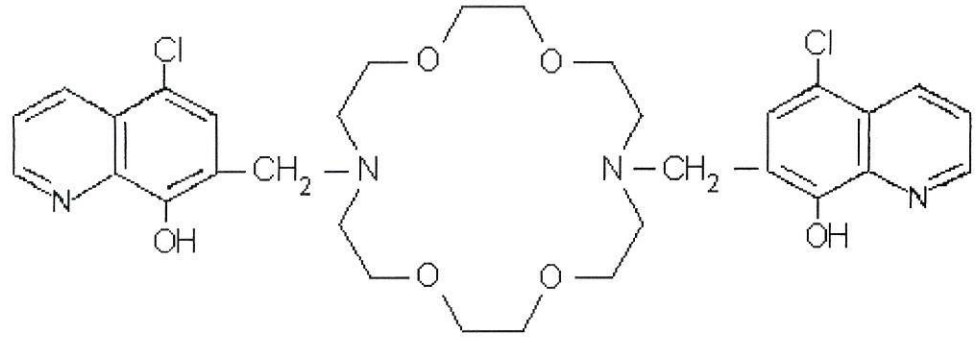



Fig. 1.24 – Estrutura química da diaza-18-coroa-6 ligada a dois 5-cloro-8-hidroxiquinolina-7-ilo.

## 1.4.2 - **Imobilização**

O facto de possuirmos sistemas ligando-catião fluorescentes não é condição suficiente para a construção do optrode, há ainda o problema da sua imobilização numa membrana mantendo a característica fluorescente.

A membrana é normalmente um polímero que aceita no seu seio o ligando, conferindo-lhe imobilidade (a quantidade de ligando não pode variar, passando para o meio a monitorizar) e, simultaneamente, acessibilidade ao analíto [66].

Os constituintes mais usados [36,37] têm sido o sol-gel [42,66,67], o XAD [66-68] e o PVC [63,70-72], se bem que quando se fala de PVC seja necessário referir que na composição aparece sempre um plastificante (dioctil sebacato, 2-nitrofenil octil éter ou 1-decanol, por exemplo) que altera substancialmente a mobilidade do analíto.

Qualquer uma das técnicas de imobilização passa, obrigatoriamente, por um modelo químico do fenómeno de transporte do analíto [67,73-75], modelo esse associado a teorias que ainda se encontram em permanente mudança.

## 1.5 – **Bibliografia**

Dos artigos (de revisão) que foi possível coleccionar o [35], [36] e [37] serão os mais sistemáticos na compilação do uso de optrodes.

[1] Guilbault, G. G., "Molecular fluorescence spectroscopy" *in*: Svehla, G., "Comprehensive analytical chemistry", 1977, vol. VIII, Elsevier Scientific Publishing Company, New York.

[2] CD informativo de produtos, Molecular Probes, Inc., 1997.

[3] Czarnik, A. W., Acc. Chem. Res., Vol. 27 nº10 (1994), 302-308.

[4] Ohnesorge, W. E., J. Inorg. Nucl. Chem., Vol. 29 (1967), 485-493.

[5] Ghasemi, J., Shamsipur, M., J. Coord. Chem., Vol. 26 (1992), 337-344.

[6] Katyal, M., Talanta, Vol. 15 (1968), 95-106.

[7] Gutierrez, A. C., Gehlen, M. H., Spectrochimica Acta A, 58 (2002), 83-89.

[8] Hernandez, F. H., Escriche, J. M., Analyst, Vol. 109 (1984), 1585-1588.

[9] Escriche, J. M., Hernandez, F. H., Analyst, Vol. 110 (1985), 287-290.

[10] Brownw, B. A., McColl, J. G., Driscoll, C. T., J. of Enviromental Quality, Vol. 19 nº1 (1990), 65-72.

[11] Buriel Martí *et al.*, "Química Analítica Cualitativa", 2000, Editorial Paraninfo, Madrid, Espana.

[12] Pavelka, F., "Microanalisi", 1954, volume 1, Firenze, Casa Editrice Del Dott. Carlo Cya.

[13] Irving, H., Butter, E. J., Ting, M. F., J. Chem. Soc., (1949), 1489-1498.

[14] Hollingshead, R. G. W., Analytical Chimica Acta, Vol.19 (1958), 447-457.

[15] Flagg, J. F., "Organic Reagents", 1948, Volume IV, Interscience Publishers, Inc., New York.

[16] Albert, A., Margrath, D., Biochem. J., Vol. 41 (1947), 534-454.

[17] Matsumura, K., J. A. Chem. Soc., Vol. 49 (1926), 810-819.

[18] Bardez, E., Devol, I., Larrey, B., Valeur, B., J. Phys. Chem., Vol. 101 (1997), 7786-7793.

[19] Mason, S. F., J. Chem. Soc., (1958), 674-685.

[20] Lytle, F. E., Storey, D. R. Juricich, M. E., Spectrochimica Acta, Vol. 29A (1973), 1357-1369.

[21] Stevens, H. M., Analytica Chimica Acta, Vol. 20 (1959), 389-396.

[22] Moeller, T., Cohen, A. J., Anal. Chem., Vol. 72 (1950), 3546-3548

[23] Stary, J., Analytica Chimica Acta, Vol. 28 (1963], 132-149.

[24] Soroka, K. *et al*, Anal. Chem., Vol. 59 (1987), 629-638.

[25] Schachter, D., The j. of Laboratory and Alinical Medicine, Vol. 54 (1959), 763-768.

[26] Hill, J. B., Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 102 (1962), 108-117.

[27] Klein, B, Oklander, M., Clinical Chemistry, Vol.13 nº1 (1967), 26-35.

[28] Schachter, D., The j. of Laboratory and Alinical Medicine, Vol. 58 (1961), 495-498.

[29] Freemen, D. C., White, C. E., J. A. Chem. Soc., Vol. 78 (1956), 2678-2682.

[30] Hobday, M. D., Smith, T. D., Coord. Chem. Ver., Vol. 9 (1972-1973), 311-337.

[31] White, C. E., Cuttitta, F., Anal. Chem., Vol. 31 n° 12 (1959), 2083-2087.

[32] Zhujun, Z., Seitz, W. R., Analytica Chimica Acta, Vol. 160 (1984), 47-55.

[33] Wolfbeis, O. S., Rodriguez, N. V., Werner, T., Mikrochim. Acta, Vol. 108 (1992), 133-141.

[34] Song, A., Parus, S., Kopelman, R., Anal. Chem., Vol. 69 (1997), 863-867.

[35] Buhlmann, P., Pretch, E., Bakker, E., Chem. Rev., Vol. 98 (1998), 1593-1687.

[36] Na página de Otto S. Wolfbeis - http://www-analytik.chemie.uni-regensburg.de/Wolfbeis/osw/papers/a.html" - encontram-se 107 artigos sobre a utilização de optrodes para catiões, aniões, moleculas como o oxigénio, dióxido de carbono, água (humidade) e a glucose, por exemplo.

[37] Janata, J., Josowicz, M., Anal. Chem., Vol. 70 (1998), 179R-208R.

[38] Leiner, M. J. P., Analytical Chimica Acta, Vol. 225 (1991), 209-222.

[39] Prodi, L., *et al*, Tetrahedron Letters, Vol. 39 (1998), 5451-5454.

[40] Winkler, J. D., Browen, C. M., Michelet, V., J. Am. Chem. Soc., Vol. 120 (1998), 3237-3242.

[41] Kurihara, K., *et al*, Analytical Sciences – The Japan Society for Analytical Chemistry, Vol. 17 (2001), i433-i436.

[42] Doong, R.-A., Tsai, H.-C., Analytica Chimica Acta, Vol. 434 (2001), 239-246.

[43] Feigl, F., Heisig, G. B., Analytica Chimica Acta, Vol. 3 (1949), 561-566.

[44] Bertino, R., Deacon, G. B., Miller, J. M., Aust. J. Chem., Vol. 31 (1978), 527-537.

[45] Kunkely, H., Vogler, A., J. of Photochemistry and Photobiology A, Vol. 144 (2001), 69-72.

[46] Slageren, R. V., Boef, G. D., Linden, W. E. V. D., Talanta, Vol. 20 (1973), 739-748.

[47] Bishop, J. A., Analytica Chimica Acta, Vol. 87 (1976), 255-257.

[48] Ryan, D. E., Pitts, A. E., Cassidy, R. M., Analytica Chimica Acta, Vol. 34 (1965), 491-494.

[49] Vogel, A., "Química Orgânica", 1984, Ao Livro Técnico S.A. – Indústria e Comercio, Rio de Janeiro, Brasil.

[50] Jensen, H., Rethwisch, F., J. Am. Chem. Soc., Vol. 50 (1928), 1144-1151.

[51] Barnum, E. R., Hamilton, C. S., J. Am. Chem. Soc., Vol. 64 (1942), 540-542.

[52] Matsumura, K., J. Am. Chem. Soc., Vol. 49 (1927), 810-519.

[53] Albert, A., Margrath, Biochem. J., Vol. 41 (1947), 534-545.

[54] Irving, H., Butler, E. J., Ring, M. F., J. Chem. Soc., (1949), 1489-1498.

[55] Haworth, R. D., Sykes, W. O., J. Chem. Soc., (1944), 311-315.

[56] Corsini, A., Billo, E. J., J. Inorg. Nucl. Chem., Vol. 32 (1970), 1249-1255.

[57] Bos, R., *et al*, Analytica Chimica Acta, Vol. 454 (2002), 147-155.

[58] Vo-Dinh, T., *et al*, Analytica Chimica Acta, Vol. 175 (1985), 181-188.

[59] Diaz, A. N., Talanta, Vol. 38 n°6 (1991), 571-588.

[60] Prodi, L., *et al*, J. Am. Chem. Soc., Vol. 122 (2000), 6769-6770.

[61] Zhang, X. X., *et al*, J. Am. Chem. Soc., Vol. 117 (1995), 11507-11511.

[62] Su, N., *et al*, J. Org. Chem., Vol. 64 (1999), 8855-8861.

[63] Lerchi, M., *Et al*, Anal. Chem., Vol. 64 (1992), 1534-1540.

[64] Das, A. K., Guardia, M. de la, Cervera, M. L., Talanta, Vol. 55 (2001), 1-28.

[65] Fabian, J., Chem. Rev., Vol. 92 (1992), 1197-1226.

[66] Oehme, I., Wolfbeis, O. S., Mikrochim. Acta, Vol. 126 (1997), 177-192.

[67] Spichiger-Keller, U. E.,"Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications", 1998, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weiheim.

[68] Mahendra, N., et al, Sensores and Actuators B, Vol. 81 (2002), 196-201.

[69] Abollino, O., Mentasti, E., Porta, V., Sarzanini, C., Anal. Chem., Vol. 62 (1990), 21-26.

[70] Morf, W. E., Seiler, K., Rusterholz, B., Simon, W., Anal. Chem., Vol. 62 (1990), 738-742.

[71] Zeng, H.-H., Wang, K.-M., Lin, C.-L., Yu, R.-Q., Talanta, Vol. 40 n°10 (1993), 1569-1573.

[72] Malins, C., *et al*, Sensors and Actuators B, Vol. 51 (1998), 359-367.

[73] Rurack, K., Spectrochimica Acta A, Vol. 57 (2001), 2161-2195.

[74] Janata, J., Analytical Chemistry, Vol.64 n° 19 (1992), 921A-927A.

[75] Schaffar, B. P. H., Wolfbeis, O. S., Analyst, Vol. 113 (1988), 693-697.

# 2 - **Procedimento experimental**

Neste capítulo está descrito todo o trabalho experimental dos diferentes sistemas fluorescentes. Todo o trabalho foi conduzido à temperatura ambiente, cerca de 25°C.

Os sistemas são nomeados pelo ligando (L) e catião ($M^{n+}$) que dão origem ao complexo fluorescente do tipo L-$M^{n+}$ (não significando que tenha número de coordenação 1, mas sim que forma um complexo com uma qualquer estequiometria como catião).

Descreve-se, também, quais os reagentes usados assim como o modo e condições de preparação das respectivas soluções.

O último tópico é a descrição das tentativas de imobilização dos ligandos em filmes de policloreto de vinilo.

## 2.1 - **Reagentes**

A lista dos reagentes utilizados tem a seguinte disposição das características: *Nome sistemático ou comum, abreviatura utilizada – Fabricante do reagente, qualidade e/ou grau de pureza* (normalmente em percentagem), *formula química* (sempre que é conhecida), *massa molecular.*

Acetato de amónio - Merck, p.a., $CH_3COONH_4$, 77,08 g/mol.

Acetato de sódio – Merck, p.a., $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, 136,08 mol/L.

Ácido acético – Merck, p.a., 100%, $CH_3COOH$, 60,05 g/mol.

Ácido sulfúrico comercial – Merck, p.a., 95-97%, $H_2SO_4$, 98,08 g/mol.

Água desionizada – obtida por permuta iónica em bateria de resinas mistas.

Alúmen de potássio - M&B, 99,5%, $Al_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 24H_2O$, 948,81 g/mol.

Amoníaco – Pronalab, 25%, $NH_3$, g/mol.

Bórax - M&B, 99,0%, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 381,37 g/mol.

BTC-5N – Molecular Probes, sal tetrapotássico, $C_{32}H_{22}K_4N_4O_{14}S$ (Fig.1.11), 875 g/mol.

5(6)-carboxinaftofluoresceína, **CONF** – Fluka, 90%, $C_{29}H_{16}O_7$ (Fig.1.19), 476,44 g/mol.

Clorofórmio – Merck, p.a., 99,0-99,4%, $CHCl_3$, 119,38 g/mol.

1-decanol, **$C_{10}$OH** – Flucka, 98,0%, $CH_3(CH_2)_9OH$, 158,29 g/mol.

Dihidrogenofosfato de potássio – Merck, p.a., $KH_2PO_4$, 136,09 g/mol.

Dioctil sebacato (Bis(2-ethylhexyl) Sebacate), **DOS** – Fluka, 97,0%, $C_{26}H_{50}O_4$, 426,69 g/mol.

Etanol absoluto – Merck, p.a., 99,8%, $C_2H_5OH$, 46,07 g/L.

Hidrogenofosfato de sódio – Merck, p.a., $Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$, 358,14 g/mol.

Hidrogenoftalato de potássio - Merck, p.a., $KC_8H_5O_4$, 204,22 g/mol.

Hidróxido de potássio – Merck, p.a., 85%, KOH, 56,11 g/mol.

8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato de sódio, **HOPSA** – Fluka, 95%, $C_{16}H_7Na_3O_{10}S_3$ (Fig.1.16), 524,38 g/mol.

8-hidroxiquinolina, **8-HQ** – Merck, p.a., $C_9H_6NOH$ (Fig.1.7), 145,16 g/mol.

Morin – Sigma, $C_{15}H_{10}O_7$ (Fig.1.3), 302,2 g/mol.

Nitrato de magnésio – Merck, p.a., 99,0%, $Mg(NO_3)\cdot 6H_2O$, 256,41 g/L.

Nitrato de potássio – Merck, p.a., 99,0%, $KNO_3$, 101,11 g/mol.

2-nitrofenil octil éter (1-nitro-2-octyloxybenzene), **NOE** – Flucka, 99,0%, $C_{14}H_{21}NO_3$, 215,33 g/mol.

N,N'-bis(salicilideno)etilenodiamina, **BSED** – Fluka, 99,0%, $C_{16}H_{16}N_2O_2$ (Fig.1.13), 268,31 g/mol.

N,N-dimetilformamida, **DMF** – Merck, 99,8%, $HCON(CH_3)_2$, 73,10 g/mol.

Solução Standard de zinco – Merck, para o uso em ICP, 1000mg/L em ácido nítrico (5%), embalagem de 100,0 mL.

Policloreto de vinil, **PVC** – Fluka, p.a., de grande peso molecular, $(-CH_2-CHCl-)_n$.

Tetrahidrofurano, **THF** – Merck, p. a., 99,5%, $C_4H_8O$, 72,11 g/mol.

## 2.2 - **Soluções**

**$Al_{aquoso}$** ($|Al^{3+}| = 1{,}112\times10^{-2}$ mol/L). Pesou-se 5,4397 g de alúmen e dissolveu-se numa solução preparada com 0,028 mL de ácido sulfúrico comercial e 50 mL de água desionizada. Transferiu-se para um balão volumétrico de 500,0 mL e completou-se o volume com água desionizada.

**$Al_{clorofórmio}$** ($|Al^{3+}| = 3{,}706\times10^{-2}$ mol/L). Pesou-se 17,58 g de alúmen de potássio e dissolveu-se em 1000 mL de água desionizada.

**BSED** (|BSED| = 0,1028 mol/L). Pesou-se 0,1393 g de BSED e dissolveu-se, num balão volumétrico de 5,00 mL, com DMF e perfez-se o volume final. Guardou-se a solução ao abrigo da luz.

**BTC-5N** (|BTC-5N| = $4,6x10^{-6}$ mol/L). Dissolveu-se o conteúdo de uma embalagem de BTC-5N sólido (1,0 mg) com solução de nitrato de potássio I = 0,1 mol/L, transferiu-se para um balão volumétrico de 250,0 mL e completou-se o volume com a mesma solução de nitrato.

**CONF** (|CONF| = $1,0x10^{-3}$ mol/L). Pesou-se 2,7 mg de CONF e dissolveu-se, num balão volumétrico de 5,00 mL, com cerca de 3,5 mL de DMF, perfez-se o restante volume com água desionizada. Guardou-se a solução ao abrigo da luz.

**$DMS_{1\%}$** - Para um balão de 500,0 mL mediu-se 5,00 mL de água desionizada e completou-se o restante volume com DMF.

**HOPSA** (|HOPSA| = $1,14x10^{-3}$ mol/L). Pesou-se 31,6 mg de HOPSA e dissolveu-se com água desionizada, transferiu-se para um balão volumétrico de 50,00 mL, perfez-se o restante volume. Guardou-se a solução ao abrigo da luz.

**$HQ_{etanol}$** (|8-HQ| = $1,8x10^{-2}$ mol/L). Preparou-se a solução pela dissolução de, aproximadamente, 0,15 g de 8-HQ em cerca de 3 mL de um total de 50,0 mL de etanol absoluto (medidos em balão volumétrico) num goblé. Adicionou-se 3,00 mL de solução tampão acetato a pH 6,5 e agitou-se. Juntou-se o restante volume de etanol absoluto (o que faltava para os 50,0 mL), acrescentou-se 7,70 mL de água desionizada e homogeneizou-se.

**$HQ_{CH_3COOH}$** (|8-HQ| = $1,378x10^{-1}$ mol/L). Pesou-se 2,0000 g de 8-HQ, dissolveu-se numa solução de 6,0 mL de ácido acético glacial e 50 mL de água desionizada. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água desionizada.

**$Mg_{água}$** ($|Mg^{2+}| = 9,900x10^{-2}$ mol/L). Pesou-se 1,2821 g de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e dissolveu-se, num balão volumétrico de 100,0 mL, com água desionizada e perfez-se o restante volume.

**$Mg_{DMF}$** ($|Mg^{2+}|$ = $1{,}001 \times 10^{-2}$ mol/L). Pesou-se 0,2579 g de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e dissolveu-se, num balão volumétrico de 100,0 mL, com DMF e perfez-se o restante volume.

**Morin** ($|morin|$ = $1{,}022 \times 10^{-4}$ mol/L). Pesou-se 0,01544 g de morin e 10,6 g de sulfato de sódio. Dissolveu-se com água desionizada e diluiu-se, num balão volumétrico, a um volume final de 500,0 mL.

**Nitrato de potássio** (I = 0,1 mol/L). Pesou-se 10,0 g de nitrato de potássio e diluiu-se a 1000 mL com água desionizada.

**Tampão acetato** ($|CH_3COO^-|_{total}$ = 2,0 mol/L, pH = 6,5). Pesou-se 68,0 g de acetato de sódio trihidratado e dissolveu-se em 250 mL de água desionizada, ajustou-se o pH, ao valor de 6,5 com algumas gotas de ácido acético glacial.

**Tampão borax** ($pH_{con.,\ 25°C,\ I\ =\ 0,1\ mol/L}$ = 9,043). Pesou-se 1,907 g de borax, condicionado sobre uma solução aquosa de açucar e sal, e 4,052 g de nitrato de potássio. Dissolveu-se e diluiu-se com água desionizada a 500,0 mL.

**Tampão dihidrogenofosfato** ($|KH_2PO_4|_{total}$ = 0,0100 mol/L, a diferentes valores de pH. Pesou-se 1,3624 g de dihidrogenofosfato de potássio e dissolveu-se em água desionizada. Transferiu-se para um balão volumétrico de 1,00 L e completou-se o volume.

Dividiu-se esta solução em nove partes e a cada uma das partes ajustou-se o pH aos valores de 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0. O ajuste foi feito com o aparelho de pH, recentemente calibrado, com uma solução, também recentemente preparada, de hidróxido de potássio cuja $|HO^-|$ era 4,3 mol/L.

**Tampão fosfato** ($pH_{con.,\ 25°C,\ I\ =\ 0,1\ mol/L}$ = 6,748). Pesou-se 1,6947 g de dihidrogenofosfato de potássio, condicionado a 110°C (pelo menos 24 horas), e 4,459 g de hidrogenofosfato de sódio. Dissolveu-se e diluiu-se com água desionizada a 500,0 mL.

**Tampão ftalato** ($pH_{con.,\ 25°C,\ I = 0,1\ mol/L}$ = 9,043). Pesou-se 5,057 g de hidrogenoftalato de potássio, condicionado a 110°C, e 2,523 g de nitrato de potássio. Dissolveu-se e diluiu-se com água desionizada a 500,0 mL.

**Tampão $NH_4^+/NH_3$**. Pesou-se 20,0 g de acetato de amónio e juntou-se 7,0 mL de amoníaco concentrado. Diluiu-se com água desionizada até a um volume final de 100 mL.

**$Zn_{aq}$** ($|Zn^{2+}| = 3,059x10^{-2}$ mol/L). Diluiu-se o conteúdo de uma ampola de 100,0 mL a um volume final, num balão volumétrico, de 200,0 mL com água desionizada.

## 2.3 - **Equipamento**

Espectrofotómetro de luminescência Perkin-Elmer LS50.

Medidor de pH Crison MicropH 20002.

Balança analítica Mettler Toledo AG245.

## 2.4 - **Software**

O manuseamento do PARAFAC e representação gráfica de todos os dados foram efectuado no programa MatLab R11, versão oficial, e a 5.3, versão para estudantes, da The Mathworks, Inc., 1999.

Para o ajuste do modelo a Gaussianas e hiperGaussianas usou-se a metodologia de regressão não linear Levenverg-Marquardt no programa SPSS 11.0.0.0 para Windows da SPSS Inc., 2001.

## 2.5 - **Controlo do pH**

A calibração do aparelho de pH foi feita diariamente com as soluções tampão de bórax (pH = 9,04), fosfato (pH = 6,75) e ftalato (pH = 3,88). A solução no interior do eléctrodo de trabalho, nitrato de potássio (I = 0,1 mol/L), foi substituída sempre que se inicia nova experiência.

Usou-se a relação de Nernst que relaciona a diferença de potencial (E em milivoltes, mV) do elemento de pilha, com o logaritmo decimal do inverso da

concentração do catião hidrogénio, pH, e a diferença de potencial padrão, $E^0$, do seguinte modo:

$$E = E^0 + s \cdot pH$$

onde s vale, para o catião $H^+$, 59,1 mV. Esta relação é linear sendo o $E^0$ a ordenada na origem e o s o declive.

## 2.6 – Descrição das experiências dos sistemas ligando-catião

### 2.6.1 - Sistema Morin-$Al^{3+}$

Diluiu-se a solução de $Al_{aquoso}$ 10 vezes com água desionizada ficando a solução, $Al_{10x}$, com uma $|Al^{3+}|_{total}$ de $1{,}112 \times 10^{-3}$ mol/L.

Colocou-se 50,0 mL de solução de morin num copo com agitação magnética e ajustou-se o pH. Sucessivamente retirou-se 2,500 mL, para a cuba do espectrofotómetro, adicionou-se o respectivo volume de solução de $Al_{10x}$ e obteve-se as $MEE^s$. A solução ficou em agitação o tempo correspondente à obtenção das $MEE^s$, tempo considerado suficiente para a formação do complexo.

Na Tabela 2.1 estão descritas as concentrações e volumes utilizados para obter um conjunto de $MEE^s$ para os diferentes valores de pH usados (3,0, 4,0, 5,0, 6,1 e 7,1).

Tabela 2.1 – Volumes de solução de $Al_{aquoso}$ diluída 10 vezes, $Al_{10x}$, adicionados à solução de morin, existente no copo, com o pH ajustado e respectivas concentrações.

| Ensaio | Volume de $Al_{10x}$ adicionado, mL | Volume total no copo, mL | $\|Al^{3+}\|_{total}$ mol/L | $\|morin\|_{total}$ mol/L |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,000 | 50,000 | 0,00 | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 1 | 0,005 | 47,505 | $1{,}17 \times 10^{-7}$ | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 2 | 0,006 | 45,011 | $2{,}65 \times 10^{-7}$ | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 3 | 0,009 | 42,520 | $5{,}00 \times 10^{-7}$ | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 4 | 0,009 | 40,029 | $7{,}50 \times 10^{-7}$ | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 5 | 0,010 | 37,539 | $1{,}05 \times 10^{-6}$ | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 6 | 0,045 | 35,084 | $2{,}47 \times 10^{-6}$ | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 7 | 0,075 | 32,659 | $5{,}02 \times 10^{-6}$ | $1{,}03 \times 10^{-4}$ |
| 8 | 0,075 | 30,234 | $7{,}76 \times 10^{-6}$ | $1{,}02 \times 10^{-4}$ |

**Condições de funcionamento do espectrofotómetro de luminescência.**

Varrimento de emissão – 400,0 a 600,0 nm com resolução de 0,5 nm; varrimento de excitação – 200 a 480 nm com resolução de 20 nm; abertura da fenda do monocromador de excitação – 10,0 nm e de emissão – 15,0 nm; velocidade de varrimento – 400.

## 2.6.2 - Sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$

Diluiu-se a solução de $Zn_{aq}$ 40 vezes com água desionizada ($Zn_{40x}$, $|Zn^{2+}|_{total}$ = $7{,}765x10^{-4}$ mol/L).

Colocou-se 40,0 mL de solução de BTC-5N num copo com agitação magnética e ajustou-se o pH. Sucessivamente retirou-se 2,300 mL para a cuba do espectrofotómetro, adicionou-se o respectivo volume de solução de $Zn_{40x}$ e obteve-se as $MEE^s$. A solução ficou em agitação o tempo correspondente à obtenção das $MEE^s$, tempo considerado suficiente para a formação do complexo.

Na Tabela 2.2 estão descritas as concentrações e os volumes utilizados para obter um conjunto de $MEE^s$ para os diferentes valores de pH usados (4,0, 5,0, 6,1 e 7,1).

Tabela 2.2 – Volumes de solução de $Zn_{aq}$ diluída 40 vezes, $Zn_{40x}$, adicionado à solução de BTC-5N, existente no copo, com o pH ajustado e respectivas concentrações.

| Ensaio | Volume de $Zn_{40x}$ adicionado, mL | Volume total no copo, mL | $\|Zn^{2+}\|_{total}$ mol/L | $\|BTC\text{-}5N\|_{total}$ mol/L |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,000 | 40,000 | 0,00 | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 1 | 0,005 | 37,705 | $1{,}11x10^{-7}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 2 | 0,005 | 35,410 | $2{,}30x10^{-7}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 3 | 0,005 | 33,115 | $3{,}57x10^{-7}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 4 | 0,005 | 30,820 | $4{,}93x10^{-7}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 5 | 0,005 | 28,525 | $6{,}40x10^{-7}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 6 | 0,005 | 26,230 | $8{,}00x10^{-7}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 7 | 0,006 | 23,936 | $1{,}01x10^{-6}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |
| 8 | 0,020 | 21,656 | $1{,}78x10^{-6}$ | $4{,}6x10^{-6}$ |

**Condições de funcionamento do espectrofotómetro de luminescência.**

Varrimento de emissão – 400,0 a 600,0 nm com resolução de 0,5 nm; varrimento de excitação – 300 a 500 nm com resolução de 10 nm; abertura da fenda do monocromador de excitação – 10,0 nm e de emissão – 15,0 nm; velocidade de varrimento – 600.

## 2.6.3 - **Sistema 8-HQ-$Al^{3+}$**

Procedeu-se a sucessivas diluições da solução de $Al_{clorofórmio}$ com água desionizada de modo a obter as concentrações descritas da Tabela 2.3.

Em frascos, com fecho hermético de 25 mL de capacidade, foram colocados 10,0 mL de solução $Al_{clorofórmio}$ diluída à respectiva concentração, adicionou-se 0,100 mL de solução tampão $NH_3/NH_4^+$ e 0,100 mL de $HQ_{CH_3COOH}$ a cada frasco e agitou-se. Deixou-se em repouso cerca de 5 minutos. Adicionou-se a esta solução 10,0 mL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente e deixou-se a repousar durante 15 minutos, ao fim dos quais se obtiveram as respectivas $MEE^s$ com cerca de 3 mL desta fase orgânica.

Tabela 2.3 – Concentrações de $Al^{3+}$ total, usadas para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$, na fase aquosa. após a mistura de 10,0 mL de $Al_{clorofórmio}$ com as diferentes concentrações com 0,100 mL de tampão $NH_3/NH_4^+$ e 0,100 mL de $HQ_{CH_3COOH}$. Todos os ensaios a $|8\text{-}HQ|_{total}$ foi de $1{,}35\times10^{-3}$ mol/L.

| ensaio | $\lvert Al^{3+}\rvert_{total}$, mol/L | ensaio | $\lvert Al^{3+}\rvert_{total}$, mol/L |
|---|---|---|---|
| branco | 0,00 | i | $9{,}80\times10^{-6}$ |
| a | $9{,}80\times10^{-8}$ | j | $2{,}45\times10^{-5}$ |
| b | $2{,}45\times10^{-7}$ | k | $4{,}90\times10^{-5}$ |
| c | $4{,}90\times10^{-7}$ | l | $7{,}35\times10^{-5}$ |
| d | $7{,}35\times10^{-7}$ | m | $9{,}80\times10^{-5}$ |
| e | $9{,}80\times10^{-7}$ | n | $2{,}45\times10^{-4}$ |
| f | $2{,}45\times10^{-6}$ | o | $4{,}90\times10^{-4}$ |
| g | $4{,}90\times10^{-6}$ | p | $7{,}35\times10^{-4}$ |
| h | $7{,}35\times10^{-6}$ | q | $9{,}80\times10^{-4}$ |

**Condições de funcionamento do espectrofotómetro de luminescência.**

Varrimento de emissão – 400,0 a 600,0 nm com resolução de 0,5 nm; varrimento de excitação – 260 a 500 nm com resolução de 20 nm; abertura da fenda do monocromador de excitação – 15,0 nm e de emissão – 15,0 nm; velocidade de varrimento – 400.

## 2.6.4 - **Sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$**

As soluções alcoólicas de $HQ_{etanol}$ foram preparadas diariamente, Tabela 2.4. Com a solução de $Mg_{água}$ procedeu-se a sucessivas diluições com água desionizada de modo a obter a gama de concentrações descritas na Tabela 2.5.

Para um frasco com rolha mediu-se 3,90 mL de $HQ_{etanol}$ e adicionou-se 0,100 ml de solução diluída de $Mg_{água}$ a diferentes concentrações, agitou-se, transferiu-se a solução para a cuba do espectrofotómetro e obteve-se as $MEE^s$. O tempo de contacto entre o ligando e o catião foi de cerca de 15 minutos antes de ser introduzido na cuba.

Tabela 2.4 – Quantidades de 8-HQ usadas nas três repetições dos ensaios para o sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$.

| Repetição | Massa de 8-HQ, g | $\|8\text{-HQ}\|_{total}$, na solução de $HQ_{etanol}$, mol/L |
|---|---|---|
| 1ª | 0,1538 | 0,018 |
| 2ª | 0,1535 | 0,018 |
| 3ª | 0,1539 | 0,018 |

Tabela 2.5 – Concentrações de magnésio usadas para o sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$ após a mistura de 3,90 mL de $HQ_{etanol}$ com 0,100 mL de $Mg_{água}$ a diferentes diluições. Todos os ensaios a $\|8\text{-HQ}\|_{total}$ foi de $1{,}8\times10^{-2}$ mol/L.

| Ensaio | $\|Mg^{2+}\|_{total}$, mol/L | ensaio | $\|Mg^{2+}\|_{total}$, mol/L |
|---|---|---|---|
| branco | 0,00 | g | $1{,}3\times10^{-4}$ |
| a | $2{,}5\times10^{-6}$ | h | $1{,}9\times10^{-4}$ |
| b | $6{,}3\times10^{-6}$ | I | $2{,}5\times10^{-4}$ |
| c | $1{,}3\times10^{-5}$ | J | $6{,}3\times10^{-4}$ |
| d | $1{,}9\times10^{-5}$ | k | $1{,}3\times10^{-3}$ |
| e | $2{,}5\times10^{-5}$ | l | $1{,}9\times10^{-3}$ |
| f | $6{,}3\times10^{-5}$ | m | $2{,}5\times10^{-3}$ |

**Condições de funcionamento do espectrofotómetro de luminescência.**

Varrimento de emissão – 450,0 a 600,0 nm com resolução de 0,5 nm; varrimento de excitação – 360 a 460 nm com resolução de 10 nm; abertura da fenda do monocromador de excitação – 15,0 nm e de emissão – 15,0 nm; velocidade de varrimento – 400.

## 2.6.5 - **Sistema BSED-$Mg^{2+}$**

Todo o material utilizado nesta experiência, para além de ter sido lavado e seco como o habitual, foi emerso, durante um dia, e, posteriormente, passado com DMF.

Em balões volumétricos de 5,00 mL, diluiu-se a solução de $Mg_{DMS}$ com $DMS_{1\%}$ de modo a obter-se as concentrações de catião magnésio descritas na Tabela 2.6.

A cada um dos balões adicionou-se 0,100 mL de BSED, agitou-se, transferiu-se a solução para a cuba e obteve-se as $MEE^s$. O tempo de contacto, entre o ligando e o catião, foi de cerca de 15 minutos, antes de introduzir a solução na cuba.

Tabela 2.6 – Concentrações de $Mg^{2+}$ totais, usadas para o sistema BSED-$Mg^{2+}$, após a adição de 0,100 mL de BSED aos 5,00 mL de solução diluída de magnésio. Todos os ensaios a $[BSED]_{total}$ foi de $1{,}02\times10^{-3}$ mol/L.

| ensaio | $[Mg^{2+}]_{total}$, mol/L | ensaio | $[Mg^{2+}]_{total}$, mol/L |
|---|---|---|---|
| branco | 0,00 | g | $9{,}80\times10^{-6}$ |
| a | $9{,}80\times10^{-9}$ | h | $4{,}90\times10^{-5}$ |
| b | $4{,}90\times10^{-8}$ | I | $9{,}80\times10^{-5}$ |
| c | $9{,}80\times10^{-8}$ | J | $4{,}90\times10^{-4}$ |
| d | $4{,}90\times10^{-7}$ | k | $9{,}80\times10^{-4}$ |
| e | $9{,}80\times10^{-7}$ | l | $4{,}90\times10^{-3}$ |
| f | $4{,}90\times10^{-6}$ | | |

**Condições de funcionamento do espectrofotómetro de luminescência.**

Varrimento de emissão – 360,0 a 540,0 nm com resolução de 0,5 nm; varrimento de excitação – 200 a 425 nm com resolução de 15 nm; abertura da fenda do monocromador de excitação – 15,0 nm e de emissão – 15,0 nm; velocidade de varrimento – 400.

### 2.6.6 - **Sistema HOPSA-$H^+$**

Usou-se 4,00 mL de solução tampão dihidrogenofosfato de potássio aos diferentes valores de pH (5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0), adicionou-se 0,100 mL de solução de HOPSA. Agitou-se e transferiu-se para a cuba do espectrofotómetro e obteve-se as $MEE^s$. O tempo de contacto entre o ligando e o catião foi o tempo necessário à obtenção da MEE.

**Condições de funcionamento do espectrofotómetro de luminescência.**

Varrimento de emissão – 430,0 a 630,0 nm com resolução de 0,5 nm; varrimento de excitação – 350 a 550 nm com resolução de 10 nm; abertura da fenda do monocromador de excitação - 2,5 nm e de emissão - 2,5 nm; velocidade de varrimento – 400.

### 2.6.7 - **Sistema CONF-$H^+$**

Usou-se 4,00 mL de solução tampão dihidrogenofosfato de potássio aos diferentes valores de pH (5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0), adicionou-se 0,100 mL de solução de CONF. Agitou-se e transferiu-se para a cuba do espectrofotómetro e obteve-se as $MEE^s$. O tempo de contacto entre o ligando e o catião foi o tempo necessário à obtenção da MEE.

**Condições de funcionamento do espectrofotómetro de luminescência.**

Varrimento de emissão – 500,0 a 800,0 nm com resolução de 0,5 nm; varrimento de excitação – 500 a 700 nm com resolução de 20 nm; abertura da fenda do monocromador de excitação - 15,0 nm e de emissão - 20,0 nm; velocidade de varrimento – 400.

## 2.7 – **Imobilização de sensores químicos**

### 2.7.1 – **8-HQ em filme de PVC**

Para um tubo eppendorf de 2,0 mL pesou-se 34 mg de PVC e dissolveu-se com 1,2 mL de THF. Para outro eppendorf pesou-se 5,0 mg de 8-HQ e dissolveu-se em 7,2 mg de solvente plastificante. Homogeneizou-se muito bem as duas soluções, principalmente a de PVC para que não ficassem grumos, e misturou-se estas duas soluções.

Sobre uma lamela de vidro (1,5x1,5 cm) espalhou-se a mistura final, de modo a que ficasse uma camada uniforme. Protegeu-se a lamela com um goblé invertido, para evitar a rápida evaporação do THF. Deixou-se a o filme secar durante 1 dia.

Usou-se 3 solventes plastificantes diferentes: o DOS, o NOE e o $C_{10}OH$.

O filme foi então hidratado com água desionizada (correspondendo à concentração nula de catião) e, posteriormente, mergulhou-se em soluções aquosas contendo o catião alumínio a diferentes concentrações. A leitura da fluorescência foi realizada sobre o suporte de filmes do espectrofotómetro de luminescência.

### 2.7.2 – **HOPSA em filme de PVC**

Para um tubo eppendorf de 2,0 mL pesou-se 90 mg de PVC e dissolveu-se com 1,0 mL de THF. Para outro eppendorf pesou-se 1,9 mg de HOPSA e dissolveu-se em 6 gotas de DOS. Homogeneizou-se muito bem as duas soluções, principalmente a de PVC para que não ficassem grumos, e misturou-se as duas soluções.

Sobre uma caixa de petri (diâmetro de 2 cm) verteu-se a mistura final, de modo a que ficasse uma camada uniforme. Protegeu-se a caixa de petri com um goblé invertido, para evitar a rápida evaporação do THF. Deixou-se a o filme secar durante 1 dia.

### 2.7.3 – **CONF em filme de PVC**

Para um tubo eppendorf de 2,0 mL pesou-se 91 mg de PVC e dissolveu-se com 1,0 mL de THF. Para outro eppendorf pesou-se 1,9 mg de HOPSA e dissolveu-se em 6 gotas de DOS. Homogeneizou-se muito bem as duas soluções, principalmente a de PVC para que não ficassem grumos, e misturou-se as duas soluções.

Sobre uma caixa de petri (diâmetro de 2 cm) verteu-se a mistura final, de modo a que ficasse uma camada uniforme. Protegeu-se a caixa de petri com um goblé invertido, para evitar a rápida evaporação do THF. Deixou-se a o filme secar durante 1 dia.

# 3 - Modelação

Neste capítulo são apresentadas algumas considerações para tentar compreender e elucidar o funcionamento dos sistemas químicos e suas propriedades de fluorescência sob o ponto de vista matemático, cuja característica mensurável é a intensidade de fluorescência, IF.

Esta IF é função da energia radiante a que a cuba está a ser sujeita, comprimento de onda de excitação (Ex, expressa em nanómetros, nm), e da energia radiante que o sistema dentro da cuba é capaz de emitir, comprimento de onda de emissão (Em, também em nanómetros). No equipamento de fluorescência utilizado o valor da IF é relativo visto ser a quantidade de luz (energia) detectada que é comparada com a quantidade de luz medida, por um sistema paralelo com os mesmos valores de Ex e Em. Este sistema contem Rodamina B que tem um rendimento quântico de fluorescência alto para todos os comprimentos de onda.

As variáveis Ex e Em são internas do equipamento e todas as restantes variáveis, por exemplo a concentração de uma determinada espécie química, $[\text{espécie química}]_{\text{condições}}$, são externas porque é necessário mudar fisicamente a solução no interior da cuba.

É usado como exemplo, ao longo de toda a exposição, o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$, visto conter um elevado número de particularidades frequentes nos sistemas fluorescentes. Os dados deste sistema resultam da média de três determinações.

## 3.1 - A ordem de aquisição dos dados

A capacidade de um sistema apresentar fluorescência depende do Ex a que está sujeito e do Em que o detector está a ler. Como tal, é frequente seleccionar o par de comprimentos de onda de excitação e emissão (Ex;Em) onde a IF é máxima e proceder à sua colecção ao longo da variação de uma variável externa.

Este tipo de registos denominam-se de **dados de ordem zero**, (zero é o número de variáveis internas de que o referido registo não depende). A quantidade de

informação contida nos dados é pequena e obriga a uma grande quantidade de informação descritiva das condições de aquisição.

A maioria dos tratamentos de dados nos métodos instrumentais de análise baseiam-se na colecção de **dados de ordem zero** em função de uma outra variável externa ao equipamento. É fácil a sua visualização/compreensão e, como tal, existe uma matemática bastante desenvolvida para a sua manipulação, assim como a estatística associada. São exemplo disto as calibrações para análise quantitativa com os estudos de repetibilidade, reprodutibilidade, limites de detecção, linearizações, etc.

No sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ pode escolher-se um par (Ex = 400 nm; Em = 480 nm) (usaremos simplesmente (400;480)) e para uma concentração total do catião Alumínio, $[Al^{3+}]_{total}$, de $2{,}45x10^{-5}$ mol/L obtém-se o valor da IF de 505,785 unidades relativas de intensidade de fluorescência - a IF é um escalar.

Os espectrofotómetros de luminescência permitem gerar IF ao longo de uma gama de Ex, espectros de excitação, ou Em, espectros de emissão (Fig. 3.1). A este tipo de informação, em função de uma variável interna do equipamento, denomina-se de **dados de primeira ordem**.

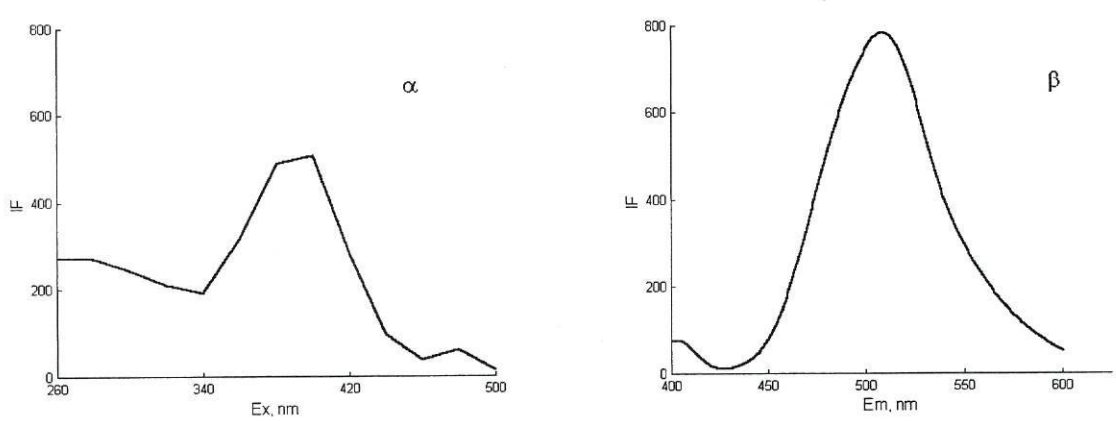



Fig. 3.1 – Representação dos espectros para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$, com uma $[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45x10^{-5}$ mol/L e pH = 5,6. Espectro de excitação ao Em = 480 nm, α, e espectro de emissão a Ex = 400 nm, β. O aspecto mais arredondado do espectro de emissão deve-se à resolução (0,5 nm) contra uma baixa resolução do espectro de excitação (20 nm).

Temos, agora, não um escalar mas um conjunto de escalares (vector) que relaciona univocamente os diferentes valores de IF com a gama de Ex ou Em de aquisição. Na figura Fig. 3.2 está a relação das IF com os valores de Em – espectro de emissão.

$$\begin{bmatrix} Em_1 \\ Em_2 \\ Em_3 \\ Em_4 \\ \dots \\ Em_{i-1} \\ Em_i \end{bmatrix} \Rightarrow \begin{bmatrix} IF_1 \\ IF_2 \\ IF_3 \\ IF_4 \\ \dots \\ IF_{i-1} \\ IF_i \end{bmatrix}$$

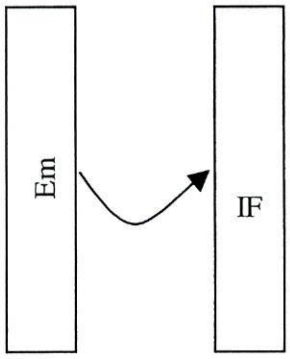



Fig. 3.2 – Representação vectorial da relação do vector dos dados IF com o vector Em que lhe deu origem (esquerda) e esquema simplificado (direita).

No entanto, visto ser possível coleccionar espectros de emissão para diferentes valores de Ex ou espectros de excitação variando o Em. Pode-se, pois, coleccionar vectores de IF fazendo variar a outra dimensão interna do equipamento, dando originem a matrizes de registos que se denominam **dados de segunda ordem**.

IF de segunda ordem é denominada matriz de excitação/emissão, MEE, visto depender das variáveis internas Ex e Em (Fig. 3.3). Na Fig. 3.4 encontra-se a relação da MEE com os respectivos vectores associados.

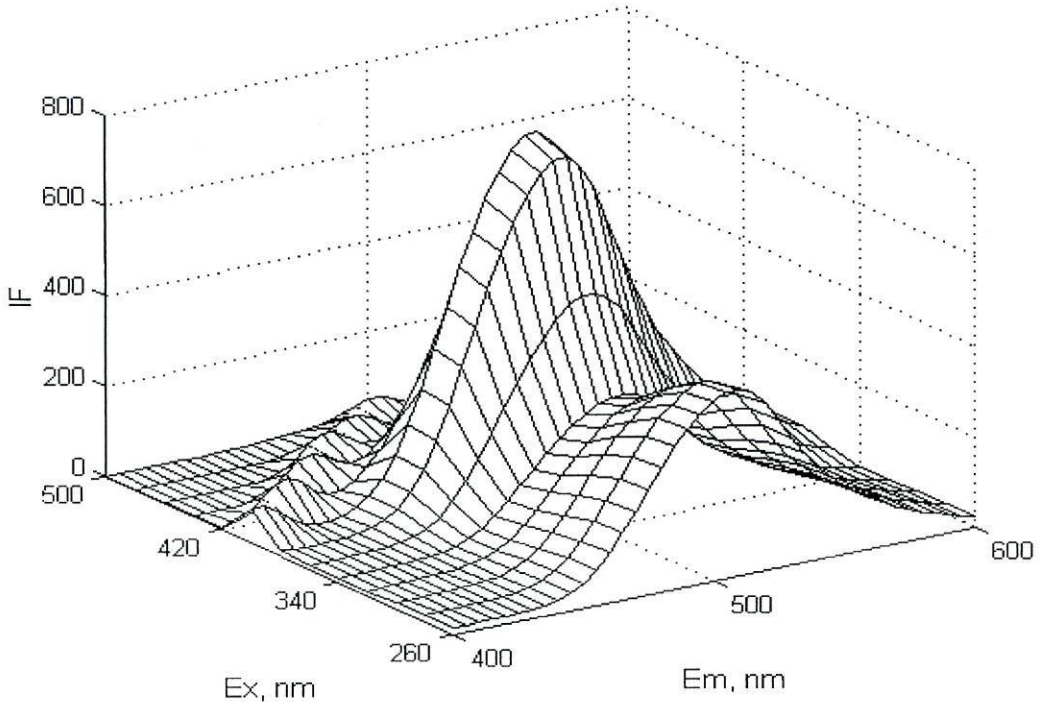



Fig. 3.3 – Representação tridimensional da MEE para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$, com uma $[Al^{3+}]_{total}$, na fase aquosa, de $2{,}45 \times 10^{-5}$ mol/L e pH = 5,6.

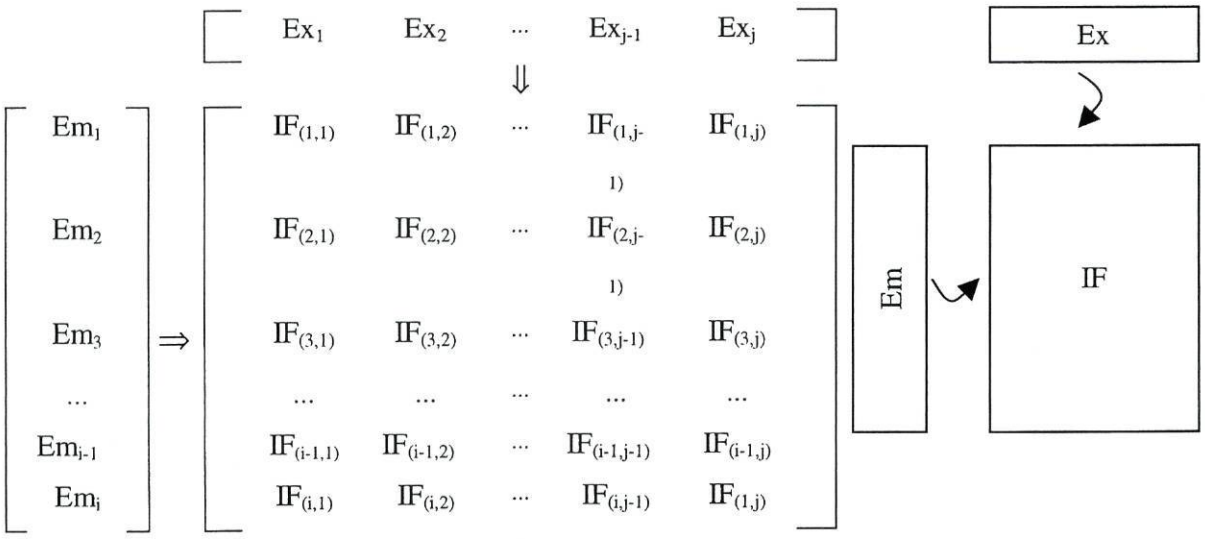



Fig. 3.4 – Representação vectorial da relação da matriz dos dados IF com os vectores Em e Ex que lhe deram origem (esquerda) e esquema simplificado (direita).

A quantidade de informação é significativamente maior, podendo-se observar o comportamento da resposta IF numa vasta área do plano (Ex,Em), para posterior interpretação dos possíveis fenómenos (sejam de natureza fluorescente ou não).

Mas a incorporação de informação nos dados registados arrasta consigo algumas desvantagens, sendo a principal a própria quantidade de informação – passou-se de um registo nos **dados de ordem zero** para 13 ou 401 registos nos espectros de excitação ou de emissão, respectivamente (Fig. 3.1) para 5213 $IF^s$ na MEE (Fig. 3.3). Embora se contorne este problema com o armazenamento via computador pessoal, não deixa de se ter que manipular uma grande quantidade de informação.

Um segundo problema prende-se à nossa capacidade de percepção espacial, a IF é a terceira dimensão quando se varre as dimensões Ex e Em. Basta introduzir uma variável externa (concentração de um dos analitos, por exemplo) para ser necessário ter uma quarta dimensão para poder representar as $MEE^s$ ao longo da variável concentração do analíto (Fig. 3.5, que contém 93834 registos de IF); a colecção de $MEE^s$ numa outra variável chama-se cubo de dados (Fig. 3.6). Pode-se imaginar as n variáveis externas possíveis de variar no sistema para que a resposta IF seja a n + 2 + 1 ésima dimensão, um hipercubo de informação.

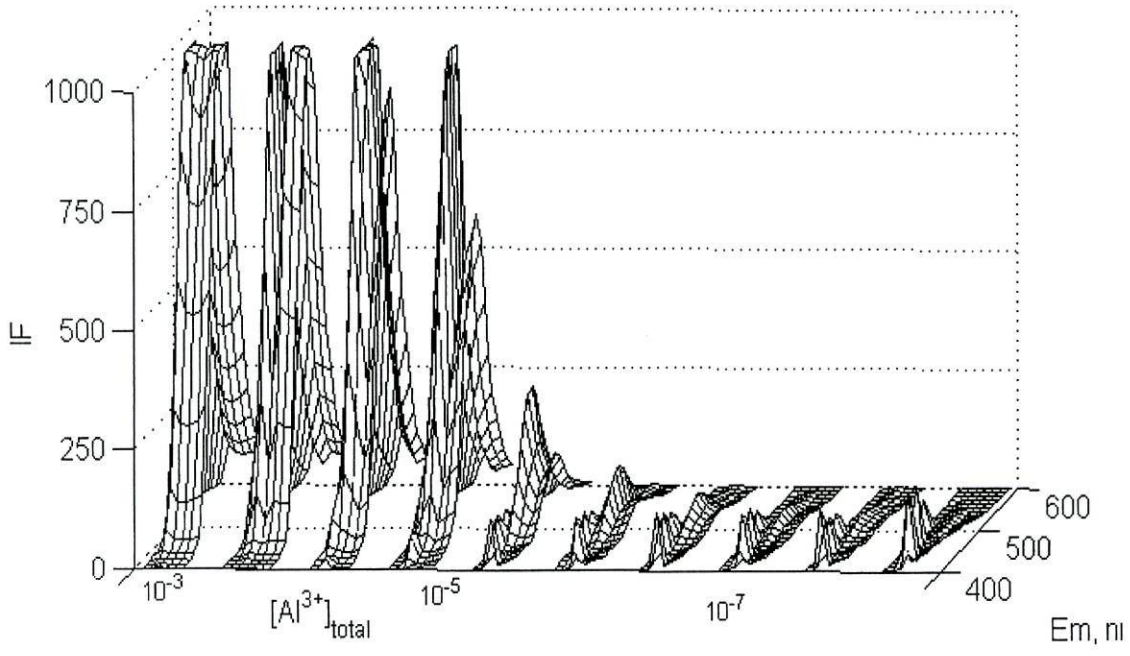



Fig. 3.5 – Representação 4D do cubo das MEE[s] para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ na fase orgânica quando o pH na fase aquosa é de 5,6. Apenas se representou metade das MEE[s], a primeira com $[Al^{3+}]_{total}$ mais alta(18ª), depois a 17ª, 16ª, 15ª, ..., e 1ª concentração de $Al^{3+}$.

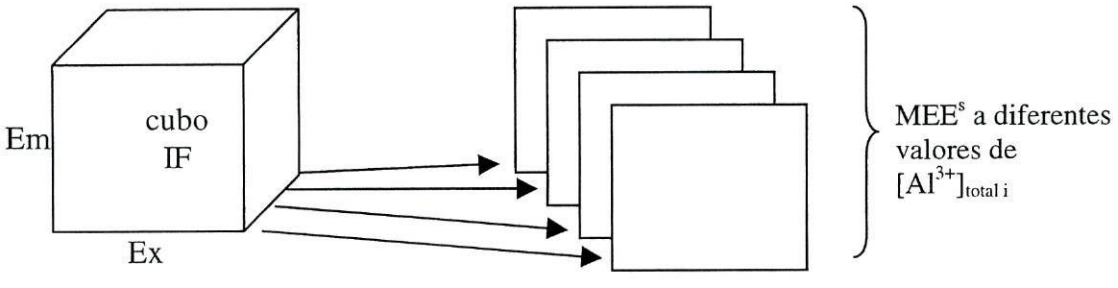



Fig. 3.6 – Esquema da colecção de MEE para a obtenção de um cubo de informação.

## 3.2 - **Perfil de concentração**

A variável externa de maior interesse, neste trabalho, é a concentração total (total porque é fácil o seu conhecimento) de uma das espécies químicas, o catião, que, supostamente, forma um complexo com um ligando em que o ligando e/ou complexo tem propriedades fluorescentes. Em última análise pretende-se obter perfis de concentração ou seja determinar a variação da IF (ou uma relação matemática qualquer de IF) com a variação da concentração total do catião.

Teoricamente a resposta IF pode ser vista como o somatório de todos os fenómenos que de algum modo contribuem para o valor observado, não necessariamente fluorescência. Explicitamente IF fica:

$$IF = \sum_{i=1}^{n} if_i \qquad [3.1]$$

onde $if_i$ são as n intensidades de fluorescência individuais, com escalas, natureza e interacções diferentes, dos i fenómenos, cuja contribuição, positiva ("enhancement") ou negativa ("quenching"), resulta na IF. Idealiza-se a $if_i$ como sendo uma resposta pura, ou seja, é da responsabilidade de um único fenómeno como se todos os restantes pudessem ser anulados, mantidos constantes.

Para o caso de quenching a if vai ter uma intensidade constante ao longo do aumento do factor que o inibe, $C_A$, até que a sua presença comece a fazer-se sentir (denominada de limite mínimo de detecção). Decresce com o aumento de $C_A$, até que a quantidade deste seja tal que o decréscimo cessa dando lugar, novamente, a um outro patamar constante da if (denominada de limite máximo de detecção) (Fig. 3.7 – $if_1$). No caso do factor ser um promotor da if, enhancement, o resultado é idêntico mas obtém-se um incremento da if com o aumento de $C_A$ (Fig. 3.7 – $if_2$ e $if_3$). Se a IF apenas depender destes três fenómenos, então o resultado que se observa é a curva IF da Fig. 3.7.

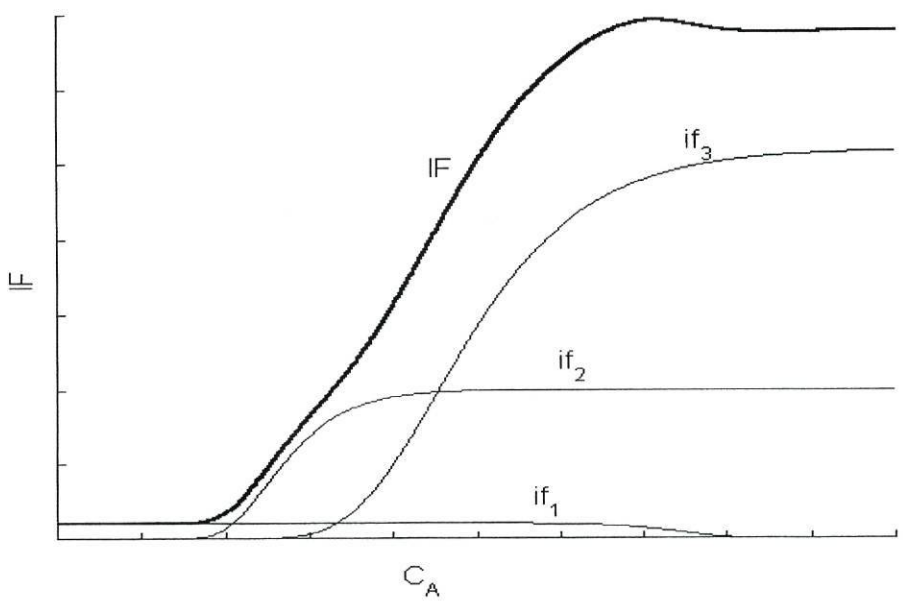



Fig. 3.7 – Representação da resposta ideal IF obtida pela eq[3.1], para um determinado par (Ex;Em), em função da concentração total da espécie química A, $C_A$.

O conhecimento dos perfis de concentração ideais, $if_i$, permitiriam o conhecimento das constantes químicas associadas ao fenómeno, assim como posterior calibrações do sistema mesmo em condições adversas de interacções dos diferentes $if_i^s$. Em oposição, perfis de concentração em função de IF apenas permitem calcular constantes condicionais ou proceder a calibrações tendo em conta o efeito matriz – só é válido se e só se a composição da amostra for bastante próxima dos padrões usados na calibração.

Tendo em conta a ordem de aquisição de dados podemos ter perfis de concentração de IF de ordem zero (Fig. 3.8) tratando-se de um caso particular no par (400,0;480,0), de primeira ordem (Fig. 3.9) tratando-se, agora do caso particular do Ex de 400,0 nm, ou o cubo de informação (Fig. 3.5) que representa todos os perfis nas gamas usadas de Ex e Em. Passou-se de 1 perfil (Fig. 3.8) para 401 perfis (Fig. 3.9) e depois para 5213 perfis (Fig. 3.5) interessa, agora, usar algumas técnicas de modo que, por um lado, se tire proveito da grande informação contida nos dados de segunda ordem, e, por outro lado, se condense essa mesma informação tornando-a de mais fácil manipulação e compreensão.

Nas duas secções seguintes descreve-se os dois procedimentos usados na condensação da informação.

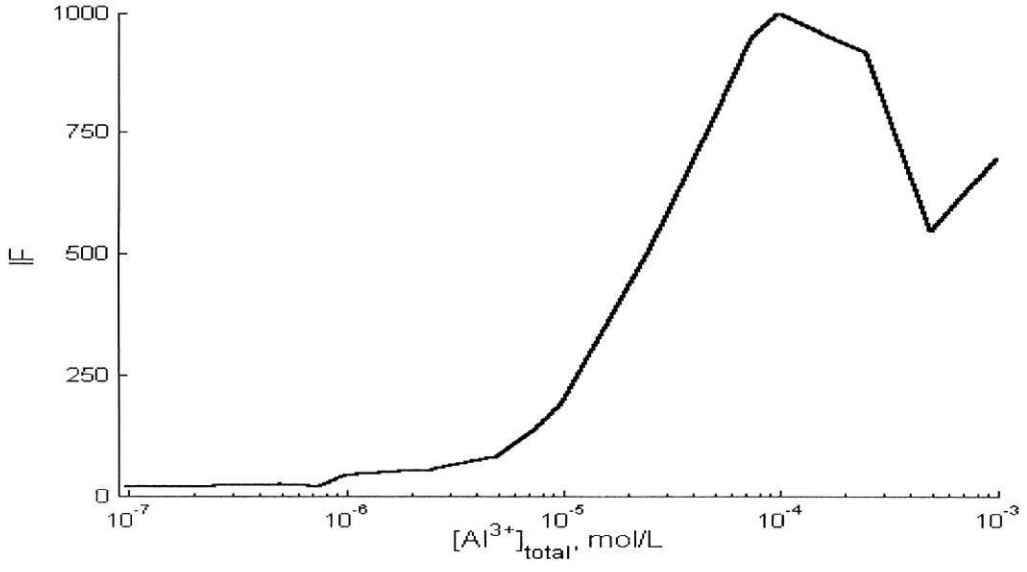



Fig. 3.8 – Representação gráficas da $IF^s$ recolhidas, quando a amostra é excitada com Ex de 400,0 nm e para o detector passa um Em de 480,0 nm, par (400,0;480,0), em função da concentração total de alumínio na fase aquosa com valor de pH de 5,6.

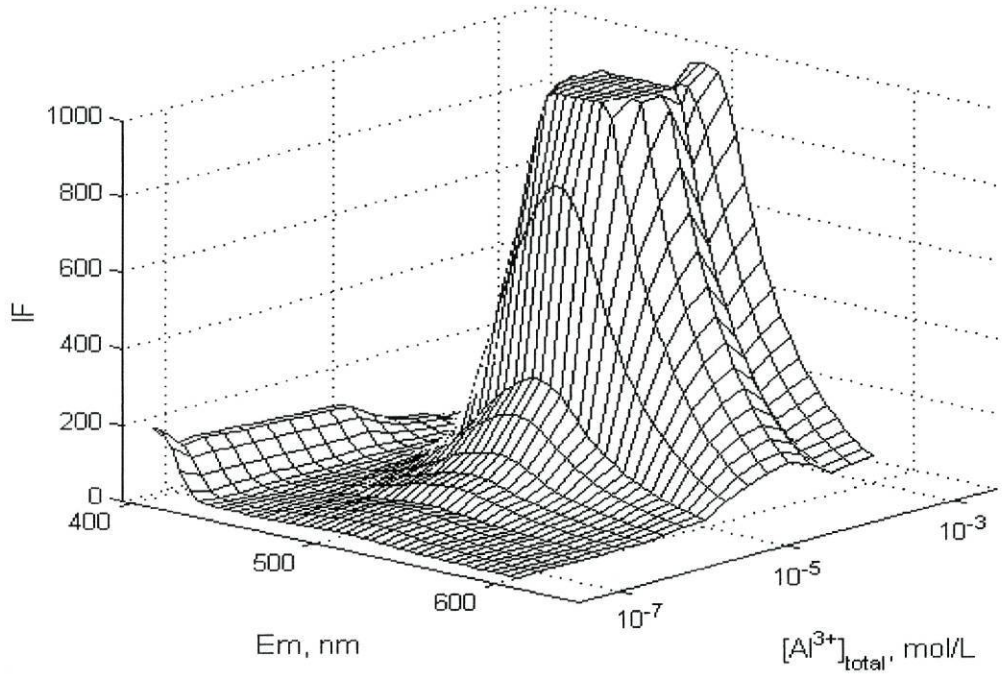



Fig. 3.9 – Representação dos espectros de emissão com a variação da $[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa ao valor de pH de 5,6, quando a amostra está a ser irradiada com Ex de 400,0 nm.

## 3.3 - **Modelação a funções matemáticas (Gaussianas)**

### 3.3.1 - **Espectros de Ex ou Em como curvas de Gauss univariadas**

Os espectros de emissão ou excitação (Fig. 3.1) podem ser vistos, tal como cada valor da IF na eq[3.1], como o somatório dos diferentes espectros associados a diferentes fenómenos que contribuem para o resultado da IF registada.

Idealiza-se a if de primeira ordem como uma curva de Gauss ou função distribuição probabilidades, $f_{(probabilidade)}$ (Fig. 3.10). A curva de Gauss fica completamente definida com dois parâmetros: o centro onde se verifica o valor máximo, valor médio $\mu$, e a largura, desvio padrão $\sigma$:

$$f_{(probabilidade)} = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \cdot \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \qquad [3.2]$$

e tem a particularidade de 68% da área abaixo da curva estar contido no intervalo $[\mu-\sigma , \mu+\sigma]$, 95% da área abaixo da curva estar contida no intervalo $[\mu-2\sigma , \mu+2\sigma]$ e 99,7% da área abaixo da curva estar contida no intervalo $[\mu-3\sigma , \mu+3\sigma]$, Fig.3.10.

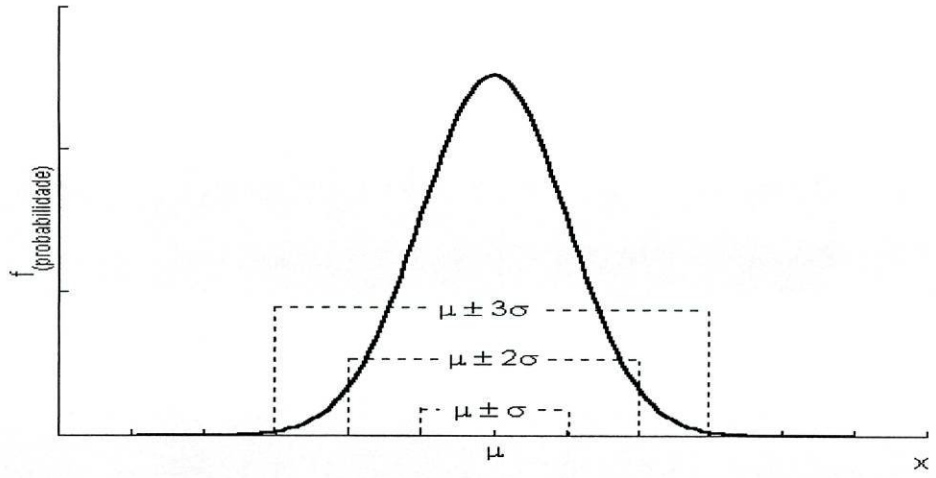



Fig. 3.10 – Representação da curva de Gauss, eq[3.2].

A if de primeira ordem é uma Gaussiana e, por analogia à curva de Gauss, é definida do seguinte modo:

$$if_i = a_i \cdot \exp\left(-\frac{(x-\overline{x_i})^2}{b_{\overline{x_i}}}\right) \qquad [3.3]$$

onde o temo $a_i$ é a pré-exponencial função da concentração do analíto, $\overline{x_i}$ o valor do Ex ou Em onde ocorre o máximo do fenómeno e $b_{\overline{x_i}}$ a largura da Gaussiana deste mesmo fenómeno. O fenómeno puro $if_i$ fica de tal modo restrito à vizinhança que qualquer valor de if fora do intervalo de $[\overline{x_i} - 3\cdot\sqrt{2\cdot b_{\overline{x_i}}}\ ; \overline{x_i} + 3\cdot\sqrt{2\cdot b_{\overline{x_i}}}\ ]$ é perfeitamente desprezável, diz-se que vale zero (a área abaixo da curva fora deste intervalo vale 0,3 % da área total). A Gaussiana é simétrica em torno do valor $\overline{x_i}$, então qualquer outra forma não simétrica diz-se que contém mais do que uma curva de Gauss.

Tomando o exemplo do espectro de emissão da Fig. 3.1β, pode ver-se que existe uma Gaussiana na proximidade do Em de 400 nm e uma outra não simétrica na zona do Em em torno dos 500 nm, então este pico conterá duas Gaussianas. A IF de primeira ordem resultará do somatório de três Gaussianas, eq[3.1], do seguinte modo:

$$IF = if_1 + if_2 + if_3$$

onde cada Gaussiana tem os seguintes parâmetros:

$$IF = 76 \cdot e^{\left(-\frac{(Em-403,4)^2}{154}\right)} + 779 \cdot e^{\left(-\frac{(Em-505,3)^2}{1461}\right)} + 117 \cdot e^{\left(-\frac{(Em-567,0)^2}{1120}\right)}$$

cuja visualização se encontra na Fig. 3.11.

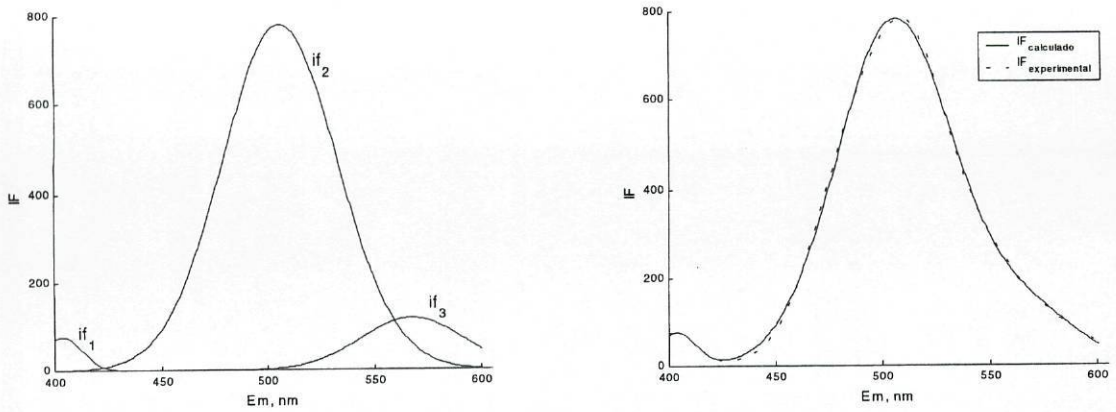



Fig. 3.11 – Representação da decomposição da curva IF da Fig. 3.1β em 3 Gaussianas, $if_1$, $if_2$ e $if_3$ (esquerda), cuja somatório origina a $IF_{calculada}$ e sua comparação com a $IF_{experimental}$ (direita).

A esta escala e nas condições que se obteve o espectro pode dizer-se que existem três fenómenos distintos: a $if_1$ que ocorre a Em de 403,4 nm quando a cuba está a ser bombardeada com Ex de 400,0 nm e corresponde à dispersão de primeira ordem – radiação que é reflectida e reemitida para o detector com a mesma energia; a $if_2$ que ocorre ao par (400,0;505,3) é a fluorescência de um qualquer complexo com principal composição 8-HQ e $Al^{3+}$ numa determinada estequiometria; a $if_3$ que ocorre ao par (400,0;567,0) que também é fluorescência de um outro complexo de 8-HQ e $Al^{3+}$ mas apresentando uma estequiometria diferente.

Interessa, agora, definir alguns critérios para justificar estes resultados e não outros. Tratando-se de ajustes não lineares, então, pode definir-se um parâmetro $R^2_{Gaussiana}$, como sendo:

$$R^2_{Gaussiana} = 1 - \frac{\text{Re}\,síduoSS}{CorrectoSS} \qquad [3.4]$$

onde ResíduoSS é o somatório do quadrado da diferença do valor de $IF_{calculado}$ para o $IF_{experimental}$ e CorrectoSS é o somatório do quadrado dos $IF_{experimental}$. O caso ideal é obter o ResíduoSS nulo tornando o valor de $R^2_{Gaussiana}$ igual a 1. Este critério só é válido

se o valor das Gaussianas for significativamente maior que a IF fora do intervalo dos três desvios padrões, mas é um parâmetro a ter em conta devido à sua simplicidade de análise. O valor de $R^2_{Gaussiana}$ para o ajuste na Fig. 3.11 é de 0,9990, significando, essencialmente, que as Gaussianas ajustadas têm um peso relativamente grande no espectro global.

Um segundo critério de avaliação é pela análise do erro assimptótico padrão que se entende como sendo um intervalo, associado ao parâmetro, que provoca uma variação entre o $IF_{calculado}$ e o $IF_{experimental}$ semelhante ao desvio padrão na distribuição normal de probabilidades, ou por outras palavras, 95% de certezas do parâmetro estar bem ajustado está contido em mais ou menos 1,96 vezes o erro assimptótico padrão. Intervalos pequenos correspondem a maiores certezas quanto ao ajuste do parâmetro (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Resultados do ajuste a três Gaussianas do espectro de emissão da Fig. 3.1β. Os limites inferiores e superiores foram determinados por $a_i$ ± 1,96 vezes o erro assimptótico padrão.

| Gaussiana | Parâmetro | estimativa | erro assimptótico padrão | limite inferior | limite superior |
|---|---|---|---|---|---|
| $if_1$ | $a_1$ | 76,4 | 2,1 | 72,2 | 80,6 |
| | $\overline{Em_1}$ | 403,44 | 0,76 | 401,96 | 404,93 |
| | $b_{\overline{Em_1}}$ | 154 | 22 | 111 | 196 |
| $if_2$ | $a_2$ | 778,6 | 1,8 | 775,1 | 782,1 |
| | $\overline{Em_2}$ | 505,31 | 0,17 | 504,98 | 505,64 |
| | $b_{\overline{Em_2}}$ | 1461 | 12 | 1436 | 1485 |
| $If_3$ | $a_3$ | 117,1 | 2,2 | 112,8 | 121,4 |
| | $\overline{Em3}$ | 566,97 | 0,90 | 565,20 | 568,74 |
| | $b_{\overline{Em_3}}$ | 1120 | 75 | 973 | 1268 |

Por fim temos a comparação directa entre a $IF_{calculado}$ e a $IF_{experimental}$ (Fig.3.11 - direita), cuja média das diferenças é –0,93 com um desvio padrão de 8,34 unidades de intensidade relativas de fluorescência.

Um bom ajuste pode ser comprovado, simplesmente, por um valor de $R^2_{Gaussiana}$ próximo de 1 (0,9...), mas valores afastados da unidade podem ser, também, um bom ajuste dependendo do intervalo do erro assimptótico padrão e, sempre que possível e para tirar qualquer tipo de dúvida, da análise visual ou através das médias e desvios padrões dos resíduos, entre a $IF_{calculada}$ e $IF_{experimental}$, Fig. 3.11 – direita.

### 3.3.2 - **Perfis de concentração nos espectros de Ex ou Em**

Como se observa na eq[3.3] o parâmetro pré-exponencial, $a_i$, é função da concentração do analíto, então a colecção de $a_i$, ajustados a diferentes espectros de Ex ou Em, recolhidos a diferentes valores da concentração do analito, permite obter o(s) perfil(is) de concentração.

Na Tabela 3.2 encontra-se o resultado dos 18 ajustes às três Gaussianas dos dados da Fig. 3.9.

Com este procedimento confirmou-se a possível existência de três fenómenos e condensou-se a informação a três vectores que são função da concentração.

Usando, agora, os termos pré-exponenciais das $if_2$ e $if_3$ (Fig. 3.12) é possível visualizar a evolução do sinal com o acréscimo do catião alumínio. Isto é uma espécie de tratamento matemático do procedimento corrente de calibração no qual se selecciona a zona do espectro onde a resposta sofre maior variação e contém menor número de interferências.

A vantagem é o facto de poder determinar com um grau de certeza associado o pico máximo, descriminar possíveis fenómenos sobrepostos com a possibilidade de descartar os mais inconvenientes (por exemplo a Fig. 3.13 é a reprodução da Fig. 3.9 sem a dispersão de primeira ordem, $if_1$) e é possível "ler" o sinal quando este excede o máximo da escala de leitura do equipamento (na Fig. 3.13 a escala é superior a 1000 unidades de fluorescência).

A Fig. 3.14 é a representação das diferença, em valor absoluto, entre cada valor de IF experimental e o simulado com as três Gaussianas ($IF_{calculado}$), cujo erro relativo máximo é de 5,8%. Não estão representados os pontos onde a IF experimental excedia o valor de 950 unidades de intensidade de fluorescência (valor acima do qual não se entrou em conta, também, na modelação a Gaussianas).

Tabela 3.2 – Resultados dos parâmetros $a_i$, em função da $[Al^{3+}]_{total}$, do ajuste a três Gaussianas (eq[3.3]), dos dados da Fig. 3.9. Junto a cada Gaussiana, $if_i$, encontra-se, por baixo, os valores de $\overline{Em_i}$ e $b_{\overline{Em_i}}$ e o parâmetro $a_i$ é seguido do respectivo erro assimptótico padrão.

| $[Al^{3+}]_{total}$ mol/L | $R^2_{Gaussiana}$ | Gaussiana $if_1$<br>$\overline{Em_1} = 403{,}2 \pm 0{,}7$<br>$b_{\overline{Em_1}} = 168 \pm 10$ | Gaussiana $if_2$<br>$\overline{Em_2} = 503 \pm 3$<br>$b_{\overline{Em_2}} = 141 \cdot 10 \pm 16 \cdot 10$ | Gaussiana $if_3$<br>$\overline{Em_3} = 558 \pm 9$<br>$b_{\overline{Em_3}} = 177 \cdot 10 \pm 14 \cdot 10$ |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,993 | 187,4±,07 | 17,1±0,4 | 2,0±0,4 |
| $9{,}80 \times 10^{-8}$ | 0,993 | 131,8±0,5 | 28,6±0,3 | 4,6±0,2 |
| $2{,}45 \times 10^{-7}$ | 0,994 | 136,5±0,4 | 32,0±0,2 | 5,3±0,2 |
| $4{,}90 \times 10^{-7}$ | 0,995 | 133,3±0,4 | 36,1±0,2 | 6,1±0,2 |
| $7{,}35 \times 10^{-7}$ | 0,987 | 130,1±0,6 | 29,7±0,3 | 5,0±0,3 |
| $9{,}80 \times 10^{-7}$ | 0,996 | 127,1±0,4 | 64,9±0,2 | 11,6±0,2 |
| $2{,}45 \times 10^{-6}$ | 0,997 | 124,9±0,4 | 80,1±0,2 | 14,7±0,2 |
| $4{,}90 \times 10^{-6}$ | 0,998 | 120,1±0,4 | 121,1±0,2 | 22,7±0,2 |
| $7{,}35 \times 10^{-6}$ | 0,998 | 115,8±0,6 | 204,1±0,3 | 39,0±0,3 |
| $9{,}80 \times 10^{-6}$ | 0,998 | 113,1±0,8 | 281,2±0,4 | 53,8±0,4 |
| $2{,}45 \times 10^{-5}$ | 0,998 | 76±2 | 749±1 | 143±1 |
| $4{,}90 \times 10^{-5}$ | 0,998 | 49±3 | 1139±3 | 220±1 |
| $7{,}35 \times 10^{-5}$ | 0,996 | 32±3 | 1384±5 | 268±2 |
| $9{,}80 \times 10^{-5}$ | 0,995 | 22±4 | 1527±6 | 298±2 |
| $2{,}45 \times 10^{-4}$ | 0,995 | 0±4 | 1321±5 | 247±2 |
| $4{,}90 \times 10^{-4}$ | 0,998 | 1±3 | 795±1 | 140±1 |
| $7{,}35 \times 10^{-4}$ | 0,998 | 0±3 | 927±2 | 162±2 |
| $9{,}80 \times 10^{-4}$ | 0,998 | 0±4 | 997±2 | 184±2 |

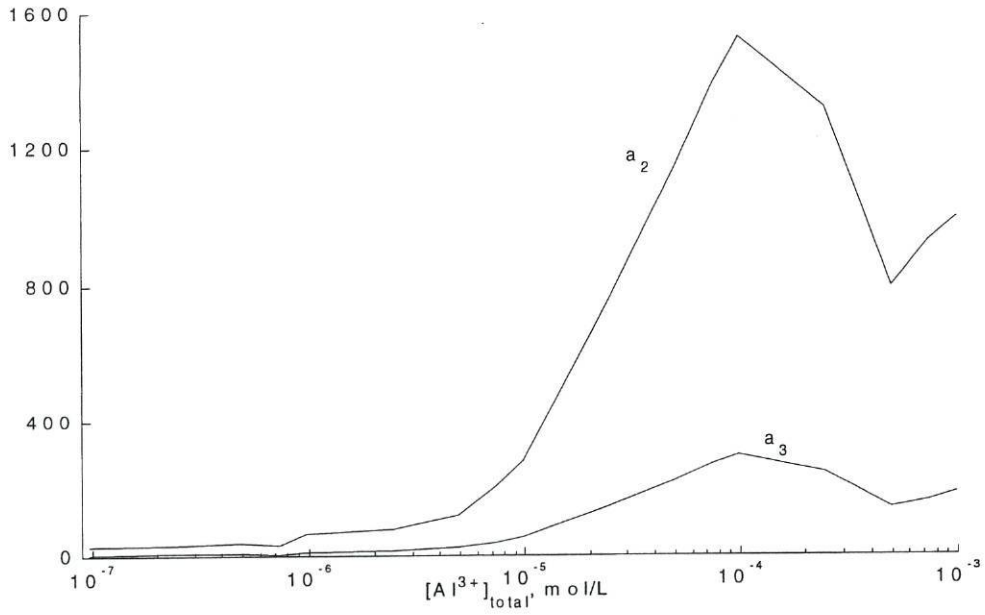



Fig. 3.12 – Representação gráfica dos parâmetros $a_2$ e $a_3$ (da Tabela 3.2), supostamente da responsabilidade de fenómenos fluorescentes, resultantes do ajuste não-linear à eq[3.3], em função $[Al^{3+}]_{total}$.

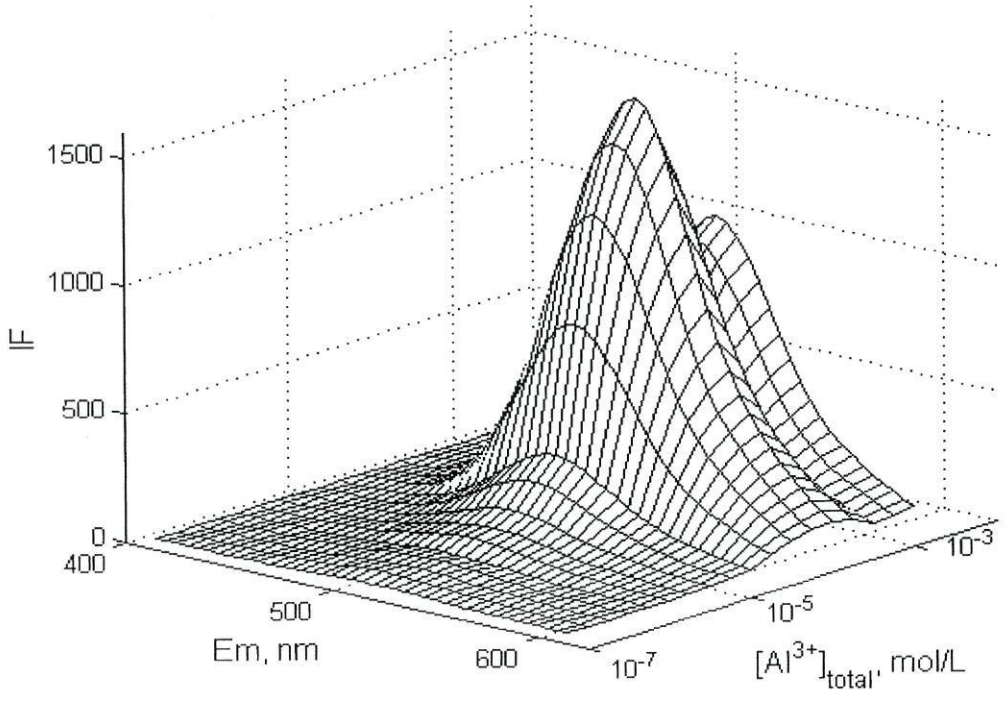



Fig. 3.13 – Representação gráfica dos espectros de emissão ao longo da variação da $[Al^{3+}]_{total}$ simulados com as Gaussianas $if_2$ e $if_3$. Foi possível "cortar" a dispersão de primeira ordem sem que seu valor viesse forçado, por exemplo a zero.

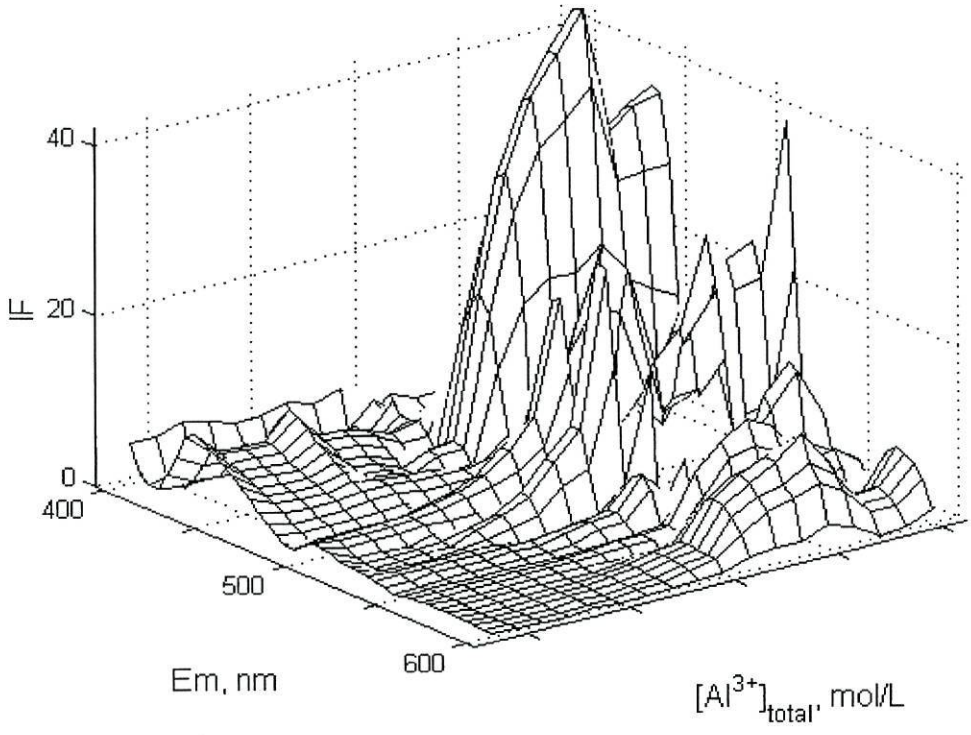



Fig. 3.14 – Representação gráfica das diferenças absolutas entre os valores da $IF_{experimental}$ (Fig. 3.9) e simuladas (Fig. 3.13).

### 3.3.3 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

No espaço das MEE$^s$, vamos ter a Gaussiana segundo a dimensão Em (espectro de emissão ao Ex fixo):

$$if_{Em} = a_{Em} \cdot \exp\left( -\frac{(Em - \overline{Em})^2}{b_{Em}} \right) \qquad [3.5]$$

e simultaneamente a Gaussiana segundo a dimensão Ex (espectro de excitação ao Em fixo):

$$if_{Ex} = a_{Ex} \cdot \exp\left( -\frac{(Ex - \overline{Ex})^2}{b_{Ex}} \right) \qquad [3.6]$$

onde cada índice indica a respectiva pertença dos parâmetros, então o produto matemático destas duas equações origina uma HiperGaussiana, HG (função distribuição de probabilidades bivariada sem interacção), Fig. 3.15:

$$if = a \cdot \exp\left( -\frac{(Ex - \overline{Ex})^2}{b_{Ex}} - \frac{(Em - \overline{Em})^2}{b_{Em}} \right) \qquad [3.7]$$

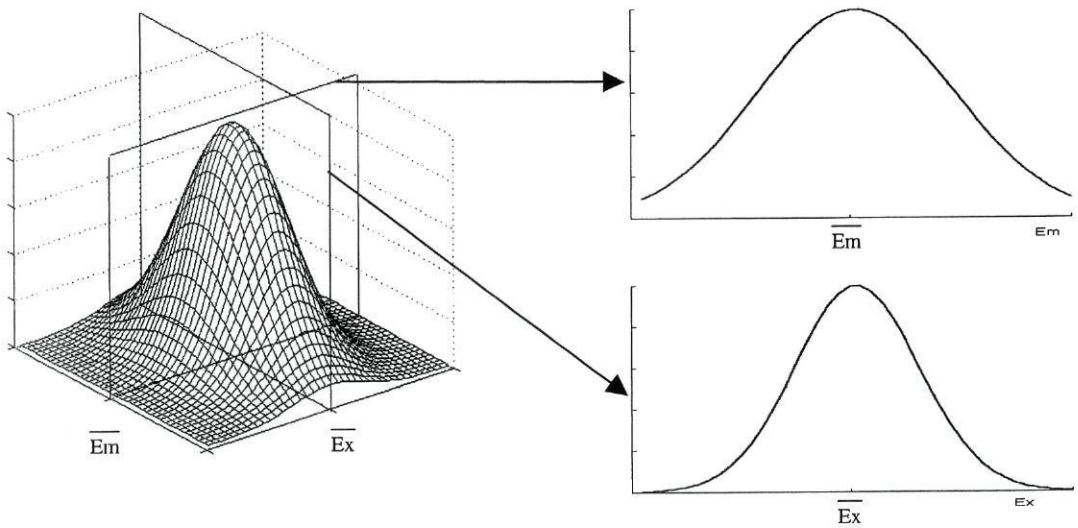



Fig. 3.15 – Representação de uma HiperGaussiana ideal, HG, de duas dimensões, Ex e Em, sem interacção. Lado direito em cima está o espectro de emissão ao Ex fixo, e do lado direito em baixo o espectro de excitação ao Em fixo.

onde a é o produto de $a_{Em}$ por $a_{Ex}$, rearranjando a eq[3.7]:

$$\frac{(Em - \overline{Em})^2}{b_{Em}} + \frac{(Ex - \overline{Ex})^2}{b_{Ex}} = Ln\left(\frac{a}{if}\right) \qquad [3.8]$$

ou seja para cada conjunto de valores de igual if esta equação representa, no plano (Ex,Em), uma elipse de centro $(\overline{Ex};\overline{Em})$ alinhada segundo os respectivos eixos, Fig. 3.16. Estes diagramas de contornos permitem visualizar a existência de interacções entre as variáveis do plano (caso não sejam elipses ou simplesmente elipses alinhadas), assim como o número de HG possíveis de determinar à escala em que se está a trabalhar, esclarece quanto ao número de fenómenos teorizáveis que se pode extrair da MEE (Fig. 3.17).

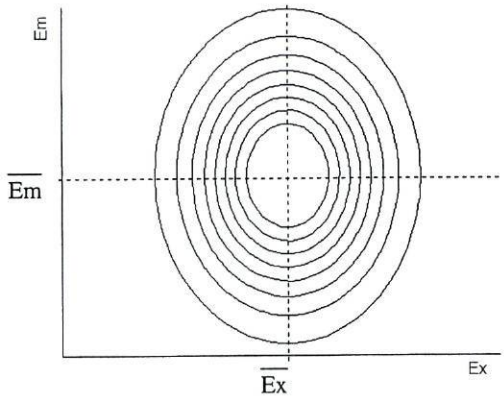



Fig. 3.16 – Representação das elipses da eq[3.8] ou o diagrama de contornos da eq[3.7]. Cada elipse é a representação de um conjunto de if[s] de igual valor.

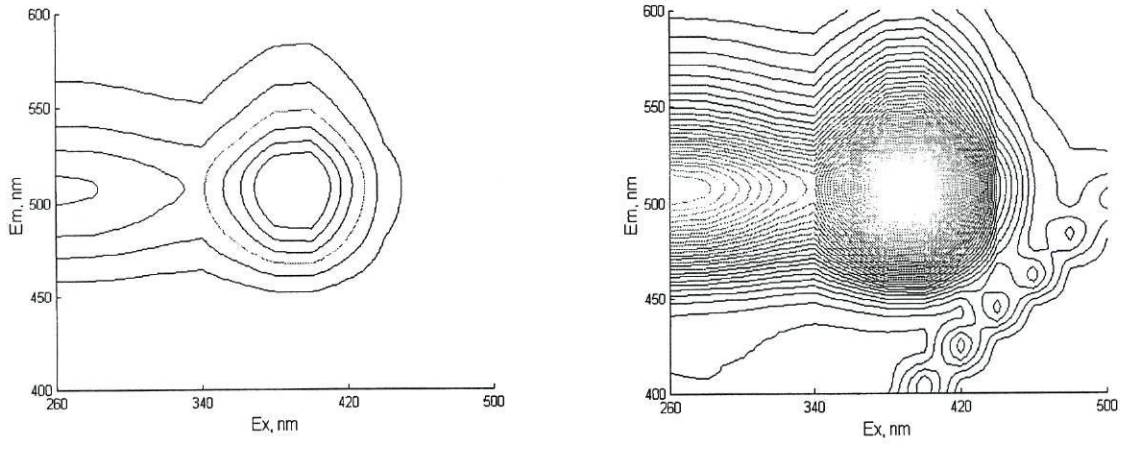



Fig. 3.17 – Representação de contornos no plano (Ex,Em) da MEE da Fig. 3.3. Lado esquerdo, com uma representação de 6 curvas, pode ver-se duas HG – uma ao centro da figura e outra cujo centro da HG se encontra fora da figura. Lado direito, a mesma MEE com 50 valores de if, onde pode ver-se, mais nitidamente, as duas HG e passou a ver-se, nitidamente, uma outra com orientação de 45°, logo com interacção – é a dispersão de primeira ordem (o aspecto de cordilheira deve-se à baixa resolução da Ex).

Interessa, agora, esclarecer o significado das HG com e sem interacção. HG é uma função matemática multivariada do tipo:

$$HG = a \cdot \exp(-f(x)-f(y)-f(z)-...) \qquad [3.9]$$

onde f(x), f(y), ..., são funções a uma única variável, quadráticas factorizáveis de raiz dupla, do tipo:

$$f(x)=\frac{(x-\bar{x})^2}{b_x} \qquad [3.10]$$

Graficamente esta equação representa uma hipérbole com a concavidade para cima (positiva) e o vértice é da forma $(\bar{x};0)$. HG cujas variáveis obedeçam a estes critérios chamam-se HG sem interacção, representam-se simplesmente por HG. Na estatística a eq[3.10] é uma espécie de translação e redução de uma variável (uniformemente distribuída) à distribuição normal de probabilidades (esta com média nula, $\mu = 0$, e desvio padrão unitário, $\sigma = 1$) chamada de variável reduzida, mas, como tem o numerador ao quadrado, é denominada de distância de Mahalanobis.

HG sem interacção origina diagramas de contorno alinhados segundo os eixos das variáveis (Fig. 3.16) e, sob o ponto de vista da interpretação do fenómeno, será o caso ideal das $if_i^s$ para a eq[3.1]. Existem HG, no entanto, cujos diagramas de contorno denunciam a existência de interacções, como por exemplo a dispersão de primeira ordem na Fig. 3.17; então na função potência não é possível decompor todas as variáveis em distâncias de Mahalanobis e chamam-se HG com interacção, $HG_{interacção}$. É exemplo disso a relação, já mencionada, da dispersão de primeira ordem nas $MEE^s$, em que parte da luz de excitação é desviada ou reemitida para o detector, então, quando a cuba está a ser irradiada com uma determinada Ex, o detector deve assinalar, ao mesmo comprimento de onda, Em = Ex, um sinal de IF (Fig. 3.17). A função matemática na potência desta zona da MEE é:

$$f(\text{dispersão1}^{\text{a}}\text{ ordem})=\frac{(Em-Ex)^2}{b_{\text{dispersão1°ordem}}} \qquad [3.11]$$

Uma outra interacção conhecida é a dispersão de segunda ordem que ocorre a metade da energia correspondente ao Ex ou seja verifica-se IF não fluorescente quando Em é igual ao dobro do Ex, do seguinte modo:

$$f(\text{dispersão2}^{\text{a}}\text{ ordem})=\frac{(Em-2\cdot Ex)^2}{b_{\text{dispersão2°ordem}}} \qquad [3.12]$$

Na Fig. 3.18 encontra-se um diagrama que mostra as duas principais zonas no plano (Ex,Em) onde se distribuem as dispersões de primeira e segunda ordens, assim como, a zona onde ocorre os principais fenómenos de fluorescência, $IF_{fluorescência}$, pelo menos é a zona onde habitualmente se trabalha.

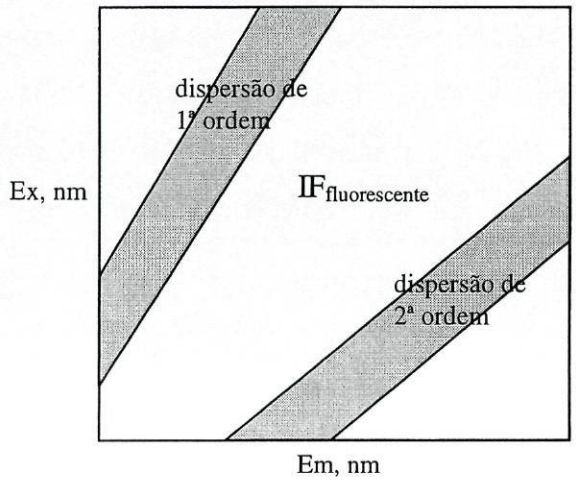



Fig. 3.18- Esquema do plano (Ex,Em) onde se encontram as zonas de dispersão.

$HG_{interacção}$ são, também, todo o tipo de HG cuja polinómio da potência é qualquer outra função matemática que não a eq[3.10], origina, nos diagramas de contorno, elipses irregulares e/ou não alinhados segundo os eixos.

A IF das MEE[s] fica então definida como sendo o somatório de todas das HG possíveis, com e sem interacção, a eq[3.1] explicitada para o plano (Ex,Em) fica:

$$IF = \sum_{i=1}^{n} HG_i + \sum_{j=1}^{m} HG\,\text{int eracção}_j \qquad [3.13]$$

dos n fenómenos de fluorescência isoláveis e dos m fenómenos com interacção, onde cada $HG_i$ é:

$$HG_{(\overline{Ex},\overline{Em})} = a_{(\overline{Ex},\overline{Em})} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-\overline{Em})^2}{b_{Em\,(\overline{Ex},\overline{Em})}} - \frac{(Ex-\overline{Ex})^2}{b_{Ex\,(\overline{Ex},\overline{Em})}} \right) \qquad [3.14]$$

e cada $HG_{interacçãoj}$ é (caso das dispersões):

$$HG_{\text{int eracção}_j} = a_j \cdot \exp\left(-\frac{(Em - j \cdot Ex)^2}{b_j}\right) \qquad [3.15]$$

da j ésima ordem da dispersão.

Ao sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ (Fig. 3.5) foram-lhe retiradas as dispersões de primeira e segunda ordem com uma largura de 30 e 20 nm, respectivamente, assim como todos os pontos cujas $IF^s$ são superiores a 950 unidades de intensidade de fluorescência. A estas $MEE^s$ cortadas ajustou-se quatro $HG^s$, duas cujo centro se encontra no interior da janela de observação, $HG_{(\overline{Ex_1},\overline{Em_1})}$ e $HG_{(\overline{Ex_2},\overline{Em_2})}$, e outras duas com o centro fora da janela de observação, $HG_{(\overline{Ex_3},\overline{Em_3})}$ e $HG_{(\overline{Ex_4},\overline{Em_4})}$, que se podem observar na Fig. 3.17. Então os dados cortados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ podem ser descritos como sendo a soma de quatro $HG^s$, eq[3.13], sem interacção, do seguinte modo:

$$IF = HG_{(\overline{Ex_1},\overline{Em_1})} + HG_{(\overline{Ex_2},\overline{Em_2})} + HG_{(\overline{Ex_3},\overline{Em_3})} + HG_{(\overline{Ex_4},\overline{Em_4})} \qquad [3.16]$$

No Tabela 3.3 e Tabela 3.4 encontram-se os resultados deste ajuste com o parâmetro $a_{(\overline{Ex},\overline{Em})}$ função da $[Al^{3+}]_{total}$.

Tabela 3.3 – Resultados dos centros e larguras do ajuste a quatro $HG^s$ dos dados da Fig. 3.5. Todos os parâmetros têm o erro assimptótico padrão associado.

| | $HG_{(390;505,6)}$ | $HG_{(393;561)}$ | $HG_{(160;503)}$ | $HG_{(257;407)}$ |
|---|---|---|---|---|
| $\overline{Ex}$ | $390 \pm 1$ | $393 \pm 6$ | $160 \pm 34$ | $257 \pm 10$ |
| $\overline{Em}$ | $505,6 \pm 0,3$ | $561 \pm 13$ | $503 \pm 3$ | $407 \pm 4$ |
| $b_{Ex_{(\overline{Ex_i},\overline{Em_i})}}$ | $1,1\text{x}10^3 \pm 1\text{x}10^2$ | $1,3\text{x}10^3 \pm 2\text{x}10^2$ | $3,9\text{x}10^4 \pm 8\text{x}10^3$ | $1,31\text{x}10^4 \pm 3\text{x}10^2$ |
| $b_{Em_{(\overline{Ex_i},\overline{Em_i})}}$ | $1,50\text{x}10^3 \pm 8\text{x}10$ | $1,32\text{x}10^2 \pm 8\text{x}10$ | $1,9\text{x}10^3 \pm 2\text{x}10^2$ | $2,62\text{x}10 \pm 9\text{x}10$ |

Tabela 3.4 – Resultados do parâmetro a $_{(\overline{Ex},\overline{Em})}$ em função da $[Al^{3+}]_{total}$, do ajuste a quatro $HG^s$ dos dados ("cortados") da Fig. 3.5. Todos os parâmetros têm o erro assimptótico padrão associado.

| $[Al^{3+}]_{total}$ mol/L | $R^2_{Gaussiana}$ | $HG_{(390;505,6)}$ | $HG_{(393;561)}$ | $HG_{(160;503)}$ | $HG_{(257;407)}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,958 | 9,7±0,2 | 1,8±0,2 | 23,0±0,2 | 52,6±0,2 |
| $9,80x10^{-8}$ | 0,991 | 23,06±0,06 | 3,74±0,06 | 25,44±0,06 | 28,71±0,05 |
| $2,45x10^{-7}$ | 0,991 | 28,76±0,07 | 4,28±0,06 | 27,76±0,07 | 28,66±0,05 |
| $4,90x10^{-7}$ | 0,991 | 29,66±0,07 | 4,86±0,06 | 30,52±0,07 | 28,05±0,05 |
| $7,35x10^{-7}$ | 0,984 | 24,07±0,06 | 4,32±0,06 | 24,79±0,06 | 25,83±0,05 |
| $9,80x10^{-7}$ | 0,992 | 55,6±0,1 | 9,3±0,1 | 50,1±0,1 | 25,59±0,08 |
| $2,45x10^{-6}$ | 0,990 | 69,4±0,1 | 11,6±0,1 | 60,4±0,1 | 23,4±0,1 |
| $4,90x10^{-6}$ | 0,990 | 106,0±0,2 | 18,0±0,2 | 89,3±0,2 | 21,0±0,2 |
| $7,35x10^{-6}$ | 0,989 | 179,5±0,4 | 31,0±0,4 | 149,4±0,4 | 18,2±0,3 |
| $9,80x10^{-6}$ | 0,990 | 248,8±0,5 | 42,6±0,5 | 204,0±0,5 | 16,6±0,4 |
| $2,45x10^{-5}$ | 0,987 | 664±2 | 116±2 | 548±2 | 0±1 |
| $4,90x10^{-5}$ | 0,974 | 1030±4 | 181±3 | 871±3 | 0±2 |
| $7,35x10^{-5}$ | 0,962 | 1307±7 | 219±4 | 1089±4 | 0±3 |
| $9,80x10^{-5}$ | 0,954 | 1398±10 | 261±5 | 1258±5 | 0±3 |
| $2,45x10^{-4}$ | 0,845 | 966±19 | 294±9 | 1578±11 | 0±7 |
| $4,90x10^{-4}$ | 0,776 | 377±12 | 224±10 | 1613±14 | 0±8 |
| $7,35x10^{-4}$ | 0,802 | 475±12 | 241±10 | 1679±14 | 0±8 |
| $9,80x10^{-4}$ | 0,801 | 519±13 | 264±10 | 1718±15 | 0±8 |

Na Fig. 3.19 estão representados os quatros perfil dos $a_i$ em função da $[Al^{3+}]_{total}$ do ajuste a quatro HG e na Fig. 3.20 encontra-se a reprodução da MEE para a $[Al^{3+}]_{total}$ de $2,45x10^{-5}$ mol/l para a $HG_{(390;505,6)}$, $HG_{(393;561)}$, $HG_{(160;503)}$ e $HG_{(257;407)}$ com os parâmetros calculados. Na Fig. 3.21 temos o resultado da soma das $MEE^s$ da Fig. 3.20 (esquerda) e a diferença em valor absoluto à MEE original (direita).

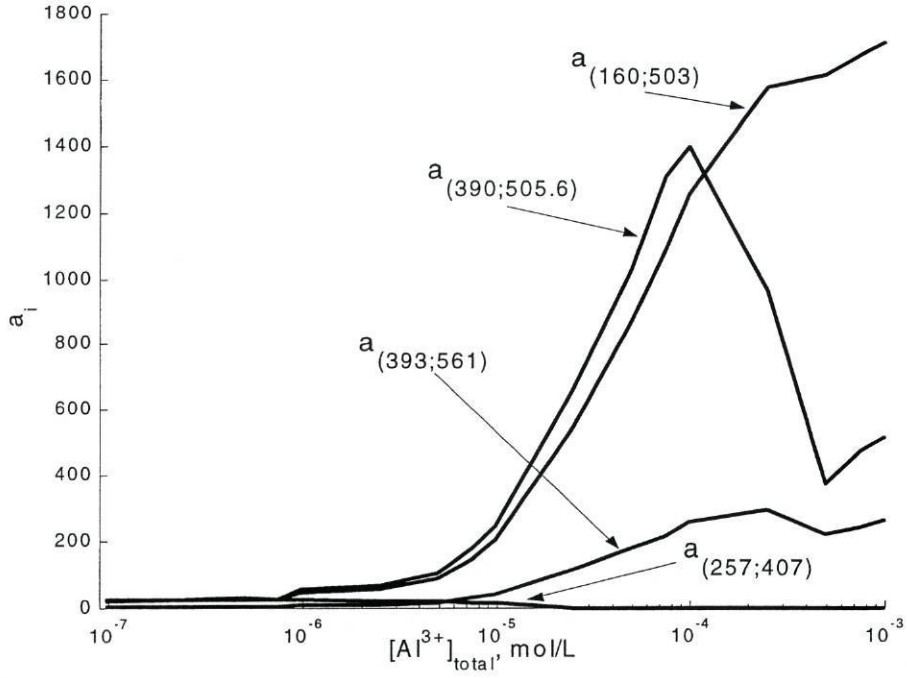



Fig. 3.19- Representação dos termos pré-exponenciais das HG em função da $[Al^{3+}]_{total}$ dos dados da Fig. 3.5.

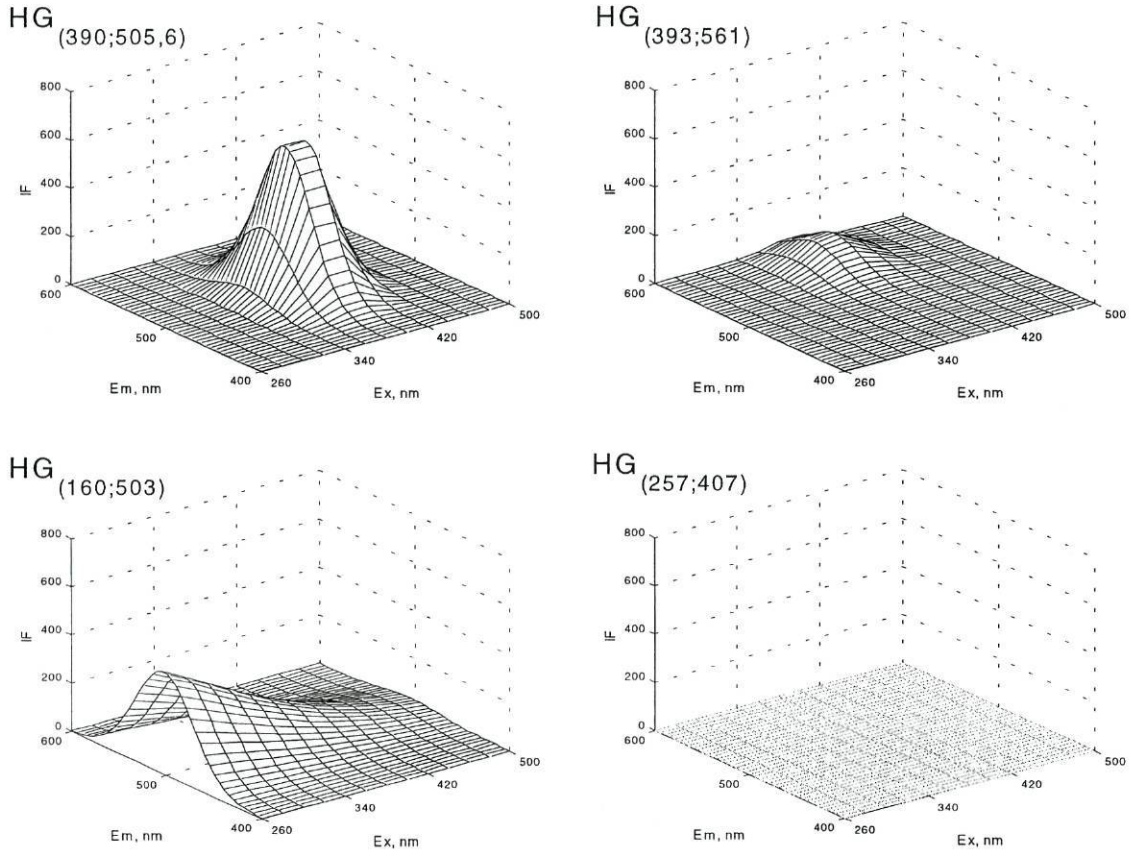



Fig. 3.20- Reprodução separada das quatro HG modeladas para a MEE, do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$, com uma $[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45 \times 10^{-5}$ mol/L do exemplo da Fig. 3.5.

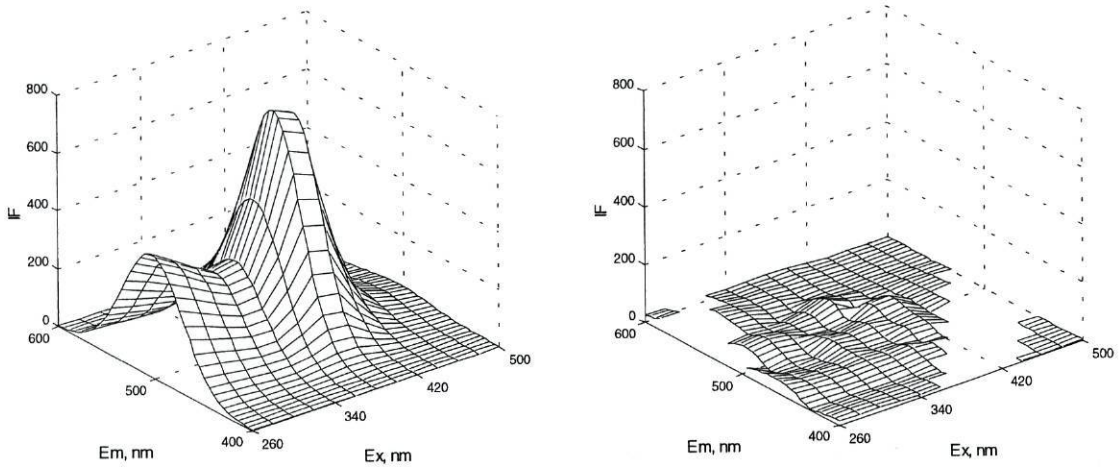



Fig. 3.21- Reprodução da MEE com as quatro HG modeladas, da Fig. 3.20, para a MEE com uma $[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45 \times 10^{-5}$ mol/L do exemplo da Fig. 3.5 (esquerda). Representação das diferenças, em valor absoluto, à MEE original (direita).

Repare-se que o critério dos $R^2_{Gaussiana}$ não é conclusivo, há valores em torno de 0,80 para as maiores concentrações de alumínio total (Tabela 3.4), mas numa análise ao erro assimptótico padrão, constata-se que este intervalo é inferior a 10% do valor do parâmetro estimado e, principalmente, verifica-se (observa-se) os resíduos obtidos entre a $IF_{calculada}$ e a $IF_{experimental}$, o valor máximo da discrepância aos valores experimentais é inferior a 6%, ou seja inferior a 50 unidades de fluorescência quando a IF vale 800.

## 3.4 - **PARAFAC – Formas puras**

### 3.4.1 - **PARAFAC aplicado às MEE (a 2 dimensões)**

O produto matricial, que aqui se vai representar por $\otimes$, é um procedimento matemático que permite obter uma matriz, X, de tamanho mxn, m linhas por n colunas, a partir de um vector coluna, A, com m elementos (linhas) e de um vector linha, B, com n elementos (colunas) do seguinte modo:

$$A \otimes B = X \qquad [3.17]$$

ou explicitamente:

$$\begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \dots \\ A_{m-1} \\ A_m \end{bmatrix} \otimes \begin{bmatrix} B_1 & B_2 & \dots & B_{n-1} & B_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_{1,1} & X_{1,2} & \dots & X_{1,n-1} & X_{1,n} \\ X_{2,1} & X_{2,2} & \dots & X_{2,n-1} & X_{2,n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ X_{m-1,1} & X_{m-1,2} & \dots & X_{m-1,n-1} & X_{m-1,n} \\ X_{m,1} & X_{m,2} & \dots & X_{m,n-1} & X_{m,n} \end{bmatrix} \qquad [3.18]$$

em que cada elemento é obtido pelo produto escalar:

$$X_{(i,j)} = A_i \cdot B_j \qquad [3.19]$$

onde i é o número da linha do vector coluna A e j é o número da coluna do vector linha B.

O PARAFAC (PARAllel FACtor analysis) é uma técnica que permite extrair (tecnicamente denominado de decompor), a partir de uma matriz X, os vectores coluna A e linha B (denominados componentes segundo as respectivas dimensão de A e B) de modo que a eq[3.17] se verifique.

Consideremos a $HG_{(390;505,6)}$ da Fig.3.20 que está matematicamente bem definida pela equação matemática

$$HG_{(390;505,6)} = 664 \cdot \exp\left( -\frac{(Em - 505.6)^2}{1497} - \frac{(Ex - 390)^2}{1085} \right)$$

aplicando o PARAFAC a essa matriz resulta o vector segundo a dimensão Em, $COMP^{Em}$, e o vector segundo a dimensão Ex, $COMP^{Ex}$ (Fig. 3.22).

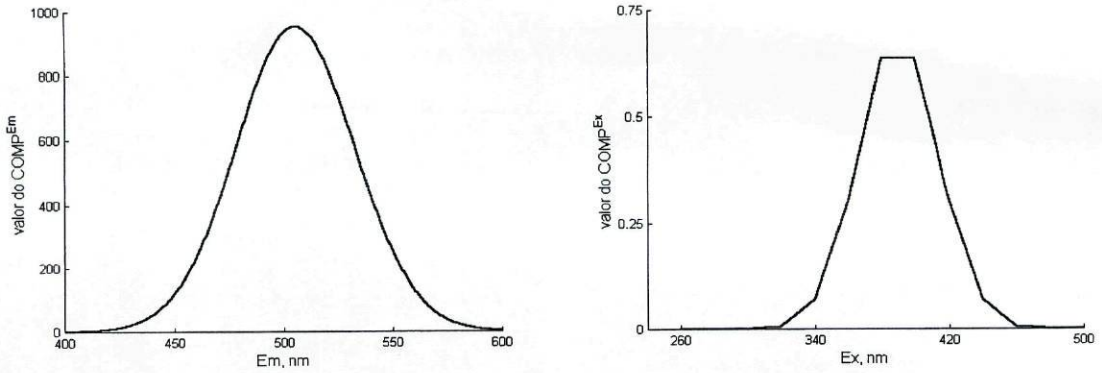



Fig. 3.22- Resultado da decomposição da $HG_{(390;505,6)}$ da Fig. 3.20 (matriz de dados obtida através da eq[3.14]).

Na prática o conteúdo numérico destes vectores não tem qualquer correlação com o(s) fenómeno(s) descritos na matriz de dados, mas representa a forma, nessa dimensão, que vai condicionar a forma final da matriz - denomina-se estes componentes de espectros puros (puros matematicamente).

Se, na matriz $HG_{(390;505,6)}$ da Fig. 3.20, determinar, agora, o espectro emissão e excitação médios, e as respectivas variâncias (Fig. 3.23) podemos concluir que os componentes são uma espécie de forma média que contempla essencialmente a sua variância quando se faz variar a outra dimensão. Daí que as escalas dos componentes não tenham qualquer relação numérica imediata com as escalas das duas dimensões. Os componentes são uma forma da resposta que contém uma grande variação, a maior variação possível.

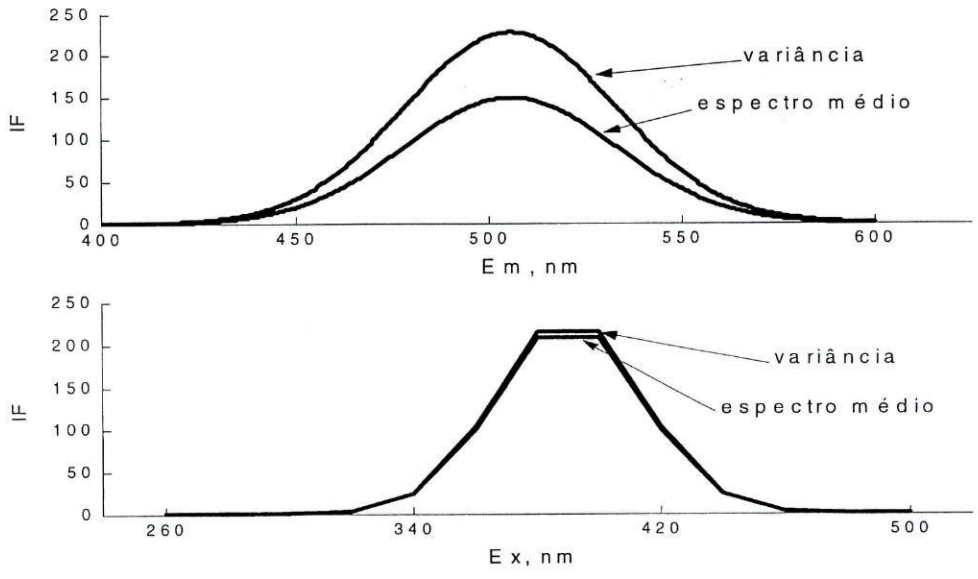



Fig. 3.23- Espectro médio e respectiva variância dos espectros de emissão (cima) e de excitação (baixo) para a matriz $HG_{(390;50,6)}$.

A reprodução da $HG_{(390;505,6)}$, usando os componentes $COMP^{Em}$ e $COMP^{Ex}$ pela eq[3.17], origina uma matriz rigorosamente igual, na Fig. 3.24 está o resultado da diferença da $HG_{(390;505,6)}$ original (Fig. 3.20) pela reproduzida pelo PARAFAC. Repare-se que a ordem de grandeza das diferenças é de $10^{-13}$, valor residual é da responsabilidade da precisão da máquina onde os cálculos foram efectuados (erros de truncatura).

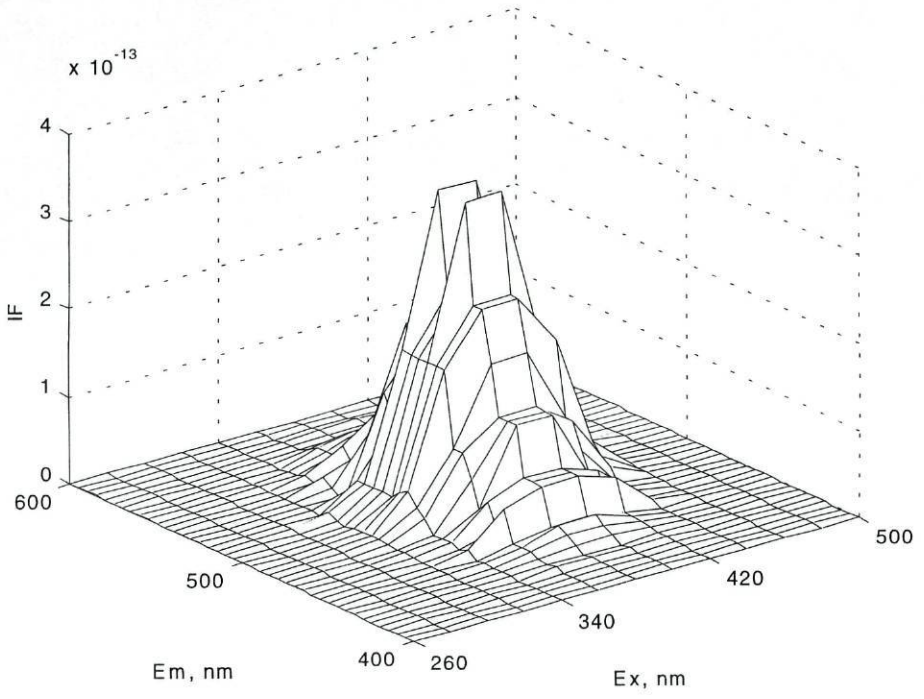
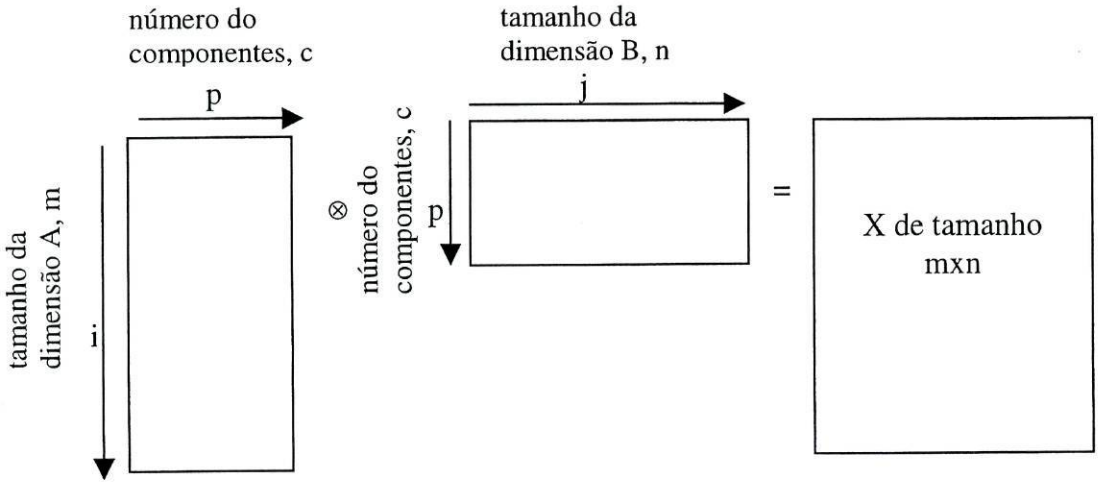



Fig. 3.24- Representação, em valor absoluto, das diferenças entre a HG(390;505.6) original e a reproduzida através dos componentes calculados pelo PARAFAC da Fig. 3.22.

Usou-se a $HG_{(390;505,6)}$ por conter uma única HG e, principalmente, porque não contém a dispersão aleatória típica das medições de sinal de fundo (limitada pela precisão do instrumento de medida), como resultado apenas contém erros de truncatura (Fig. 3.24). Na realidade, as $MEE^s$ contêm mais do que uma HG, provavelmente com interacção ou pelo menos sobrepostas, $HG_{interacção}$ (dispersão de primeira ordem, por exemplo) e, além disso, existe a dispersão associada ao sinal de fundo, logo é previsível obter resíduos uma ou duas décadas abaixo da leitura efectuada e não na ordem de grandeza da Fig. 3.24.

O modelo PARAFAC é extensível a mais do que um componente por dimensão; esquematicamente pode ser visto do seguinte modo:




deixando de ter um único componente para passar a ter p componentes ou seja p espectros puros em cada dimensão. O produto matricial só é possível se o número de colunas da primeira matriz A for igual ao número de linhas da segunda matriz B. Formalmente temos:

$$X_{(i,j)} = \sum_{q=1}^{p} A_{(i,q)} \cdot B_{(q,j)} \qquad [3.20]$$

onde q é o q ésimo componente ($COMP1^{dimensão}$, $COMP2^{dimensão}$ ...$COMPq^{dimensão}$) de um total de p.

O $COMP1^{dimensão}$ é a forma da matriz, segundo a dimensão a considerar, que contém a maior quantidade de variação, o $COMP2^{dimensão}$ é a forma que contém a maior quantidade de variação após extrair, à matriz original, o $COMP1^{dimensão}$, ou seja o que contém a segunda maior variação, e assim sucessivamente até ao número máximo de componentes escolhido.

Como há sempre uma discrepância entre os valores de IF originais e os reproduzidos, então para estabelecer a igualdade entre as duas matrizes basta adicionar à matriz reproduzida, X, uma outra de resíduos, R, do mesmo tamanho que X, ficando a eq[3.17]:

$$X = A \otimes B + R \qquad [3.21]$$

onde cada elemento é obtido do seguinte modo:

$$X_{(i,j)} = \sum_{q=1}^{p} A_{(i,q)} \cdot B_{(q,j)} + R_{(i,j)} \qquad [3.22]$$

concretamente:

$$MEE = IF_{(i,j)} = \sum_{q=1}^{p} COMPq_i^{Em} \cdot COMPq_j^{Ex} + R_{(i,j)} \qquad [3.23]$$

Este modelo matemático é traduzido para cada par de (Ex;Em), ou seja para cada valor da IF, como sendo:

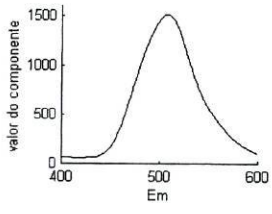
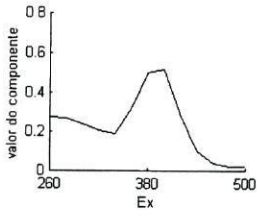
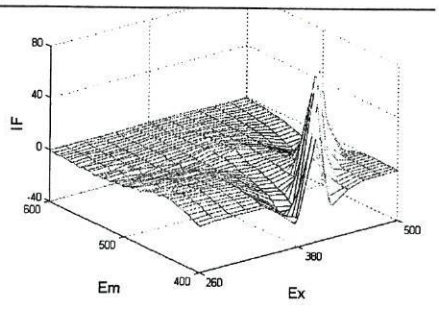
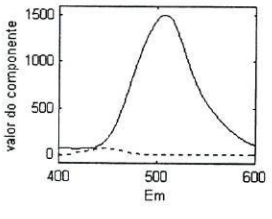
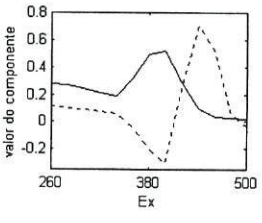
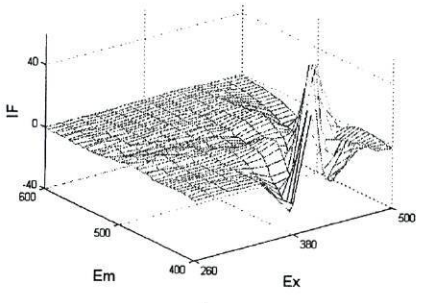
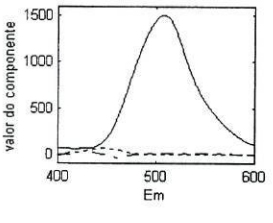
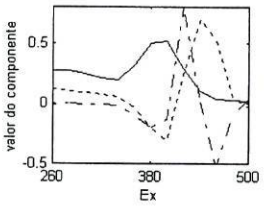
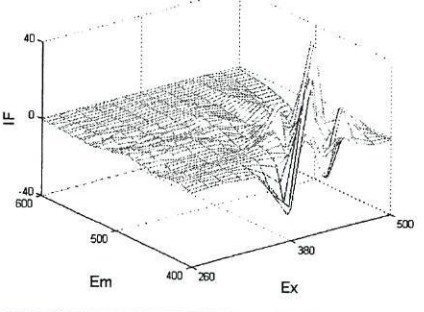
$$IF = COMP1^{Em} \cdot COMP1^{Ex} + COMP2^{Em} \cdot COMP2^{Ex} + ... + COMPp^{Em} \cdot COMPp^{Ex} + R$$

que é a equação de uma recta a q variáveis, logo o modelo é linear, e como se está a trabalhar a duas dimensões, diz-se de bi-linear (embora se possa estar a trabalhar a p componentes). Vamos ter tantas regressões lineares quanta a extensão e resolução do plano (Ex;Em) com uma ordenada na origem (R).

Na Tabela 3.5 encontra-se a decomposição da MEE da Fig. 3.3 nos respectivos espectros puros, usando a decomposição para 1, 2 e 3 componentes. Repare-se que à medida que o número de componentes aumenta diminui o valor dos resíduos, embora a variação seja menor quando se passa de 2 para 3 componentes. A decomposição em 1 componente originou espectros puros positivos em toda a sua extensão; no entanto, para mais de um componente os espectros puros começam a conter partes negativas, o que, fisicamente, é um caso indesejável pois os espectros devem ser sempre positivos.

Na Fig. 3.25 pode ver-se que, para esta MEE, um componente é suficiente para representar a quase totalidade do sinal, e além disso a $MEE_{COMP1}$ não contém a zona de dispersão de primeira ordem, tendo sido esta (mais ou menos) incorporada no segundo componente, $MEE_{COMP2}$. O terceiro componente não tem qualquer significado.

Tabela 3.5 – Decomposição da MEE da Fig 3.3 (do sistema HQ-$Al^{3+}$, com uma $[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45x10^{-5}$ mol/L e pH = 5,6) em espectros puros ($COMP1^{dimensão}$ (—), $COMP2^{dimensão}$ (·····) e $COMP3^{dimensão}$ (–·–)). Os resíduos são obtidos por diferença entre a MEE original e a MEE reproduzida com os respectivos componentes.

| Número de componentes | Espectros puros | | Resíduos |
|---|---|---|---|
| | Em | Ex | |
| 1 |  |  |  |
| 2 |  |  |  |
| 3 |  |  |  |

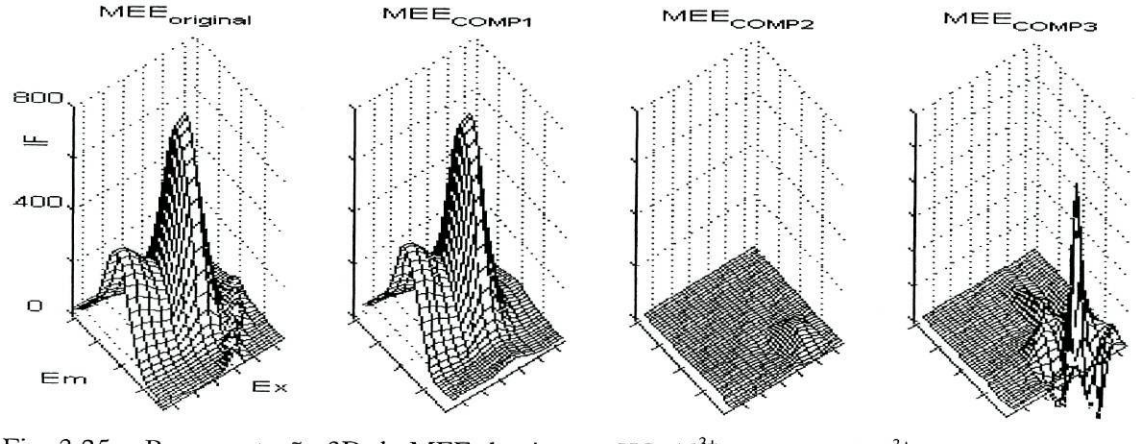



Fig. 3.25 – Representação 3D da MEE do sistema HQ-$Al^{3+}$, com uma $[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45x10^{-5}$ mol/L e pH = 5,6) – $MEE_{original}$, e das reproduzidas com os componentes 1 ($MEE_{COMP1}$), 2 ($MEE_{COMP2}$) e 3 ($MEE_{COMP3}$) da decomposição da Tabela 3.5.

## 3.4.2 - **Critérios de avaliação**

Visto estarmos no espaço a duas dimensões, a resposta IF é a terceira na qual ainda nos é possível visualizar através de representações 3D. Mas se incorporarmos uma ou mais novas dimensões, por exemplo a $[Al^{3+}]_{total}$, a sua representação 4D, 5D, etc, torna-se bastante incómoda e de difícil avaliação. Interessa, então, referir alguns critérios de avaliação do modelo PARAFAC que sejam simples e, principalmente, se torne fácil a sua visualização.

Na Tabela 3.6 encontram-se os critérios de avaliação para o resultado da aplicação do PARAFAC à MEE da Fig. 3.3 ou seja para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$.

Tabela 3.6 - Parâmetros de avaliação para o modelo de PARAFAC.

| nº componentes | | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|---|
| PARAFAC | it | 2 | 2 | 2 |
| | err | $6,7x10^{+5}$ | $3,7x10^{+5}$ | $2,2x10^{+5}$ |
| | corcondia | 100 | 100 | 100 |
| CORCOND | T | 1 | 24,8668 0<br>0 7,8580 | 24,8668 0 0<br>0 7,8580 0<br>0 0 7,3317 |
| | G | 1 | 24,8668 -0,000C<br>0,0000 7,8580 | 24,8668 0,0000 -0,0000<br>-0,0000 7,8580 -0,0000<br>0,0000 0,0000 7,3317 |
| | stdG | 0,0139 | 0,3450 1,0917<br>1,0917 7,8580 | 0,3452 1,0922 1,1706<br>1,0922 3,4564 3,7045<br>1,1706 3,7045 3,9704 |
| NCROSSDECOMP | Fit | 99,50 | 99,68 | 99,81 |
| | Xval | 99,42 | 99,33 | 99,02 |

Com o PARAFAC é possível calcular, para além dos respectivos espectros puros, três parâmetros que servem de critério de avaliação.

O número de iterações, **it**, em que um grande it pode significar um mau ajuste ou mesmo a não convergência dos métodos numéricos caso o it seja de 2500, valor ao fim do qual o PARAFAC apresenta o conjunto de soluções sem ter atingido o valor óptimo. O aumento do número de componentes implica modelar sinal (variância) cada vez mais pequeno, o que tem como consequência o aumento do it.

A visualização directa da diferença entre os valores originais e os reproduzidos seria o método mais indicado (matriz de resíduos) mas, como foi dito anteriormente, se se usar um grande número de variáveis, a matriz de resíduos seria uma representação "número de variáveis mais uma" dimensão, o que é inviável sob o ponto de vista prático. No entanto, pode reduzir-se a matriz de resíduos a um escalar, calculando o somatório do quadrado dos resíduos, **err**. Este valor pode servir de termo de comparação entre modelos com número de componentes diferentes, mas não como um termo isolado porque a grandeza do err depende da grandeza do conteúdo da matriz original e, principalmente, do tamanho da matriz em questão. O err diminui sempre com o aumento do número de componentes e a sua análise pode ser feita, por exemplo, pela quantidade de err que diminui em cada incremento do número de componentes. No nosso caso, quando se passa de 1 para 2 componentes o err diminui 44,8% e quando se passa de 2 para o 3 componentes o err diminui 40,5%, sendo a diminuição entre o primeiro e terceiro de 67,2%.

O parâmetro **corcondia** (**COR**e **CON**sistency **DIA**gnostics) é um teste que prova quanto, em percentagem, o núcleo é diferente da matriz elemento neutro do produto matricial . O núcleo é o de elemento neutro da multiplicação. Suponhamos que em determinada técnica deveria obter-se (o valor escalar – logo a uma dimensão) de 9,0, se na medição acusar o valor 10,0, sem qualquer outro tipo de consideração, pode dizer-se que o valor 9,0 continua a verificar-se porque o seu elemento neutro da multiplicação (que é 1, lembrando que 9,0x**1**=9,0) foi destorcido para um valor diferente do unitário. A nossa medição é 10,0, logo o valor 9,0 é obtido pelo produto do resultado 10,0 pelo núcleo, agora, destorcido do seguinte modo: 10,0x**0,90**=9,0. Então este 0,90 representa a distorção do núcleo ao valor unitário que apenas contém 90% do elemento neutro da multiplicação. O valor máximo do parâmetro corcondia é 100%.

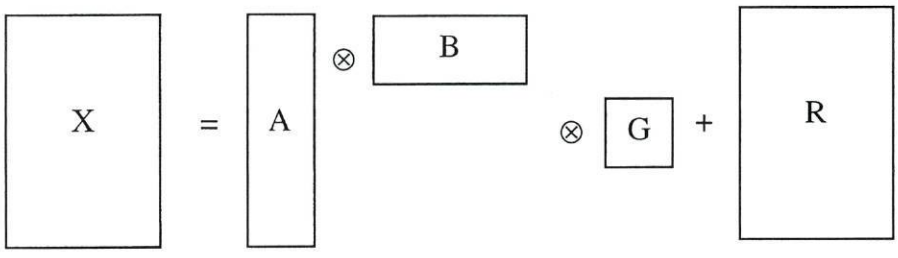
Na Tabela 3.6, para testar o modelo usou-se, ainda, mais duas subrotinas o CORCOND e o NCROSSDECOMP.

O CORCOND testa os espectros puros obtidos no PARAFAC e devolve, para além do **corcondia** atrás explicado, a matriz do núcleo que satisfaz a integridade do produto matricial, matriz alvo **T**, a matriz que é possível obter com os componentes calculados, matriz distorcida **G** e a incerteza associada a esta matriz distorcida **G**, **stdG**. Na prática o **corcondia** é suficiente para avaliar a consistência do núcleo e o valor óptimo é 100%.

No calculo matricial este núcleo, **G**, pode ser visto como:

$$X = A \otimes B \otimes G + R \qquad [3.24]$$

esquematicamente a duas dimensões:




onde X e R têm o mesmo tamanho mxn, A e B obedecem à regra da multiplicação matricial, A mxp e B pxn, e **G** de tamanho pxp.

O NCROSSDECOMP é uma subrotina que permite retirar informação quanto ao ajuste, a percentagem de ajuste, **Fit**, que é o **err** em forma percentual que cada componente contém, onde 100% corresponde a um ajuste total. E, o mais importante, o **Xval** que consiste em testar os espectros puros em diferentes escalas, é um teste para verificar se a parte é igual ao todo . Para isso, são calculado vários espectros puros obtidos de matrizes incompletas, a partir da matriz de dados original, e testada a sua igualdade, o resultado vem em percentagem de igualdade para cada componente.

### 3.4.3 - **PARAFAC a n dimensões**

O PARAFAC permite trabalhar com dados a n dimensões, sendo o n superior a 2, o formalismo matemático é o mesmo que a duas dimensões com a ressalva da dificuldade de visualização dos dados num todo. Então, cada conjunto de dados vai ser decomposto em espectros puros, de tal modo que se verifique:

$$X = A \otimes B \otimes C \otimes ... \otimes N + R \qquad [3.25]$$

onde N representa a n ésima dimensão e cada elemento de X é $X_{(i,j,...,n)}$, sendo obtido do seguinte modo:

$$X_{(i,j,...,n)} = \sum_{q=1}^{p} A_{(i,q)} \cdot B_{(q,j)} \cdot ... \cdot N_{(n,q)} + R_{(i,j,...,q)} \qquad [3.26]$$

onde q é o q ésimo componente e R o resíduo.

O sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ a 3 dimensões (Ex, Em e $[Al^{3+}]_{total}$) (Fig. 3.5) aplicando o PARAFAC origina os espectros da Fig. 3.26 a um componente e Fig. 3.27 a dois componentes, os respectivos critérios de avaliação encontram-se na Tabela 3.7.

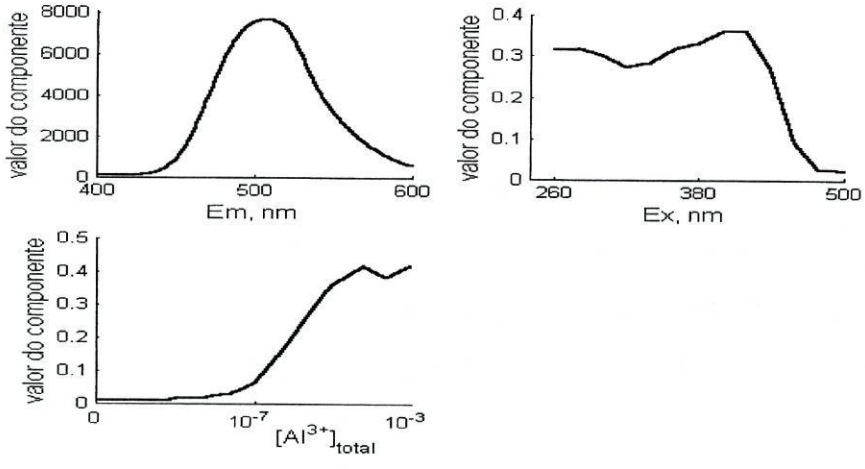



Fig. 3.26 - Decomposição da matriz de dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ em 1 componente.

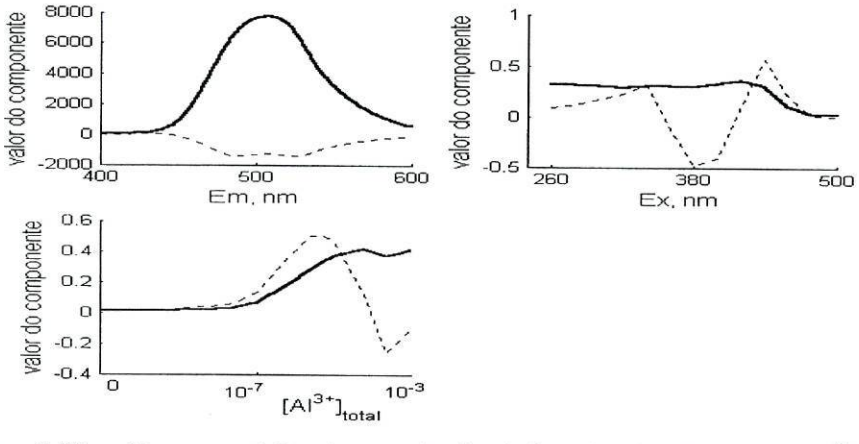



Fig. 3.27 - Decomposição da matriz de dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ em 2 componentes. COMP1 (linha a cheio), COMP2 (linha a tracejado).

Tabela 3.7 - Parâmetros de avaliação para a decomposição da matriz de dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$.

| | componente nº | 1 | 2 |
|---|---|---|---|
| PARAFAC | it | 4 | 2 |
| | err | $2,80x10^{+8}$ | $4,72x10^{+7}$ |
| | corcondia | 100 | 100 |
| NCROSSDECOMP | Fit | 95,71 | 98,82 |
| | Xval | 95,43 | 98,75 |

Este sistema é satisfatoriamente traduzido por um único componente. A introdução do segundo (para além de conter partes negativas em todas as dimensões) não traz melhorias significativas, por exemplo, a quantidade de ajuste Fit passa de 95.7 para 98,8%.

Na Fig. 3.28 está representada a MEE para uma $[Al^{3+}]_{total}$ de $2,45x10^{-5}$ mol/L, $MEE_{original}$, contra a MEE reproduzida com 1 componente para a mesma concentração, $MEE_{reproduzida}$. A dificuldade do PARAFAC modelar o maior pico na $MEE_{original}$ prende-se ao facto de nesta zona onde as MEE, para grandes $[Al^{3+}]_{total}$, atingiram o valor máximo da IF (Fig. 3.5), logo existe uma determinada quantidade de $MEE^s$ que não apresenta variação, ou seja, o seu peso relativo vem diminuído, não sendo incorporado no componente remetendo esta para o segundo componente, Fig. 3.29. Esta é a principal desvantagem da modelação com o PARAFAC, não é possível trabalhar com matrizes de dados incompletas, sendo obrigatório terem todas as folhas de MEE igual tamanho.

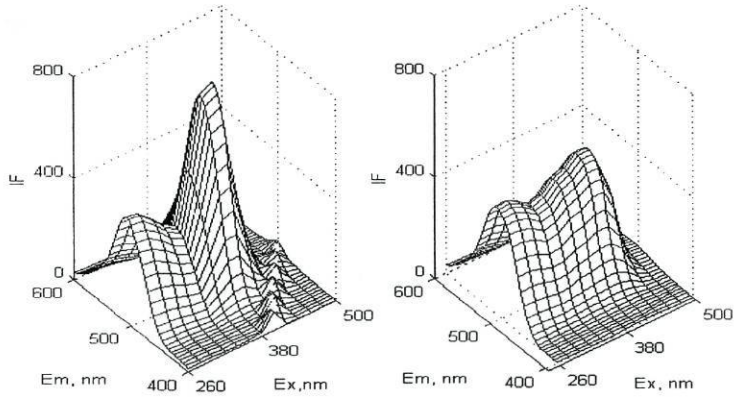



Fig. 3.28 - Representação da MEE para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ original, esquerda, e a MEE reproduzida com um componente para a mesma concentração, direita.

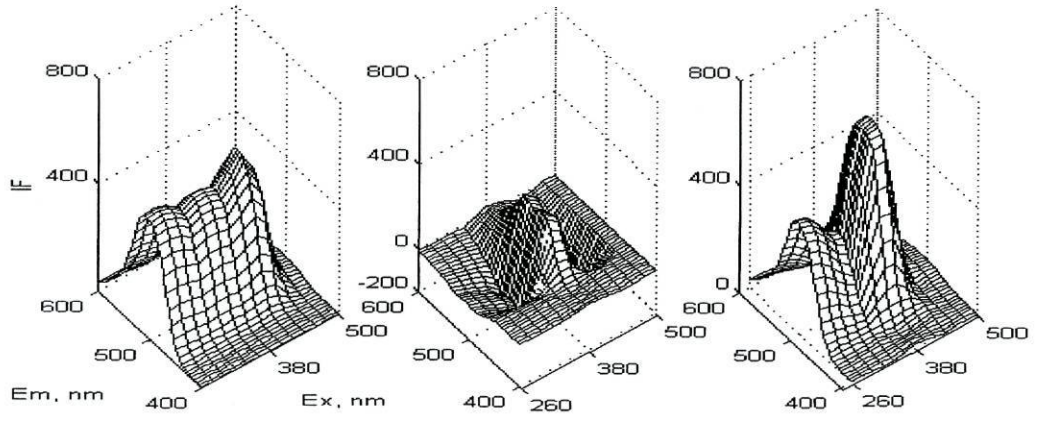



Fig. 3.29 - Representação da MEE reproduzidas para o sistema HQ-$Al^{3+}$, mais à esquerda reprodução com o primeiro componente, ao centro com o segundo componentes e à direita a reprodução com os dois componentes.

Excluindo, agora as $MEE^s$ com valores "forçados", as $[Al^{3+}]_{total}$ superiores a $4{,}90x10^{-5}$ mol/L (usando apenas as 11 primeiras), recalculando os espectros puros através do PARAFAC, origina a Fig. 3.30 para um componente, a Fig. 3.31 para dois componentes e a Fig. 3.32 para três componentes.

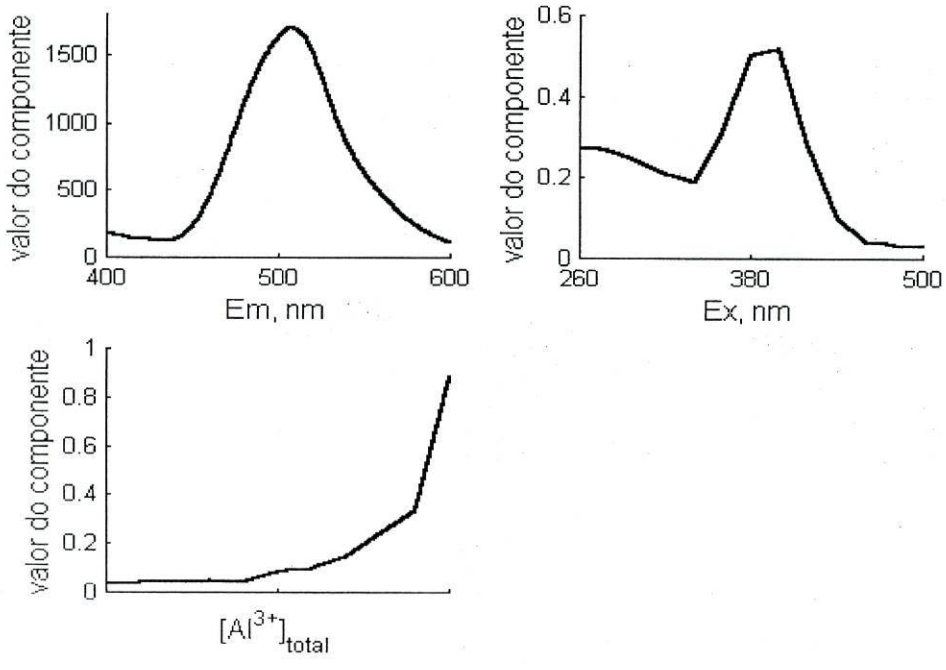



Fig. 3.30 - Espectros puros da decomposição da matriz de dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ (usando apenas os 11 primeiros valores de concentração) em 1 componente.

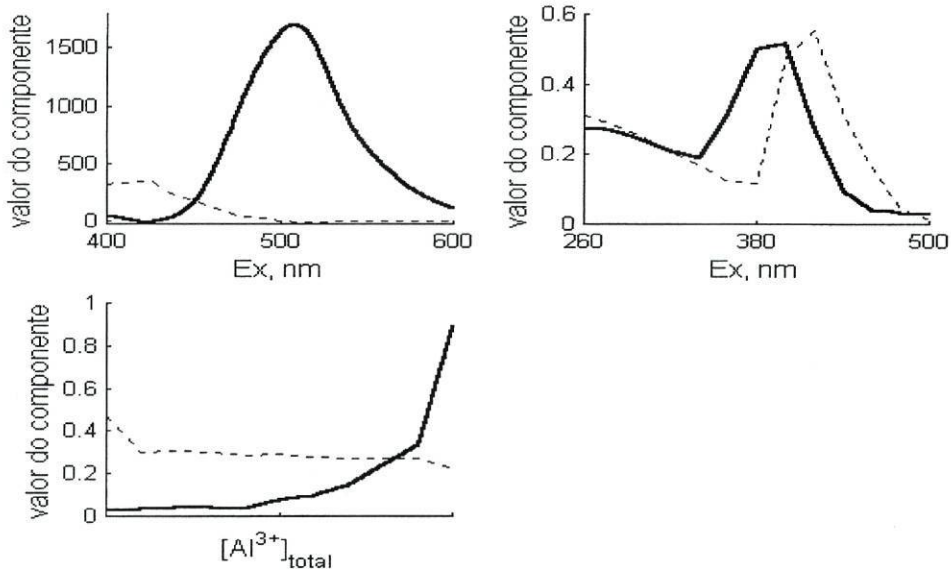



Fig. 3.31 Espectros puros da decomposição da matriz de dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ (usando apenas os 11 primeiros valores de concentração) em 2 componentes. $COMP1^{dimensão}$ (——) e $COMP2^{dimensão}$ (·····).

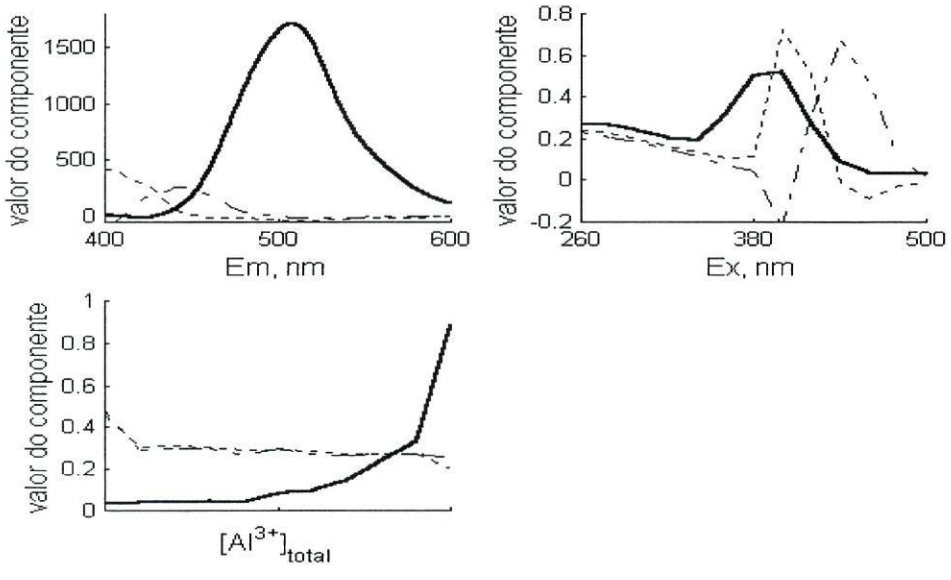



Fig. 3.32 - Espectros puros da decomposição da matriz de dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ (usando apenas os 11 primeiros valores de concentração) em 3 componentes. $COMP1^{dimensão}$ (——), $COMP2^{dimensão}$ (·····) e $COMP3^{dimensão}$ (–·–).

Na Tabela 3.8 encontra-se a reprodução das MEE correspondentes à $[Al^{3+}]_{total}$ de $2{,}45 \times 10^{-5}$ mol/L, onde pode ver-se que o COMP1 continua a representar a maior quantidade de IF, o COMP2 representa a zona da MEE onde ocorre dispersão de primeira ordem e o COMP3 não tem qualquer significado físico, na Fig. 3.32 pode ver-

se que o $COMP3^{Ex}$ contem uma boa parte negativa. Analisando, agora, os critérios de avaliação (Tabela 3.9) verifica-se que o parâmetro corcondia baixou para 69% quando se passa de 2 para 3 componentes, ou seja, o núcleo já foi demasiadamente "distorcido". Concluindo-se que, excluindo as $MEE^s$ com valores de IF que excedam as 1000 unidades, este sistema pode ser representado por dois componentes, sendo o primeiro o sinal da responsabilidade do complexo que se está a formar – fenómeno de fluorescência – e o segundo componente uma espécie de linha de base – fenómenos não fluorescentes.

Tabela 3.8 - Reprodução das $MEE^s$ com os espectros puros obtidos com o PARAFAC para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ para as 11 primeiras concentrações. As $MEE^s$ debaixo do $COMPp^{dimensão}$ correspondem à reprodução usando apenas o p componente e a MEE global é o somatório das $MEE^s$ com os respectivos componentes.

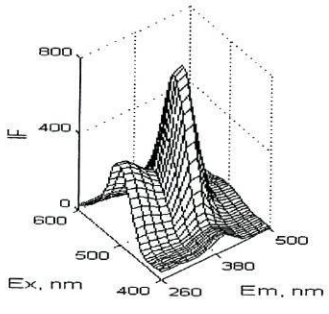
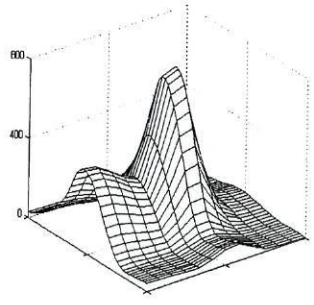
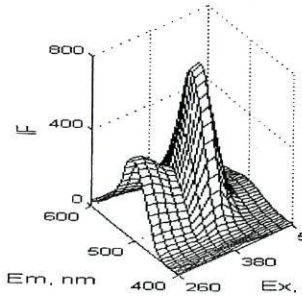
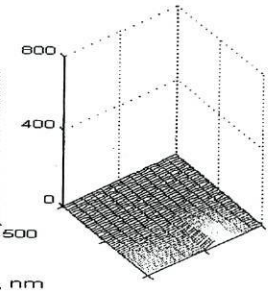
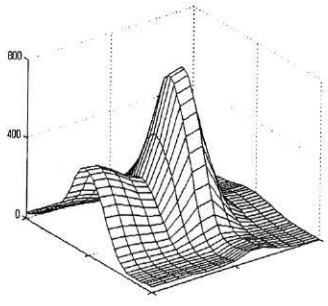
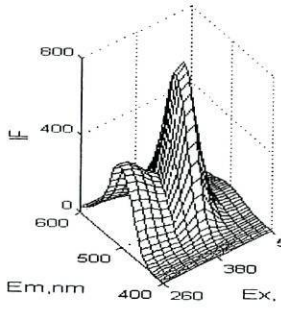
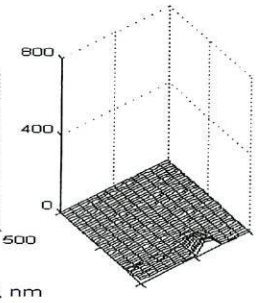
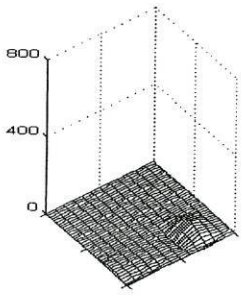
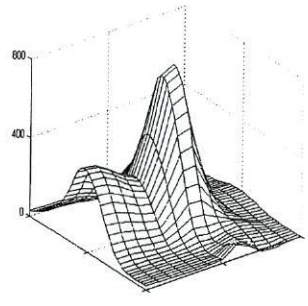
| COMP1 | COMP2 | COMP3 | MEE global |
|---|---|---|---|
|  | | |  |
|  |  | |  |
|  |  |  |  |

Tabela 3.9 - Parâmetros de avaliação para a modelação com o PARAFAC às MEE$^{s}$ do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ em 1, 2 e 3 componentes.

| nº de componentes | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| it | 3 | 2 | 58 |
| err | $1{,}66x10^{+7}$ | $8{,}90x10^{+6}$ | $5{,}54x10^{+6}$ |
| corcondia | 100 | 100 | 69,48 |
| Fit | 90,64 | 93,91 | 96,21 |
| Xval | 90,60 | 93,73 | 96,05 |

## 3.5 - **Curvas de calibração e constantes condicionais**

Todas as modelações descritas atrás têm como finalidade obter uma ou várias relações entre os valores conhecidos das concentrações de um analíto com o sinal, perfis de concentração (Fig$^{s}$.3.7, 3.8, 3.12, 3.19, 3.26, 3.27, 3.30, 3.31 e 3.32).

Estes perfis de concentração podem ser usados na calibração do equipamento, bastando para isso, seleccionar a gama de concentrações onde a resposta é mais linear e aplicar a lei de Lambert-Beer modificada, ou seja, procurar a existência de gama de concentrações em que o parâmetro função da concentração, $a_i$ ou $COMPp^{[Al^{3+}]_{total}}$, varia linearmente com a variação de uma qualquer relação matemática do conhecido valor da concentração, por exemplo função da concentração, do logaritmo da concentração, etc.

# 4 - **Resultados experimentais**

Neste capítulo são descritos os resultados da modelação das MEE$^s$ a HG e a espectros puros dos diferentes sistemas, sendo o principal objectivo a obtenção de relações da concentração total do catião, em estudo, com uma qualquer relação passível de ser recolhida nos dois métodos de modelação (os $a_{(Ex;Em)}$, termos pré-exponenciais, da eq[3.14] dos possíveis fenómenos de fluorescência e os p componentes da dimensão concentração, eq[3.26], que melhor representam as MEE$^s$ originais).

Discute-se, também, as particularidades de cada sistema como a separação do sinal em diferentes curvas isoladas (ou mais propriamente às colinas visto estarmos a trabalhar numa superfície tridimensional, MEE), as propriedades fotoquímicas associadas a cada colina (supostamente a cada fenómeno) e a remoção do ruído de fundo. O uso de duas metodologias diferentes permitiu elucidar mutuamente o fenómeno da fluorescência, e nenhuma das metodologias é suficiente e autónoma para caracterizar os sistemas fluorescentes mas complementam-se.

## 4.1 - **Sistema Morin-$Al^{3+}$**

### 4.1.1 - **MEE**

Este sistema tem cinco dimensões: duas internas (Ex e Em), duas externas ($[Al^{3+}]_{total}$ e o valor de pH) e a quinta é a IF. Uma possível representação deste sistema pentadimensional (5D) é fazer a representação das $MEE^s$ no espaço das variáveis externas (Fig. 4.1).

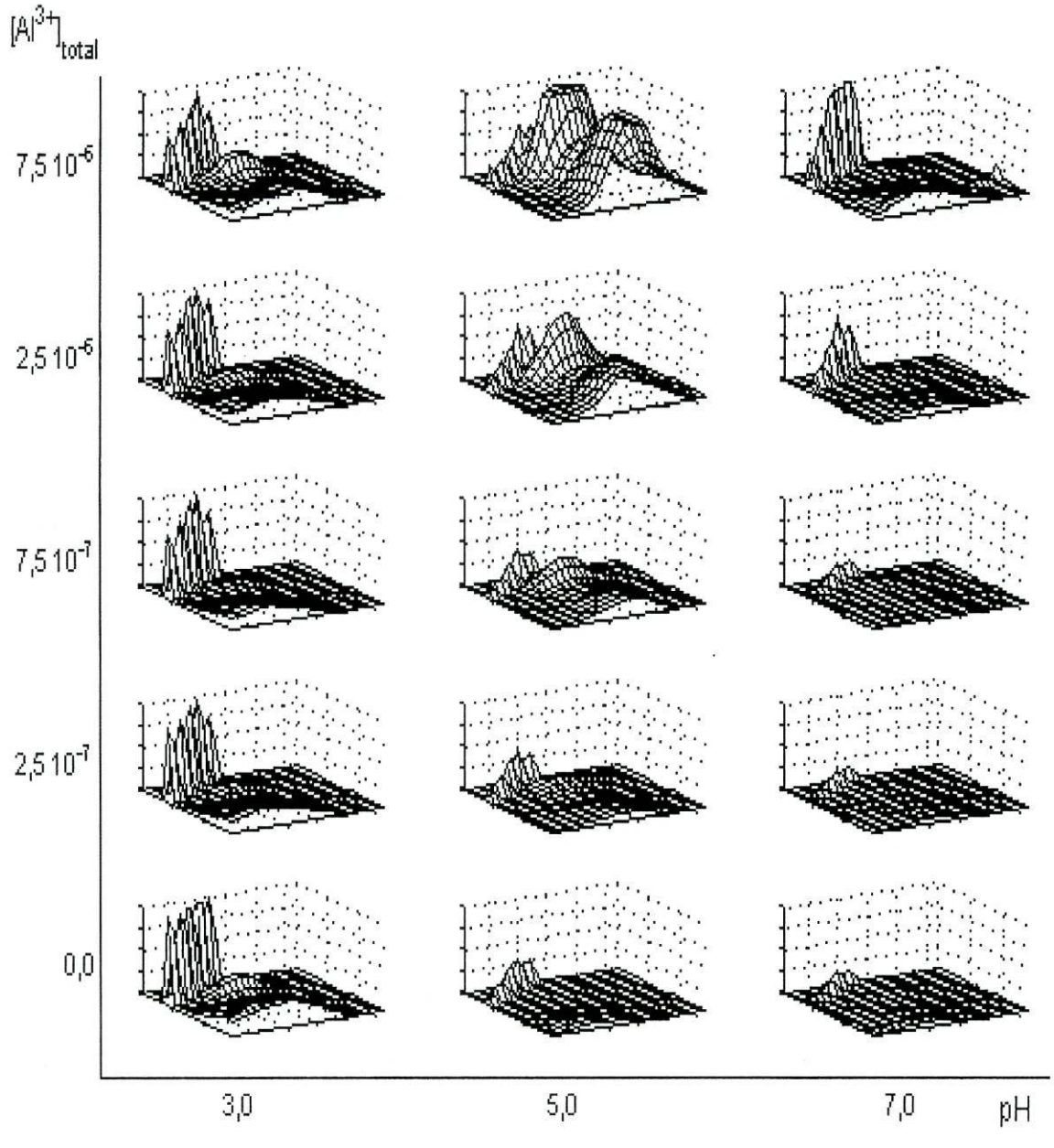



Fig. 4.1 – Representação 5D dos resultados do sistema morin-$Al^{3+}$. Apenas se representou os valores de pH e da $[Al^{3+}]_{total}$ (mol/L) assinalados. Cada representação 3D é composta pelas IF (eixo vertical de 0 a 1000 unidades de IF), Ex (eixo do lado esquerdo, de 200 a 480 nm) e Em (eixo do lado direito, de 400 a 600 nm). As $MEE^s$ que faltam são superfícies intermédias entre cada representação.

Na Fig. 4.1 pode ver-se que o aumento da $|Al^{3+}|_{total}$, qualquer que seja o valor de pH, provoca o crescimento dos picos na superfície das $MEE^s$ e a dependência com a $|H^+|$ apresenta um máximo para valores de pH à volta do valor 5.

Fazendo as representações (ampliadas) das $MEE^s$, para o valor de pH onde se verifica maior variação de sinal (pH 5,0), correspondente à $|Al^{3+}|_{total}$ de $1{,}17x10^{-7}$ mol/L (Fig. 4.2) e $5{,}02x10^{-6}$ mol/L (Fig. 4.3), pode constatar-se a existência de duas colinas, situando-se: uma dentro da janela de observação e outra fora da janela de observação. A representação por contornos da Fig. 4.3 (Fig. 4.4) permite confirmar a existência destas duas colinas, para além da colina correspondente à dispersão de primeira ordem.

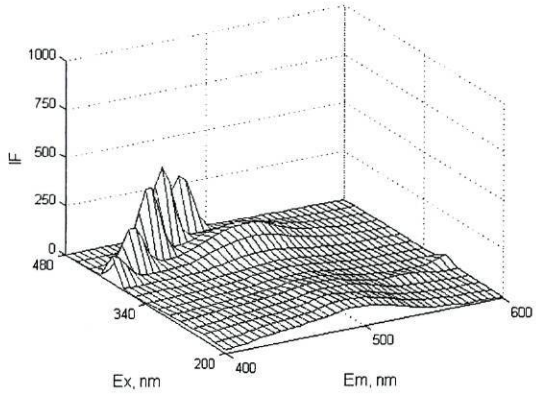



Fig. 4.2 – Representação 3D dos dados do sistema Morin-$Al^{3+}$ para a $|Al^{3+}|_{total}$ de $1{,}17x10^{-7}$ mol/L quando o valor de pH é 5,0.

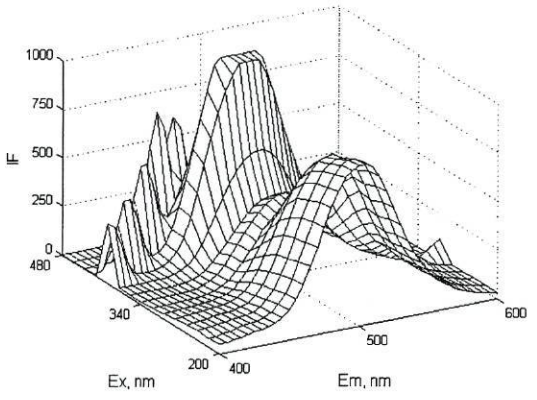



Fig. 4.3 – Representação 3D dos dados do sistema Morin-$Al^{3+}$ para uma $|Al^{3+}|_{total}$ de $5{,}02x10^{-6}$ mol/L quando o valor de pH é 5,0.

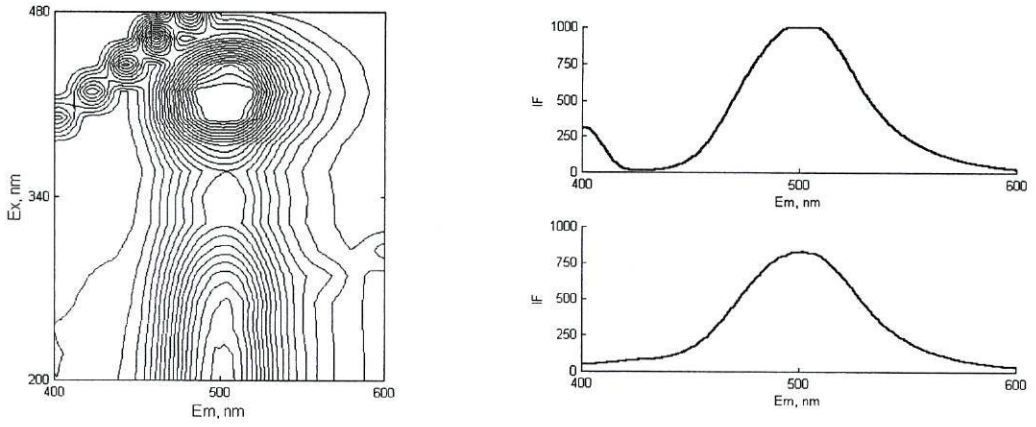



Fig. 4.4 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.3 (esquerda) e dos espectros de emissão quando o Ex é 440 nm (direita cima) e o Ex é 200 nm (direita baixo).

## 4.1.2 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

Após a remoção das dispersões de primeira, segunda ordem e de todas as IF cujo valor excedia 950 unidades relativas de fluorescência, foi possível modelar duas HG: uma dentro da janela de observação e uma segunda fora.

Os centros dependem do valor da concentração do catião $H^+$, sendo necessário descriminar os cinco centros e as respectivas larguras das $HG^s$, a expressão matemática para o valor de pH 3,0 fica definida por:

$$MEE = HG_{(412,5;492)} + HG_{(176;451)}$$

onde

$$HG_{(412,5;492)} = a_{(412,5;492)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-492)^2}{1400} - \frac{(Ex-412,5)^2}{1120} \right)$$

HG no interior da janela de observação e

$$HG_{(176;451)} = a_{(176;451)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-451)^2}{5000} - \frac{(Ex-176)^2}{17000} \right)$$

HG no exterior da janela de observação. Na Tabela 4.1 encontram-se todos os parâmetros para os diferentes valores de pH. Com estes centros e respectivas larguras é possível recolher os termos pré-exponenciais (Tabela 4.2) cuja representação em função da $|Al^{3+}|_{total}$ é o perfil de concentrações apresentado na Fig. 4.5.

Tabela 4.1 – Parâmetros do ajuste a $HG^s$ das $MEE^s$ do sistema Morin-$Al^{3+}$ a duas HG. Junto de cada valor encontra-se a respectiva imprecisão.

| pH | HG no interior da janela de observação | | | | HG no exterior da janela de observação | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{Ex}$ | $b_{\overline{Ex}} x10^{-2}$ | $\overline{Em}$ | $b_{\overline{Em}} x10^{-2}$ | $\overline{Ex}$ | $b_{\overline{Ex}} x10^{-3}$ | $\overline{Em}$ | $b_{\overline{Em}} x10^{-3}$ |
| 3,0 | 412,5±0,8 | 11,2±0,8 | 492±2 | 14±2 | 176±18 | 17±1 | 451±11 | 5±1 |
| 4,0 | 413,8±0,5 | 13±1 | 495,9±0,9 | 12,9±0,4 | 200±10 | 14±1 | 472±20 | 4,2±0,4 |
| 5,0 | 419±1 | 13,4±0,2 | 504,2±0,3 | 14,6±0,2 | 203±9 | 22±2 | 500±2 | 2,0±0,4 |
| 6,1 | 424±3 | 17±1 | 511,4±0,7 | 13,4±0,4 | 170±10 | 21±1 | 484±8 | 4,1±0,5 |
| 7,1 | 404±16 | 34±8 | 512±2 | 24±7 | 179±22 | 19±2 | 480±9 | 4,0±0,4 |

Tabela 4.2 – Valor dos termos pré-exponenciais. Por baixo de cada valor de pH está o valor do parâmetro $R^2_{Gaussiana}$ do perfil de concentrações ($R^2_{Gaussiana}$ global) e por baixo de cada par de pré-exponenciais está o respectivo parâmetro $R^2_{Gaussiana}$.

| $[Al^{3+}]_{total}$, mol/L | pH=3,0 | | pH=4,0 | | pH=5,0 | | pH=6,1 | | pH=7,1 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,9568 | | 0,7791 | | 0,9693 | | 0,9242 | | 0,8925 | |
| | $a_{(412,5;492)}$ | $a_{(176;451)}$ | $a_{(413,8;495,9)}$ | $a_{(200;472)}$ | $a_{(419;504,2)}$ | $a_{(203;500)}$ | $a_{(424;511,4)}$ | $a_{(170;484)}$ | $a_{(404;512)}$ | $a_{(179;480)}$ |
| 0,00 | 193±1 | 337,4±0,9 | 7±2 | 170±1 | 13±1 | 54,9±0,7 | 7±1 | 167±1 | 16,7±0,2 | 65,6±0,2 |
| | 0,9510 | | 0,7261 | | 0,1610 | | 0,7451 | | 0,9493 | |
| $1,17x10^{-7}$ | 81,1±0,6 | 265,5±0,4 | 35±1 | 162,0±0,9 | 106,5±0,7 | 107,6±0,5 | 31,1±0,7 | 133,0±0,5 | 22,7±0,1 | 56,3±0,1 |
| | 0,9796 | | 0,7820 | | 0,8702 | | 0,8881 | | 0,9388 | |
| $2,65x10^{-7}$ | 54,0±0,5 | 220,1±0,3 | 75±1 | 163,6±0,7 | | | 54,3±0,5 | 139,7±0,3 | 24,8±0,2 | 66,6±0,2 |
| | 0,9827 | | 0,8567 | | * | | 0,9513 | | 0,9346 | |
| $5,00x10^{-7}$ | 44,6±0,5 | 200,1±0,4 | 136,0±0,8 | 186,4±0,5 | 184,2±0,6 | 155,5±0,4 | 92,3±0,4 | 138,3±0,3 | 26,6±0,2 | 70,2±0,2 |
| | 0,9703 | | 0,9384 | | 0,9601 | | 0,9647 | | 0,9070 | |
| $7,50x10^{-7}$ | 43,3±0,6 | 204,2±0,4 | 198,5±0,6 | 198,1±0,4 | 264,6±0,6 | 206,0±0,4 | 106,8±0,6 | 128,3±0,4 | 30,1±0,2 | 58,5±0,2 |
| | 0,9696 | | 0,9758 | | 0,9798 | | 0,9247 | | 0,9151 | |
| $1,05x10^{-6}$ | 50,4±0,5 | 193,5±0,4 | 277,3±0,8 | 232,5±0,5 | 356,1±0,8 | 269,4±0,5 | 87,2±0,4 | 119,1±0,3 | 31,4±0,2 | 58,9±0,2 |
| | 0,9682 | | 0,9699 | | 0,9826 | | 0,9465 | | 0,9059 | |
| $2,47x10^{-6}$ | 119,0±0,4 | 211,1±0,3 | 621±3 | 349±2 | 684±1 | 503±1 | 92,0±0,4 | 163,6±0,3 | 29,0±0,2 | 93,5±0,2 |
| | 0,9842 | | 0,9076 | | 0,9848 | | 0,9749 | | 0,9477 | |
| $5,02x10^{-6}$ | 201,1±0,8 | 544,5±0,6 | 1178±9 | 568±3 | 1089±3 | 798±2 | 178,9±0,9 | 277,8±0,6 | 19,4±0,6 | 145,1±0,6 |
| | 0,9560 | | 0,8089 | | 0,9779 | | 0,9537 | | 0.8792 | |
| $7,76x10^{-6}$ | 286±2 | 260±1 | 1708±18 | 733±7 | 1500±7 | 1063±3 | 315±2 | 426±1 | 21,8±0,8 | 208,1±0,8 |
| | 0,9041 | | 0,6907 | | 0,9577 | | 0,9376 | | 0,8736 | |

* esta MEE foi omitida pelo facto de se ter perdido os dados.

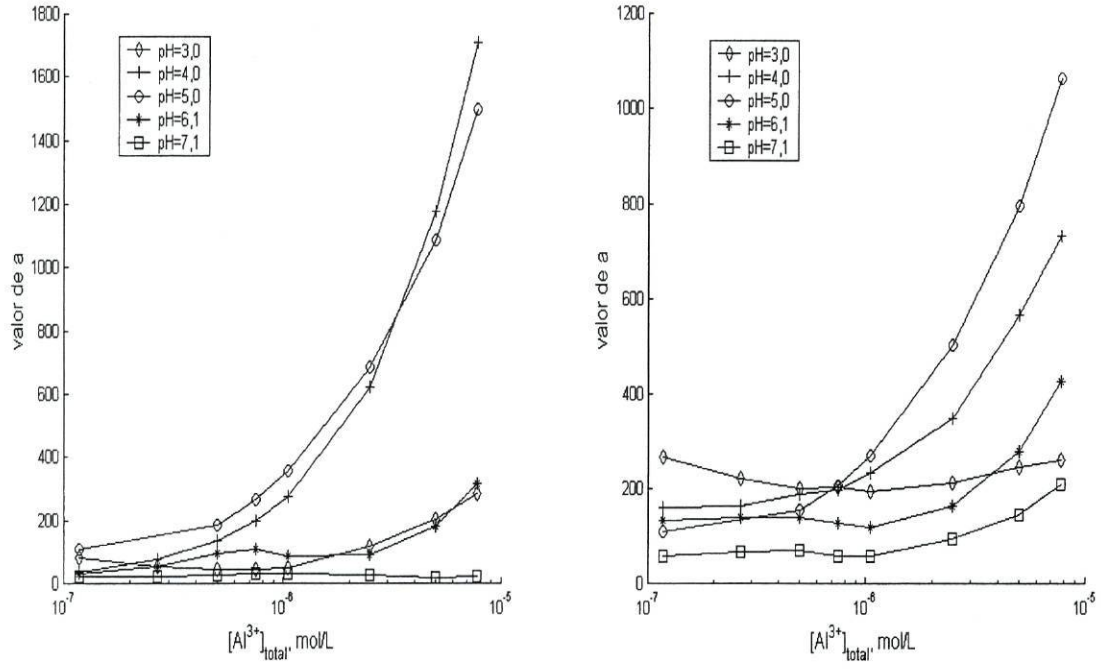



Fig. 4.5- Representação dos perfis de concentração para o sistema morin-$Al^{3+}$ para os diferentes valores de pH. Figura à direita perfis de concentração da HG que se encontra no interior da janela de observação e na figura à esquerda os perfis de concentração da HG fora da janela de observação.

## 4.1.3 - **MEE decompostas em espectros puros**

O sistema morin-$Al^{3+}$ é decomposto em componentes (Tabela 4.3) de cuja análise dos parâmetros de avaliação (Tabela 4.4) se conclui que 2 componentes são suficientes para descrever a variância dos dados originais, logo apenas se representou a decomposição até mais um componente do número total de componentes que o sistema pode ser traduzido.

Tabela 4.3 – Decomposição em espectros puros das MEE[s] do sistema morin-$Al^{3+}$ usando o PARAFAC, para os diferentes valores de pH.

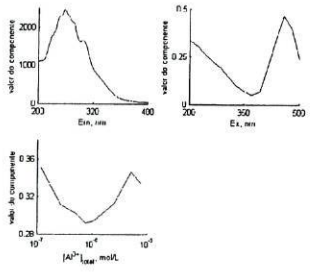
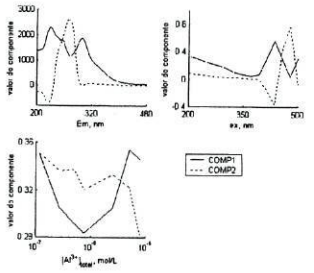
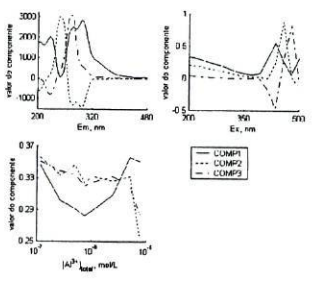
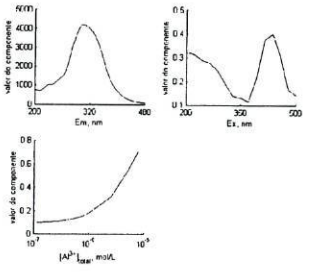
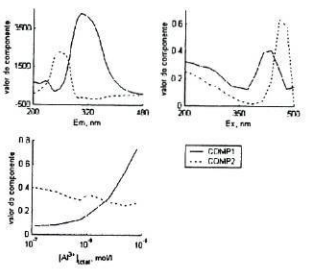
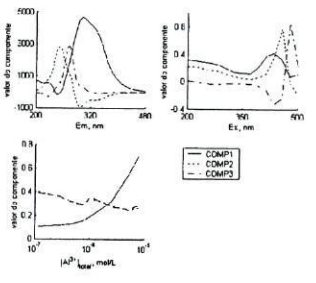
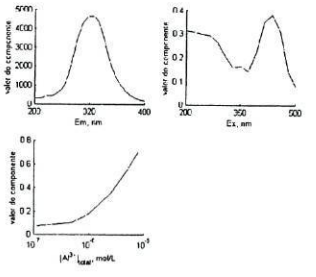
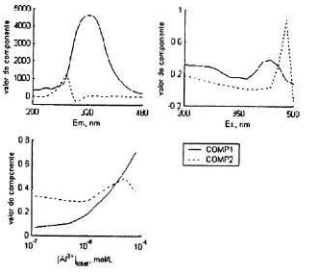
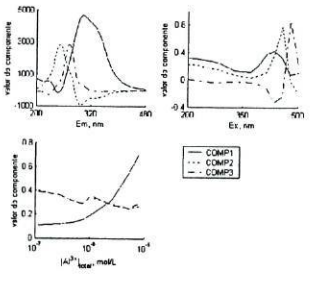
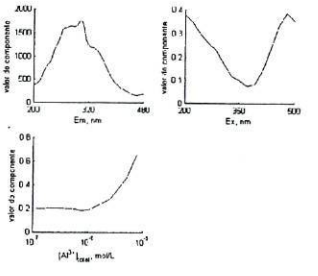
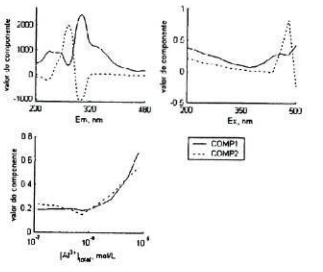
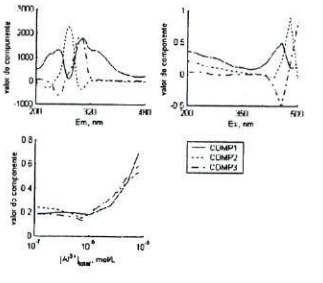
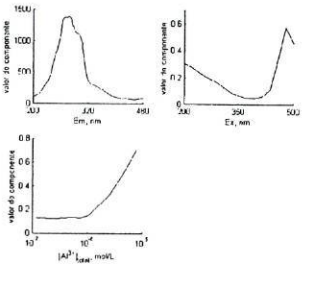
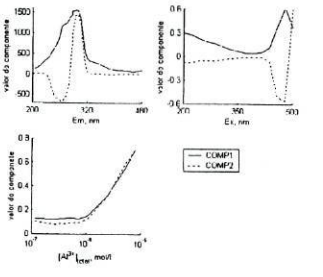
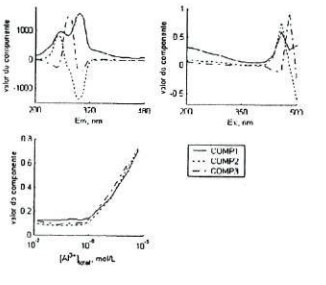
| pH | 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|---|
| 3,0 |  |  |  |
| 4,0 |  |  |  |
| 5,0 |  |  |  |
| 6,1 |  |  |  |
| 7,1 |  |  |  |

Tabela 4.4 – Critérios de avaliação da decomposição do sistema morin-$Al^{3+}$ resumida na Tabela 4.3.

| | | pH=3,0 | pH=4,0 | pH=5,0 | pH=6,1 | pH=7,1 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 componente | It | 6 | 4 | 3 | 5 | 4 |
| | err | $7,26x10^{8}$ | $6,74x10^{8}$ | $1,11x10^{8}$ | $3,26x10^{8}$ | $1,65x10^{8}$ |
| | corcondia | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| | Fit | 31,98 | 51,44 | 91,19 | 35,62 | 38,84 |
| | Xval | -25,48 | 54,35 | 90,36 | -30,54 | -44,06 |
| 2 componentes | It | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | err | $4,93x10^{8}$ | $4,33x10^{8}$ | $7,52x10^{7}$ | $2,12x10^{8}$ | $9,30x10^{7}$ |
| | corcondia | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| | Fit | 54,61 | 71,13 | 94,13 | 62,07 | 69,41 |
| | Xval | -1599 | 35,55 | 89,70 | -719 | -319 |
| 3 componentes | It | 2 | 10 | 14 | 22 | 93 |
| | err | $2,73x10^{8}$ | $2,63x10^{8}$ | $4,73x10^{7}$ | $1,06x10^{8}$ | $3,89x10^{7}$ |
| | corcondia | 70,9 | 22,0 | 28,85 | 75,77 | 94,88 |
| | Fit | 73,47 | 82,65 | 96,54 | 80,40 | 89,21 |
| | Xval | -214 | -85,33 | 76,60 | -159 | -97,34 |

## 4.1.4 – **Reprodução das MEE$^{s}$**

Na Fig. 4.6 estão as representações da $HG_{(419;504,2)}$, HG dentro da janela de observação, e a $HG_{(203;500)}$, HG fora da janela de observação, para a $|Al^{3+}|_{total}$ de $1,17x10^{-7}$ mol/L e o valor de pH de 5,0, cujo soma, de $HG_{(419;504,2)}$ com $HG_{(203;500)}$ - eq[3.13] com apenas os termos das eq[3.14], origina a MEE reproduzida para estas condições.

Na Fig. 4.7 encontram-se as mesmas representação mas agora para a $|Al^{3+}|_{total}$ de $5,02x10^{-6}$ mol/L e o mesmo valor de pH.

Com este ajuste, no qual se eliminou deliberadamente as zonas correspondentes às dispersões que, e como tal, não vêm reproduzidas, é possível isolar os fenómenos dentro da zona de fluorescência. Na Fig. 4.8 está a representação da diferença entre as MEE$^{s}$ modeladas com HG$^{s}$ e as MEE$^{s}$ originais; para o exemplo da Fig. 4.2 e Fig. 4.3, esta matriz de resíduos é uma possível representação do ruído de fundo e das dispersões.

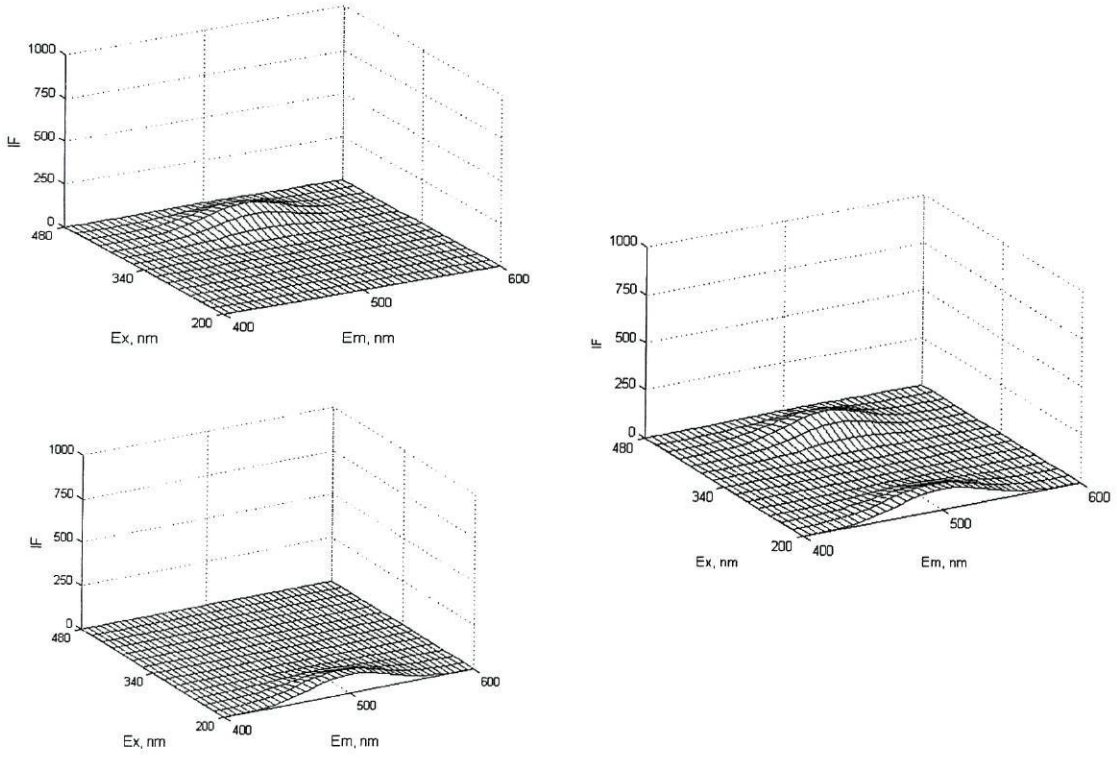



Fig. 4.6 – Representação das MEE$^s$ reproduzidas para o valor da concentração de alumínio da Fig. 4.2. Esquerda em cima é a $HG_{(419;504,2)}$, esquerda em baixo a $HG_{(203;500)}$ e à direita a MEE.

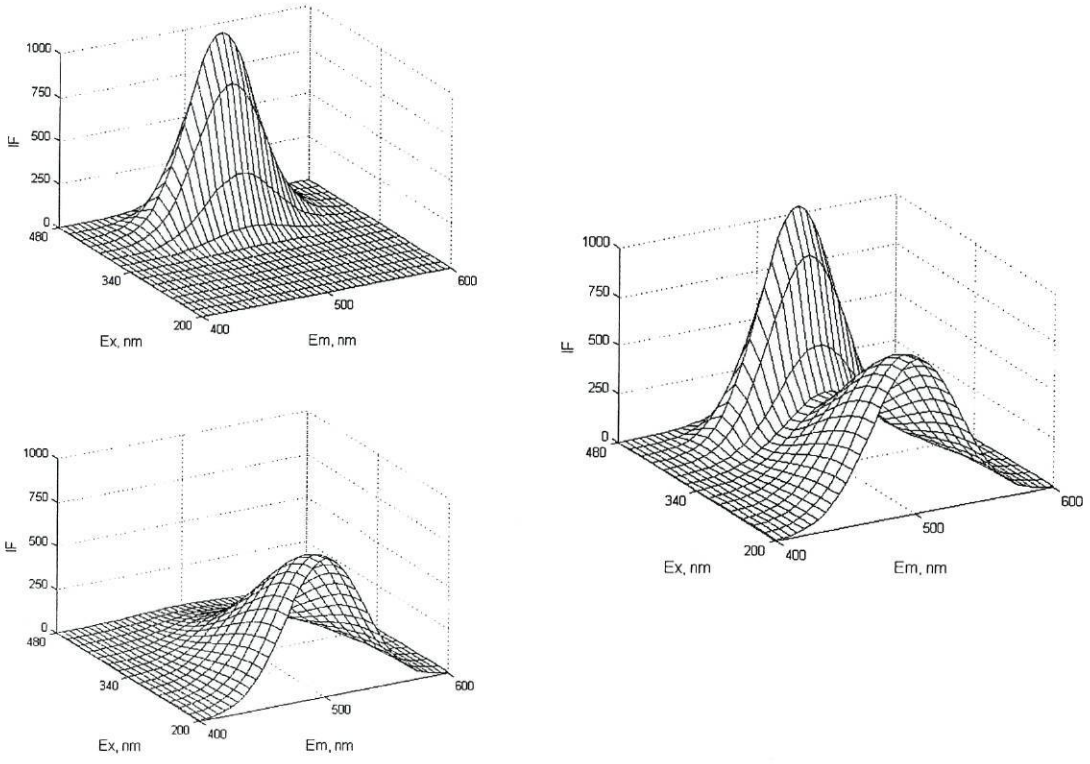



Fig. 4.7 – Representação das MEE$^s$ reproduzidas para o valor da concentração de alumínio da Fig. 4.3. Esquerda em cima é a $HG_{(419;504,2)}$, esquerda em baixo a $HG_{(203;500)}$ e à direita a MEE.

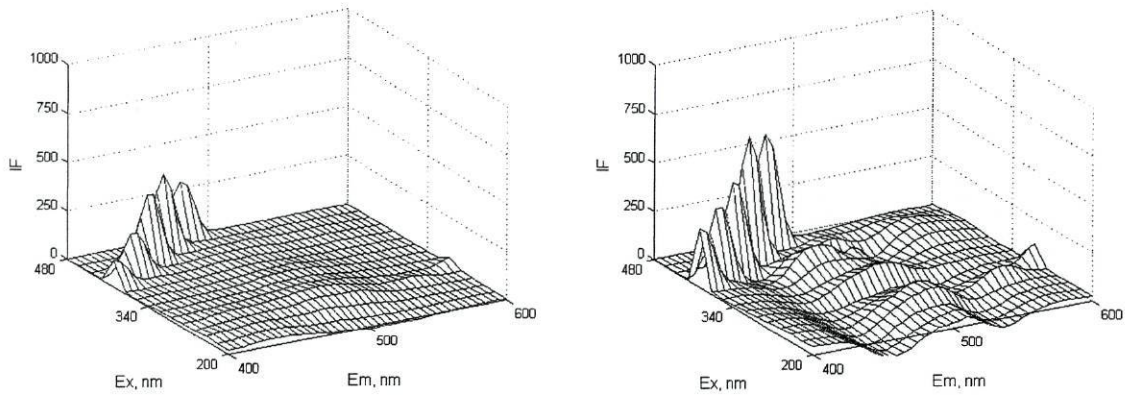



Fig. 4.8 – Representação das diferenças entre as $MEE^s$ modeladas com $HG^s$ e as $MEE^s$ originais a $MEE^s$. Esquerda quando a $|Al^{3+}|_{total}$ é $1{,}17x10^{-7}$ mol/L e direita quando a $|Al^{3+}|_{total}$ é $5{,}02x10^{-6}$ mol/L, ambas para o valor de pH de 5,0.

Usando agora os espectros puros podemos verificar que o primeiro componente representa as duas $HG^s$ (Fig. 4.9) e o segundo componente (Fig. 4.10) é ruído de fundo com a parte linear da dispersão. Então pode concluir-se que para o sistema morin-$Al^{3+}$ um componente é suficiente para englobar a variância (em relação à concentração de alumínio) de todo o sistema. Para confirmar, pode ver-se na Fig. 4.11 a representação da diferença entre a MEE original e a reproduzida com um só o COMP1 (Fig. 4.11 esquerda) e o somatório de COMP1 e COMP2 (Fig.4.11 direita), para a $|Al^{3+}|_{total}$ de $5{,}02x10^{-6}$ mol/L e o valor de pH de 5,0.

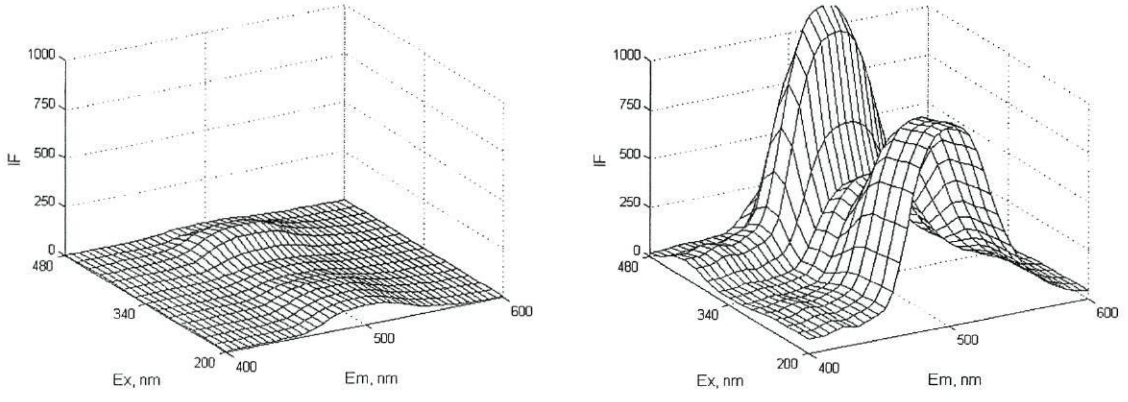



Fig. 4.9 – Representação das $MEE^s$ modeladas com o COMP1. Esquerda quando a $|Al^{3+}|_{total}$ é $1{,}17x10^{-7}$ mol/L e direita quando a $|Al^{3+}|_{total}$ é $5{,}02x10^{-6}$ mol/L, ambas para o valor de pH de 5,0.

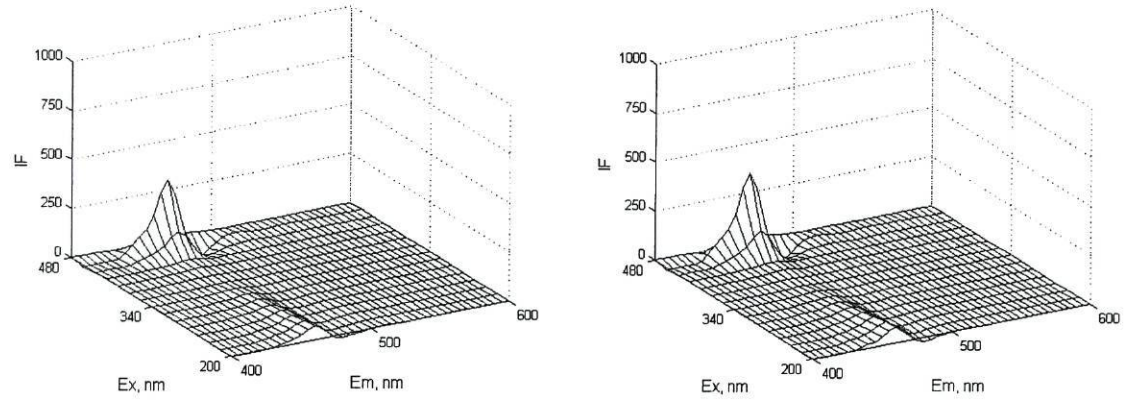



Fig. 4.10 – Representação das MEE$^{s}$ modeladas com o COMP2. Esquerda quando a $|Al^{3+}|_{total}$ é $1{,}17x10^{-7}$ mol/L e direita a $|Al^{3+}|_{total}$ é $5{,}02x10^{-6}$ mol/L, ambas para o valor de pH de 5,0.

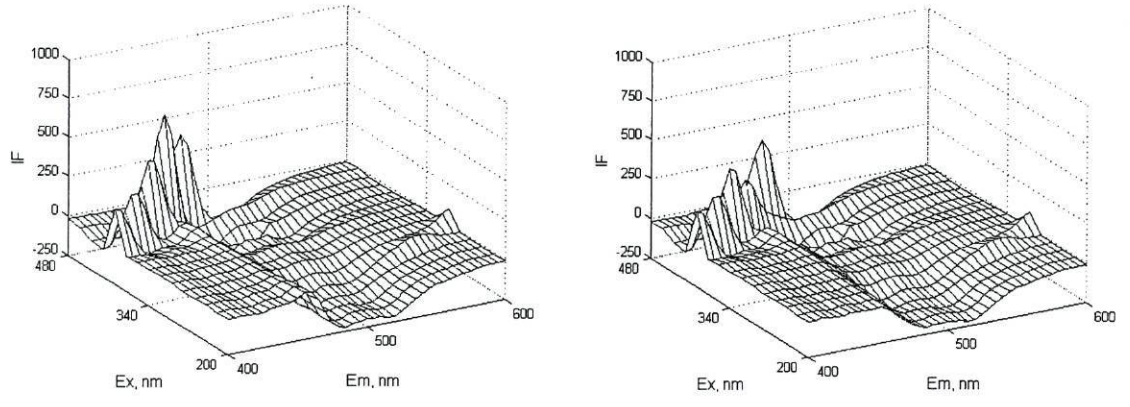



Fig. 4.11 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE obtida: só com o COMP1 (esquerda) e com o COMP1 e COMP2 (direita), quando a $|Al^{3+}|_{total}$ é $5{,}02x10^{-6}$ mol/L e o valor de pH de 5,0. Repare-se que foi necessário alterar a gama das IF de 0 a 1000 para –250 a 1000.

## 4.1.5 – **Comentários dos resultados**

Analisando os resultados da decomposição pelo PARAFAC, pode concluir-se que este sistema contêm 2 componentes, ou seja, existe uma relação linear entre as variáveis até ao segundo espectro puro. O terceiro componente acarreta uma perda da consistência do núcleo (Tabela 4.4 – teste de corcondia inferior a 100,0%). No entanto, sob o ponto de vista do fenómeno da fluorescência, apenas o primeiro componente, $COMP1^{Ex}$, $COMP1^{Em}$ e $COMP1^{[Al^{3+}]_{total}}$, tem interesse sendo o vector $COMP1^{[Al^{3+}]_{total}}$ o perfil de concentrações.

O sistema morin-$Al^{3+}$ contêm interacções nas variáveis internas, de tal modo que o Fit, mesmo a dois componentes, representa 94% da matriz original a pH 5,0, Fit

máximo, e 55% para o valor de pH 3,0, Fit mínimo. Tudo o que falta para a totalidade são relações não lineares. O mesmo problema também se reflectiu no ajuste a HG em que o $R^2_{Gaussiana}$ teimava em se afastar da unidade (Tabela 4.2), mesmo modelando a mais HG que as duas usadas. O Xval é frequentemente inferior ao Fit, sendo mesmo bastante inferior (sempre negativo no caso dos valores de pH 3,0, 6,1 e 7,1) o que demonstra que existem zonas restritas no espaço (Ex;Em) que contêm variações de valor de IF relativamente baixos mas não suficientemente baixos para serem incorporados no ruído de fundo nem, principalmente, seguem um padrão dito de linear, e, como tal, há um problema de escalas, o todo não é igual à parte.

A bibliografia refere o complexo morin-$Al^{3+}$ como sendo fluorescente [1], mas nada se encontrou quanto às características fotoquímicas do(s) complexo(s) de morin-$Al^{3+}$ em meio aquoso [2].

O ajuste a HG resultou em dois centros que dependiam do valor de pH. Na Tabela 4.5 encontra-se os máximos de Ex e Em, e, também, os máximos dos espectros puros do ajuste pelo PARAFAC.

Tabela 4.5 – Centros das HG (HG no interior da janela de observação – HG interior e HG no exterior da janela de observação- HG exterior) e dos máximos dos espectros puros de Ex e Em (Ex;Em) em função do valor de pH para o sistema morin-$Al^{3+}$.

| Ajuste | | pH=3,0 | pH=4,0 | pH=5,0 | pH=6,1 | pH=7,1 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HG | HG interior | (412,5;492) | (413,8;495,9) | (419;504,2) | (424;511,4) | (404;512) |
| | HG exterior | (176;451) | (200;472) | (203;500) | (170;484) | (179;480) |
| PARAFAC | COMP1* | (420;425,5) | (420;489) | (420;503,5) | (480;482,5) | (460;474) |

* Este par (Ex;Em) é representado pelo máximo do espectro puro $COMP1^{Ex}$ (a Ex) e pelo máximo do espectro puro $COMP1^{Em}$ (a Em).

Refira-se que a maior parte dos máximos dos espectros puros de excitação e emissão correspondem às dispersões de primeira ordem (Ex=Em), o que denota um forte peso relativo das dispersões em relação ao sinal fluorescente do complexo. Este motivo será uma eventual justificação da dificuldade do PARAFAC em isolar espectros puros, uma vez que as dispersões não respondem linearmente à variação da concentração total do catião.

O facto dos centros dependerem do pH está relacionado com o grau de protonação do ligando e com o grau de hidrólise do catião.

## 4.2 - Sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$

### 4.2.1 - MEE

Este sistema tem cinco dimensões: duas internas (Ex e Em), duas externas ($[Zn^{2+}]_{total}$ e o valor de pH) e a quinta é a IF. Uma possível representação, deste sistema pentadimensional (5D), é fazer a representação das $MEE^s$ no espaço das variáveis externas (Fig. 4.12).

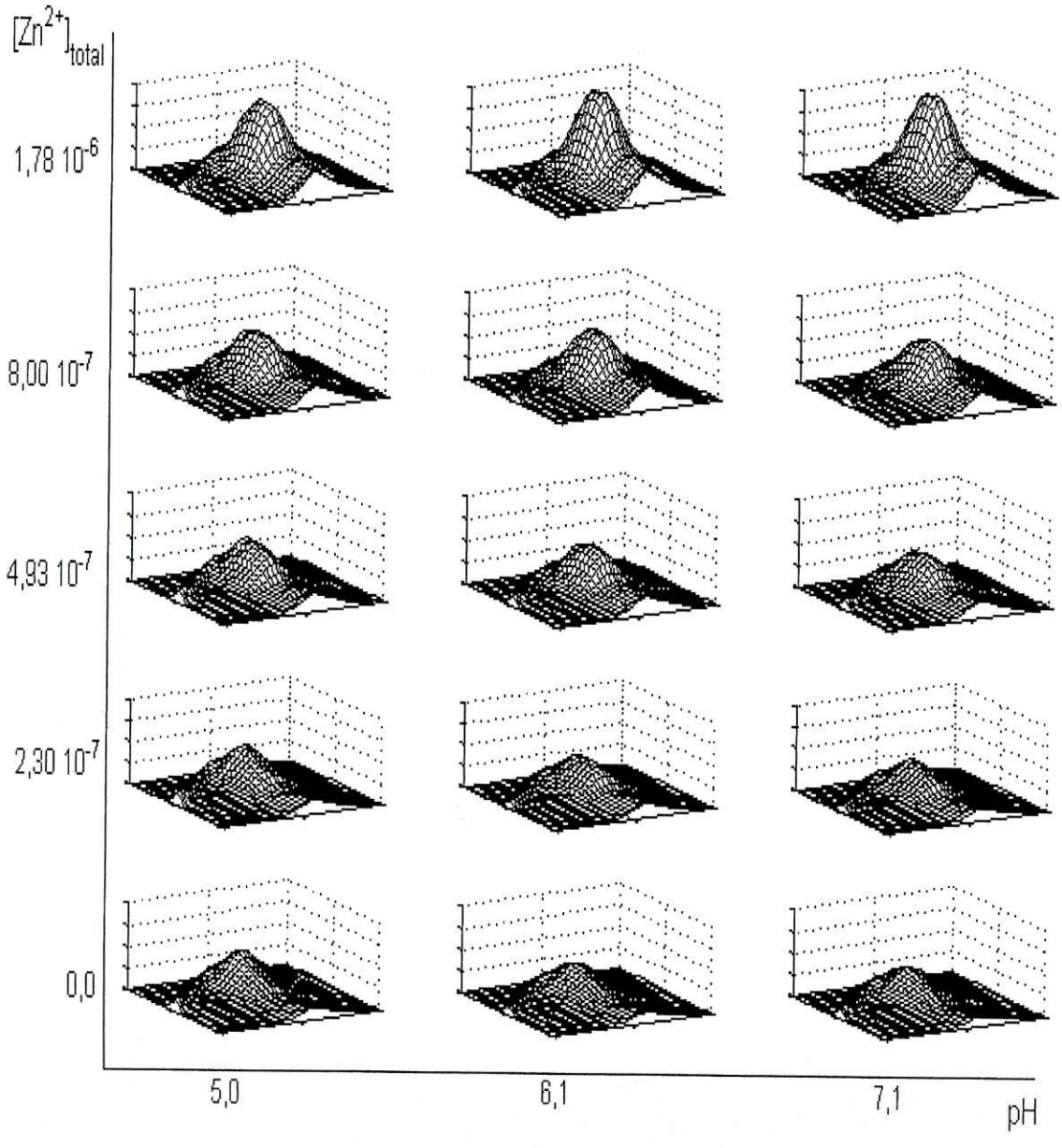



Fig. 4.12 – Representação 5D dos resultados do sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$. Apenas se representou os valores de pH e da $[Zn^{2+}]_{total}$ (mol/L) assinalados. Cada representação 3D é composta pelas IF (eixo vertical de 0 a 1000 unidades de IF), Ex (eixo do lado esquerdo, de 300 a 500 nm) e Em (eixo do lado direito, de 400 a 600 nm). As $MEE^s$ que faltam são superfícies intermédias entre cada representação.

Há uma coluna no interior da MEE que aumenta com o aumento da $|Zn^{2+}|_{total}$, qualquer que seja o valor de pH, sendo a dependência com o pH pequena, para a gama de valores de pH da Fig. 4.12, no entanto verifica-se uma resposta mais acentuada a pH 6,1. A colina, no centro da janela de observação da MEE, está próxima da dispersão de primeira ordem (Fig. 4.13 e Fig. 4.14) e não é simétrica (Fig. 4.15 direita cima), logo, pressupõe-se a existência de duas colinas sobrepostas nesta zona; existe, ainda, uma terceira colina fora da janela de observação (pelo menos junto à base da dimensão Ex, próximo dos 300 nm).

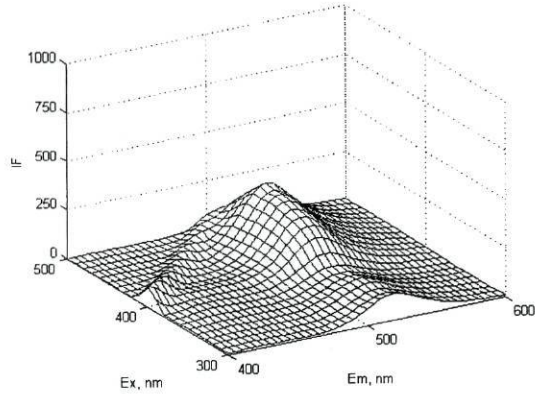



Fig. 4.13 – Representarão 3D dos dados do sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$ para a $|Zn^{2+}|_{total}$ de $1{,}11x10^{-7}$ mol/L quando o valor de pH é 6,1.

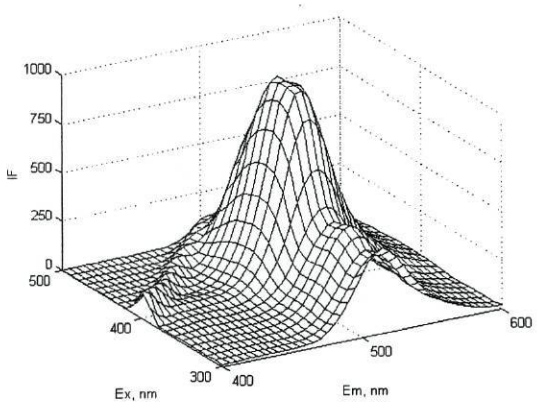



Fig. 4.14 – Representarão 3D dos dados do sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$ para a $|Zn^{2+}|_{total}$ de $1{,}78x10^{-6}$ mol/L quando o valor de pH é 6,1.

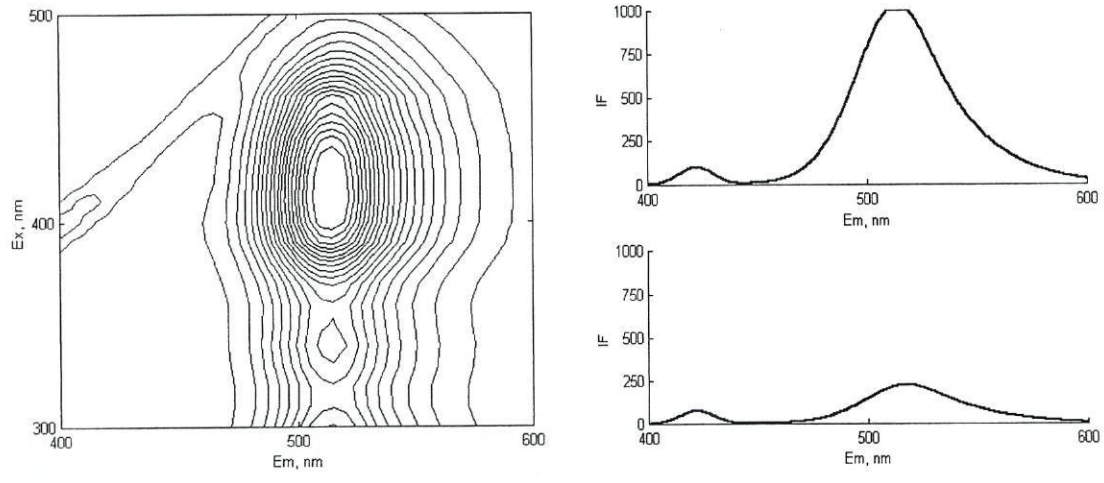



Fig. 4.15 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.14 (esquerda) e dos espectros de emissão quando o Ex é 420 nm (direita cima) e o Ex é 300 nm (direita baixo).

## 4.2.2 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

Após a remoção das dispersões de primeira, segunda ordem e de todas as IF cujo valor excedia 950 unidades relativas de fluorescência. Mesmo removendo as $HG_{interação}$ de primeira e segunda ordem, foi possível, neste sistema, detectar a existência de mais duas HG não simétricas em relação à Em, que não sofriam variação "significativa" ao longo da variação do catião zinco, a que chamamos $HG_{(Ex,Em)fundoi}$ (usaram-se expressões de $HG^s$ não simétricas). A HG, supostamente da responsabilidade do complexo formado, é uma terceira hiperGaussiana perfeita que sofre acréscimo acentuado com o aumento da $|Zn^{2+}|_{total}$.

Os centros e larguras das três HG não dependem do valor de pH do meio. Então vamos ter, para todo este sistema, centros e larguras independentes da concentração do catião hidrogenião e temos:

$$MEE = HG_{(451;516)fundo1} + HG_{(302;516)fundo2} + HG_{(410;515,0)}$$

onde:

$$HG_{(451;516)fundo1} = a_{(451;516)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-516)}{21,2} - \exp\left( -\frac{(Em-516)}{21,2} \right) + 1 - \frac{(Ex-451)^2}{5000} \right)$$

$$HG_{(302;516)fundo2} = a_{(302;516)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-516)}{21,2} - \exp\left( -\frac{(Em-516)}{21,2} \right) + 1 - \frac{(Ex-302)^2}{2000} \right)$$

e

$$HG_{(410;515,0)} = a_{(410;515,0)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-515,0)^2}{1020} - \frac{(Ex-410)^2}{2670} \right)$$

sendo esta última a HG com interesse na modelação do fenómeno fluorescente.

Na Tabela 4.6 encontram-se todos estes parâmetros com as respectivas desvios e na Tabela 4.7 os termos pré-exponenciais, cuja representação dos $a_{(410;515,0)}$ em função da $|Zn^{2+}|_{total}$ é o perfil de concentrações (Fig. 4.16).

Tabela 4.6 – Parâmetros do ajuste a $HG^s$ das $MEE^s$ do sistema BTC-$Zn^{2+}$. Junto de cada valor encontra-se a respectiva imprecisão.

| | $HG_{(451;516)}$ | $HG_{(302;516)}$ | $HG_{(410;515,0)}$ |
|---|---|---|---|
| $\overline{Ex}$ | 451±4 | 302±2 | 410±1 |
| $b_{\overline{Ex}}$ | $5x10^3$±$1x10^3$ | $20x10^2$±$6x10^2$ | 267x10±3x10 |
| $\overline{Em}$ | 516±2 | 516±2 | 515,0±0,2 |
| $b_{\overline{Em}}$ | 21,2±0,4 | 21,2±0,4 | 102x10±2x10 |

Tabela 4.7 – Valor dos termos pré-exponenciais. Por baixo de cada valor de pH está o valor do parâmetro $R^2_{Gaussiana}$ do perfil de concentrações e por baixo de cada conjunto de três pré-exponenciais está o respectivo valor do parâmetro $R^2_{Gaussiana}$.

| $[Zn^{2+}]_{total}$, mol/L | | 0,00 | $1,11x10^{-7}$ | $2,30x10^{-7}$ | $3,57x10^{-7}$ | $4,93x10^{-7}$ | $6,40x10^{-7}$ | $8,00x10^{-7}$ | $1,01x10^{-6}$ | $1,78x10^{-6}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH 4,0 | $a_{(451;516)}$ | 346±1 | 344±1 | 340±1 | 341±2 | 346±2 | 346±2 | 343±2 | 340±2 | 337±2 |
| | $a_{(302;516)}$ | 128±1 | 128±1 | 132±1 | 136±1 | 138±1 | 142±1 | 145±1 | 143±1 | 159±1 |
| 0,940 | $a_{(410;515)}$ | 8±1 | 15±1 | 30±2 | 38±2 | 46±1 | 57±1 | 69±2 | 69±2 | 112±2 |
| | $R^2_{Gaussiana}$ | 0,9439 | 0,9428 | 0,9403 | 0,9400 | 0,9395 | 0,9392 | 0,9373 | 0,9354 | 0,9405 |
| pH 5,0 | $a_{(451;516)}$ | 314±1 | 327±1 | 322±1 | 314±1 | 313±1 | 308±1 | 308±1 | 307±1 | 312±1 |
| | $a_{(302;516)}$ | 121,7±0,9 | 134,1±0,9 | 152,7±0,9 | 169,6±0,9 | 190±1 | 208±1 | 230±1 | 258±1 | 344±2 |
| 0,979 | $a_{(410;515)}$ | 0±1 | 11±1 | 64±1 | 115±1 | 169±1 | 225±1 | 285±1 | 361±1 | 585±2 |
| | $R^2_{Gaussiana}$ | 0,9541 | 0,9648 | 0,9713 | 0,9763 | 0,9788 | 0,9812 | 0,9822 | 0,9823 | 0,9813 |
| pH 6,1 | $a_{(451;516)}$ | 235,4±0,8 | 235,1±0,8 | 234,8±0,9 | 239,4±0,9 | 242±1 | 245±1 | 250±1 | 256±2 | 278±2 |
| | $a_{(302;516)}$ | 108,3±0,7 | 125,9±0,7 | 147,0±0,7 | 174,4±0,8 | 198±1 | 225±1 | 253±1 | 290±1 | 405±2 |
| 0,979 | $a_{(410;515)}$ | 38,3±0,9 | 89,6±0,9 | 142,8±0,9 | 209±1 | 270±1 | 340±1 | 411±1 | 502±2 | 779±3 |
| | $R^2_{Gaussiana}$ | 0,9623 | 0,9722 | 0,9771 | 0,9805 | 0,9821 | 0,9825 | 0,9828 | 0,9824 | 0,9766 |
| pH 7,1 | $a_{(451;516)}$ | 234,5±0,8 | 233,7±0,8 | 234,6±0,8 | 235,5±0,9 | 228±1 | 232±1 | 235±1 | 247±2 | 274±2 |
| | $a_{(302;516)}$ | 97,7±0,7 | 111,1±0,7 | 131,0±0,7 | 153,3±0,7 | 179±1 | 202±1 | 228±1 | 284±1 | 402±2 |
| 0,978 | $a_{(410;515)}$ | 4,4±0,9 | 43,2±0,9 | 93,6±0,9 | 151,2±0,9 | 229±1 | 286±1 | 352±1 | 496±2 | 773±2 |
| | $R^2_{Gaussiana}$ | 0,9511 | 0,9617 | 0,9714 | 0,9772 | 0,9804 | 0,9819 | 0,9824 | 0,9823 | 0,9771 |

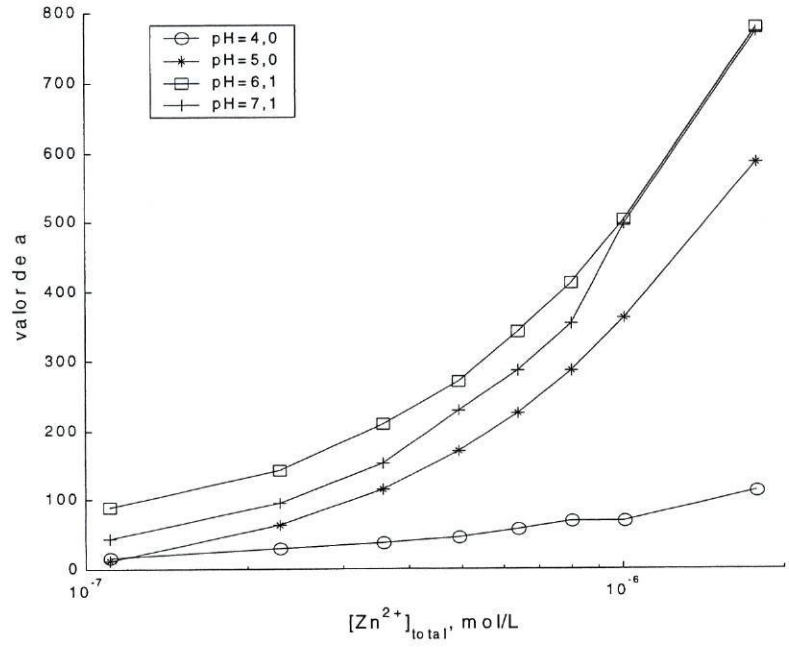



Fig. 4.16- Representação dos perfis de concentração para o sistema BTC-$Zn^{2+}$ aos diferentes valores de pH da HG perfeita.

## 4.2.3 – **MEE decompostos em espectros puros**

O sistema BTC-$Zn^{2+}$ é decomposto em componentes (Tabela 4.8) de cuja análise dos parâmetros de avaliação, (Tabela 4.9) se conclui que 2 componentes são suficientes para descrever a variância dos dados originais, logo apenas se representou a decomposição até mais um componente do número total de componentes em que o sistema pode ser traduzido.

Tabela 4.8 – Decomposição em espectros puros das MEE[s] do sistema BTC-$Zn^{2+}$ usando o PARAFAC, para os diferentes valores de pH..

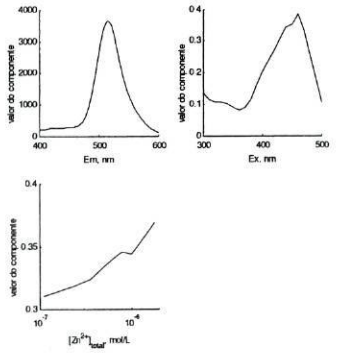
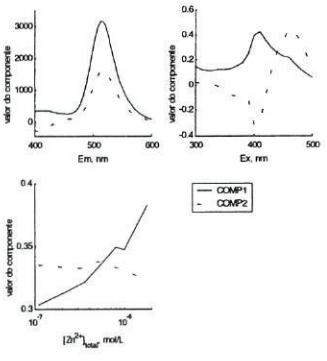
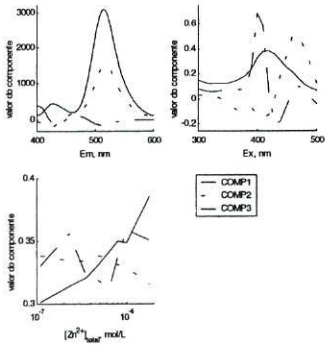
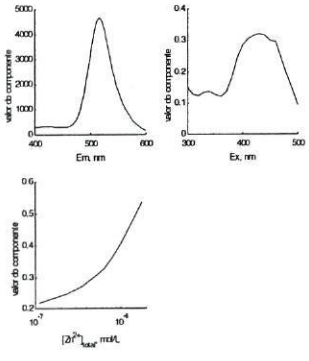
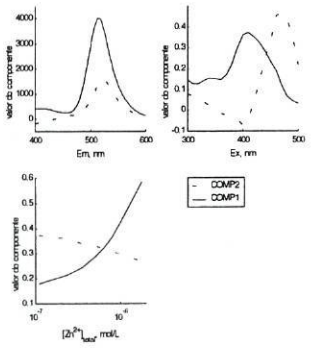
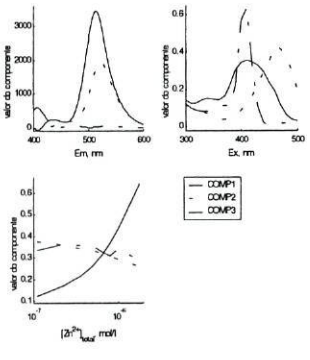
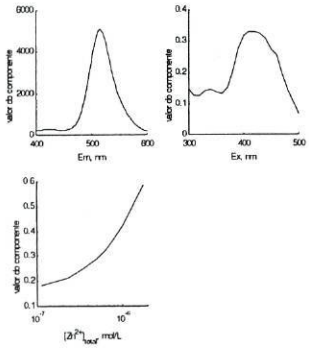
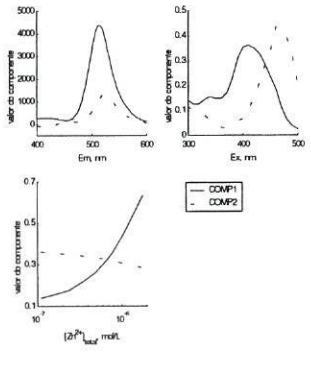
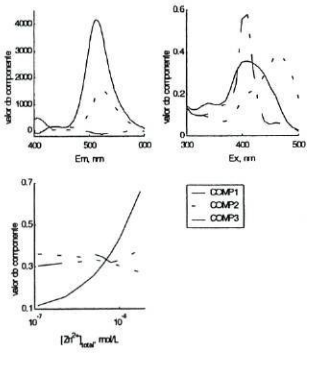
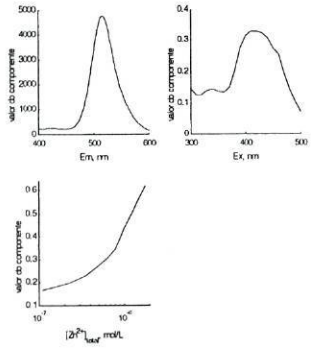
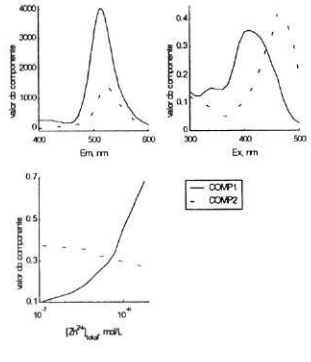
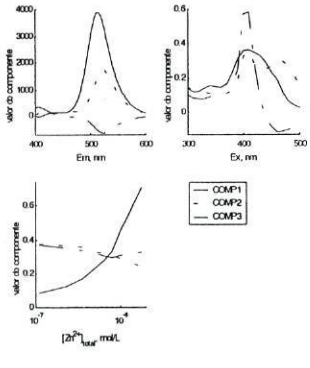
| pH | 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|---|
| 4,0 |  |  |  |
| 5,0 |  |  |  |
| 6,1 |  |  |  |
| 7,1 |  |  |  |

Tabela 4.9 – Critérios de avaliação da decomposição do sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$ resumida na Tabela 4.8.

| | | pH=4,0 | pH=5,0 | pH=6,1 | pH=7,1 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 componente | It | 3 | 4 | 4 | 4 |
| | err | $1,79x10^{7}$ | $5,08x10^{7}$ | $3,12x10^{7}$ | $3,53x10^{7}$ |
| | corcondia | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| | Fit | 97,22 | 95,45 | 97,68 | 97,10 |
| | Xval | 97,07 | 95,34 | 97,63 | 97,06 |
| 2 componentes | It | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | err | $8,79x10^{6}$ | $1,54x10^{7}$ | $8,53x10^{6}$ | $8,52x10^{6}$ |
| | corcondia | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| | Fit | 98,42 | 98,48 | 99,33 | 99,27 |
| | Xval | 97,97 | 98,26 | 99,25 | 99,20 |
| 3 componentes | It | 105 | 103 | 14 | 125 |
| | Err | $6,13x10^{6}$ | $9,39x10^{6}$ | $5,11x10^{6}$ | $4,57x10^{6}$ |
| | corcondia | 50,5 | 87,18 | 76,85 | 50,72 |
| | Fit | 98,90 | 98,99 | 99,55 | 99,54 |
| | Xval | 98,08 | 98,45 | 99,32 | 99,35 |

## 4.2.4 – **Reprodução das MEE$^{s}$**

Na Fig. 4.17 estão as representações da $HG_{(410;515)}$ para as $|Zn^{2+}|_{total}$ de $1,11x10^{-7}$ mol/L e $1,78x10^{-6}$ mol/L, ambas ao valor de pH de 6,1. A sua comparação com as respectivas MEE$^{s}$ originais (Fig. 4.18) permite constatar a existência de fenómenos de valores relativos de IF pequenos que, embora não tenham uma forma HG perfeita, têm um valor de IF suficientemente grande para serem incorporados no sinal de ruído. Nas Fig. 4.19 e Fig. 4.20 estão representadas as $HG_{(451;516)fundo1}$ e $HG_{(302;516)fundo2}$ para as concentrações das Fig. 4.13 e Fig. 4.14 e, na Fig. 4.21 está representado o sinal ruído para as mesmas concentrações.

Tal como foi dito na modelação a curvas de Gauss bivariadas, os termos pré-exponenciais das $HG_{fundoi}$ (como se pode confirmar a existência de duas colinas, Fig. 4.18, não variam significativamente, na Fig.4.18 pode constatar-se que, para as duas concentrações de $Zn^{2+}$, a altura das formas é praticamente iguais. Este fenómeno, independentemente de se tratar de fluorescência ou não, existe e é independente da $|Zn^{2+}|_{total}$, mas decresce com o aumento do valor do pH (Tabela 4.7 $a_{(451;516)}$ e $a_{(302,516)}$).

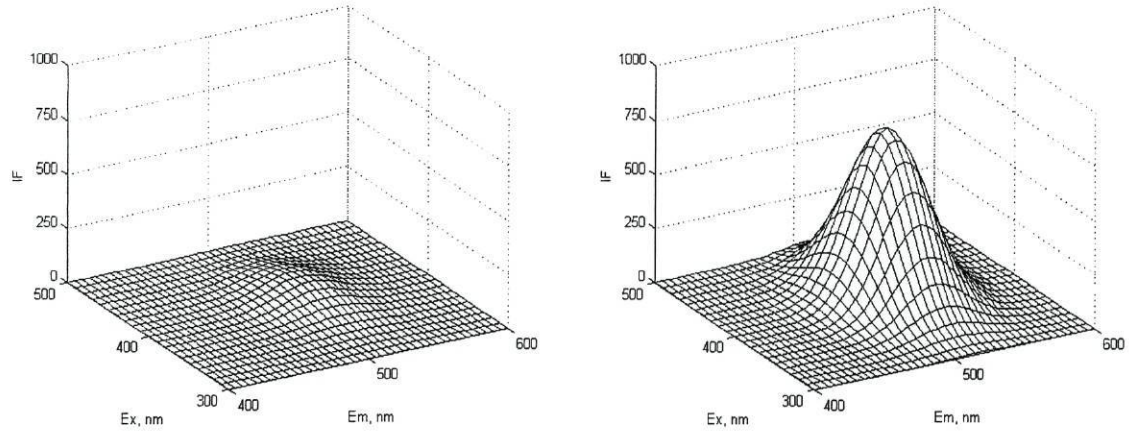



Fig. 4.17 – Representação das MEE$^s$ reproduzidas com a $HG_{(410;515,0)}$ para o valor da $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig.4. 14 (direita).

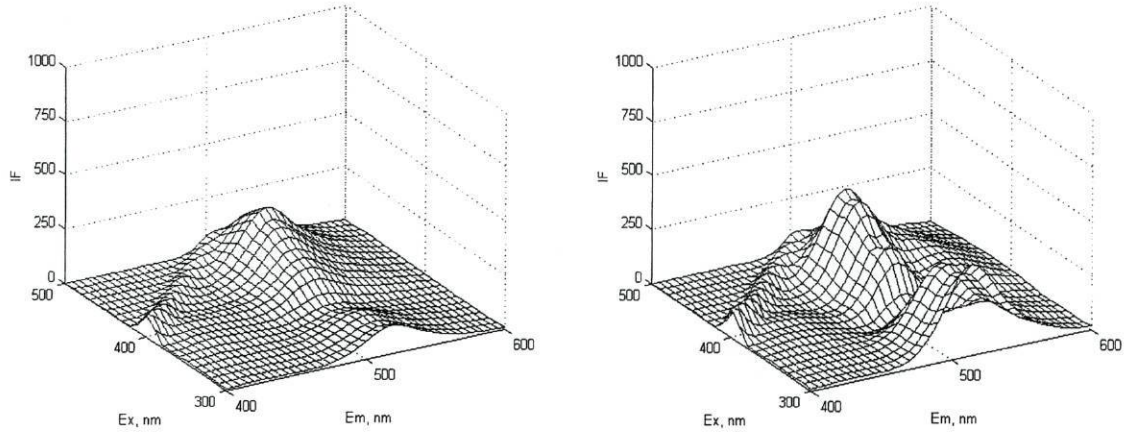



Fig. 4.18 – Representação das diferenças entre as MEE$^s$ originais e a $HG_{(410;515,0)}$ reproduzidas para a $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig. 4.14 (direita).

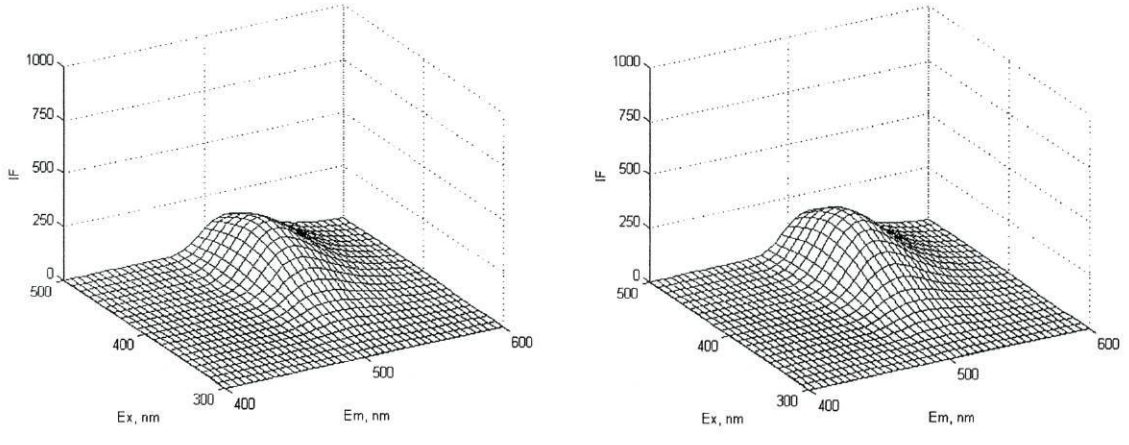



Fig. 4.19 – Representação das $HG_{(451;516)fundo1}$ reproduzidas para a $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig. 4.14 (direita).

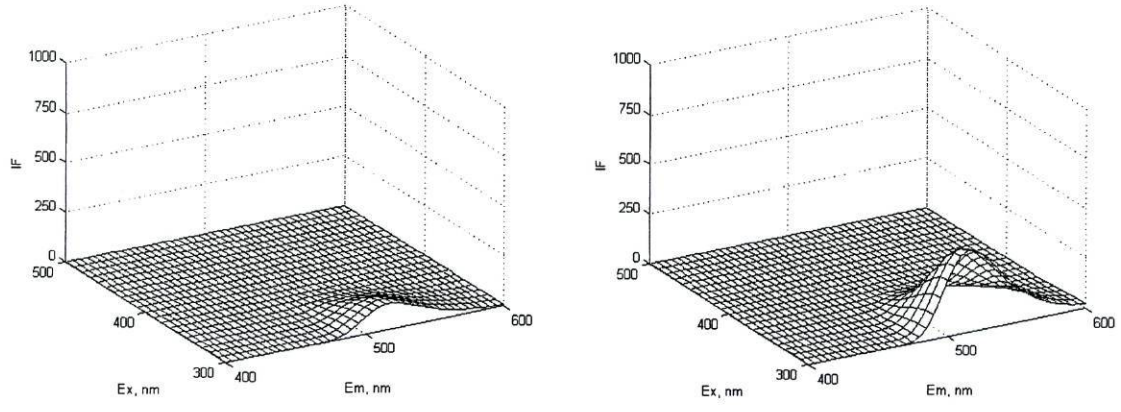



Fig. 4.20 – Representação das $HG_{(302;516)fundo2}$ reproduzidas para a $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig. 4.14 (direita).

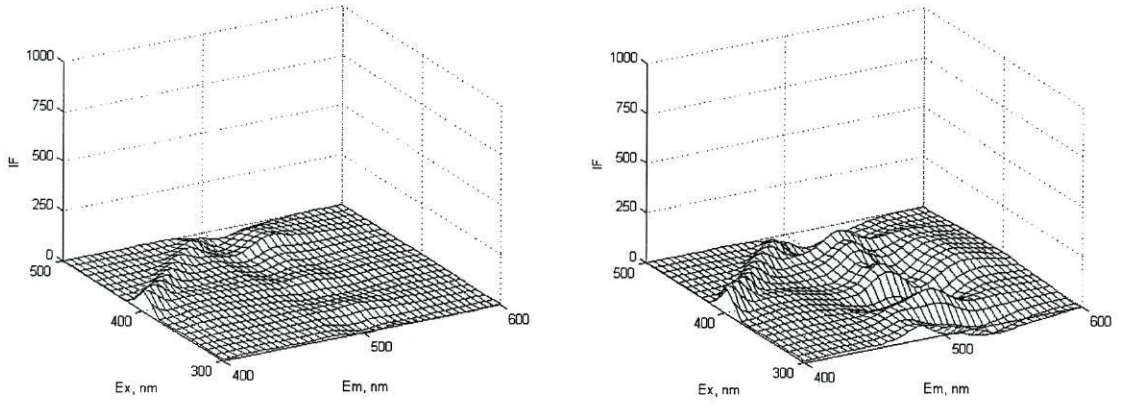



Fig. 4.21 – Representação das diferenças entre as $MEE^s$ originais e o somatório de $HG_{(451;516)fundo1}$, $HG_{(302;516)fundo2}$ e $HG_{(410;515,0)}$ (matrizes de sinal ruído) para a $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig. 4.14 (direita).

Usando agora os espectros puros podemos verificar que o primeiro componente representa o sinal da fluorescência que responde à $|Zn^{2+}|_{total}$ (Tabela 4.8 $COMP1^{|Zn^{2+}|_{total}}$ para qualquer valor de pH - Fig. 4.22), o segundo componente é uma superfície que contêm IF de valor apreciável (Fig. 4.23) mas que a sua relação com a $|Zn^{2+}|_{total}$ é pequena e de extinção da fluorescência (Tabela 4.8 $COMP2^{|Zn^{2+}|_{total}}$ para qualquer valor de pH), note-se que se tinha chegado à conclusão da existência de uma certa quantidade de IF que não variava significativamente no ajuste a HG ($HG_{fundo}$).

Este sistema não pode ter o terceiro componente (perda de consistência do núcleo) o que significa que a dispersão de primeira ordem (Fig. 4.24, o ruído de fundo), quando isolada, não tem uma relação linear com as variáveis internas.

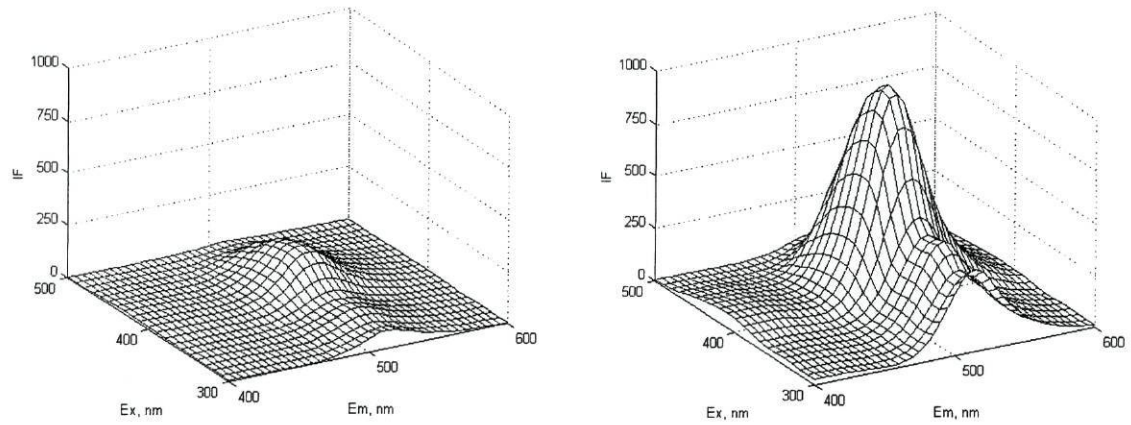



Fig. 4.22 - Representação das MEE$^{s}$ reproduzidas com o COMP1 para a $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig. 4.14 (direita).

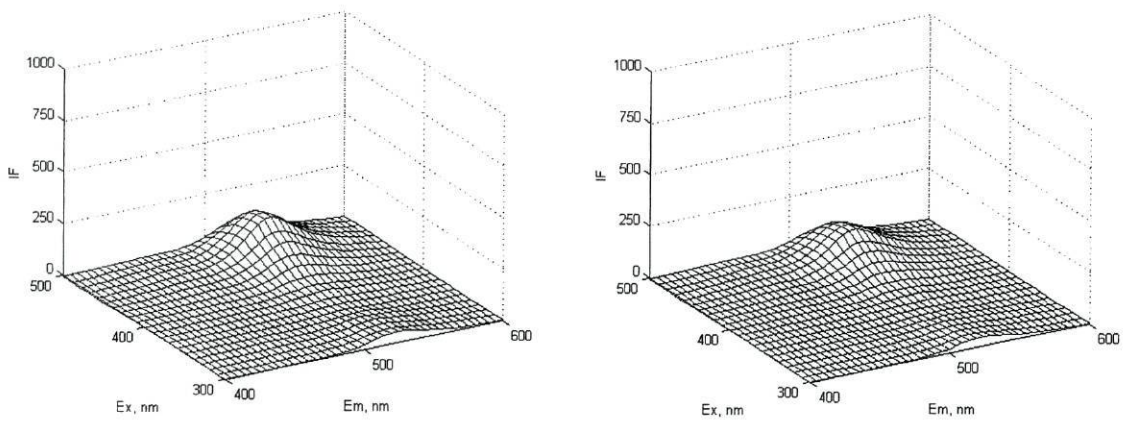



Fig. 4.23 - Representação das MEE$^{s}$ reproduzidas com o COMP2 para a $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig. 4.14 (direita).

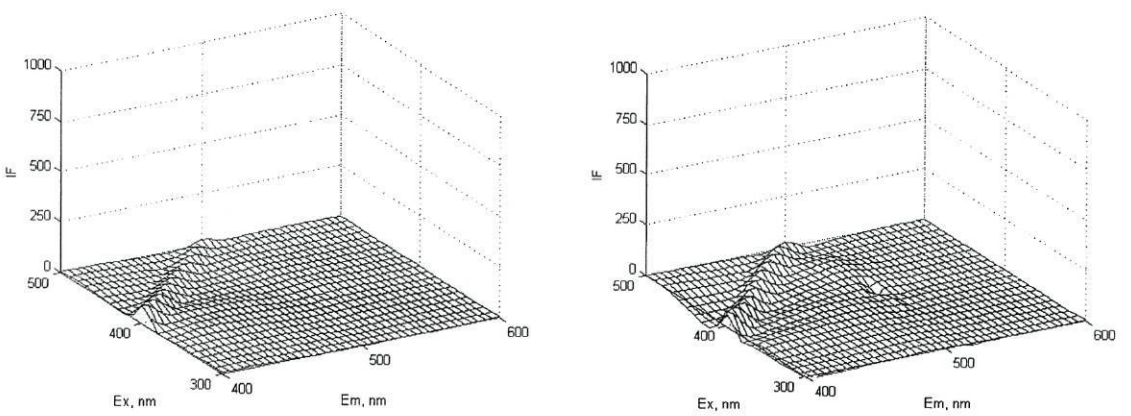



Fig. 4.24 – Representação das diferenças entre as MEE$^{s}$ originais e o somatório das MEE$^{s}$ do COMP1 e COMP2 para a $|Zn^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.13 (esquerda) e Fig. 4.14 (direita).

### 4.2.5 – **Comentários dos resultados**

Analisando os resultados da decomposição pelo PARAFAC, pode concluir-se que este sistema contêm 2 componentes, ou seja, existe uma relação linear entre as variáveis até ao segundo espectro puro. O terceiro componente acarreta uma perda da consistência do núcleo (Tabela 4.9 – teste do corcondia inferior a 100,0%).

Estes dois componentes podem ser vistos como o sinal do complexo formado, correspondendo o COMP1 à $HG_{(410;515)}$, e o sinal relativo ao fundo da MEE (que não ruído), COMP2 relacionado com $HG_{fundo1}$ e $HG_{fundo2}$ . O sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$ não contém interacções "significativas" nas variáveis, o Fit mesmo a 1 componente engloba cerca de 97% de todo o sinal, e no ajuste a HG obteve-se um $R^2_{Gaussiana}$ para o perfil de concentrações a pH 4,0 é de 0,94, o mais desfavorável.

Pela comparação do Xval com o Fit, pode dizer-se que qualquer que seja a variação da escala a resposta é sempre a mesma, ou seja, não existem partes da MEE que encerrem fenómenos físicos com IF significativamente grandes que se possam ter em conta.

Na folha de informação de produtos da Molecular Probes [3], este sistema é referido como tendo um máximo no plano (Ex;Em) de (415;517) no interior das células.

O ajuste a $HG^s$ resultou em apenas uma HG perfeita cujo centro é (410;515). Na Tabela 4.10 encontra-se o resumo das propriedades fotofísicas deste sistema quer do ajuste a $HG^s$ quer da decomposição em espectros puros.

Tabela 4.10 – Centros das HG e dos máximos dos espectros puros de Ex e Em (Ex;Em) em função do valor de pH para o sistema BTC-5N-$Zn^{2+}$.

| | pH=4,0 | pH=5,0 | pH=6,1 | pH=7,1 |
|---|---|---|---|---|
| $HG_{(410;515,0)}$ | (410;515,0) | (410;515,0) | (410;515,0) | (410;515,0) |
| $HG_{(451;516)}$ | (451;516) | (451;516) | (451;516) | (451;516) |
| $HG_{(302;516)}$ | (302;516) | (302;516) | (302;516) | (302;516) |
| COMP1 | (410;515,5) | (410;516,0) | (410;515,0) | (410;514,5) |
| COMP2 | (460;517,5) | (470;523,5) | (460;524,5) | (460;524,5) |

Os centros das HG não dependem do valor de pH e na decomposição PARAFAC poder-se-ia falar na média ao longo do pH. O COMP1 é (410;515,3), valor coincidente com a $HG_{(410;515,0)}$, e o COMP2 é (463;522.5), valor muito próximo da $HG_{(451;516)fundo2}$.

## 4.3 - **Sistema 8-HQ-$Al^{3+}$**

### 4.3.1 - **MEE**

Este sistema tem quatro dimensões: duas internas (Ex e Em), uma externa ($[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa) e a quarta é a IF. Uma possível representação, deste sistema tetradimensional (4D), é fazer a representação das $MEE^s$ no espaço da variável externa (Fig. 4.25).

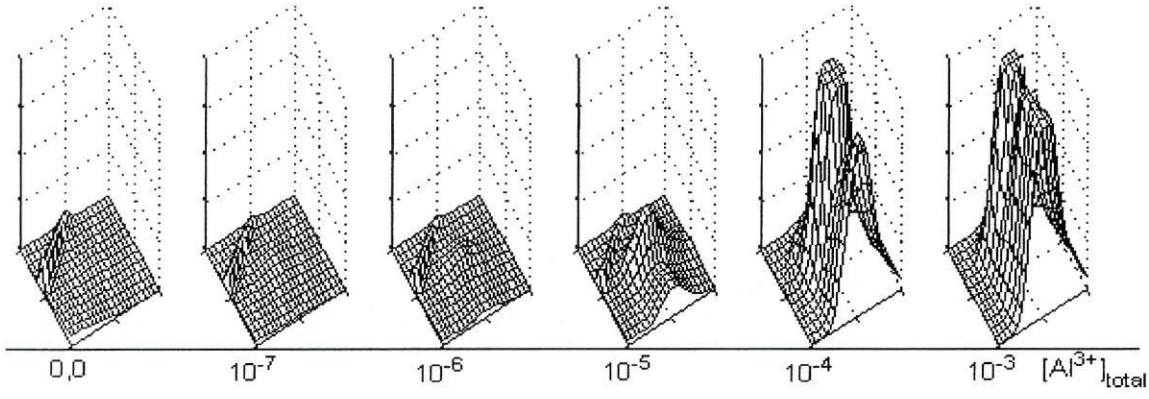



Fig. 4.25 – Representação 4D dos resultados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$. Apenas se representou os valores da $[Al^{3+}]_{total}$ (mol/L) assinalados. Cada representação 3D é composta pelas IF (eixo vertical de 0 a 1000 unidades de IF), Ex (eixo do lado esquerdo, de 260 a 500 nm) e Em (eixo do lado direito, de 400 a 600 nm). As $MEE^s$ que faltam são superfícies intermédias entre cada representação.

Na Fig. 4.25 pode ver-se que o aumento da $|Al^{3+}|_{total}$ provoca o crescimento dos picos na superfície das $MEE^s$, de tal modo que, a partir da $|Al^{3+}|_{total}$ de $4{,}90 \times 10^{-5}$ mol/L, as $MEE^s$ excedem o máximo da escala das $IF^s$ (Fig. 4.26).

Fazendo as representações (ampliadas) das $MEE^s$, correspondente à $|Al^{3+}|_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45 \times 10^{-7}$ mol/L (Fig. 4.27) e $2{,}45 \times 10^{-5}$ mol/L (Fig. 4.28), pode constatar-se a existência de duas colinas, situando-se uma dentro da janela de observação e outro fora da janela de observação. A representação por contornos da Fig. 4.28 (Fig. 4.29 esquerda) permite confirmar a existência destas duas colinas, para além da colina correspondente à dispersão de primeira ordem (Ex = Em), verificando-se a não simetria das colinas (Fig. 4.29 direita).

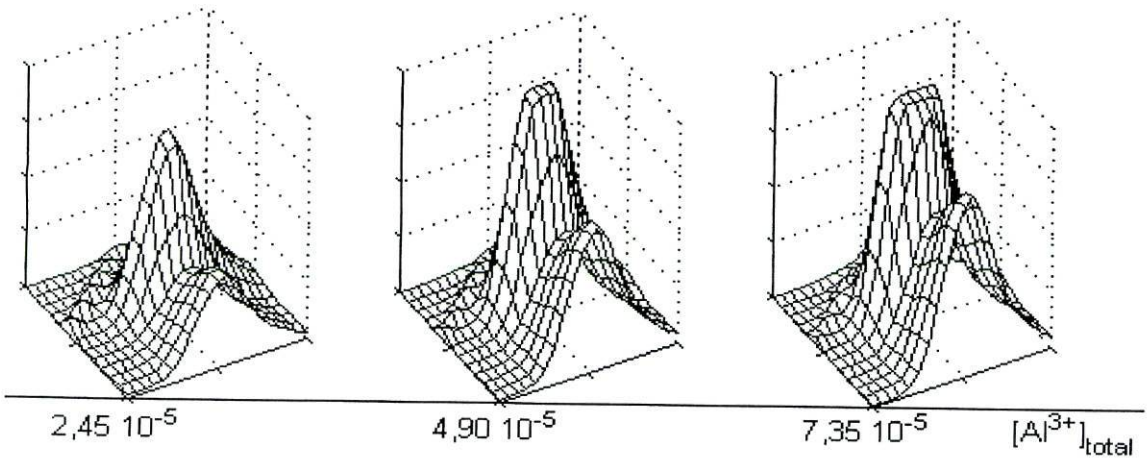



Fig. 4.26 – Representação 4D dos resultados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ para as $[Al^{3+}]_{total}$ na fase aquosa (mol/L) assinalados.

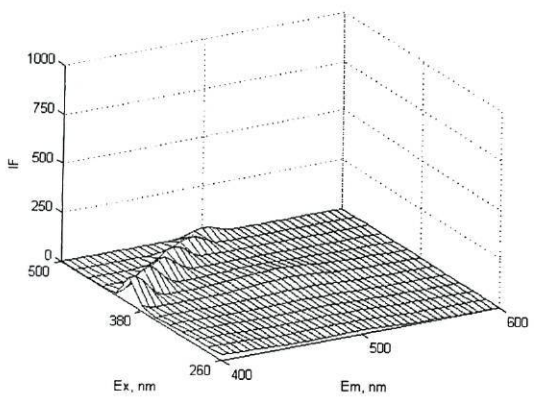



Fig. 4.27 – Representação 3D dos dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ para a $|Al^{3+}|_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45 \times 10^{-7}$ mol/L.

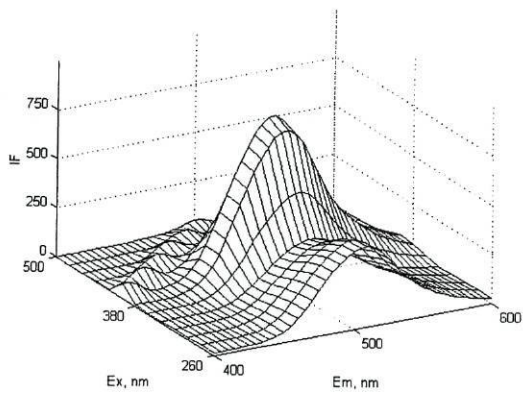



Fig. 4.28 – Representação 3D dos dados do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ para a $|Al^{3+}|_{total}$ na fase aquosa de $2{,}45 \times 10^{-5}$ mol/L.

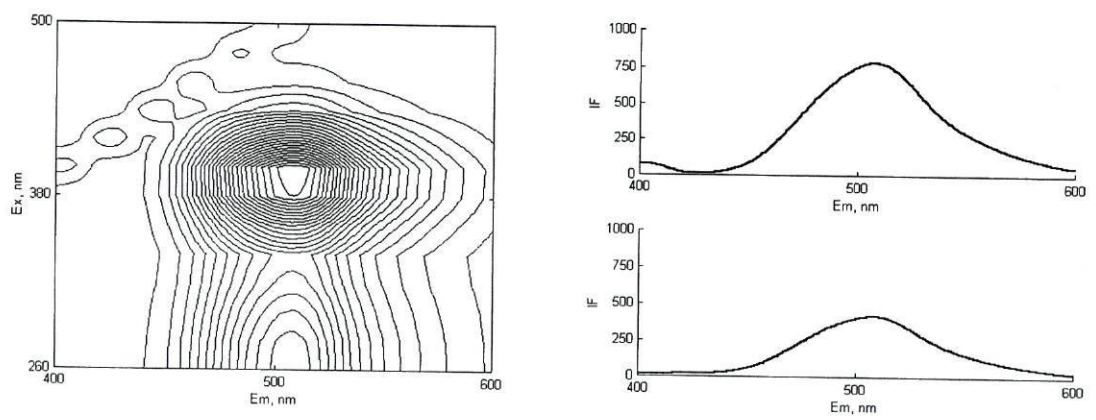



Fig. 4.29 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.28 (esquerda) e dos espectros de emissão quando o Ex é 400 nm (direita cima) e o Ex é 260 nm (direita baixo).

## 4.3.2 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

Após a remoção das dispersões de primeira, segunda ordem e de todas as IF cujo valor excedia 950 unidades relativas de fluorescência, foi possível, neste sistema, detectar a existência de quatro HG. Duas, sobrepostas, $HG_{(390;505,6)}$ e $HG_{(393;561)}$, dentro da janela de observação e duas, também sobrepostas, $HG_{(160;503)}$ e $HG_{(257;407)}$, mas fora da janela de observação. As MEE$^s$ ficam definidas:

$$MEE = HG_{(390;505,6)} + HG_{(393;561)} + HG_{(160;503)} + HG_{(257;407)}$$

onde

$$HG_{(390;505,6)} = a_{(390;505,6)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-505,6)^2}{1500} - \frac{(Ex-390)^2}{1100} \right)$$

$$HG_{(393;561)} = a_{(393;561)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-561)^2}{1320} - \frac{(Ex-393)^2}{1300} \right)$$

$$HG_{(160;503)} = a_{(160;503)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-503)^2}{1900} - \frac{(Ex-160)^2}{39000} \right)$$

e

$$HG_{(257;407)} = a_{(257;407)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-407)^2}{2620} - \frac{(Ex-257)^2}{13100} \right)$$

Na Tabela 4.11 encontram-se todos estes parâmetros ajustados com os respectivos desvios e na Tabela 4.12 os termos pré-exponenciais, cuja representação em função da $|Al^{3+}|_{total}$ é o perfil de concentrações (Fig. 4.30).

Tabela 4.11 – Parâmetros do ajuste a $HG^s$ das $MEE^s$ do sistema HQ-$Al^{3+}$. Junto de cada valor encontra-se a respectiva imprecisão.

| | $HG_{(390;505,6)}$ | $HG_{(393;561)}$ | $HG_{(160;503)}$ | $HG_{(257;407)}$ |
|---|---|---|---|---|
| $\overline{Ex}$ | 390±1 | 393±6 | 160±30 | 257±10 |
| $b_{\overline{Ex}}$ | $11x10^2$±$1x10^2$ | $13x10^2$±$2x10^2$ | $19x10^2$±$2x10^2$ | $131x10^2$±$3x10^2$ |
| $\overline{Em}$ | 505,6±0,3 | 561±13 | 503±3 | 407±4 |
| $b_{\overline{Em}}$ | 150x10±8x10 | 132x10±8x10 | $39x10^3$±$8x10^3$ | 262x10±9x10 |

Tabela 4.12 – Valor dos termos pré-exponenciais. O valor do parâmetro $R^2_{Gaussiana}$ encontra-se ao lado de cada conjunto dos quatro termos pré-exponenciais O $R^2_{Gaussiana}$ global dos perfis de concentração é de 0,875.

| $\lvert Al^{3+}\rvert_{total}$, mol/L | $R^2_{Gaussiana}$ | $HG_{(390;505,6)}$ | $HG_{(393;561)}$ | $HG_{(160;503)}$ | $HG_{(257;407)}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,00 | 0,9577 | 9,7±0,2 | 1,8±0,2 | 23,0±0,2 | 52,6±0,2 |
| $9,80x10^{-8}$ | 0,9913 | 23,06±0,06 | 3,74±0,06 | 25,44±0,06 | 28,71±0,05 |
| $2,45x10^{-7}$ | 0,9911 | 25,76±0,07 | 4,28±0,06 | 27,76±0,07 | 28,66±0,05 |
| $4,90x10^{-7}$ | 0,9913 | 29,66±0,07 | 4,86±0,06 | 30,52±0,07 | 28,05±0,05 |
| $7,35x10^{-7}$ | 0,9894 | 24,07±0,06 | 4,33±0,06 | 24,79±0,06 | 25,83±0,05 |
| $9,80x10^{-7}$ | 0,9916 | 55,6±0,1 | 9,3±0,1 | 50,1±0,1 | 25,59±0,08 |
| $2,45x10^{-6}$ | 0,9903 | 69,4±0,1 | 11,6±0,1 | 60,4±0,1 | 23,4±0,1 |
| $4,90x10^{-6}$ | 0,9899 | 106,0±0,2 | 18,0±0,2 | 89,3±0,2 | 21,0±0,2 |
| $7,35x10^{-6}$ | 0,9889 | 179,5±0,4 | 31,0±0,4 | 149,4±0,4 | 18,2±0,3 |
| $9,80x10^{-6}$ | 0,9895 | 248,8±0,5 | 42,6±0,5 | 204,0±0,5 | 16,6±0,4 |
| $2,45x10^{-5}$ | 0,9869 | 664±2 | 116±2 | 548±2 | 0±1 |
| $4,90x10^{-5}$ | 0,9743 | 1030±4 | 181±3 | 871±3 | 0±2 |
| $7,35x10^{-5}$ | 0,9623 | 1307±7 | 219±4 | 1089±4 | 0±3 |
| $9,80x10^{-5}$ | 0,9539 | 1398±10 | 261±5 | 1258±5 | 0±3 |
| $2,45x10^{-4}$ | 0,8448 | 966±19 | 294±9 | 1578±11 | 0±7 |
| $4,90x10^{-4}$ | 0,7757 | 377±11 | 224±10 | 1613±14 | 0±8 |
| $7,35x10^{-4}$ | 0,8023 | 475±12 | 241±10 | 1679±14 | 0±8 |
| $9,80x10^{-4}$ | 0,8007 | 519±13 | 264±10 | 1718±15 | 0±8 |

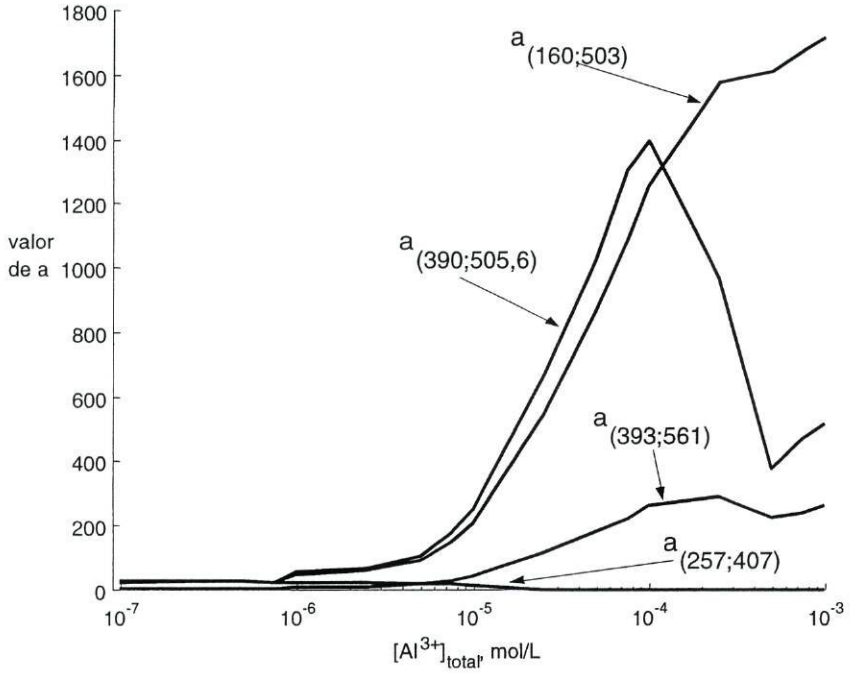



Fig. 4.30- Representação dos perfis de concentração para o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$.

## 4.3.3 - **MEE decompostos em espectros puros**

O sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ é decomposto em componentes (Tabela 4.13) de cuja análise dos parâmetros de avaliação (Tabela 4.14) se conclui que 2 componentes são suficientes para descrever a variância dos dados originais, logo apenas se representou a decomposição até mais um componente do número total de componentes em que o sistema pode ser traduzido.

Tabela 4.13 – Decomposição em espectros puros das MEE$^s$ do sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ usando o PARAFAC.

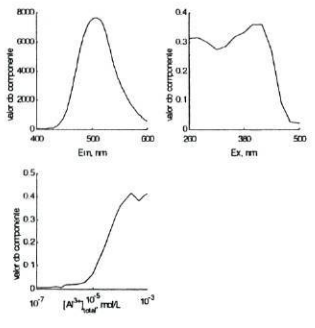
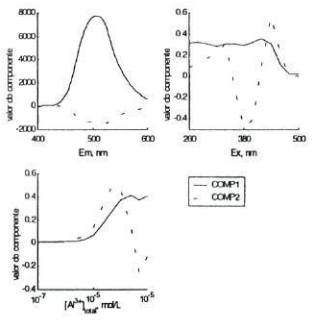
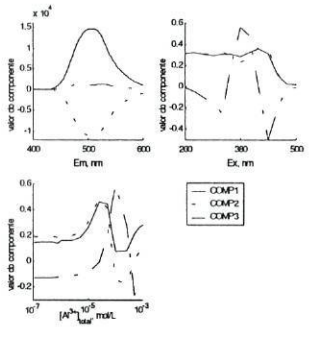
| 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|
|  |  |  |

Tabela 4.14 – Critérios de avaliação da decomposição do sistema HQ-$Al^{3+}$ resumida na Tabela 4.13.

| | 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|---|
| It | 4 | 2 | 86 |
| err | $2,80x10^8$ | $4,72x10^7$ | $3,62x10^7$ |
| corcondia | 100,0 | 100,0 | 0,25 |
| Fit | 90,64 | 93,91 | 96,21 |
| Xval | 90,60 | 93,73 | 96,05 |

## 4.3.4 – **Reprodução das MEE$^s$**

Na Fig. 4.31 são apresentadas as representações das $HG_{(390;505,6)}$ e $HG_{(393;561)}$, $HG^s$ dentro da janela de observação, e das $HG_{(160;503)}$ e $HG_{(257;407)}$, HG fora da janela de observação, para a $|Al^{3+}|_{total}$ de $4,90x10^{-5}$ mol/L cujo somatório das quatro $HG^s$ (eq[3.13] com apenas os termos das eq[3.14]) origina a MEE reproduzida nestas condições (Fig. 4.32).

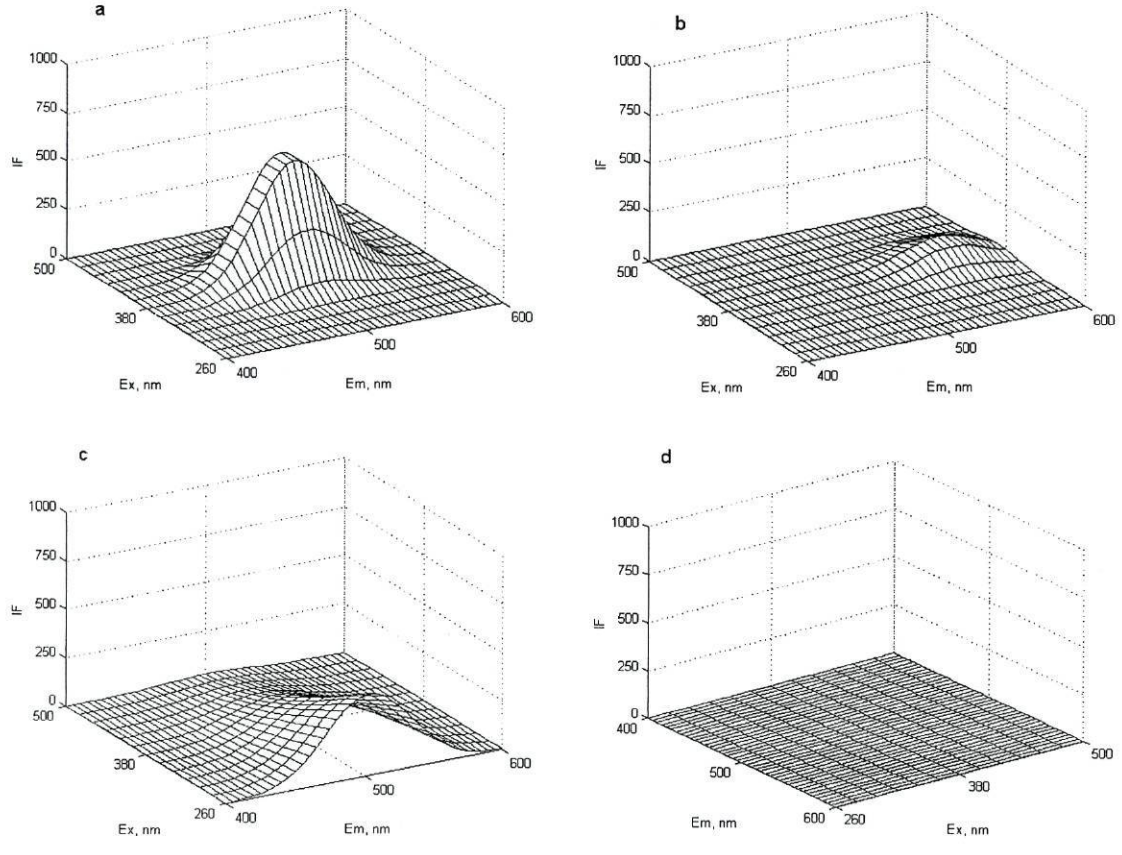



Fig. 4.31 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor da concentração de alumínio da Fig. 4.28. a) $HG_{(390;505,6)}$, b) $HG_{(393;561)}$, c) $HG_{(160;503)}$ e d) $HG_{(257;407)}$.

Com este ajuste, no qual se eliminou deliberadamente as zonas correspondentes às dispersões e como tal não vêm reproduzidas, foi possível isolar quatro fenómenos dentro da zona de fluorescência, na Fig. 4.33 está a representação da diferença entre as MEE original (Fig. 4.28) e a MEE reproduzida (Fig. 4.32), esta matriz de resíduos é uma possível representação do ruído de fundo e das dispersões

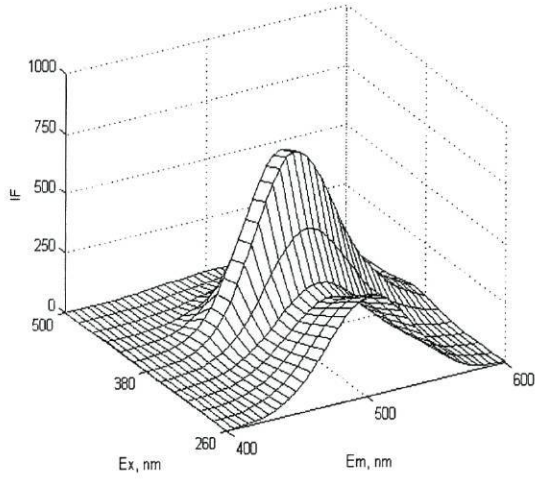



Fig. 4.32 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ reproduzidas na Fig. 4.31.

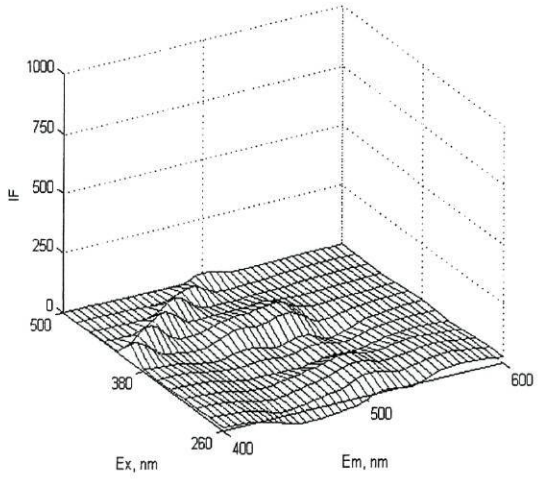



Fig. 4.33 – Representação da matriz de resíduos (sinal de fundo mais dispersão de primeira ordem) obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.28) e a MEE reproduzida (Fig. 4.32).

Usando agora os espectros puros da decomposição pelo PARAFAC, podemos verificar que o COMP1 representa as quatro $HG^s$ (Fig. 4.34) e o COMP2 (Fig. 4.35) é a compensação de o COMP1 conter as quatro $HG^s$, ou melhor, conter as duas colinas que são duas $HG^s$ não perfeitas. Na Fig. 4.36 pode ver-se que o que resta da MEE original, após remoção da MEE reproduzida com o COMP1, contem zonas bastante negativas (na ordem das – 400 unidades de fluorescência) e o segundo componente contem essas mesmas zonas (negativas) que pela sua subtracção da MEE resulta em resíduos com menor amplitude (superior a – 100 unidades de fluorescência, Fig. 4.32).

Nem o COMP1 nem o COMP2 contêm as dispersões de primeira ou segunda ordem.

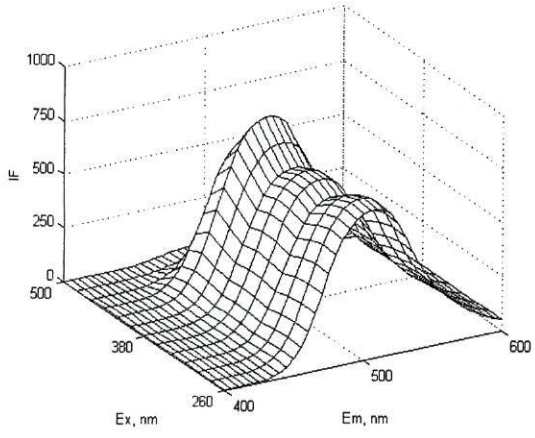



Fig. 4.34 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para a $|Al^{3+}|_{total}$ da Fig. 4.28.

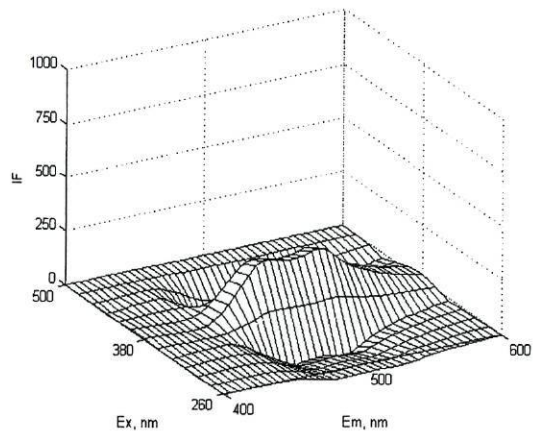



Fig. 4.35 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para a $|Al^{3+}|_{total}$ da Fig. 4.28.

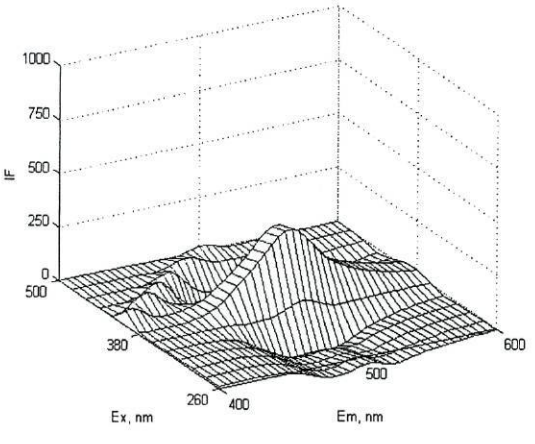



Fig. 4.36 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com o COMP1, para a $|Al^{3+}|_{total}$ da Fig. 4.28.

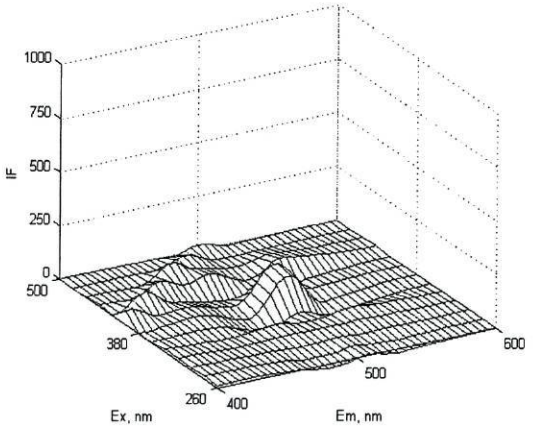



Fig. 4.37 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para a $|Al^{3+}|_{total}$ da Fig. 4.28.

## 4.3.5 – **Comentários dos resultados**

Analisando os resultados da decomposição pelo PARAFAC, pode concluir-se que este sistema contém 2 componentes, ou seja, que existe uma relação linear entre as variáveis até ao segundo espectro puro. O terceiro componente acarreta uma perda da consistência do núcleo (Tabela 4.12 – o teste de corcondia inferior a 100,0%) acompanhado de um grande aumento do número de iterações, it.

Não temos quatro componentes, em comparação com as quatro HG ajustadas, porque no COMP1 é possível incorporar as quatro HG (reprodução do somatório das quatro $HG^s$ (Fig. 4.32) comparada com a reprodução com o COMP1 (Fig. 4.34)) e a elevada interacção que existe entre as variáveis internas (HG não perfeitas) associada ao facto da maior colina crescer (em função da $|Al^{3+}|_{total}$) sobreposta à dispersão de primeira ordem, é uma explicação para a dificuldade nos ajustes efectuados – valores próximos de 0,90 de $R^2_{Gaussiana}$, no ajuste a $HG^s$ (Tabela 4.12), a forma irregular dos espectros puros de Ex e Em no ajuste a dois componentes (Tabela 4.13) e consequente necessidade do COMP2 compensar a forma dos COMP1 com partes negativas (Tabela 4.13).

Note-se, também, que para grandes concentrações de catião (a partir da concentração $4{,}90\text{x}10^{-5}$ mol/L) a IF excedeu a leitura máxima do equipamento (1000 unidades), embora isto não constituísse problema no ajuste a HG, na decomposição em espectros puros não é possível eliminar zonas da MEE (zonas que não linhas ou colunas completas), logo, estamos perante um problema de dados "forçados" que se traduzem num Fit de 94%.

Pela proximidade dos valores de Xval com o Fit, pode dizer-se que qualquer que seja a variação da escala a resposta é sempre a mesma, ou seja, não existem partes da MEE que encerrem fenómenos físicos com IF significativamente grandes que se possam ter em conta.

Goon [4] usou, para a curva de calibração neste sistema, o par (Ex;Em) de (365;450). Na modelação a $HG^s$ obtiveram-se quatro máximos: (390;505,6) e (393;561) dentro da janela de observação e fora os centros (160;503) e (257;407). E pelo PARAFAC temos dois máximos nos $COMP1^{Ex}$ e $COMP1^{Em}$ de (420;508,5) e para o COMP2 o par (440;436,5). Repare-se que o máximo do segundo componente equivale a Ex=Em, logo, este componente não é fluorescência, mas sim o complemento da dificuldade da decomposição mesmo a um componente.

O limite de detecção referido em [4] é de 2 mg de alumínio em 104 mL de solução aquosa que posteriormente é posta em contacto com 50 mL de clorofórmio, ou seja, $7\text{x}10^{-5}$ mol/L de alumínio total na fase aquosa. A $|Al^{3+}|_{total}$ a partir da qual o sistema começa a dar resposta é de, aproximadamente, $10^{-6}$ mol/L de alumínio total na fase aquosa.

## 4.4 - **Sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$**

### 4.4.1 - **MEE**

Este sistema tem quatro dimensões: duas internas (Ex e Em), uma externa ($[Mg^{2+}]_{total}$) e a quarta dimensão é a IF. Uma possível representação deste sistema tetradimensional (4D), é fazer a representação das $MEE^s$ no espaço da variável externa (Fig. 4.38).

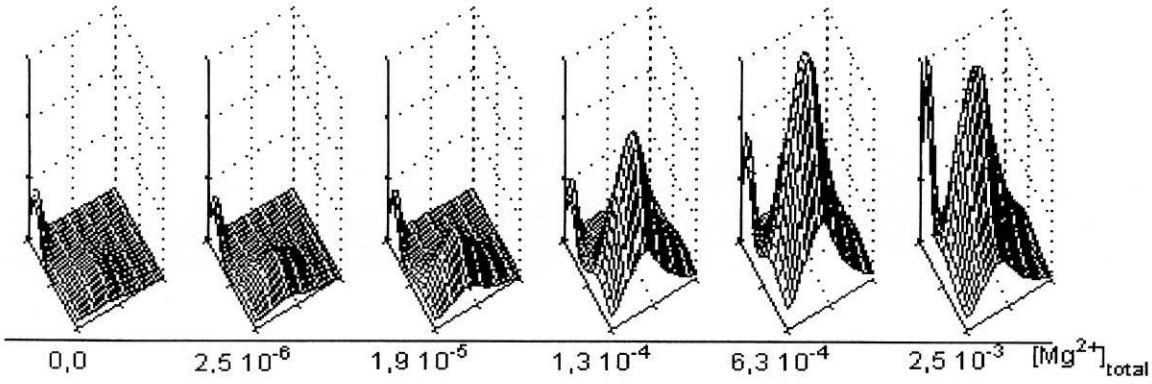
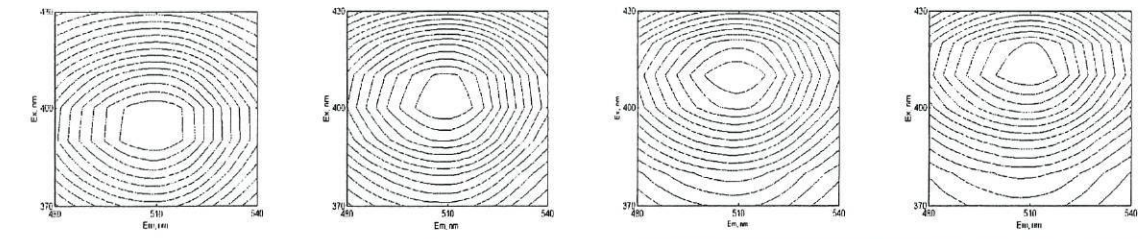



Fig. 4.38 – Representação 4D dos resultados do sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$. Apenas se representou os valores da $[Mg^{2+}]_{total}$ (mol/L) assinalados. Cada representação 3D é composta pelas IF (eixo vertical de 0 a 300 unidades de IF), Ex (eixo do lado esquerdo, de 360 a 460 nm) e Em (eixo do lado direito, de 450 a 600 nm). As $MEE^s$ que faltam são superfícies intermédias entre cada representação.

Na Fig. 4.38 pode ver-se que o incremento da $[Mg^{2+}]_{total}$ provoca o crescimento do pico na superfície das $MEE^s$, no entanto, repare-se que a partir da concentração $6{,}3x10^{-4}$ mol/L o valor máximo de IF deixa de crescer e desloca-se para valores de Ex maiores, uma visualização dos diagramas de contornos em função da $[Mg^{2+}]_{total}$, é possível verificar, mais facilmente, esse deslocamento da colina (Fig. 4.39).

Nas $MEE^s$, ainda da Fig. 4.38, pode ver-se que existe uma única colina, mais facilmente confirmada numa ampliação da $[Mg^{2+}]_{total}$ de 6,3x10-6 mol/L (Fig. 4.40) e $1{,}9x10^{-3}$ mol/L (Fig. 4.41). A representação por contornos da Fig. 4.41 (Fig. 4.42 esquerda) permite confirmar a existência desta colina, para além da colina correspondente à dispersão de primeira ordem (Ex = Em), verificando-se a não simetria das colinas (Fig. 4.42 direita).



$6,3x10^{-4}$ $1,3x10^{-3}$ $1,9x10^{-3}$ $2,5x10^{-3}$

$[Mg^{2+}]_{total}$

Fig. 4.39 – Representação por diagramas de contornos das MEE[s] do sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$ para as $[Mg^{2+}]_{total}$ (mol/L) assinaladas.

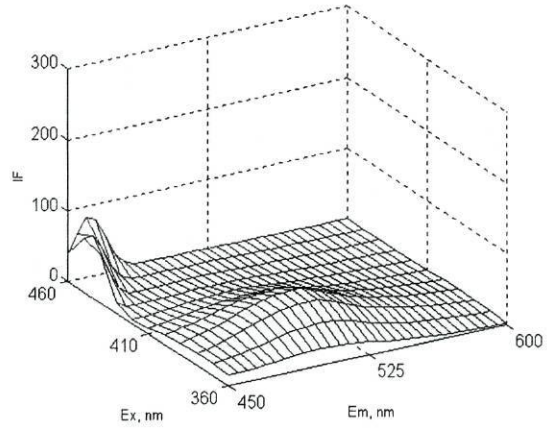



Fig. 4.40 – Representação 3D dos dados do sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$ para a $[Mg^{2+}]_{total}$ de $6,3x10^{-6}$ mol/L.

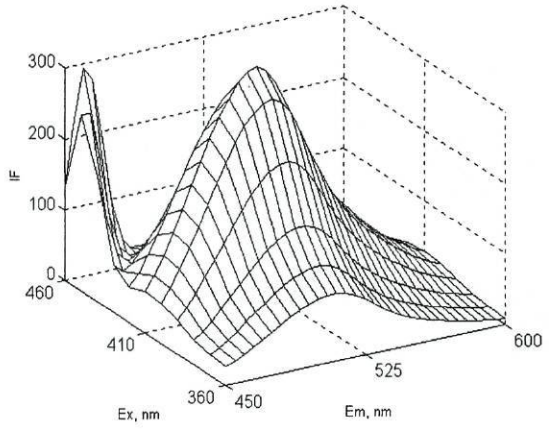



Fig. 4.41 – Representação 3D dos dados do sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$ para a $[Mg^{2+}]_{total}$ de $1,9x10^{-3}$ mol/L.

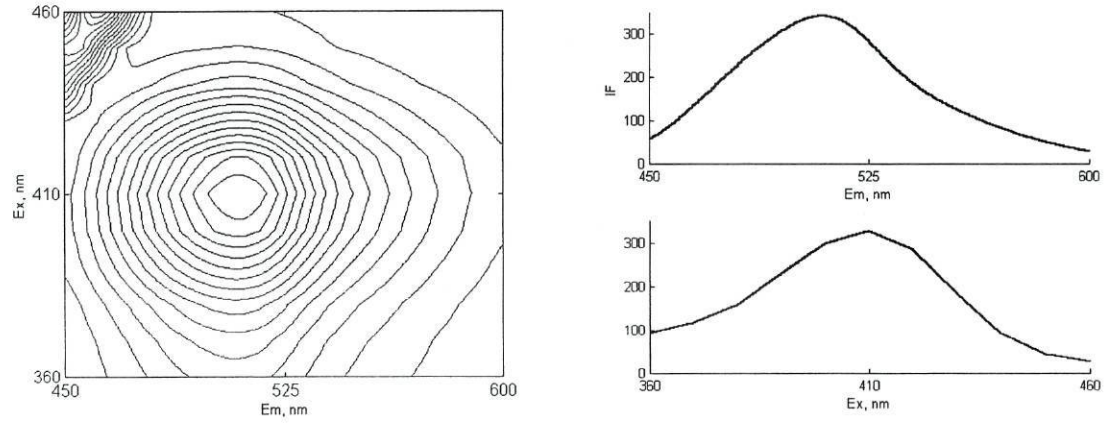



Fig. 4.42 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.41 (esquerda), do espectro de emissão quando o Ex é 410 nm (direita cima) e do espectro de excitação quando o Em é 260 nm (direita baixo).

## 4.4.2 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

Removeu-se as dispersões de primeira, segunda ordem e todas as IF cujo valor excedia 950 unidades relativas de fluorescência.

A representação dos máximos de IF (centros), no plano (Ex;Em) relativos à colina (Fig. 4.43), permite visualizar o deslocamento que esta HG faz quando se provoca um aumento da concentração de catião. A HG "nasce" no centro (385,34;500,0), cresce deslocando-se para o Em de 508,5 nm e, ainda em crescimento, desloca-se, agora, no sentido crescente do Ex de 409,67.

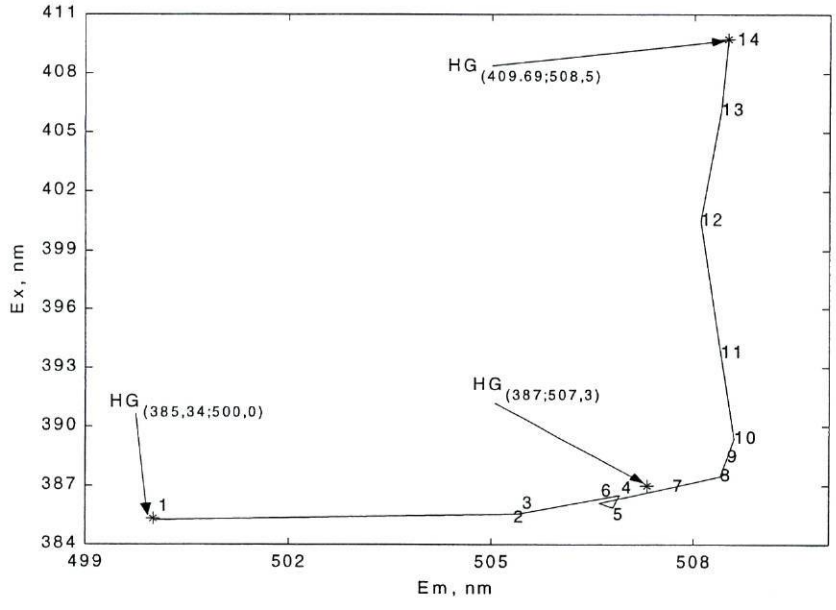



Fig. 4.43- Representação dos centros, para o sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$, na primeira tentativa de ajustar a uma HG. Os números representam as $[Mg^{2+}]_{total}$, sendo o 1 a concentração nula e o 14 a última, $2{,}5x10^{-3}$ mol/L (da Tabela 2.5).

Então esta evolução (Fig. 4.43) pode ser interpretada como o jogo de três HGs que, crescendo ou diminuindo, vão provocar este deslocamento, da seguinte forma: há uma HG de centro (385,34;500,0), a $HG_{(385,34;500,0)}$, que cresce com o aumento da quantidade de catião. Paralelamente há a $HG_{(387;507,3)}$ que começa a crescer para valores mais altos da concentração do catião, até que a certo ponto, a $HG_{(385,34;500,0)}$ começa a decrescer e, por volta desta concentração de catião, a Gaussiana $HG_{(409,69;508,5)}$ começa a crescer.

Pode imaginar-se estas três $HG^s$ como sendo a $HG_{(385,34;500,0)}$ relativa ao ligando e as outras duas a complexos de estequiometria diferentes, sendo todas fluorescentes e

com propriedades fotofísicas diferentes. Além disso, o facto de termos três $HG^s$ próximas permite resolver o problema de serem HG não perfeitas. Estas três HG originam a MEE do seguinte modo:

$$MEE = HG_{(385,34;500,0)} + HG_{(387;507,3)} + HG_{(409,69;508,5)}$$

onde

$$HG_{(385,34;500,0)} = a_{(385,34;500,0)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-500,0)^2}{3200} - \frac{(Ex-385,34)^2}{1062} \right)$$

$$HG_{(387,5;507,3)} = a_{(387,5;507,3)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-507,3)^2}{2100} - \frac{(Ex-387)^2}{600} \right)$$

e

$$HG_{(409,69;508,5)} = a_{(409,69;508,5)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-508,5)^2}{2330} - \frac{(Ex-409,69)^2}{1066} \right)$$

Na Tabela 4.15 encontram-se todos os parâmetros com as respectivas desvios e na Tabela 4.16 os termos pré-exponenciais, cuja representação em função da $[Mg^{2+}]_{total}$ é o perfil de concentrações (Fig. 4.44).

Tabela 4.15 – Parâmetros do ajuste a $HG^s$ das $MEE^s$ do sistema HQ-$Mg^{2+}$. Junto de cada valor encontra-se a respectiva imprecisão.

| | $HG_{(385,34;500,0)}$ | $HG_{(387;507,3)}$ | $HG_{(409,69;508,5)}$ |
|---|---|---|---|
| $\overline{Ex}$ | 385,34±0,08 | 387±1 | 409,69±0,09 |
| $b_{\overline{Ex}}$ | 1062±8 | $6x10^2$±$1x10^2$ | 1066±8 |
| $\overline{Em}$ | 500,0±0,1 | 507,3±0,6 | 508,5±0,1 |
| $b_{\overline{Em}}$ | 320x10±2x10 | $21x10^2$±$1x10^2$ | 233x10±2x10 |

Tabela 4.16 – Valor dos termos pré-exponenciais. O valor do ajuste $R^2_{Gaussiana}$ encontra-se ao lado de cada conjunto dos quatro termos pré-exponenciais O $R^2_{Gaussiana}$ global dos perfis de concentração é de 0,974.

| $[Mg^{2+}]_{total}$, mol/L | $R^2_{Gaussiana}$ | $HG_{(385,34;500,0)}$ | $HG_{(387;507,3)}$ | $HG_{(409,69;508,5)}$ |
|---|---|---|---|---|
| 0,00 | 0,973 | 26,0±0,3 | 3,2±0,3 | 0,95±0,09 |
| $2,5x10^{-6}$ | 0,985 | 21,6±0,3 | 28,0±0,4 | 3,1±0,1 |
| $6,3x10^{-6}$ | 0,985 | 24,4±0,4 | 29,2±0,4 | 3,3±0,1 |
| $1,3x10^{-5}$ | 0,988 | 25,5±0,5 | 66,6±0,6 | 10,8±0,2 |
| $1,9x10^{-5}$ | 0,988 | 26,6±0,5 | 60,6±0,6 | 7,3±0,2 |
| $2,5x10^{-5}$ | 0,989 | 28,6±0,6 | 70,4±0,6 | 8,4±0,2 |
| $6,3x10^{-5}$ | 0,988 | 31,0±0,8 | 107,7±0,9 | 19,4±0,3 |
| $1,3x10^{-4}$ | 0,987 | 35±1 | 191±2 | 41,1±0,5 |
| $1,9x10^{-4}$ | 0,986 | 43±2 | 219±2 | 61,6±0,6 |
| $2,5x10^{-4}$ | 0,984 | 48±2 | 235±2 | 84,5±0,8 |
| $6,3x10^{-4}$ | 0,976 | 67±3 | 189±3 | 164±1 |
| $1,3x10^{-3}$ | 0,969 | 85±3 | 55±4 | 240±1 |
| $1,9x10^{-3}$ | 0,965 | 52±3 | 0±3 | 276±1 |
| $2,5x10^{-3}$ | 0,952 | 10±3 | 0±4 | 296±1 |

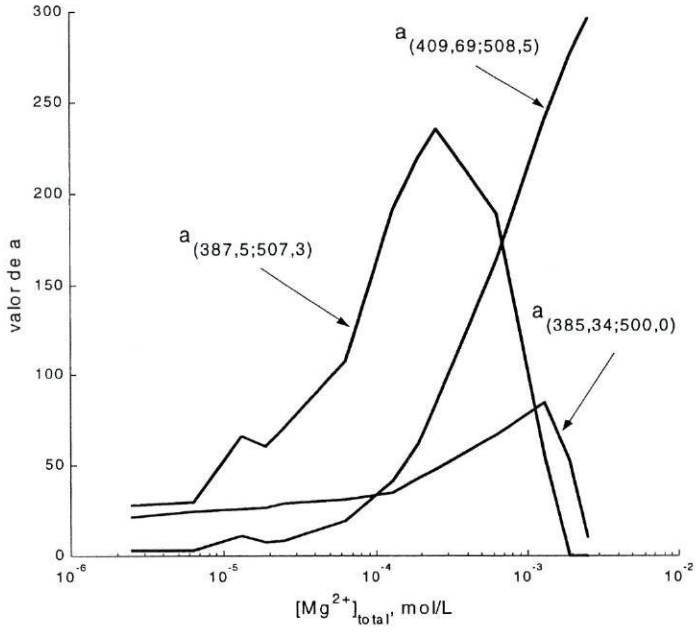



Fig. 4.44- Representação dos perfis de concentração para o sistema HQ-$Mg^{2+}$.

### 4.4.3 - **MEE decompostos em espectros puros**

O sistema HQ-$Mg^{2+}$ é decomposto em componentes (Tabela 4.17) de cuja análise dos parâmetros de avaliação (Tabela 4.18) se conclui que 2 componentes são suficientes para descrever a variância dos dados originais, logo apenas se representou a decomposição até mais um componente do número total de componentes em que o sistema pode ser traduzido.

Tabela 4.17 – Decomposição em espectros puros das MEE$^s$ do sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$ usando o PARAFAC.

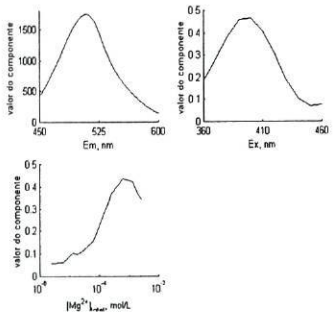
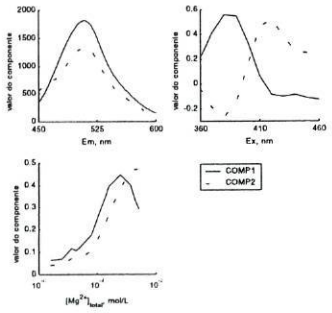
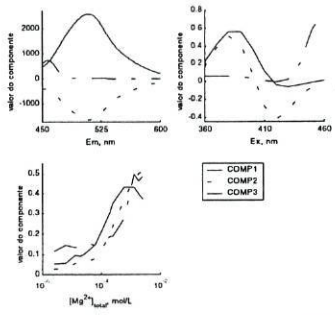
| 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|
|  |  |  |

Tabela 4.18 – Critérios de avaliação da decomposição do sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$ resumida na Tabela 4.17.

| | 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|---|
| It | 4 | 2 | 84 |
| Err | $3{,}88\times10^{7}$ | $1{,}68\times10^{7}$ | $2{,}07\times10^{6}$ |
| Corcondia | 100,0 | 100,0 | 26,97 |
| Fit | 80,40 | 93,09 | 98,15 |
| Xval | 80,39 | 93,09 | 98,15 |

### 4.4.4 – **Reprodução das MEE$^s$**

A reprodução das $HG_{(385,34;500,0)}$, $HG_{(387,5;507,3)}$ e $HG_{(409,69;508,5)}$ para a $|Mg^{2+}|_{total}$ de $6{,}3\times10^{-6}$ mol/L (Fig. 4.45) e $1{,}9\times10^{-3}$ mol/L (Fig. 4.46), cujo somatório das três HGs (eq[3.13] com apenas os termos das eq[3.14]) origina a MEE reproduzida nas respectivas condições (Fig. 4.47 e Fig. 4.48). A diferença da MEE original para a reproduzida origina a matriz de resíduos, que engloba o sinal ruído de fundo e a dispersão de primeira ordem (Fig. 4.49 e Fig. 4.50).

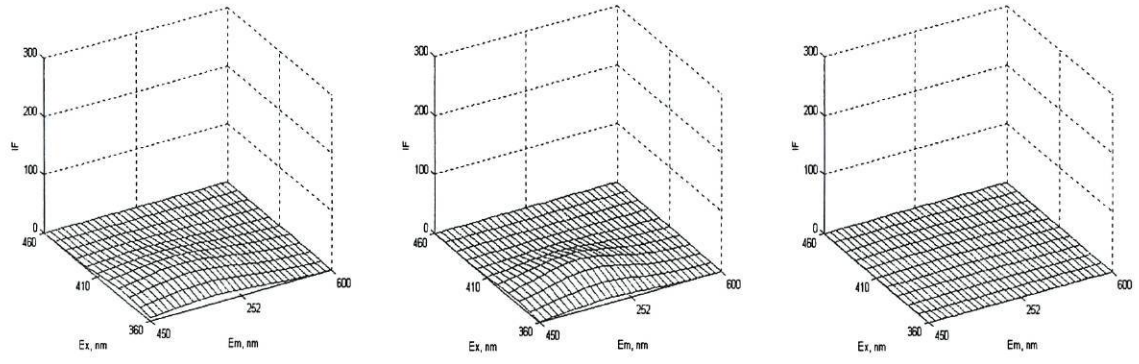



Fig. 4.45 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor da $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.40. Da esquerda para a direita temos a $HG_{(385,34;500,0)}$, $HG_{(387,5;507,3)}$ e $HG_{(409,69;508,5)}$.

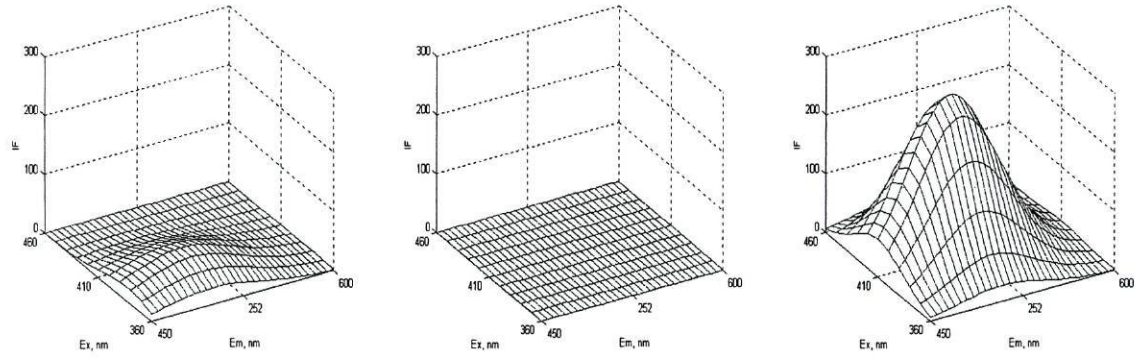



Fig. 4.46 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor da $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.41. Da esquerda para a direita temos a $HG_{(385,34;500,0)}$, $HG_{(387,5;507,3)}$ e $HG_{(409,69;508,5)}$.

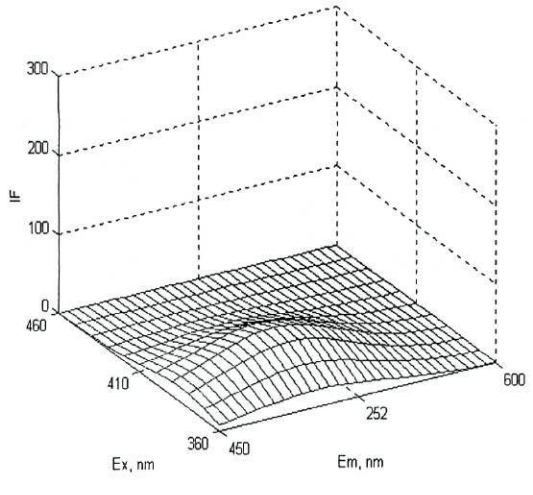



Fig. 4.47 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ reproduzidas na Fig. 4.45.

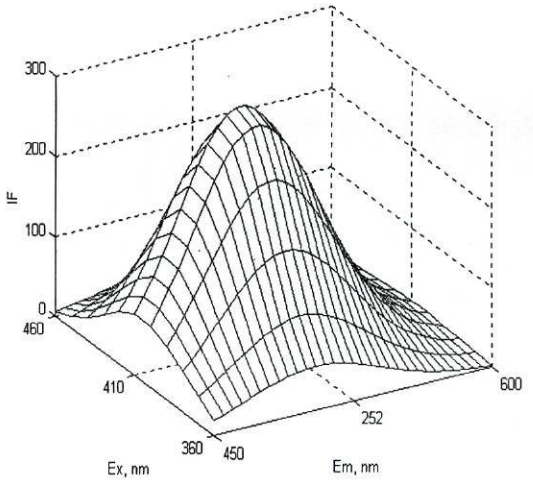



Fig. 4.48 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ reproduzidas na Fig. 4.46.

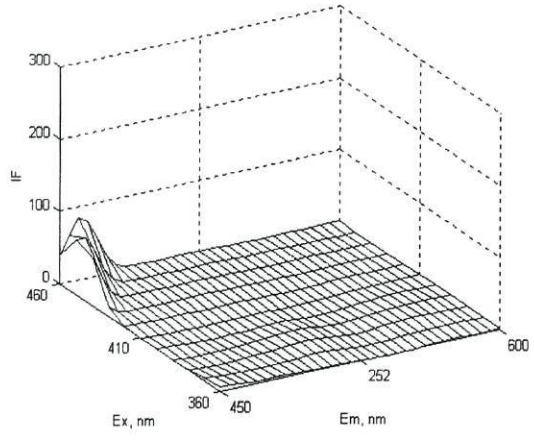



Fig. 4.49 – Representação da matriz de resíduos (sinal de fundo mais dispersão de primeira ordem) obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.40) e a MEE reproduzida (Fig. 4.47).

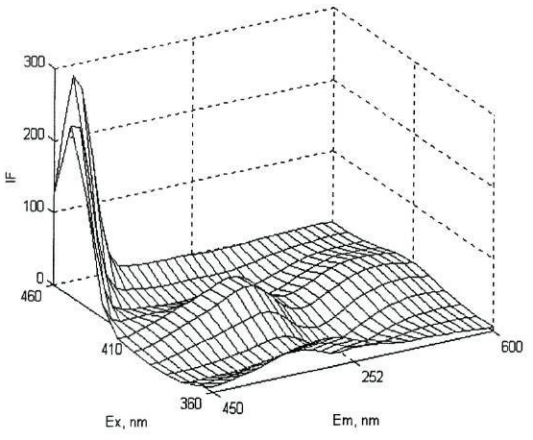



Fig. 4.50 – Representação da matriz de resíduos (sinal de fundo mais dispersão de primeira ordem) obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.41) e a MEE reproduzida (Fig. 4.48).

Usando agora os espectros puros, da decomposição pelo PARAFAC, podemos verificar que o COMP1 representa uma colina (Fig. 4.51 e Fig. 4.52) e o COMP2 (Fig. 4.53 e Fig. 4.54) é uma segunda colina que, como pode ver-se na Tabela 4.17 $COMP2^{Ex}$, contém uma parte bastante negativa (baixos valores do Ex e Em), a compensação da primeira colina não ser perfeita. Nenhum dos dois componente contêm a dispersão de primeira ordem (Fig. 4.55 e Fig. 4.56 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ de $1{,}9x10^{-3}$ mol/L).

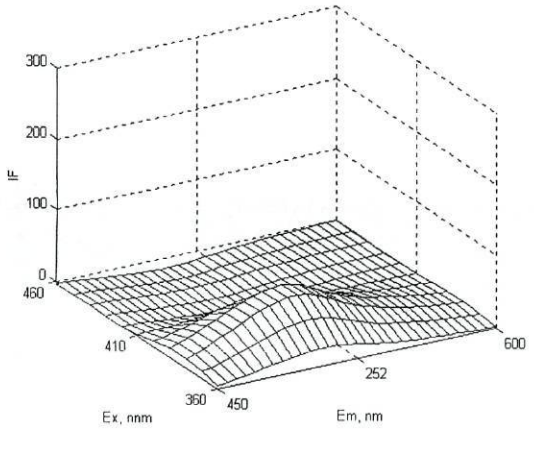



Fig. 4.51 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.40.

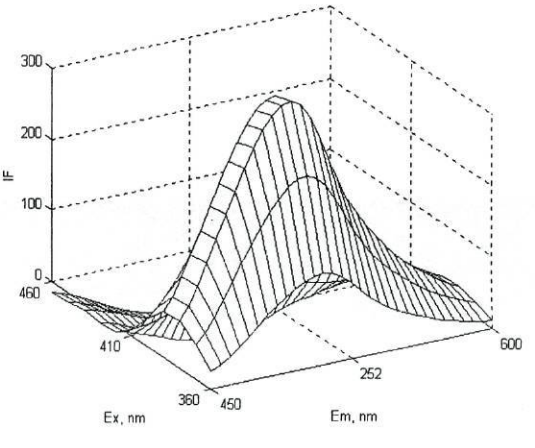



Fig. 4.52 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.41.

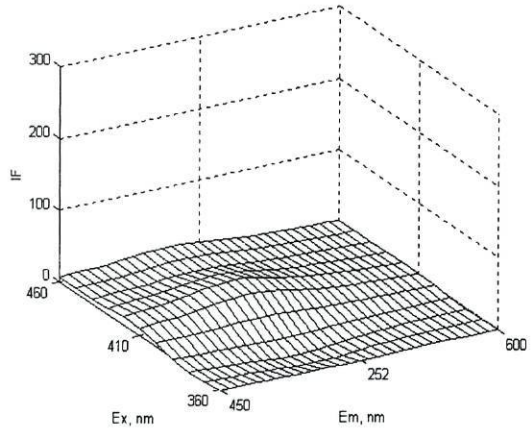



Fig. 4.53 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.40.

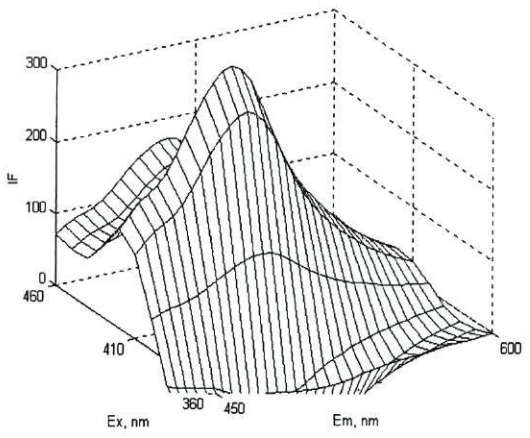



Fig. 4.54 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.41.

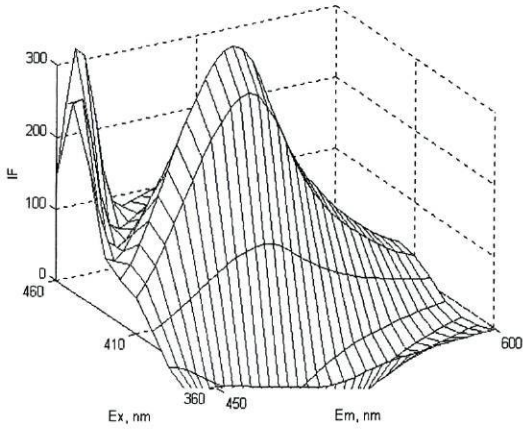



Fig. 4.55 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com o COMP1, para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.41.

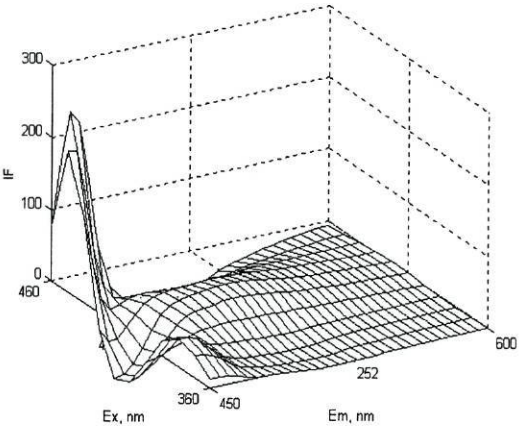



Fig. 4.56 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.41.

## 4.4.5 – **Comentários dos resultados**

Analisando os resultados da decomposição pelo PARAFAC, pode concluir-se que este sistema contém 2 componentes, ou seja, existe uma relação linear entre as variáveis até ao segundo espectro puro. O terceiro componente acarreta uma perda da consistência do núcleo (Tabela 4.18 – teste do corcondia inferior a 100,0%) associado a um grande aumento do número de iterações, it, embora, apenas com uma representatividade de 93%, Fit para dois componentes. Este valor do Fit é devido, provavelmente e como se viu, ao deslocamento da HG não simétrica (Fig. 4.43) que

acompanha o próprio crescimento do sinal (Fig. 4.44) que no ajuste a HG foi solucionado com três $HG^s$.

Para o par no plano (Ex;Em) Schachterde [5] usa como máximo o par (420;530). Os valores encontrados por ajuste a $HG^s$ foram de (385,34;500,0) para um fenómeno fluorescente (possivelmente da responsabilidade do ligando), (387;507,3) também de fluorescência de uma espécie química que se forma para baixas $|Mg^{2+}|_{total}$ e que desaparece com o aumento da $|Mg^{2+}|_{total}$ dando lugar a uma outra espécie química com propriedades fotoquímicas em (409,69;508,5) (Fig. 4.44), sendo este último, provavelmente, o complexo mencionado em [5].

No ajuste a espectros puros pode-se referir dois máximos, Tabela 4.17 a 2 componentes, sendo (380;510) e (420;510) para primeiro e segundo componente, respectivamente. O primeiro componente é como se fosse a $HG_{(385,34;500,0)}$ e $HG_{(387;507,3)}$ juntas e o segundo o fenómeno de fluorescência correspondente à $HG_{(409,69;508,5)}$ e da referência bibliográfica. Com dois componentes não foi possível descriminar as dispersões de primeira e segunda ordem.

O sistema começa a responder à $|Mg^{2+}|_{total}$, na solução etanol-água, de aproximadamente $10^{-5}$ mol/L. Em qualquer um dos ajustes, este valor está de acordo com a referência [5].

## 4.5 - **Sistema BSED-$Mg^{2+}$**

### 4.5.1 - **MEE**

Este sistema tem quatro dimensões: duas internas (Ex e Em), uma externa ($[Mg^{2+}]_{total}$) e a quarta dimensão é a IF. Uma possível representação deste sistema tetradimensional (4D), é fazer a representação das $MEE^s$ no espaço da variável externa (Fig. 4.57).

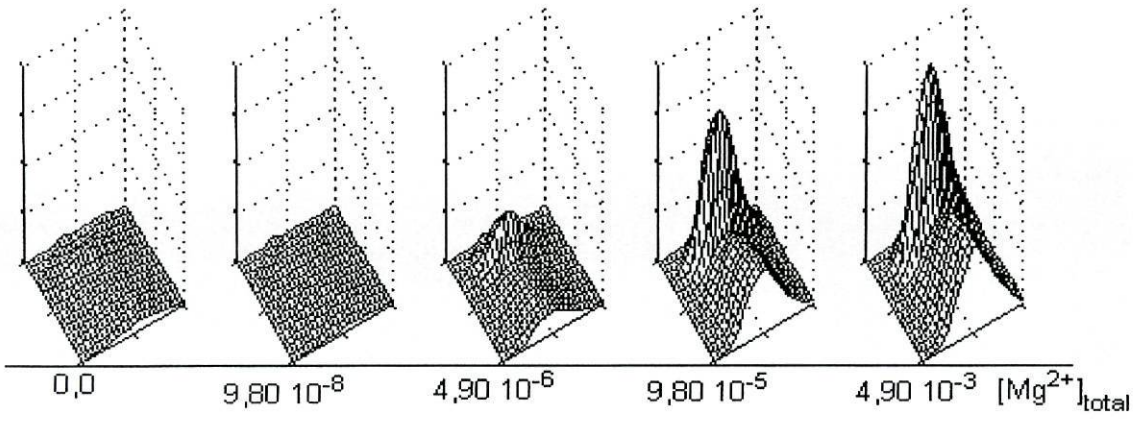



Fig. 4.57 – Representação 4D dos resultados do sistema BSED-$Mg^{2+}$. Apenas se representou os valores da $[Mg^{2+}]_{total}$ (mol/L) assinalados. Cada representação 3D é composta pelas IF (eixo vertical de 0 a 1000 unidades de IF), Ex (eixo do lado esquerdo, de 200 a 425 nm) e Em (eixo do lado direito, de 360 a 560 nm). As $MEE^s$ que faltam são superfícies intermédias entre cada representação.

Na Fig. 4.57 pode ver-se que o aumento da $|Mg^{2+}|_{total}$ provoca o crescimento dos picos na superfície das $MEE^s$ e fazendo as representações (ampliadas) das $MEE^s$, correspondente à $|Mg^{2+}|_{total}$ de $4{,}90 \times 10^{-9}$ mol/L (Fig. 4.58) e $9{,}80 \times 10^{-4}$ mol/L (Fig. 4.59), pode constatar-se a existência de duas colinas, situando-se as duas dentro da janela de observação, uma centrada no Ex de cerca de 400 nm e a outro junto do limite inferior do Ex de 200 nm, encontrando-se ambas alinhadas ao mesmo Em.

A representação por contornos da Fig. 4.59 (Fig. 4.60 esquerda) permite confirmar a existência destas duas colinas verificando-se a não simetria pouco acentuada das colinas (espectros de emissão, Fig. 4.60 direita). Com o aumento da $|Mg^{2+}|_{total}$ a dispersão de primeira ordem (Ex = Em) deixa de ser visível porque o crescimento da colina, acaba por englobar a dispersão (Fig. 4.61).

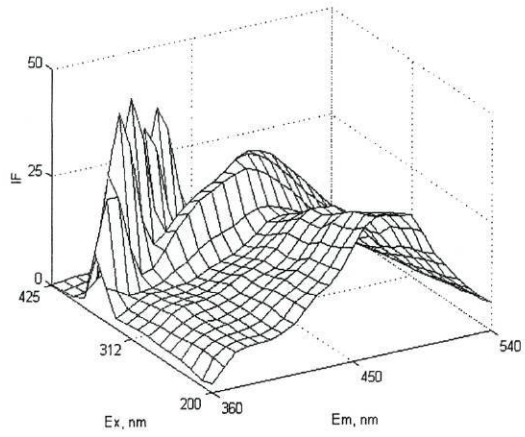



Fig. 4.58 – Representação 3D dos dados do sistema BSED-$Mg^{2+}$ para a $[Mg^{2+}]_{total}$ de $9{,}80x10^{-9}$ mol/L.

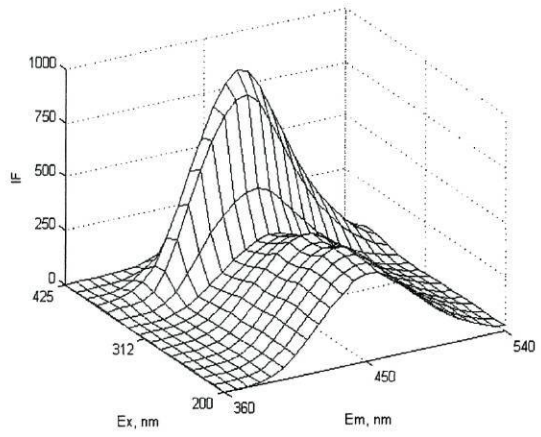



Fig. 4.59 – Representação 3D dos dados do sistema BSED-$Mg^{2+}$ para a $[Mg^{2+}]_{total}$ de $9{,}80x10^{-4}$ mol/L.

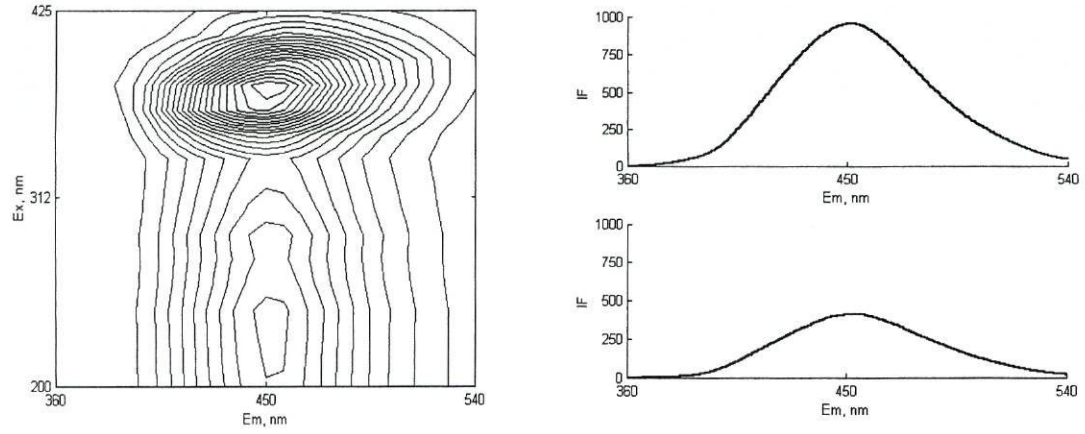



Fig. 4.60 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.59 (esquerda) e dos espectros de emissão quando o Ex é 380 nm (direita cima) e o Ex é 200 nm (direita baixo).

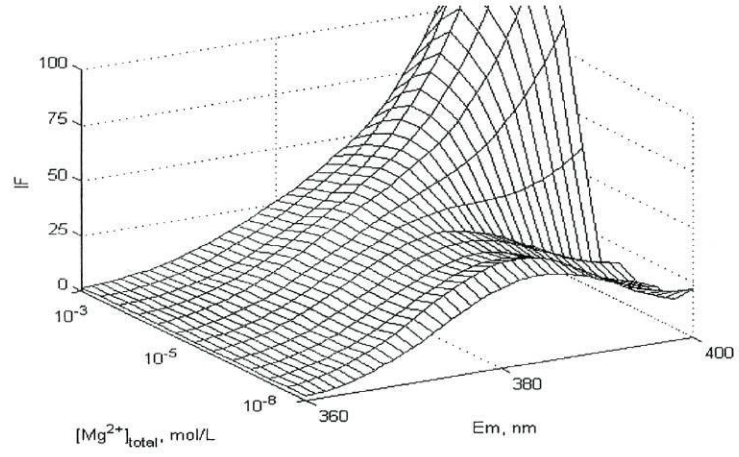



Fig. 4.61 – Representação 3D das IF em função dos Em e $[Mg^{2+}]_{total}$. A dispersão verifica-se quando Em é igual ao Ex (380 nm).

## 4.5.2 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

Após a remoção das dispersões de primeira, segunda ordem e de todas as IF cujo valor excedia 950 unidades relativas de fluorescência, foi possível detectar a existência de três HG$^s$ - $HG_{(369,2;439)}$, $HG_{(385;474)}$ e $HG_{(233;451)}$, as MEE$^s$ ficam então definidas:

$$MEE = HG_{(369,2;439)} + HG_{(385;474)} + HG_{(233;451)}$$

onde

$$\mathrm{HG}_{(369,2;439)} = \mathrm{a}_{(369,2;439)} \cdot \exp\left( -\frac{(\mathrm{Em}-439)^2}{400} - \frac{(\mathrm{Ex}-369,2)^2}{1300} \right)$$

$$HG_{(385;474)} = a_{(385;474)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-474)^2}{2200} - \frac{(Ex-385)^2}{510} \right)$$

e

$$HG_{(233;451)} = a_{(233;451)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-451)^2}{1890} - \frac{(Ex-233)^2}{25000} \right)$$

Na Tabela 4.19 encontram-se todos os estes parâmetros com os respectivos desvios e na Tabela 4.20 os termos pré-exponenciais, cuja representação em função da $|Mg^{2+}|_{total}$ é o perfil de concentrações (Fig. 4.62).

Tabela 4.19 – Parâmetros do ajuste a HG$^s$ das MEE$^s$ do sistema BSED-$Mg^{2+}$. Junto de cada valor encontra-se a respectiva imprecisão.

| | $HG_{(369,2;439)}$ | $HG_{(385;474)}$ | $HG_{(233;451)}$ |
|---|---|---|---|
| $\overline{Ex}$ | 369,2±0,4 | 385±10 | 233±5 |
| $b_{\overline{Ex}}$ | $13x10^2$±$1x10^2$ | 51x10±4x10 | $25x10^3$±$6x10^3$ |
| $\overline{Em}$ | 439±1 | 474±8 | 451±4 |
| $b_{\overline{Em}}$ | 40x10±3x10 | $22x10^2$±$2x10^2$ | 189x10±3x10 |

Tabela 4.20 – Valor dos termos pré-exponenciais. O valor do ajuste $R^2_{Gaussiana}$ encontra-se ao lado de cada conjunto dos três termos pré-exponenciais O $R^2_{Gaussiana}$ global dos perfis de concentração é de 0,980.

| $\|Mg^{2+}\|_{total}$, mol/L | $R^2_{Gaussiana}$ | $a_{(369,2;439)}$ | $a_{(385;474)}$ | $a_{(233;451)}$ |
|---|---|---|---|---|
| 0,00 | 0,792 | 37,2±0,6 | 32,0±0,5 | 44,8±0,2 |
| $9,80x10^{-9}$ | 0,351 | 2,9±0,6 | 20,7±0,5 | 29,1±0,2 |
| $4,90x10^{-8}$ | 0,600 | 12,7±0,5 | 21,6±0,4 | 30,0±0,2 |
| $9,80x10^{-8}$ | 0,713 | 14,0±0,3 | 11,4±0,3 | 23,0±0,1 |
| $4,90x10^{-7}$ | 0,884 | 31,3±0,3 | 14,3±0,3 | 31,6±0,1 |
| $9,80x10^{-7}$ | 0,751 | 18,9±0,3 | 8,2±0,3 | 25,0±0,1 |
| $4,90x10^{-6}$ | 0,979 | 222,8±0,7 | 25,3±0,6 | 104,1±0,3 |
| $9,80x10^{-6}$ | 0,979 | 436±1 | 57±1 | 193,2±0,6 |
| $4,90x10^{-5}$ | 0,988 | 561±2 | 151±1 | 273,7±0,6 |
| $9,80x10^{-5}$ | 0,990 | 613±2 | 213±1 | 318,6±0,6 |
| $4,90x10^{-4}$ | 0,989 | 635±2 | 417±2 | 415,3±0,8 |
| $9,80x10^{-4}$ | 0,983 | 554±3 | 485±2 | 418±1 |
| $4,90x10^{-3}$ | 0,963 | 427±4 | 598±3 | 432±1 |

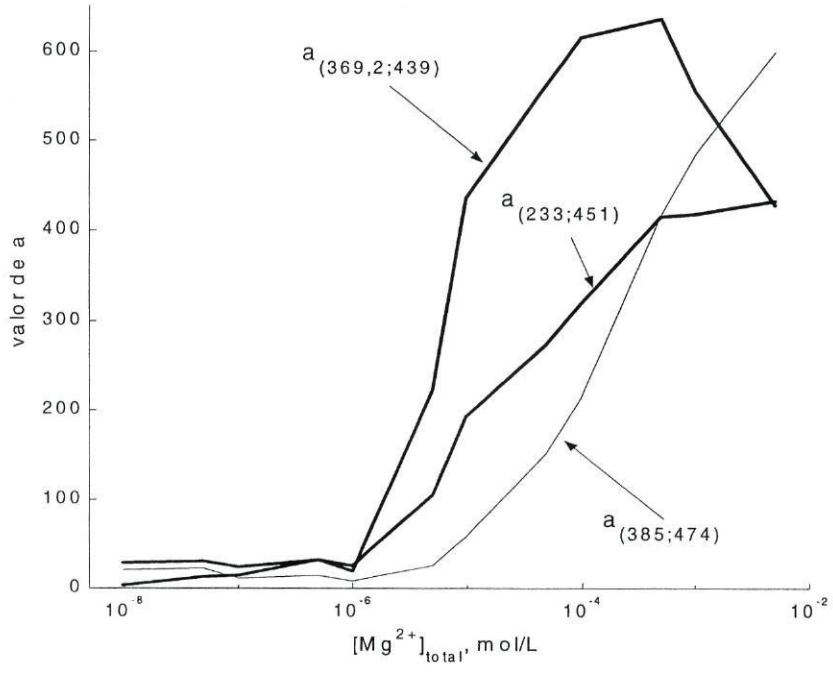



Fig. 4.62- Representação dos perfis de concentração para o sistema BSED-$Mg^{2+}$.

## 4.5.3 - **MEE decompostos em espectros puros**

O sistema BSED-$Mg^{2+}$ é decomposto em componentes (Tabela 4.21) de cuja análise dos parâmetros de avaliação (Tabela 4.22) se conclui que 2 componentes são suficientes para descrever a variância dos dados originais, logo apenas se representou a decomposição até mais um componente do número total de componentes em que o sistema pode ser traduzido.

Tabela 4.21 – Decomposição em espectros puros das $MEE^s$ do sistema BSED-$Mg^{2+}$ usando o PARAFAC.

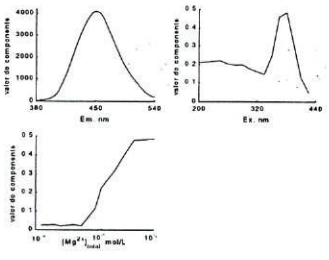
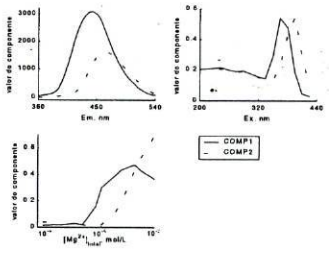
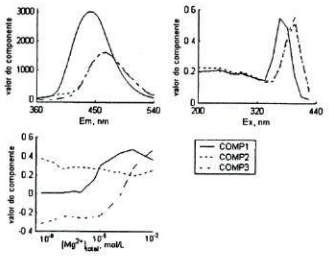
| 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|
|  |  |  |

Tabela 4.22 – Critérios de avaliação da decomposição do sistema BSED-$Mg^{2+}$ resumida na Tabela 4.21.

| | 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|---|
| It | 4 | 2 | 224 |
| Err | $3{,}90\text{x}10^{7}$ | $2{,}92\text{x}10^{6}$ | $9{,}72\text{x}10^{5}$ |
| Corcondia | 100,0 | 100,0 | 54,92 |
| Fit | 95,90 | 99,79 | 99,88 |
| Xval | 95,89 | 99,79 | 99,88 |

## 4.5.4 – **Reprodução das $MEE^s$**

Com os parâmetros do ajuste a $HG^s$ reproduziu-se a $HG_{(369,2;439)}$, $HG_{(385;474)}$ e $HG_{(233;451)}$, para $[Mg^{2+}]_{total}$ de $9{,}80\text{x}10^{-9}$ mol/L (Fig. 4.63) e $9{,}80\text{x}10^{-9}$ mol/L (Fig. 4.64), cujo somatório das $HG^s$ (eq[3.13] só com os termos das eq[3.14]) origina a MEE reproduzida nestas condições (Fig. 4.65 e Fig. 4.66, respectivamente).

A matriz de resíduos é obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.58 e Fig. 4.59) e a MEE reproduzida (Fig. 4.65 e Fig. 4.66, respectivamente) para as respectivas $[Mg^{2+}]_{total}$ de $9{,}80\text{x}10^{-9}$ mol/L (Fig. 4.67) e $9{,}80\text{x}10^{-9}$ mol/L (Fig. 4.68).

Repare-se que na concentração maior a dispersão de primeira ordem não vem assinalada, foi incorporada na HG que crescia junto desta área.

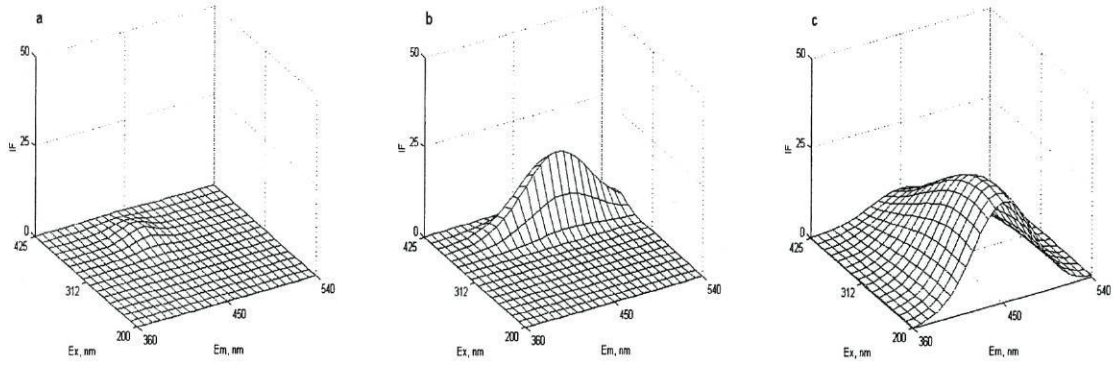



Fig. 4.63 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor da concentração de magnésio da Fig. 4.58. a) $HG_{(369,2;439)}$, b) $HG_{(385;474)}$ e c) $HG_{(233;451)}$.

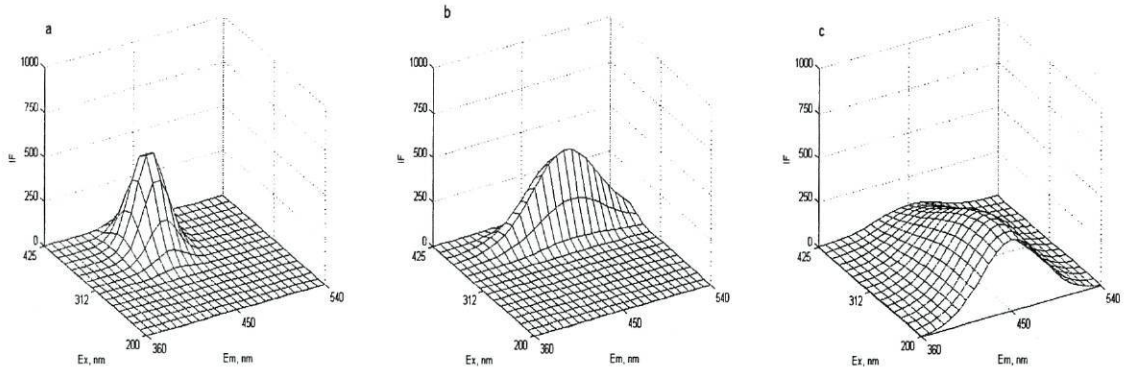



Fig. 4.64 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor da concentração de magnésio da Fig. 4.59. a) $HG_{(369,2;439)}$, b) $HG_{(385;474)}$ e c) $HG_{(233;451)}$.

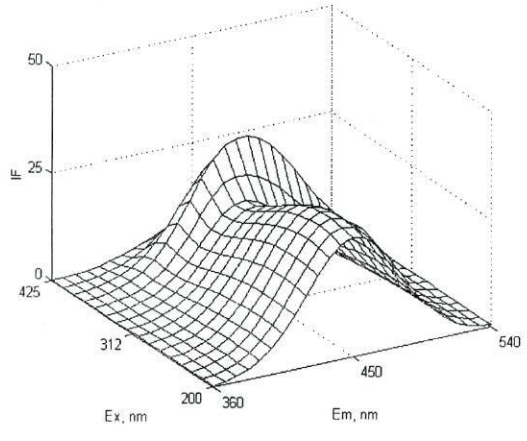



Fig. 4.65 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ reproduzidas na Fig. 4.63 ($|Mg^{2+}|_{total}$ de $9{,}80x10^{-9}$ mol/L).

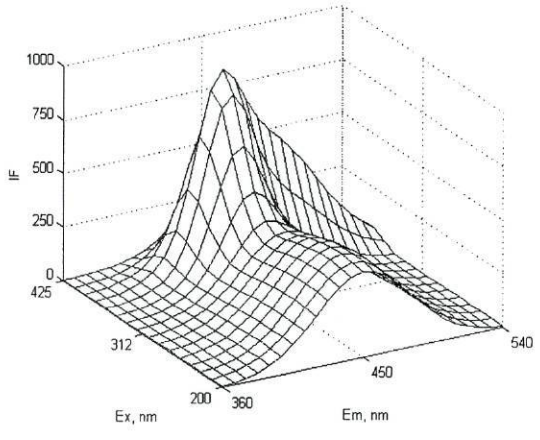



Fig. 4.66 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ reproduzidas na Fig. 4.64 ($|Mg^{2+}|_{total}$ de $9{,}80x10^{-4}$ mol/L).

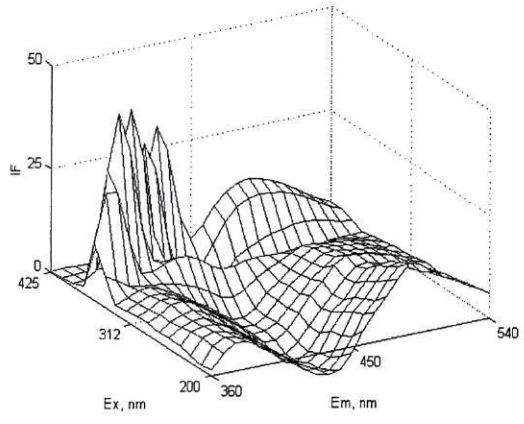



Fig. 4.67 – Representação da matriz de resíduos (sinal de fundo mais dispersão de primeira ordem) obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.58) e a MEE reproduzida (Fig. 4.65).

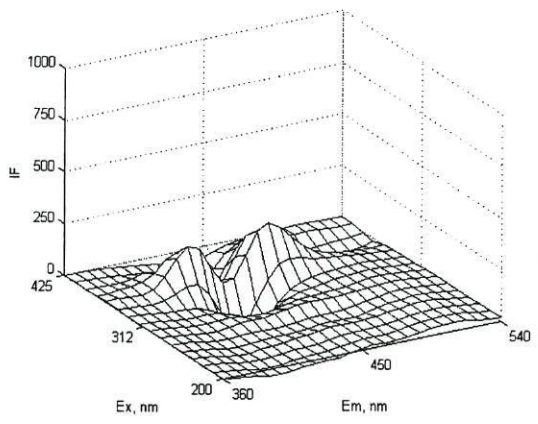



Fig. 4.68 – Representação da matriz de resíduos (sinal de fundo mais dispersão de primeira ordem) obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.59) e a MEE reproduzida (Fig. 4.66).

Usando agora os espectros puros, da decomposição pelo PARAFAC a dois componentes, podemos verificar que o COMP1 (Fig. 4.69 e Fig. 4.70) representa uma parte das duas $HG^s$ (centrada no Em de menor valor) e o COMP2 (Fig. 4.71 e Fig. 4.72) representa outra parte das duas $HG^s$ (centrada no Em de maior valor). Desta maneira, a dois componentes, o PARAFAC traduz 99,8 % dos dados originais (Fig. 4.73 e Fig. 4.74 comparado com os respectivos resíduos da Fig. 4.75 e Fig. 4.76).

Nem o COMP1 nem o COMP2 contêm as dispersões de primeira ou segunda ordem.

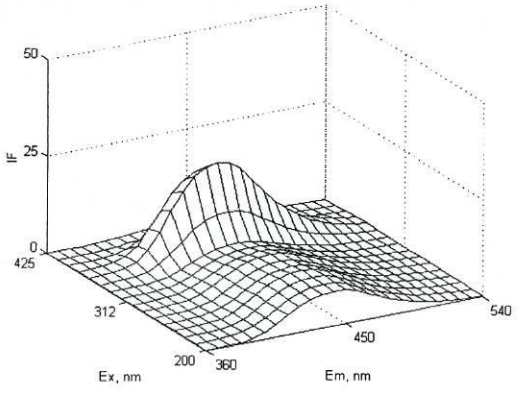



Fig. 4.69 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.58.

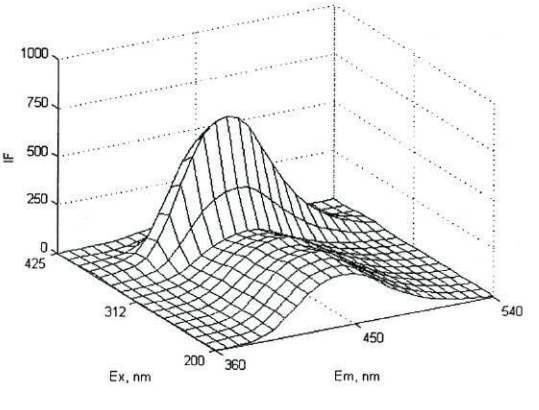



Fig. 4.70 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.59.

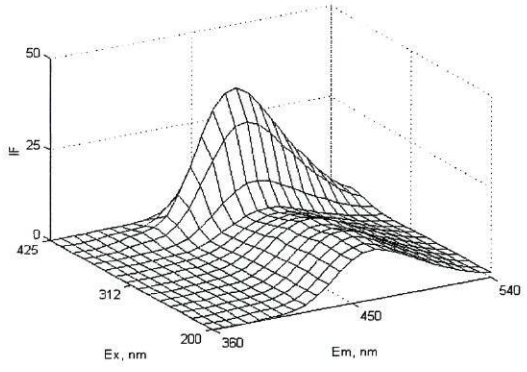



Fig. 4.71 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.58.

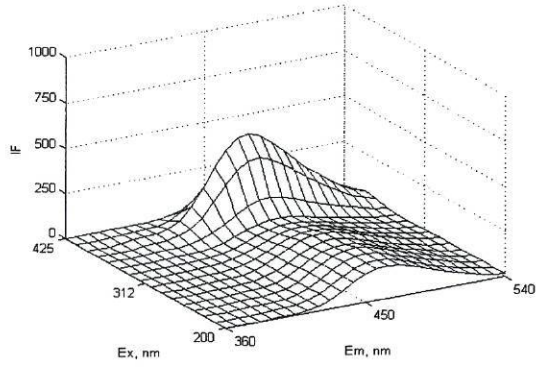



Fig. 4.72 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.59.

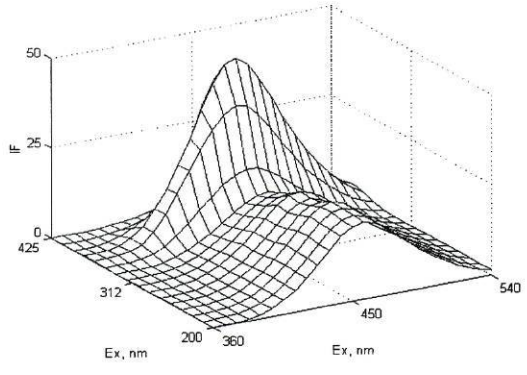



Fig. 4.73 – Representação da MEE reproduzida com a soma de COMP1 e COMP2 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.58.

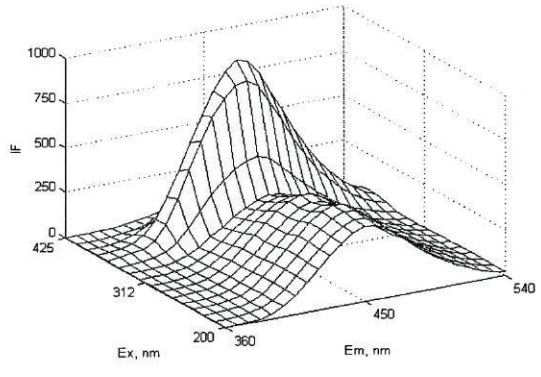



Fig. 4.74 – Representação da MEE reproduzida com a soma de COMP1 e COMP2 para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.59.

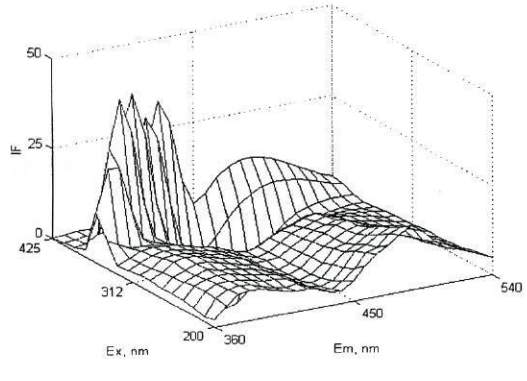



Fig. 4.75 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.58.

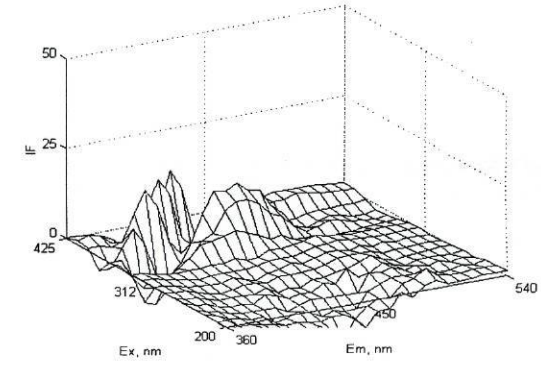



Fig. 4.76 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para a $|Mg^{2+}|_{total}$ da Fig. 4.59 (para esta concentração alterou-se a escala das IF para de 0 a 50).

## 4.5.5 – **Comentários dos resultados**

Os baixos valores de $R^2_{Gaussiana}$ no ajuste a HG, para baixos valores da concentração do catião (Tabela 4.17), deve-se ao quase nulo valor da IF em toda a MEE e logicamente nas zonas da $HG^s$, o que implica que o $R^2_{Gaussiana}$ seja o reflexo essencialmente do ruído de fundo. Repare-se que a partir da $|Mg^{2+}|_{total}$ de $5x10^{-7}$ mol/L o $R^2_{Gaussiana}$ sobe bastante e o $R^2_{Gaussiana}$ do perfil de concentrações (o global, 0,980) contempla, essencialmente, as $MEE^s$ de maior sinal de IF.

Analisando os resultados da decomposição pelo PARAFAC, pode concluir-se que este sistema contém, nitidamente, 2 componentes (Fit de 99,8% para estes dois componentes), ou seja, existe uma relação linear entre as variáveis até ao segundo espectro puro. O terceiro componente acarreta uma perda da consistência do núcleo (Tabela 4.22 – teste do corcondia inferior a 100,0%) associada a um grande aumento do número de iterações, it.

De acordo com White [6], o sistema BSED-$Mg^{2+}$ tem um máximo de fluorescência, no plano (Ex;Em), em (355;439). Os máximos encontrados na modelação a $HG^s$ foram: (369,2;439), (385;474) e (233;451). Do ajuste a espectros puros há dois máximos nítidos, um a (365;444) para o primeiro componente e (395:464) para o segundo componente (equivalendo às HG de centro (369,2;439), (385;474) devido à proximidade), remetendo para segundo plano, mas não menos importante, a HG de centro (233,451).

Pela análise dos centros das duas modelações, pode concluir-se que, neste sistema, há, nitidamente, a formação de dois complexos fluorescentes, na zona das $HG_{(369,2;439)}$, $HG_{(385;474)}$, cujos perfis se encontram na Fig. 4.6 e Tabela 4.21. Ou pelo menos há dois fenómenos de fluorescência com propriedades fotoquímicas diferentes.

White [6] refere, ainda, que o sistema tem um limite de detecção de $7x10^{-6}$ mol/L. Nas duas modelações o sistema começa a responder para uma $|Mg^{2+}|_{total}$, na solução DMF-água, de, aproximadamente, $10^{-6}$ mol/L (Fig. 4.6 e Tabela 4.21).

## 4.6 - **Sistema HOPSA-H$^+$**

### 4.6.1 - **MEE**

Este sistema tem quatro dimensões: duas internas (Ex e Em), uma externa (pH) e a quarta dimensão é a IF. Uma possível representação deste sistema tetradimensional (4D) é fazer a representação das MEE$^s$ no espaço da variável externa (Fig. 4.77).

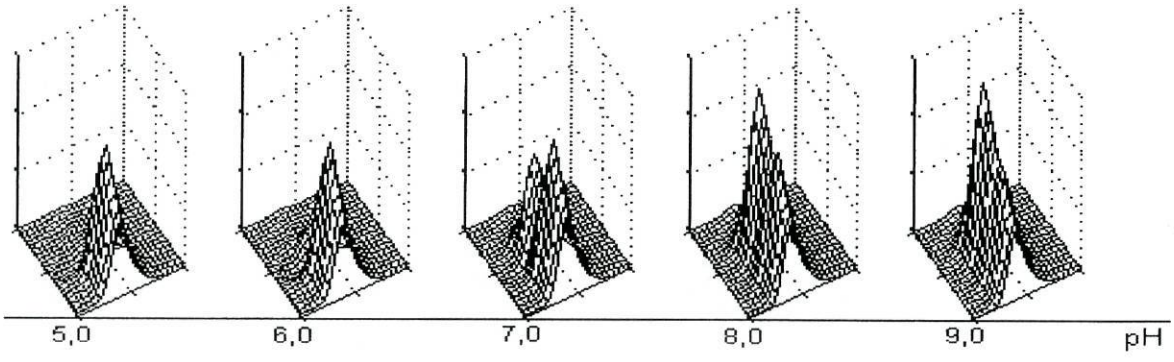



Fig. 4.77 – Representação 4D dos resultados do sistema HOPSA-H$^+$. Apenas se representou os valores de pH assinalados. Cada representação 3D é composta pelas IF (eixo vertical de 0 a 300 unidades de IF), Ex (eixo do lado esquerdo, de 350 a 550 nm) e Em (eixo do lado direito, de 430 a 630 nm). As MEE$^s$ que faltam são superfícies intermédias entre cada representação.

Existem duas colinas no interior da janela de observação (Fig. 4.77), cujos centros estão, sensivelmente, alinhados na dimensão Em; e na dimensão Ex situam-se: um acima dos 450 nm (colina que cresce, nitidamente, com o aumento do valor de pH) e o outro abaixo dos 450 nm (colina que decresce, muito pouco, com o aumento do valor de pH).

Fazendo as representações (ampliadas) das MEE$^s$, correspondentes ao valor de pH de 5,5 (Fig. 4.78) e 8,5 (Fig. 4.79), pode constatar-se a existência das duas colinas, as duas dentro da janela de observação. A representação por contornos da Fig. 4.78 (Fig. 4.80 esquerda) permite visualizar que, a este valor de pH, existe uma colina nítida e uma segunda bastante pequena, esta colina não é simétrica principalmente na dimensão Ex (espectro de emissão e excitação, Fig. 4.60 direita). A representação por contornos da Fig. 4.79 (Fig. 4.81 esquerda) permite confirmar a existência das duas colinas; a este valor de pH a segunda colina já se encontra bastante evidenciada, embora, também não seja simétrica (espectro de emissão, Fig. 4.81 direita cima) e no espectro de excitação pode ver-se a sobreposição das duas colinas (espectro de emissão e excitação, Fig. 4.60 direita).

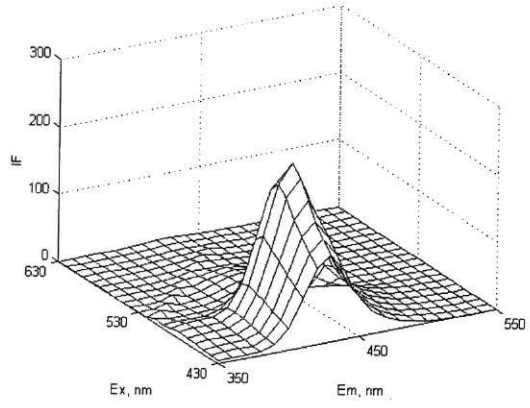



Fig. 4.78 – Representação 3D dos dados do sistema HOPSA-$H^+$ para o valor de pH 5,5.

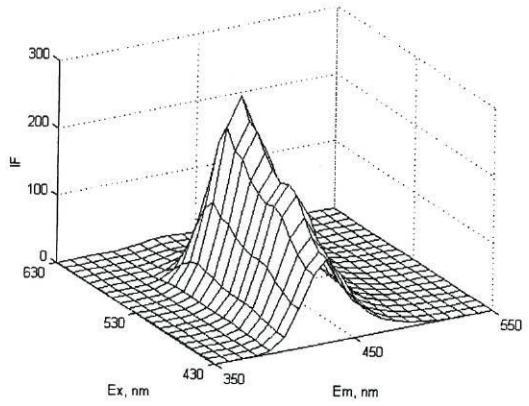



Fig. 4.79 – Representação 3D dos dados do sistema HOPSA-$H^+$ para o valor de pH 8,5.

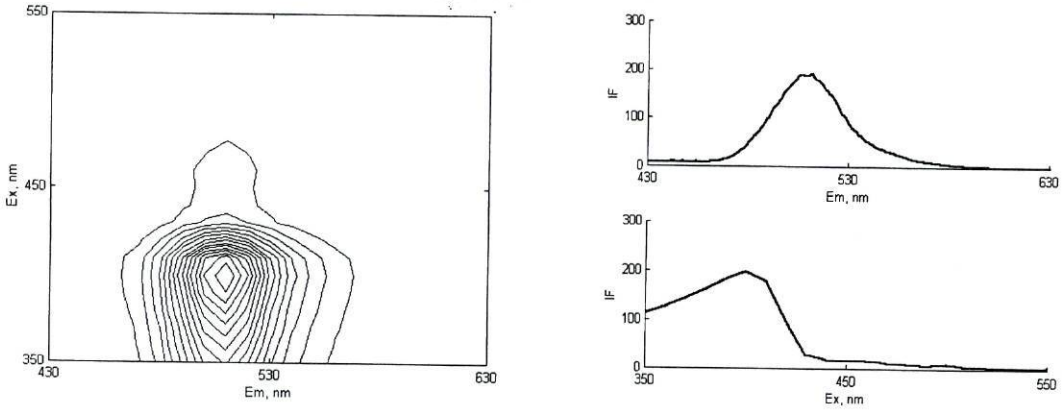



Fig. 4.80 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.78 (esquerda), do espectro de emissão quando o Ex é 380 nm (direita cima), e espectro de excitação quando o Em é 500 nm (direita baixo).

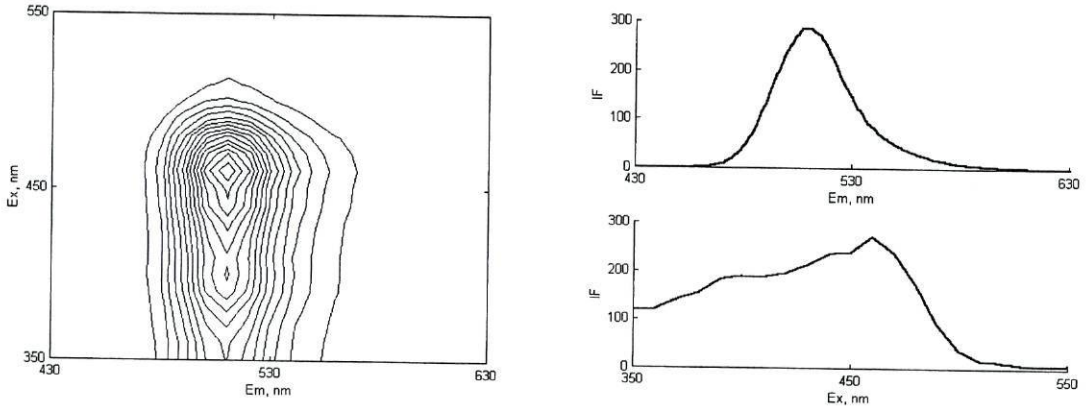



Fig. 4.81 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.79 (esquerda), do espectro de emissão quando o Ex é 460 nm (direita cima), e espectro de excitação quando o Em é 505 nm (direita baixo).

## 4.6.2 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

Após a remoção das dispersões de primeira e de segunda ordem, foi possível ajustar os dados a três HG$^s$ - $HG_{(404,86;509,3)}$, $HG_{(373,7;509,08)}$ e $HG_{(459;509,8)}$; constatando-se que o termo pré-exponencial da $HG_{(373,7;509,08)}$ não variava com o pH, então as MEE$^s$ ficam definidas:

$$MEE = HG_{(404,86;509,3)} + HG_{(373,7;509,08)} + HG_{(459;509,8)}$$

onde

$$HG_{(404,86;509,3)} = a_{(404,86;509,3)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-509,3)^2}{730} - \frac{(Ex-404,86)^2}{283} \right)$$

$$HG_{(373,7;509,08)} = 162 \cdot \exp\left( -\frac{(Em-509,08)^2}{688} - \frac{(Ex-373,7)^2}{1799} \right)$$

e

$$HG_{(459;509,8)} = a_{(459;509,8)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-509,8)^2}{650} - \frac{(Ex-459)^2}{1430} \right)$$

Na Tabela 4.23 encontram-se todos os estes parâmetros com os respectivos desvios e na Tabela 4.24 os termos pré-exponenciais, cuja representação, em função do valor de pH, é o perfil de concentrações (Fig. 4.82).

Tabela 4.23 – Parâmetros do ajuste a HG$^s$ das MEE$^s$ do sistema HOPSA-H$^+$. Junto de cada valor encontra-se a respectiva imprecisão.

| | $HG_{(404,86;509,3)}$ | $HG_{(373,7;509,08)}$ | $HG_{(459;509,8)}$ |
|---|---|---|---|
| $a_{(373,7;509,08)}$ | --- | 162±13 | --- |
| $\overline{Ex}$ | 404,86±0,08 | 373,7±0,2 | 459±6 |
| $b_{\overline{Ex}}$ | 283±5 | 1799±19 | 65· 10±2· 10 |
| $\overline{Em}$ | 509,3±0,1 | 509,08±0,05 | 509,8±0,9 |
| $b_{\overline{Em}}$ | 730±8 | 688±4 | 143x10±7x10 |

Tabela 4.24 – Valor dos termos pré-exponenciais. O valor do ajuste $R^2_{Gaussiana}$ encontra-se ao lado de cada conjunto dos quatro termos pré-exponenciais O $R^2_{Gaussiana}$ global dos perfis de concentração é de 0,978.

| pH | $R^2_{Gausssiana}$ | $a_{(404,86;509,3)}$ | $a_{(459;509,8)}$ |
|---|---|---|---|
| 5,0 | 0,987 | 126,4±0,4 | 6,3±0,3 |
| 5,5 | 0,988 | 125,5±0,3 | 11,9±0,3 |
| 6,0 | 0,988 | 124,6±0,4 | 29,7±0,3 |
| 6,5 | 0,985 | 121,2±0,5 | 69,1±0,3 |
| 7,0 | 0,979 | 115,1±0,6 | 143,7±0,4 |
| 7,5 | 0,977 | 100,0±0,7 | 224,4±0,5 |
| 8,0 | 0,975 | 80,8±0,8 | 257,4±0,6 |
| 8,5 | 0,971 | 66,6±0,9 | 266,2±0,6 |
| 9,0 | 0,969 | 62,5±0,9 | 273,3±0,7 |

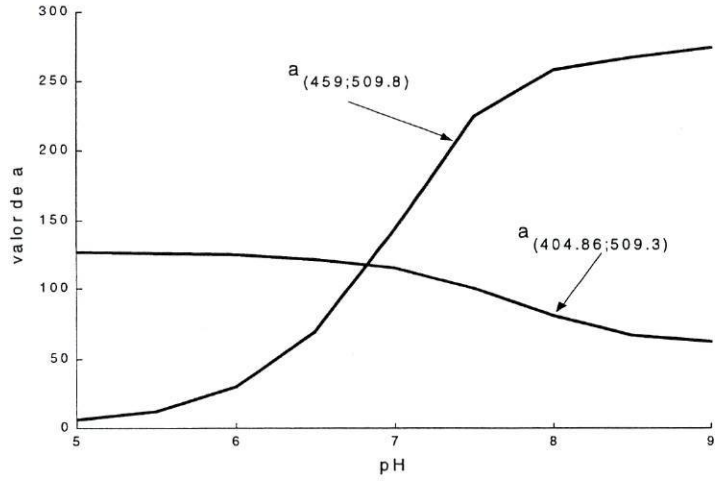



Fig. 4.82 - Representação dos perfis de concentração para o sistema HOPSA-$H^+$.

## 4.6.3 - **MEE decompostos em espectros puros**

O sistema HOPSA-$H^+$ é decomposto em componentes (Tabela 4.25) de cuja análise dos parâmetros de avaliação (Tabela 4.26) se conclui que 2 componentes são suficientes para descrever a variância dos dados originais, logo apenas se representou a decomposição até mais um componente do número total de componentes em que o sistema pode ser traduzido.

Tabela 4.25 – Decomposição em espectros puros das MEE$^s$ do sistema HOPSA-H$^+$ usando o PARAFAC.

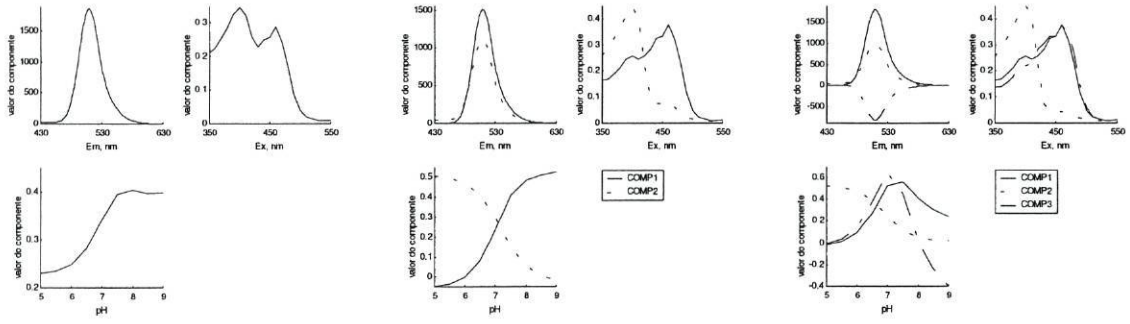
| 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|
|  | | |

Tabela 4.26 – Critérios de avaliação da decomposição do sistema HOPSA-H$^+$ resumida na Tabela 4.25.

| | 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|---|
| It | 5 | 2 | 298 |
| Err | $2{,}25\text{x}10^7$ | $1{,}74\text{x}10^5$ | $3{,}73\text{x}10^4$ |
| Corcondia | 100,0 | 100,0 | -8,17 |
| Fit | 90,49 | 99,92 | 99,98 |
| Xval | 90,49 | 99,91 | 99,97 |

## 4.6.4 – **Reprodução das MEE$^s$**

Com os parâmetros do ajuste a HG$^s$ reproduziu-se a $HG_{(373,7;509,08)}$, HG cujo parâmetro pré-exponencial não varia com o valor de pH (Fig. 4.83), e as $HG_{(404,86;509,3)}$ e $HG_{(459;509,8)}$ para o valor de pH de 5,5 (Fig. 4.84) e 8,5 (Fig. 4.85), cujo somatório (eq[3.13] com apenas os termos das eq[3.14]) originam as MEE$^s$ reproduzidas nestas condições (Fig. 4.86 e Fig. 4.87, respectivamente).

A matriz de resíduos é obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.78 para o valor de pH de 5,5 e Fig. 4.79 para o valor de pH de 8,5) e a MEE reproduzida (Fig. 4.86 e Fig. 4.87, respectivamente). Estas matrizes de resíduos (Fig. 4.88 e Fig. 4.89) contêm as interacções, partes negativas no plano (Ex;Em), ruído do sinal de fundo e na Fig. 4.88 vê-se a pequena dispersão de primeira ordem que este sistema apresenta.

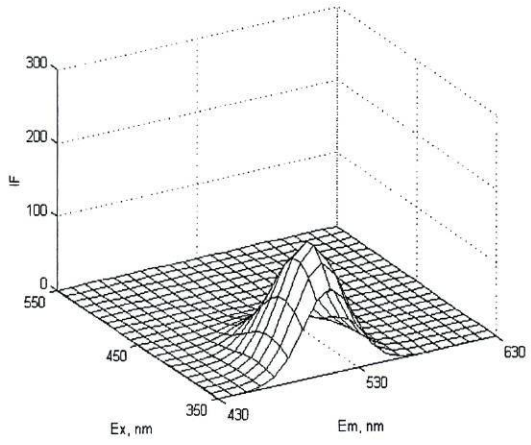



Fig. 4.83 – Representação da HG(404,86;509,3).

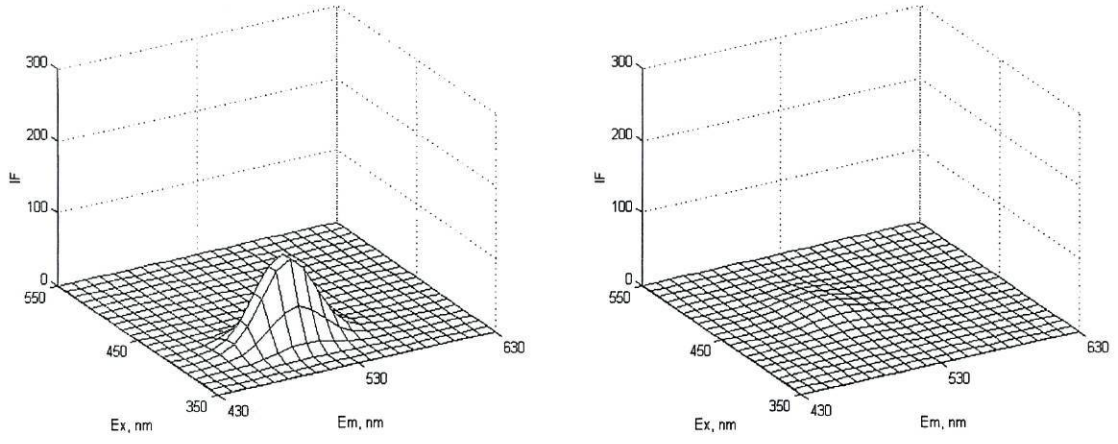



Fig. 4.84 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor de pH da Fig. 4.78. Esquerda $HG_{(404,86;509,3)}$ e direita $HG_{(459;509,8)}$.

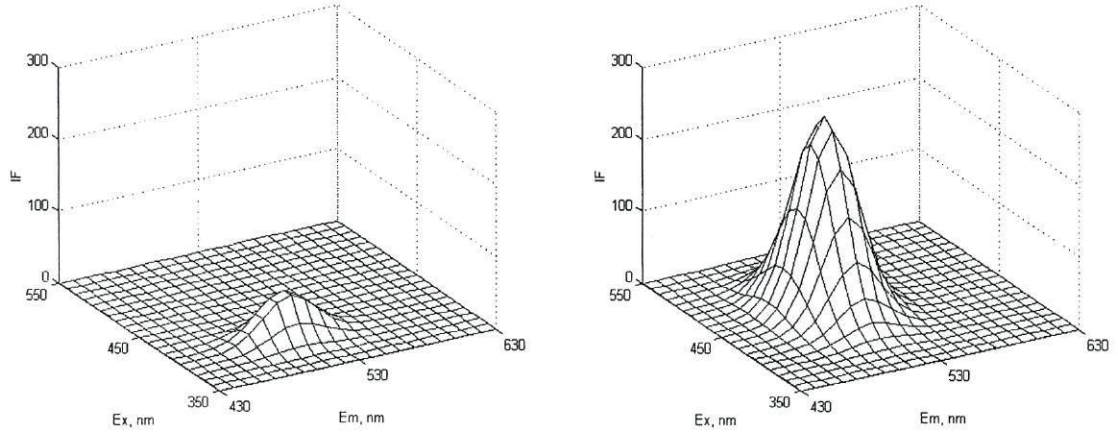



Fig. 4.85 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor de pH da Fig. 4.79. Esquerda $HG_{(404,86;509,3)}$ e direita $HG_{(459;509,8)}$.

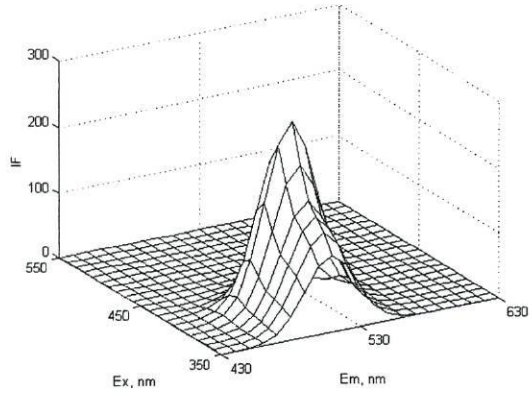



Fig. 4.86 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ para o valor de pH de 5,5 (somatório das Fig. 4.83 e Fig. 4.84).

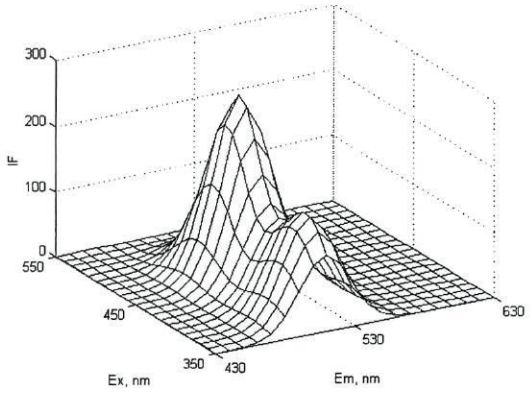



Fig. 4.87 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ para o valor de pH de 8,5 (somatório das Fig. 4.83 e Fig. 4.85).

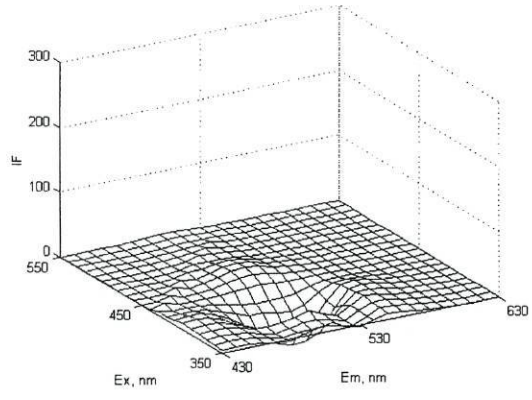



Fig. 4.88 – Representação da matriz de resíduos obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.78) e a MEE reproduzida (Fig. 4.86).

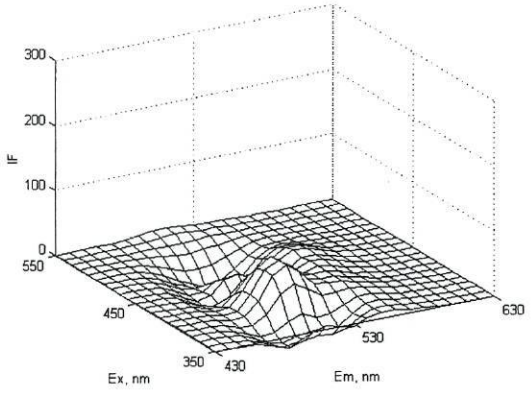



Fig. 4.89 – Representação da matriz de resíduos obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.79) e a MEE reproduzida (Fig. 4.87).

Usando agora os espectros puros da decomposição pelo PARAFAC a dois componentes, podemos verificar que o COMP1 (Fig. 4.90 e Fig. 4.91, ainda para os valores de pH de 5,5 e 8,5, respectivamente) é a parte do sinal correspondente à HG de mais alto valor do Ex e o COMP2 (Fig. 4.92 e Fig. 4.93) é a parte do sinal correspondente à HG de mais baixo valor do Ex. Estas duas colinas vão ter um perfil de concentrações ($COMP1^{pH}$ e $COMP2^{pH}$) que varia segundo um diagrama de distribuição de um ácido monoprótico - par ácido/base (Tabela 4.26 dimensão pH).

A representação das matrizes resíduos (Fig. 4.94 e Fig. 4.95 na qual se alterou as escalas da IF para –5 a 10) demonstram o Fit de 99,9%, repare-se no reduzido valor relativo da IF. Um outro facto que contribuiu para uma grande percentagem de ajuste, foi o facto de neste sistema as dispersões, nomeadamente a de maior magnitude, dispersão de primeira ordem, não terem um valor de IF significativo (Fig. 4.78 e Fig. 4.79).

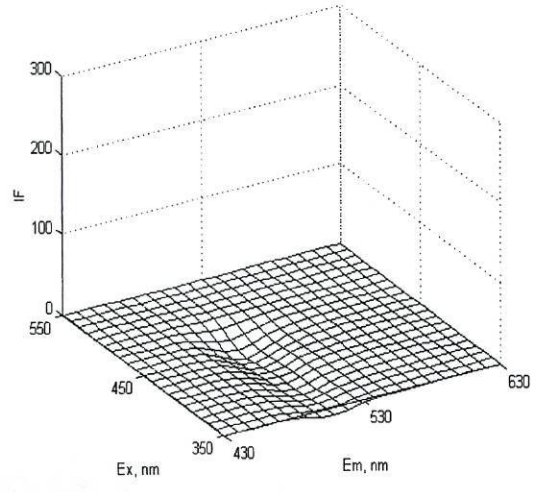



Fig. 4.90 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para o valor de pH da Fig. 4.78.

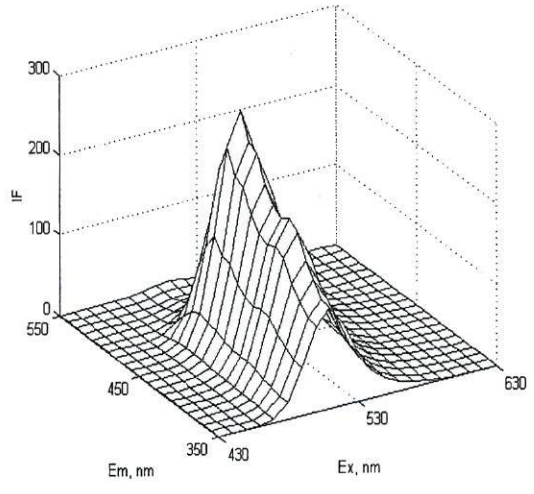



Fig. 4.91 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para o valor de pH da Fig. 4.79.

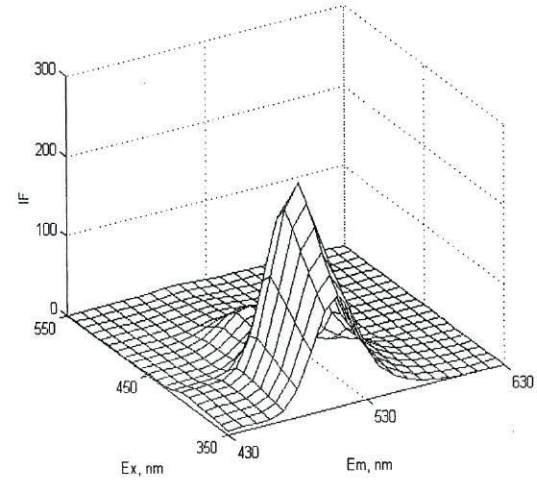



Fig. 4.92 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para o valor de pH da Fig. 4.78.

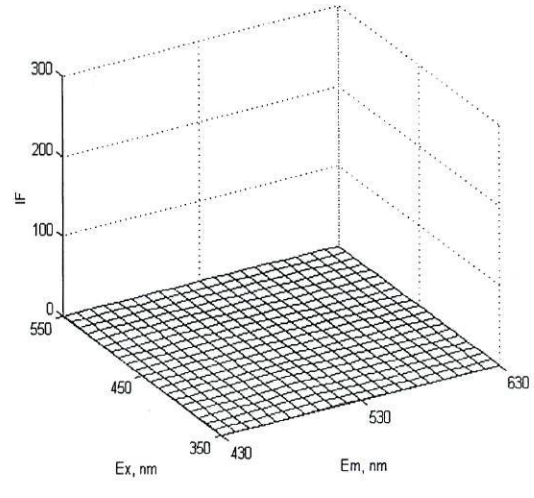



Fig. 4.93 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para o valor de pH da Fig. 4.79.

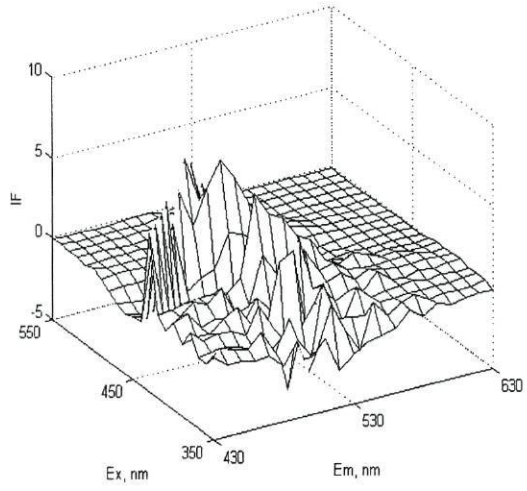



Fig. 4.94 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para o valor de pH da Fig. 4.78.

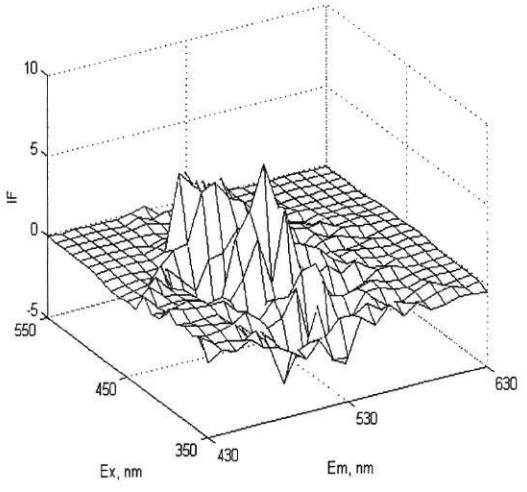



Fig. 4.95 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para a o valor de pH da Fig. 4.78.

## 4.6.5 – **Comentários dos resultados**

Analisando os resultados da decomposição pelo PARAFAC, pode concluir-se que este sistema contêm, nitidamente, 2 componentes (Fit de 99,9%), ou seja, que existe uma relação linear entre as variáveis até ao segundo espectro puro. O terceiro componente acarreta uma perda da consistência do núcleo (Tabela 4.24 – teste do corcondia inferior a 100,0%) associada a um grande aumento do número de iterações, it. O sistema é consistente quanto à escala, Xval muito próximo do Fit.

Nos dois ajustes efectuados chegou-se à conclusão que este sistema tem dois máximos com propriedades fotoquímicas distintas cujos perfis de concentração (Fig. 4.82 e Tabela 4.25 $COMP1^{pH}$ e $COMP2^{pH}$) seguem os perfis de um diagrama de distribuição de um ácido monoprótico.

Usou-se este sistema a partir de dados de indicadores de pH fluorescentes da Fluka-BioChemika. Na literatura apenas se encontrou dados fotoquímicos da HOPSA imobilizada, Zhujun [7], por exemplo, refere a existência de uma dependência do centros com o valor de pH, ou seja, existem dois máximos, um relacionado com o ligando protonado (com Ex de 405 nm) e outro com o ligando desprotonado (com Ex de 470 nm). Os dois compostos têm um máximo no mesmo Em de 510 nm ou seja os pares (405;510) e (470;510).

No ajuste a $HG^s$ chegou-se ao modelo de duas HGs, uma que crescia com o aumento do pH, a (459;509,8) (fluorescência da responsabilidade da espécie química desprotonada), e outra que decrescia no centro (404,86;509,3) (fluorescência da responsabilidade da espécie química protonada).

Da decomposição das $MEE^s$ em dois componentes puros, verifica-se que estes têm um máximo a (460;510,5) para o COMP1 (fluorescência da responsabilidade da espécie química desprotonada) e (410;510,5) para o COMP2 (fluorescência da responsabilidade da espécie química protonada).

Note-se que os valores dos centros, para o sistema HOPSA-$H^+$, são praticamente iguais nas duas modelações e, curiosamente, também são muito próximos dos valores do mesmo sistema imobilizado num suporte sólido.

## 4.7 - **Sistema CONF-$H^+$**

### 4.7.1 - **MEE**

Este sistema tem quatro dimensões: duas internas (Ex e Em), uma externa (pH) e a quarta dimensão é a IF. Uma possível representação deste sistema tetradimensional (4D) é fazer a representação das $MEE^s$ no espaço da variável externa (Fig. 4.96).

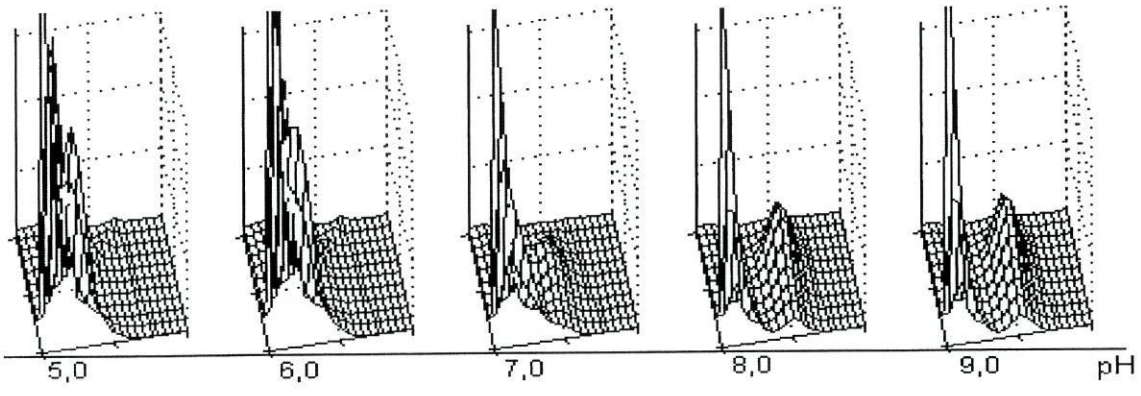



Fig. 4.96 – Representação 4D dos resultados do sistema CONF-$H^+$. Apenas se representou os valores de pH assinalados. Cada representação 3D é composta pelas IF (eixo vertical de 0 a 50 unidades de IF), Ex (eixo do lado esquerdo, de 500 a 700 nm) e Em (eixo do lado direito, de 500 a 800 nm). As $MEE^s$ que faltam são superfícies intermédias entre cada representação.

Este sistema responde com IF muito baixas, as IF mais altas correspondem às dispersões de primeira ordem e valem cerca de 60 unidades de fluorescência e dentro da zona de fluorescência o sinal é na ordem das 30.

Existem duas colinas, uma junto ao limite inferior do Ex (Fig.4.97) que decresce com o aumento do valor de pH, pouco perceptível na Fig. 4.96, e outra dentro da janela de observação (Fig. 4.98, repare-se que a colina não excede a 10 unidades relativas de fluorescência (figura do lado direito)) que cresce com o aumento do valor de pH, esta bastante nítida a partir de valores de pH de 7,0.

A representação por contornos da Fig. 4.97 (Fig. 4.99 esquerda) permite visualizar que, a este valor de pH, existe a colina muito próxima da dispersão de primeira ordem. No espectro de emissão ao Ex de 500 nm (Fig. 4.99 direita) pode ver-se melhor esta colina (a cerca de 550 nm o Em) e a sua proximidade com a dispersão (de 500 nm do Em). A evolução desta colina com o incremento do valor de pH pode ser confirmada pela representação dos espectros de emissão a diferentes valores de pH (Fig. 4.100). A colina situada no interior da janela de observação, embora com valores

de IF pequenos e encontrando-se, igualmente, próxima da dispersão de primeira ordem, tem um valor relativo de IF bastante superior ao sinal da dispersão (Fig. 4.10l).

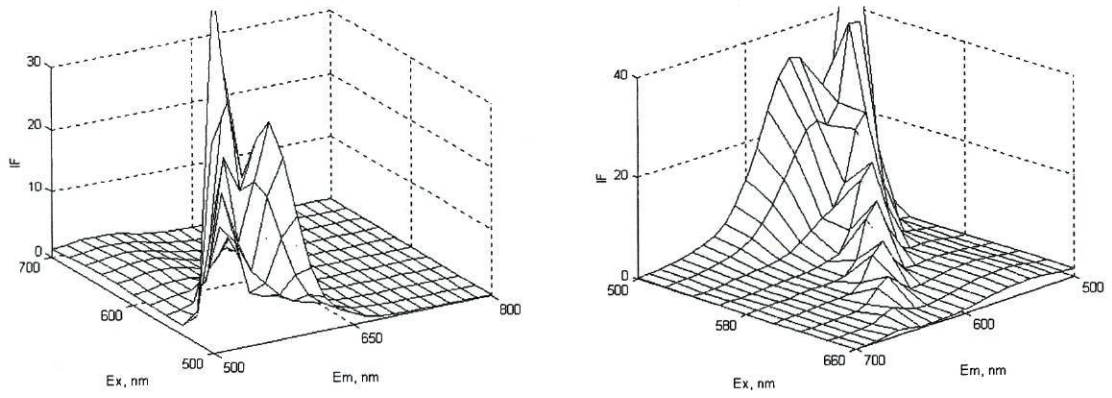



Fig. 4.97 – Representação 3D dos dados do sistema CONF-$H^+$ para o valor de pH 5,5. Ampliação da Fig. 4.96 (esquerda) e outra perspectiva com outras escalas (direita).

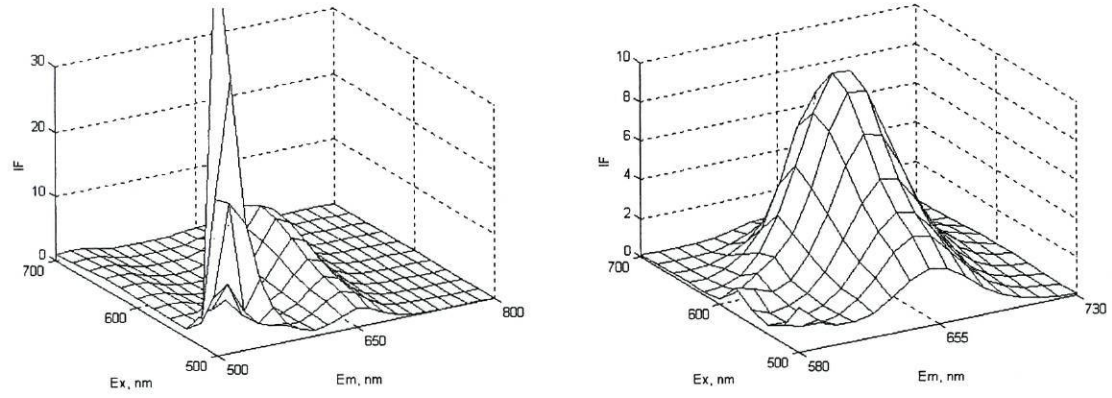



Fig. 4.98 – Representação 3D dos dados do sistema CONF-$H^+$ para o valor de pH 8,5. Ampliação da Fig. 4.96 (esquerda) e outra perspectiva com outras escalas (direita).

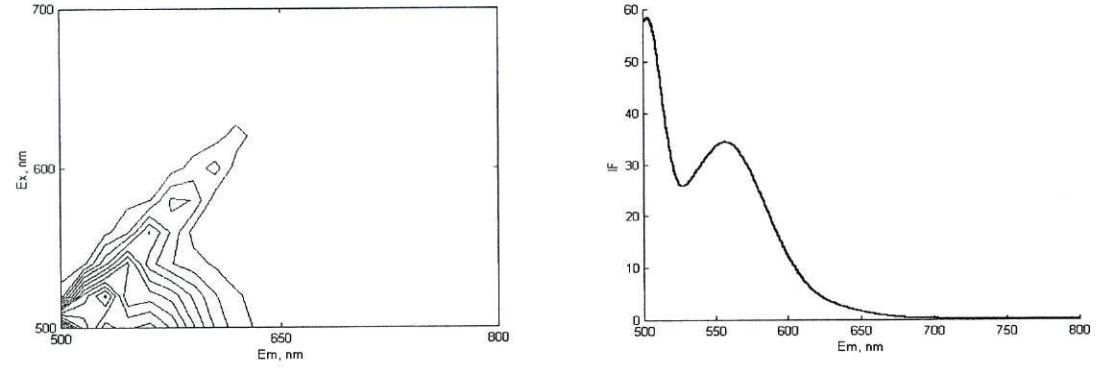



Fig. 4.99 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.97 (esquerda) e do espectro de emissão quando o Ex é 500 nm (direita).

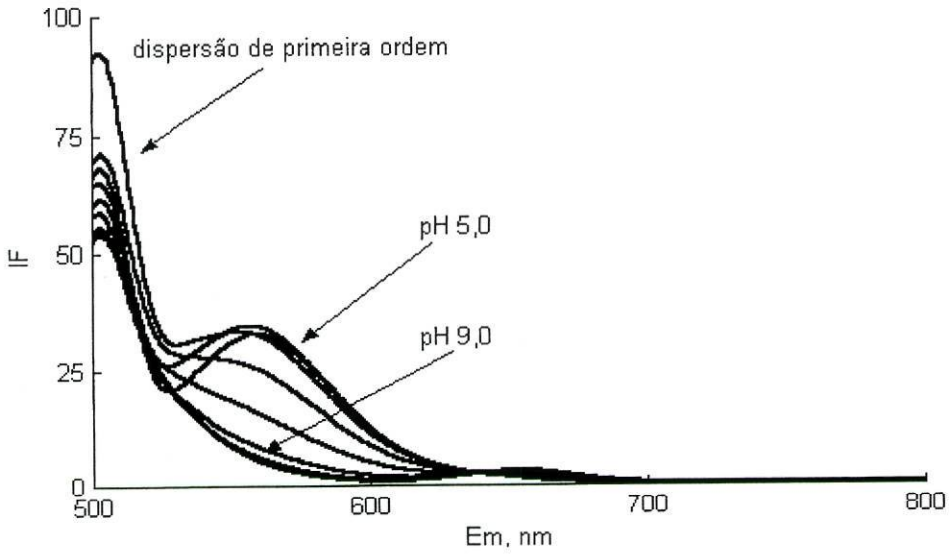



Fig. 4.100 – Representação dos espectros de emissão, ao Ex de 500 nm, aos diferentes valores de pH. Ao Em de cerca de 500 nm as curvas representam o valor de pH crescente conforme se vai da curva de maior valor de IF para valores mais baixos.

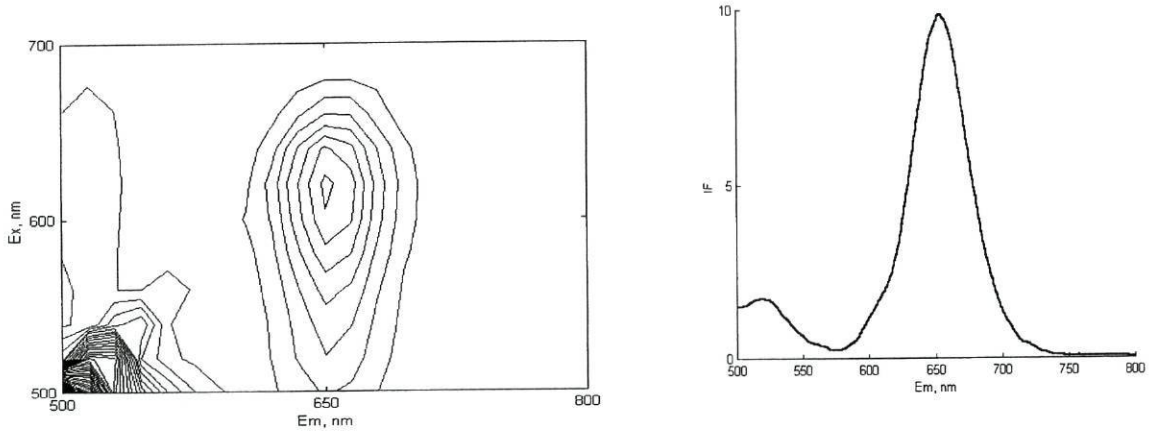



Fig. 4.101 – Representação por contornos da MEE da Fig. 4.98 (esquerda) e do espectro de emissão quando o Ex é 600 nm (direita).

## 4.7.2 - **MEE como curvas de Gauss bivariadas**

Após a remoção das dispersões de primeira e de segunda ordem, foi possível detectar a existência de duas HG$^s$, a $HG_{(503,0;552)}$ e a $HG_{(597;654)}$, ficando então as MEE$^s$ definidas:

$$MEE = HG_{(503,0;552)} + HG_{(597;654)}$$

onde

$$HG_{(503,0;552)} = a_{(503,0;552)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-552)^2}{1600} - \frac{(Ex-503,0)^2}{600} \right)$$

e

$$HG_{(597;654)} = a_{(597;654)} \cdot \exp\left( -\frac{(Em-654)^2}{1040} - \frac{(Ex-597)^2}{6300} \right)$$

Na Tabela 4.27 encontram-se todos os estes parâmetros com os respectivos desvios e na Tabela 4.28 os termos pré-exponenciais, cuja representação em função do valor de pH é o perfil de concentrações (Fig. 4.102).

Tabela 4.27 – Parâmetros do ajuste a $HG^s$ das $MEE^s$ do sistema CONF-$H^+$. Junto de cada valor encontra-se a respectiva imprecisão.

| | $HG_{(503,0;552)}$ | $HG_{(597;654)}$ |
|---|---|---|
| $\overline{Ex}$ | 503,0±0,8 | 597±1 |
| $b_{\overline{Ex}}$ | $6x10^2$±$4x10^2$ | $63x10^2$±$2x10^2$ |
| $\overline{Em}$ | 552±6 | 654±2 |
| $b_{\overline{Em}}$ | $16x10^2$±$8x10^2$ | 104x10±2x10 |

Tabela 4.28 – Valor dos termos pré-exponenciais. O valor do ajuste $R^2_{Gaussiana}$ encontra-se ao lado de cada conjunto dos quatro termos pré-exponenciais O $R^2_{Gaussiana}$ global dos perfis de concentração é de 0,910.

| pH | $R^2_{Gaussiana}$ | $a_{(503,0;552)}$ | $a_{(597;654)}$ |
|---|---|---|---|
| 5,0 | 0,9125 | 37±0 | 0,9±0,2 |
| 5,5 | 0,9275 | 38,6±0,1 | 0,99±0,08 |
| 6,0 | 0,9244 | 36,3±0,1 | 1,54±0,08 |
| 6,5 | 0,9205 | 28,0±0,1 | 2,43±0,06 |
| 7,0 | 0,8868 | 17,27±0,08 | 4,13±0,05 |
| 7,5 | 0,8481 | 9,20±0,07 | 6,61±0,04 |
| 8,0 | 0,8596 | 6,81±0,08 | 8,12±0,04 |
| 8,5 | 0,8547 | 6,28±0,08 | 8,77±0,05 |
| 9,0 | 0,8572 | 6,05±0,08 | 9,22±0,05 |

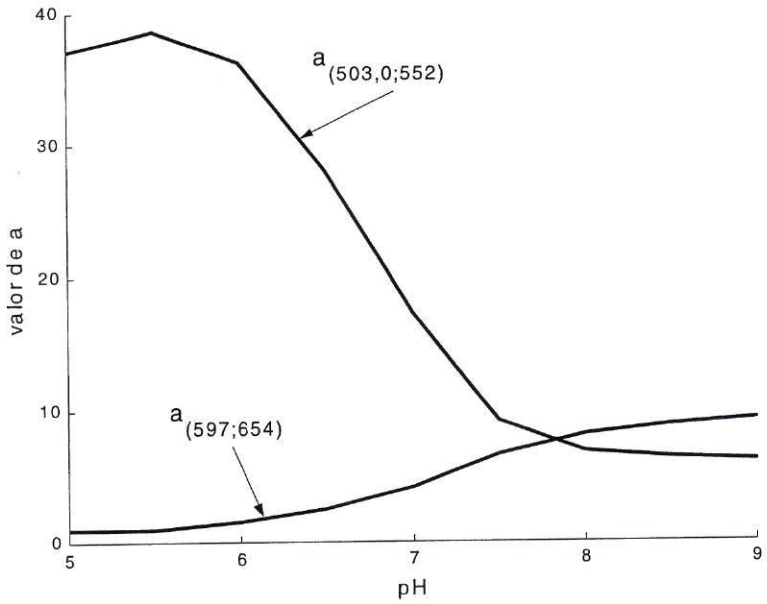



Fig. 4.102- Representação dos perfis de concentração para o sistema CONF-$H^+$.

## 4.7.3 - **MEE decompostos em espectros puros**

O sistema CONF-$H^+$ é decomposto em componentes (Tabela 4.29) de cuja análise dos parâmetros de avaliação (Tabela 4.30) se conclui que 2 componentes são suficientes para descrever a variância dos dados originais, logo apenas se representou a decomposição até mais um componente do número total de componentes em que o sistema pode ser traduzido.

Tabela 4.29 – Decomposição em espectros puros das MEE$^s$ do sistema CONF-$H^+$ usando o PARAFAC.

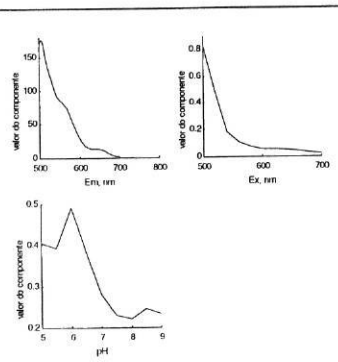
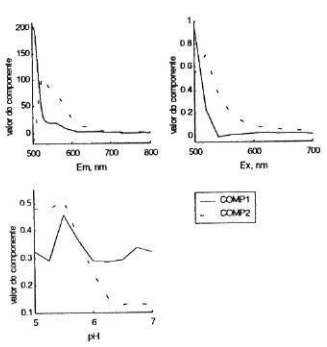
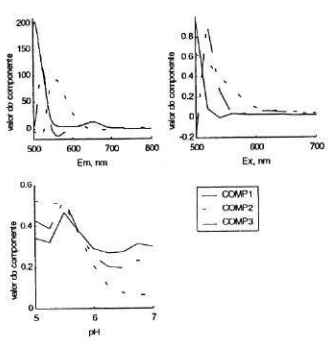
| 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|
|  |  |  |

Tabela 4.30 – Critérios de avaliação da decomposição do sistema CONF-$H^+$ resumida na Tabela 4.29.

| | 1 componente | 2 componentes | 3 componentes |
|---|---|---|---|
| It | 5 | 2 | 216 |
| Err | $6{,}43\text{x}10^5$ | $3{,}58\text{x}10^5$ | $2{,}18\text{x}10^5$ |
| Corcondia | 100,0 | 100,0 | 0,61 |
| Fit | 71,46 | 84,53 | 91,41 |
| Xval | 71,12 | 84,22 | 91,23 |

## 4.6.4 – **Reprodução das MEE$^s$**

Com os parâmetros do ajuste a $HG^s$ reproduziram-se as $HG_{(503,0;552)}$ e $HG_{(597;654)}$ para o valor de pH de 5,5 (Fig. 4.103) e 8,5 (Fig. 4.104), cujo somatório das $HG^s$ (eq[3.13] com apenas os termos das eq[3.14]) origina as MEE reproduzidas nestas condições (Fig. 4.105 e Fig. 4.106, respectivamente).

A matriz de resíduos é obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.97 para o valor de pH de 5,5 e Fig. 4.98 para o valor de pH de 8,5) e a MEE reproduzida (Fig. 4.105 e Fig. 4.106, respectivamente). Estas matrizes de resíduos (Fig. 4.107 e Fig. 4.108) contêm as interacções, partes negativas no plano (Ex;Em), ruído do sinal de fundo e na Fig. 4.88 vê-se a pequena dispersão de primeira ordem que este sistema apresenta.

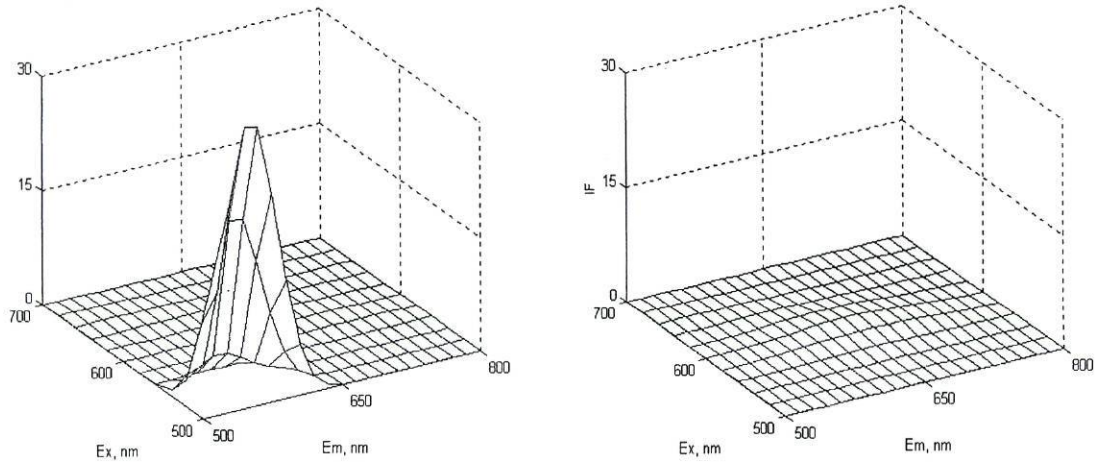



Fig. 4.103 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor de pH da Fig. 4.97. Esquerda $HG_{(503,0;552)}$ e direita $HG_{(597;654)}$.

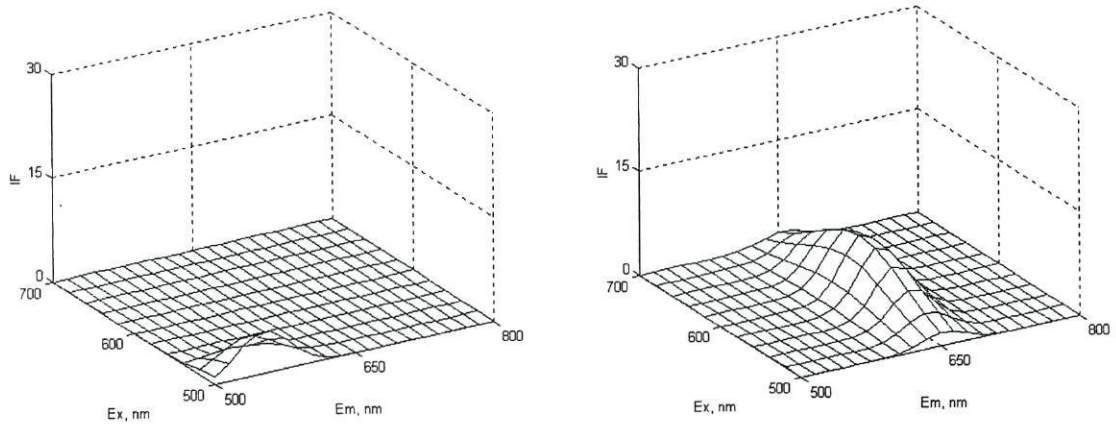



Fig. 4.104 – Representação das $HG^s$ reproduzidas para o valor de pH da Fig. 4.98. Esquerda $HG_{(503,0;552)}$ e direita $HG_{(597;654)}$.

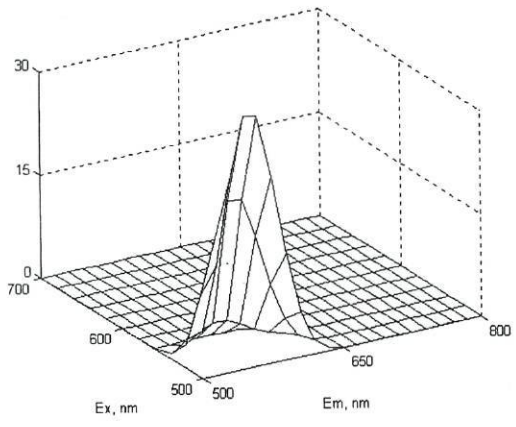



Fig. 4.105 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ para o valor de pH de 5,5 (somatório das Fig. 4.103).

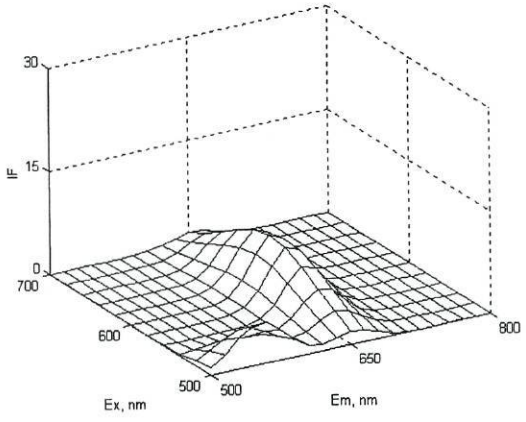



Fig. 4.106 – Representação da MEE obtida pelo somatório das $HG^s$ para o valor de pH de 8,5 (somatório das Fig. 4.104).

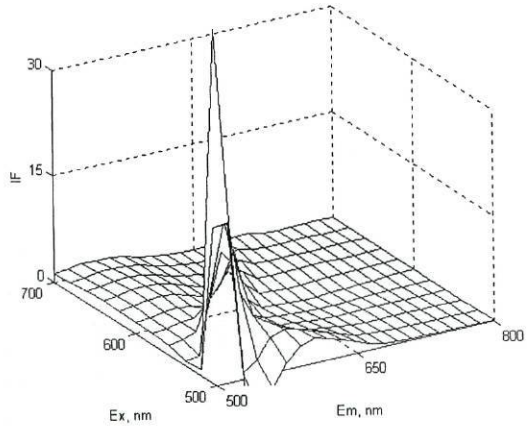



Fig. 4.107 – Representação da matriz de resíduos obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.97) e a MEE reproduzida (Fig. 4.105).

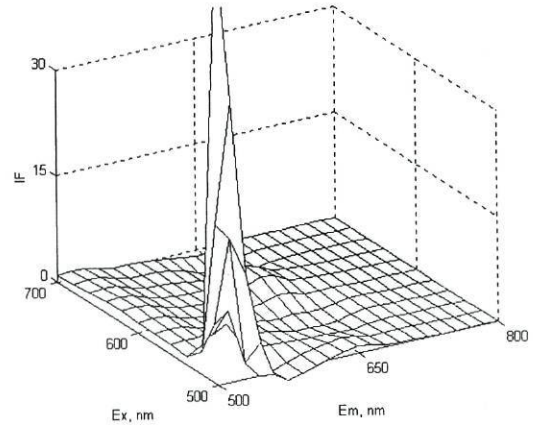



Fig. 4.108 – Representação da matriz de resíduos obtida pela diferença entre a MEE original (Fig. 4.98) e a MEE reproduzida (Fig. 4.106).

Usando agora os espectros puros da decomposição pelo PARAFAC a dois componentes, podemos verificar que o COMP1 (Fig. 4.109 e Fig. 4.110, ainda para os valores de pH de 5,5 e 8,5, respectivamente) é a uma parte do sinal correspondente à HG junto ao limite inferior do Ex (500 nm), e o COMP2 (Fig. 4.111 e Fig. 4.112) é outra parte da mesma HG. O COMP1 poderá conter alguma dispersão (analisando os máximos de COMP1 para as dimensões Ex e Em da Tabela 4.29). Os dois componentes representam a colina atras mencionada.

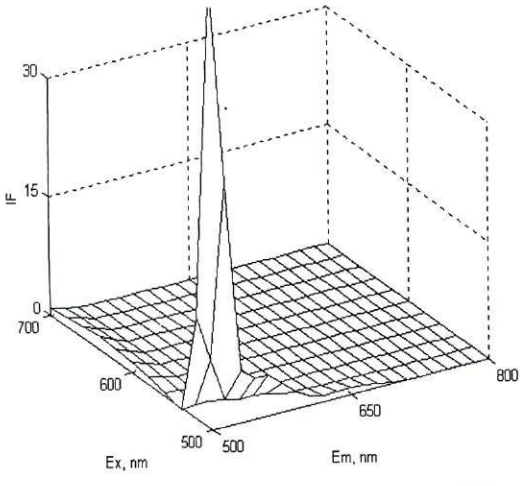



Fig. 4.109 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para o valor de pH da Fig. 4.97.

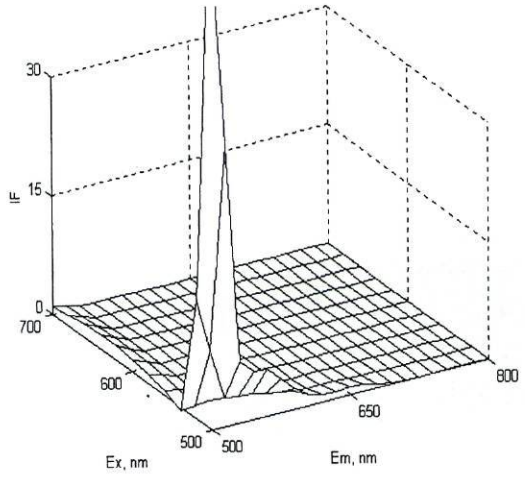



Fig. 4.110 – Representação da MEE reproduzida com o COMP1 para o valor de pH da Fig. 4.98.

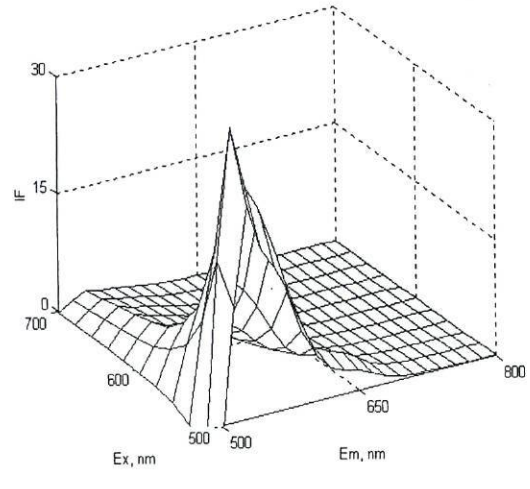



Fig. 4.111 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para o valor de pH da Fig. 4.97.

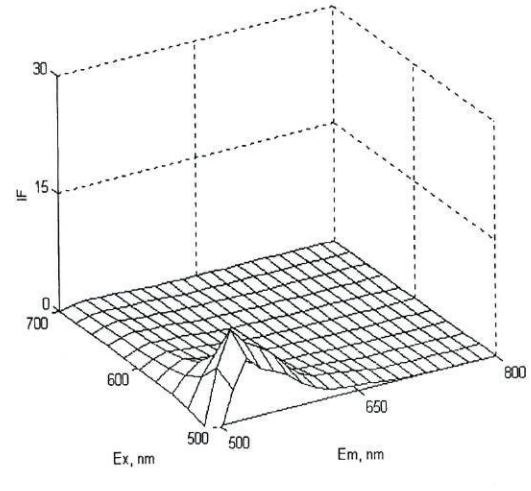



Fig. 4.112 – Representação da MEE reproduzida com o COMP2 para o valor de pH da Fig. 4.98.

Na visualização da matriz de resíduos, para o valor de pH de 5,5 (Fig. 4.113), verifica-se que estes resíduos são a dispersão de primeira ordem (com alguma parte negativa) e a representação dos resíduos para valores mais altos de pH (Fig. 4.114) permite concluir que a colina no interior da janela de observação não faz parte de qualquer um destes dois componentes.

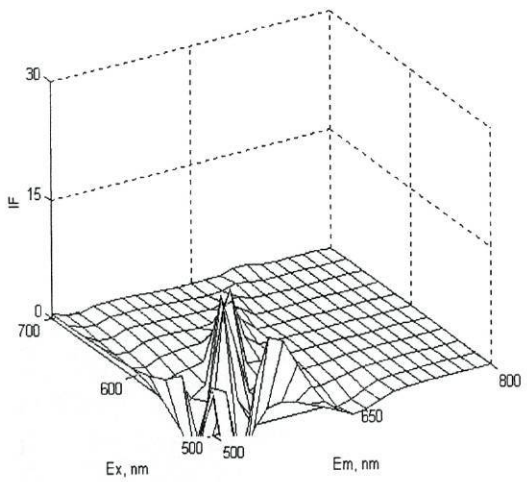



Fig. 4.113 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para o valor de pH da Fig. 4.97.

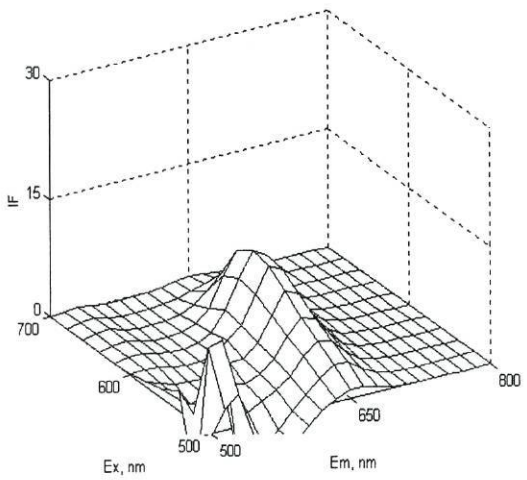



Fig. 4.114 – Representação das diferenças entre a MEE original e a MEE reproduzida com os COMP1 e COMP2, para a o valor de pH da Fig. 4.98.

## 4.7.5 – **Comentários dos resultados**

O valor de $R^2_{Gaussiana}$, do ajuste a $HG^s$, é baixo (0,9), não devido ao baixo valor de IF (Fig. 4.96), mas, visto neste ajuste usar-se matrizes não completas descartando as zonas das duas dispersões, e principalmente devido ao facto de se ter usado uma extensa gama de Em, logo, este parâmetro de avaliação, reflecte essencialmente a grande quantidade de ruído de fundo (como se pode comprovar pelas matrizes de resíduos da Fig. 4.107 e Fig. 4.108).

Analisando os resultados da decomposição pelo PARAFAC, pode concluir-se que este sistema contém 2 componentes, embora ainda com o Fit de 85%, as causas são as mesmas do $R^2_{Gaussiana}$ do ajuste a $HG^s$ – um baixo valor relativo de IF associado à grande extensão do plano (Ex;Em). O terceiro componente acarreta uma perda da consistência do núcleo (Tabela 4.30 – teste do corcondia inferior a 100,0%) associada a um grande aumento do número de iterações, it. O sistema é consistente quanto à escala,

Xval muito próximo do Fit. No entanto o COMP1 e COMP2 traduzem apenas a colina centrada no Ex de 500 nm e Em de 550, o PARAFAC não conseguiu ler a colina no interior da janela de observação.

Não se encontrou dados relativos a este sistema na literatura. No ajuste a $HG^s$ chegou-se a dois perfis de concentração, ou seja, a duas $HG^s$ cujos centros são (503,0;552) e (597;654). Da Fig.4.102 pode dizer-se que o centro (503,0;552) é a fluorescência da forma protonada do CONF e (597;654) da forma desprotonada.

Os máximos nos espectros puros a dois componentes são (500;503) para o COMP1 e (520;528,5) para o COMP2, que, tendo os máximos nestes pares logo $MEE^s$ de maiores valores em torno destes centros, não representam fluorescência mas são dispersões de primeira ordem (Ex = Em).

## 4.8 - Bibliografia

[1] Svehla, G., "Comprehensive analytical chemistry", 1977, Vol. VIII, Elsevier Scientific Publishing Company, New York.

[2] Browne, B. A., McColl, J. G., Driscoll, C. T., J. of Environmental Quality, Vol. 19:1 (1990), 65-72.

[3] CD informativo de produtos, "BTC-5N heavy metal indicator", Molecular Probes, Inc., 1997.

[4] Goon, E., *et al*, Analytical chemistry, Vol. 25 n°4 (1953), 608-610.

[5] Schachter, D., The J. of Lab. and Clinical Medicine, Vol. 54, 763-768.

[6] White, C. E., Cuttitta, F., Analytical Chemistry, Vol. 31 n°12 (1959), 2083-2090.

[7] Zhujun, Z., Seitz, W. R., Analytica Chimica Acta, Vol. 160 (1984), 47-55.

# 5 – Conclusões e perspectivas

## 5.1 – Sistemas fluorescentes

Os sistemas fluorescentes, para a detecção de catiões em solução, constituem uma das técnicas mais sensíveis, conseguindo-se, frequentemente, trabalhar na gama da concentração dos p.p.b. e mesmo nos p.p.t..

O reduzido número de moléculas, capazes de formar este tipo de sistemas, permite eliminar uma boa parte do chamado efeito matriz ou sinal de fundo. O problema prende-se, quase sempre, à pouca selectividade dos ligandos para com os catiões. Mas a alteração das estruturas químicas é um bom exemplo de como tornar um ligando generalista com excelentes propriedades fluorescentes em seus derivados que, ainda que com propriedades fluorescentes, se torna muito específico, por exemplo o derivado da 8-HQ a diaza-18-coroa-6 ligada a dois 5-cloro-8-hidroxiquinolina-7-ilo só forma complexos fluorescentes com o catião $Mg^{2+}$ e com mais nenhum catião alcalino ou alcalino-terroso.

Como a maioria dos compostos absorve na região do ultravioleta, UV, visível próximo do UV, reduzindo a quantidade de luz disponível para os sistemas fluorescentes, interessa, então, deslocar as características fotoquímicas para a região do infravermelho, IV. Aumentar a estrutura química dos ligandos permite, por si só, este deslocamento e tornar o ligando mais específico. No entanto este deslocamento pode ser excessivo, por exemplo o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ fluorescente em clorofórmio e se considerarmos o derivado 4-hidroxiacridina (4-acridinol) forma um complexo com o $Al^{3+}$, em clorofórmio, mas é não fluorescente, pensa-se que o deslocamento ultrapassou a região do IV.

Um outro factor que condiciona muito a fluorescência é o solvente. Por exemplo, o sistema 8-HQ-$Al^{3+}$ fluorescente em clorofórmio não o é em solução aquosa, mas o facto do solvente condicionar a fluorescência pode ser encarado como mais uma vantagem destes sistemas. Continuando com o mesmo exemplo, o clorofórmio é imiscível em água logo pode-se extrair, e mesmo concentrar, o complexo 8-HQ-$Al^{3+}$,

insolúvel em água, para o meio clorofórmio, onde o complexo é mais solúvel e, obviamente, fluorescente.

O meio é, ainda, responsável pela disponibilidade das diferentes formas em que, quer o ligando quer o catião, se encontrem. A constante de autoprotólise assim como o tipo ligações na solvatação que o solvente consegue impor aos solutos, é determinante para a sua disponibilidade e consequente não competição com o sistema fluorescente. É clássico o controlo de pH para este fim e encontramos, entre os catiões estudados, no alumínio o exemplo mais "complexo". No sistema do morin-$Al^{3+}$, em meio aquoso, encontra-se desde o complexo de morin com o $Al^{3+}$ até aos aquoaluminatos e aquohidroxialuminatos, sendo a maioria fluorescentes.

## 5.2 – **Tratamento de dados**

A fluorescência permite recolher dados de segunda ordem, as matrizes de excitação-emissão, MEE. Esta dependência a duas variáveis, Ex e Em, permite ter um panorama abrangente dos fenómenos que possam ocorrer nas janelas de observação, o equipamento permite usar Ex na gama de 200 a 800 nm e Em na gama de 200 a 900 nm. Como foi dito, na secção "modelação" este plano (Ex;Em) encerra alguns fenómenos conhecidos como as dispersões de primeira e segunda ordem (quando o Em é igual ao Ex e Em é o dobro da Ex) e o fenómeno da fluorescência ocorre entre estas duas zonas – zona de fluorescência. Interessa conseguir modelos matemáticos que permitam elucidar/quantificar os fenómenos de fluorescência e as possíveis interacções. Para isso usou-se dois modelos matemáticos: o ajuste das MEE a HiperGaussianas, HG, e a decomposição das MEE a vectores, espectros puros, cujo produto matricial resulta na MEE original, PARAFAC).

O tipo de conclusões que se pode tirar, nos dois sistemas, é diversa e muitas vezes complementar.

No ajuste a HG, tentou-se modelar o maior número de HG possível e cada uma destas HG corresponderia a um único fenómeno fluorescente (ou a fluorescência de um tipo de estequiometria de complexação). A vantagem deste tipo de ajuste é a possibilidade de determinar matematicamente as propriedades fotoquímicas dos sistemas, o centro da HG é o par (Ex;Em) onde se verifica o máximo de IF. Além disso é possível separar HG cujos centros estão relativamente próximos (centros cuja

proximidade é inferior à elipse de igual "probabilidade" correspondente a 3 desvios padrões), por exemplo no sistema morin-$Al^{3+}$, e mesmo sobrepostos – HG não perfeitas ou com deslocamento dos centros da HG, por exemplo no sistema 8-HQ-$Mg^{2+}$. Uma outra vantagem é a possibilidade de remover as dispersões da MEE, visto trabalhar-se com as MEE desconvulsionadas, ou seja coloca-se a MEE (de dimensão n colunas x m linhas) num vector (com uma única colina e n·m linhas) com as respectivas relações unívocas do Ex e Em. A principal desvantagem é a morosidade do processo de optimização dos parâmetros das $HG^s$.

Na decomposição das $MEE^s$ a espectros puros, PARAFAC, foi possível constatar que, dependendo do tipo de picos da MEE e principalmente da variabilidade da IF relativa entre eles, o modelo pode adaptar-se bem (no sistema BSED-$Mg^{2+}$ até é possível separar o sinal IF das dispersões (o segundo componente)) ou com alguns problemas (o exemplo do sistema morin-$Al^{3+}$). O PARAFAC não consegue resolver picos sobrepostos nem picos não parecidos com HG perfeitas. A principal vantagem é a rapidez de obtenção dos espectros puros, apenas alguns minutos, mesmo para 3 componentes, contra cerca de 1 semana, para o mesmo sistema, no ajuste a HG. A principal desvantagem a impossibilidade de trabalhar com matrizes de dados incompletas – seria útil descartar as dispersões, por exemplo.

Qualquer uma das metodologias seguidas tinha como principal objectivo obter perfis de concentração, nos quais se poderá proceder à calibração e obtenção de constantes químicas. No ajuste a HG pensa-se que, se for possível extrair todos os fenómenos químicos, é possível determinar as constantes específicas desse fenómeno. Não foi possível proceder a este tipo de análise - não houve tempo.

## 5.3 – **Optrodes**

Apenas foram feitas algumas tentativas de imobilização de ligandos em membranas de PVC, as quais não foram devidamente estudadas. A não disponibilidade de equipamento apropriado foi uma das causas, tentou-se contornar este problema usando o suporte para sólidos do espectrofotómetro de fluorescência, mas constatou-se que uma grande quantidade de luz é desviada para o detector – reflexão IF muito alta quando o Ex é igual ao Em.

O principal problema com que se deparou na preparação das membranas foi a não fixação do ligando ao suporte. Quando se mergulhava na solução a monitorizar o ligando passava para a solução – nos filmes com HOPSA e CONF a solução tampão rapidamente adquiria a cor típica da forma ácida ou básica do ligando, logo é necessário experimentar muitos outros suportes.

## 5.4 – **Perspectivas**

Como trabalho de iniciação a uma nova técnica, as perspectivas para a sua continuação são imensas.

Os sistemas de fluorescência apresentam-se como um novo ramo da química analítica capaz de monitorizar catiões em concentrações muito baixas e, simultaneamente, em meios com elevado grau de complexidade. Interessa, então, (i) continuar a pesquisar e, principalmente, sintetizar novos ligandos, e aqui a 8-HQ parece ter potencial para ser uma estrutura base de partida ou um radical auxiliar, (ii) seleccioná-los de modo que sejam o mais possível selectivos para o catião e (iii) a reacção química reversível (ou que haja um processo prático de reversibilidade – complexante auxiliar).

Nos optrodes há que tentar imobilizar estes sistemas fluorescentes para catiões em suportes, (iv) testar novas composições químicas, que lhes confiram mobilidade do analíto, simultaneamente a imobilidade do ligando e ao mesmo tempo a reversibilidade.

Quanto ao tratamento de dados, quer para os sistemas fluorescentes quer para os optrodes interessa tirar partido da IF ser de segunda ordem. É necessário esquecer um pouco o raciocínio das relações univariadas e testar formas matemáticas "simples" multivariadas, como por exemplo as HG ou os quocientes de polinómios – muito conhecidos na química de equilíbrios químicos (originando os diagramas de distribuição por exemplo) ou métodos quimiométricos que permitem condensar a informação dos sistemas multivariados, por exemplo o PARAFAC.