

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ELETROQUÍMICOS E ESPECTROFLUOMÉTRICOS PARA COMPOSTOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO: ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FLUORESCENTES DAS ACRIDINAS APÓS DERIVAÇÃO FOTOQUÍMICA VISANDO CONDIÇÕES SELETIVAS DE DETERMINAÇÃO**

**Aluno: Thiago Fernando Mota Gonsalves**  
**Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio**

## **Introdução**

### **Acridinas**

Os compostos policíclicos aromáticos nitrogenados (CPAN) com um único heteroátomo endocíclico de nitrogênio, podem ser divididos em duas classes: as acridinas (que contêm um anel de piridina) e os carbazóis (que contêm um anel pirrol). Uma fonte de CPAN é a combustão incompleta da matéria orgânica contendo nitrogênio. CPAN foram detectados em material particulado de ar urbano, em fumaça de cigarro e em exaustão de automóveis. Outras fontes de CPAN são os produtos derivados de petróleo [1].

Um grande número de CPAN são conhecidos por serem mutagênicos ou carcinogênicos. Estes efeitos biológicos tornam os CPAN interessantes tanto do ponto de vista ambiental quanto ocupacional. Em geral, as acridinas têm uma atividade mutagênica mais elevada do que os carbazóis e esta atividade é comparável a dos HPA [2]. A concentração de CPAN detectada em amostras ambientais é, em geral, mais baixa que a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) correspondentes. Em material particulado do ar urbano, por exemplo, essa concentração é de uma a três vezes menor. Devido a sua atividade biológica, o desenvolvimento de métodos de análise para de identificar e quantificar os CPAN no ambiente é considerado de fundamental importância.

A determinação seletiva das acridinas, algumas delas apresentadas na figura 1, é importante porque, além de cada uma delas possuir um grau de toxicidade diferente, o estudo da distribuição destes compostos num ambiente contaminado por óleo, por exemplo, pode gerar informações sobre a origem do material contaminante [3].

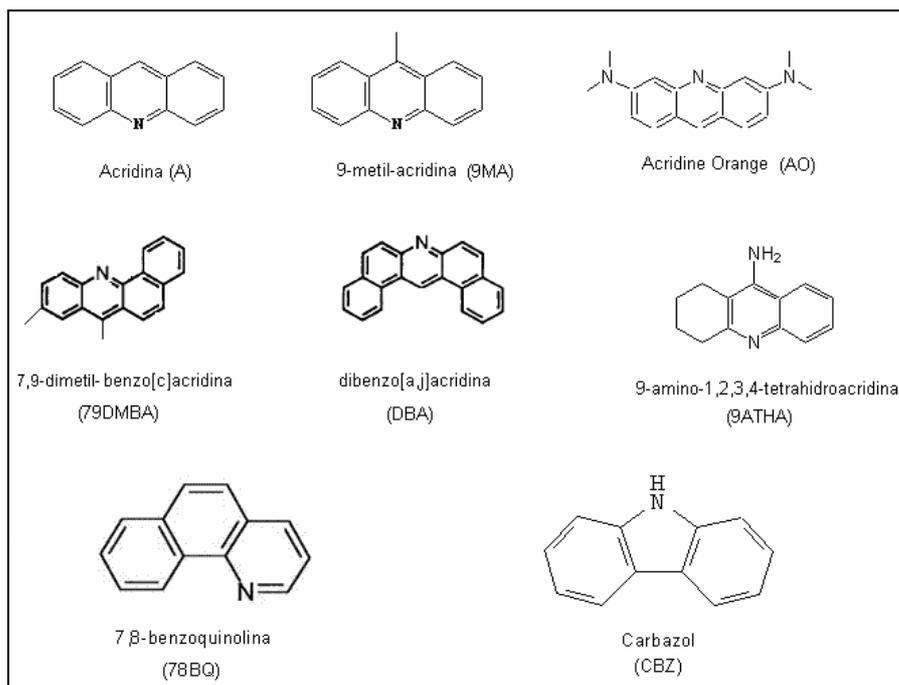


Figura 1 – Estruturas dos compostos policíclicos aromáticos nitrogenados em estudo.

## Luminescência

A luminescência é a radiação eletromagnética (na região do ultravioleta próximo-visível) emitida quando espécies químicas que foram previamente excitadas por fótons, se desativam para níveis de menor energia (em geral o estado fundamental), processo que envolve elétrons de valência.

O estado fundamental da maioria dos compostos orgânicos é um estado singlete  $S_0$  e a absorção de luz promove os elétrons da molécula para um dos vários estados excitados  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_n$ , dependendo do comprimento de onda da radiação. Considerando uma população de moléculas promovida para um estado excitado singlete após a absorção de radiação de comprimento de onda característico, vários processos atuam simultaneamente para trazer essa população de volta para o estado fundamental ( $S_0$ ), conforme representado na figura 2. Primeiramente, por meio de uma série de relaxamentos vibracionais (processos não-radiativos), essa população é levada através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade até atingir o primeiro nível vibracional do estado excitado singlete de menor energia ( $S_1$ ). Esse processo, denominado de cruzamento interno (CI) ocorre com muita rapidez ( $10^{-13}$  a  $10^{-11}$  s), e por causa disso, a desativação radiativa (fotoluminescência) só pode ocorrer a partir do nível vibracional de menor energia do estado eletrônico excitado de menor energia (regra de Kasha).

A partir de  $S_1$ , a população de moléculas pode seguir três caminhos distintos para retornar ao estado fundamental. Primeiro, se a diferença de energia entre  $S_1$  e  $S_0$  (estado fundamental) não for muito grande e existir possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode ser levada a  $S_0$  por relaxamento vibracional sem a emissão de radiação eletromagnética. No entanto, se a diferença energética entre  $S_1$  e  $S_0$  for relativamente grande, a desativação para o estado fundamental se dá com emissão de radiação na forma de fluorescência. A fluorescência ocorre na escala de tempo da ordem de nanossegundos ( $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  s).

Em uma molécula onde os estados de energia singlete  $S_1$  e tripleto  $T_1$  estão muito próximos, a molécula pode cair para o estado de mais baixa energia  $T_1$  através de um processo conhecido como conversão intersistema (CIS) ( $10^{-12}$  -  $10^{-4}$  s). A molécula pode então retornar

para o estado fundamental através de emissão de radiação e esta transição de  $T_1$  para  $S_0$  é chamada fosforescência, a qual tem um tempo de vida longo que pode variar de  $10^{-6}$  a  $10^2$  s, dependendo da estrutura da molécula e do meio onde ela se encontra. O espectro de emissão de fosforescência ocorre em maiores comprimentos de onda que os de fluorescência por causa da pequena perda de energia que ocorre na conversão intersistema do estado singleto para o tripleto.

Como consequência de ser um processo mais rápido e envolvendo um estado excitado singleto, a fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Isso possibilita a fácil observação de fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em soluções líquidas, caracterizando um procedimento experimental mais simples.

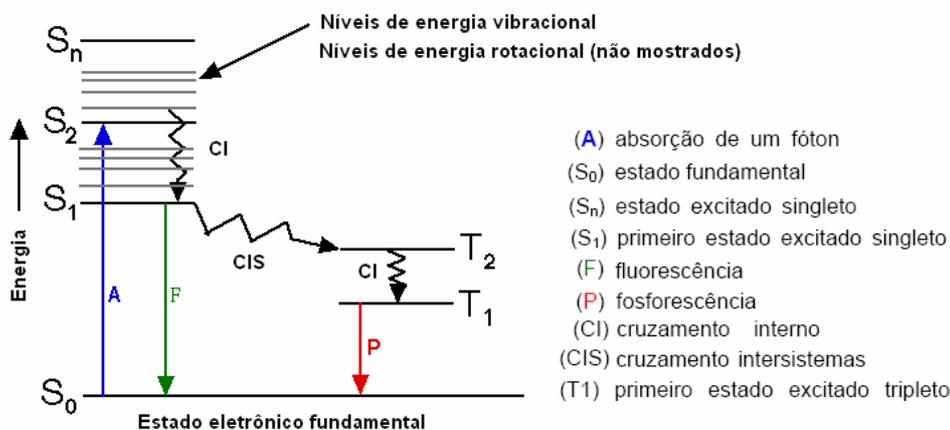


Figura 2 - Diagrama de Jablonski modificado. (Adaptado de Finete [4])

### Efeito do solvente

Para que ocorra a luminescência, uma molécula precisa ter estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa, sendo esses dois fatores críticos na magnitude da eficiência quântica luminescente ( $\phi_L$ ) de uma substância.

A eficiência quântica luminescente é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência ( $I_L$ ) e o número de fótons absorvidos pela espécie química ( $I_A$ ). Assim, se a eficiência quântica tiver magnitude entre 0,1 e 1, uma molécula será significativamente luminescente.

$$\frac{I_L}{I_A} = \phi_L$$

Embora seja difícil prever teoricamente se uma molécula exibirá luminescência sem o prévio conhecimento da diferença de energia relativa entre os estados excitado e fundamental, é possível, de um modo geral, observar alguns requisitos.

Primeiramente, moléculas relativamente rígidas e ricas em elétrons  $\pi$  (como no caso das moléculas aromáticas), contendo ou não heteroátomos em sua cadeia principal, são potencialmente luminescentes. Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) têm o processo de desativação não radiativo por CI significativamente minimizado, com conseqüente aumento da  $\phi_L$ .

Outros fatores, tais como a temperatura, pH, solvente e a presença de outras espécies, também têm profundo efeito nas características luminescentes de uma substância, afetando não somente as velocidades dos processos luminescentes e dos processos não-radiativos, mas também a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia.

Em geral o aumento da temperatura tem como consequência um aumento na eficiência dos processos de relaxamento vibracional (CI) na desativação do estado excitado. No entanto, por ser um fenômeno de tempo de vida relativamente curto, esse fator é menos crítico no caso da fluorescência, o que permite fácil observação do fenômeno na temperatura ambiente.

A natureza do sistema de solventes também é fator relevante sendo que a sua viscosidade, polaridade e caráter prótico podem afetar significativamente a luminescência. A viscosidade pode diminuir a taxa de colisões bimoleculares desativadoras, pela diminuição da difusão de espécies causadoras dessa desativação e do oxigênio no meio. No caso da fluorescência, a presença do oxigênio não é crítica, pois este é apenas desativador do estado excitado tripleto. Já a polaridade e o caráter prótico do solvente são importantes, pois afetam a energia relativa do estado excitado.

A influência do solvente no espectro eletrônico ocorre devido as suas propriedades eletrostáticas. As interações do solvente com as moléculas do soluto podem ser dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido ou pontes de hidrogênio, dependendo das estruturas moleculares do solvente e do soluto. As moléculas do solvente rapidamente se reorientam em torno da molécula luminescente logo após serem promovidas para o estado excitado e antes do retorno para o estado fundamental. Conseqüentemente, a energia relativa do estado excitado após a luminescência pode ser significativamente diferente do que era durante o processo de absorção. Assim, a mudança da polaridade do solvente ou do seu caráter prótico, acarreta em deslocamentos batocrômico do espectro (em direção ao vermelho) ou deslocamentos hipsocrômicos (em direção ao azul).

### **Influência do pH**

O efeito do pH nos sistemas de solventes próticos é relevante na luminescência de moléculas aromáticas contendo grupos funcionais básicos ou ácidos, sendo muito comum observar significativa diferença entre as propriedades luminescentes de moléculas protonadas e não-protonadas.

Moléculas potencialmente fluorescentes apresentam tempos de vida no estado singleto de menor excitação da ordem de  $10^{-11}$  a  $10^{-7}$  segundos. Apesar de esses tempos de vida serem extremamente curtos, alguns fenômenos químicos são rápidos o bastante para competir com os processos fotofísicos que desativam a molécula excitada. Como ácidos e bases no estado excitado apresentam distribuição eletrônica diferente da apresentada em seu estado fundamental, o grau de acidez ou basicidade deve ser muito diferente para a mesma molécula nesses dois estados. Quando a acidez ou basicidade é manifestada no estado excitado, a competição dessas reações químicas com a fluorescência das espécies excitadas geralmente resulta em luminescências múltiplas de soluções nas quais uma única espécie é diretamente excitada. Normalmente, o espectro de fluorescência varia com a concentração de prótons aceptores ou doadores. Os rendimentos e o perfil do decaimento da fluorescência irão variar com o pH.

### **Derivação Fotoquímica**

A derivação fotoquímica é um método usado para induzir luminescência de espécies químicas por meio de reações fotoquímicas provocadas por radiação ultravioleta (UV). Esse procedimento se fundamenta em modificações de um determinado analito por reações, que dependendo de sua estrutura e dos componentes do meio reacional, podem ser de natureza foto-oxidativa, fotoredutora, foto-decomposição, foto-hidrólise, entre outras. Assim, após o

tratamento com radiação UV, se obtém espécies derivadas com um rendimento quântico luminescente mais elevado. Alternativamente, este procedimento pode gerar derivados não-luminescentes provenientes de substâncias previamente luminescentes, que podem ser úteis para suprimir a luminescência de potenciais interferentes, quando misturas complexas são analisadas. Esse procedimento possui vantagens inerentes, pois a radiação UV pode ser prontamente disponível em várias intensidades, apresentando um baixo custo para sua aplicação e eliminando problemas relacionados com contaminação, como potencialmente pode-se observar com a adição de reagentes químicos.

## Procedimento experimental

### Reagentes e materiais diversos

Todos os experimentos foram realizados com reagentes de grau analítico e água ultra-purificada. Os solventes usados foram Amônia, Etanol e Metanol da Merck (Brasil). A água ultra-purificada foi obtida de um ultra purificador de água Máster Sistem 1000 – GEHAKA. Nos estudos que envolveram a acidificação ou a alcalinização do meio, utilizou-se ácido clorídrico e hidróxido de sódio, ambos da Merck (Brasil).

Carbazol (CBZ), 7,8-Benzoquinolina (78BQ) e Acridina (A) foram adquiridos da Acros Organics (EUA), Dibenzo[a,j]acridina (DBA) foi adquirido da CHEM Service, 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina (9ATHA) foi adquirido da Sigma Chemical CO, a 7,9-Dimetilbenzo[c]acridina (79DMBA), a 9-Metilacridina (9MA) e Acridine Orange (AO) foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

### Espectros de luminescência

O equipamento utilizado para as leituras de fluorescência foi o espectrômetro de luminescência modelo LS-45 da Perkin Elmer. O esquema óptico desse instrumento é mostrado na figura 3.

Os monocromadores são do tipo Monk-Gillieson que cobrem as faixas espectrais de 200-800nm para excitação e 200-900nm para emissão. A fonte de excitação é uma lâmpada de descarga de xenônio que produz intensos pulsos de 8  $\mu$ s de duração e 20 kW de potência, sendo a largura do pulso, na metade da altura do mesmo, menor que 10  $\mu$ s.

O detector é um tubo fotomultiplicador com resposta para operação S5 modificada, até em torno de 900 nm.

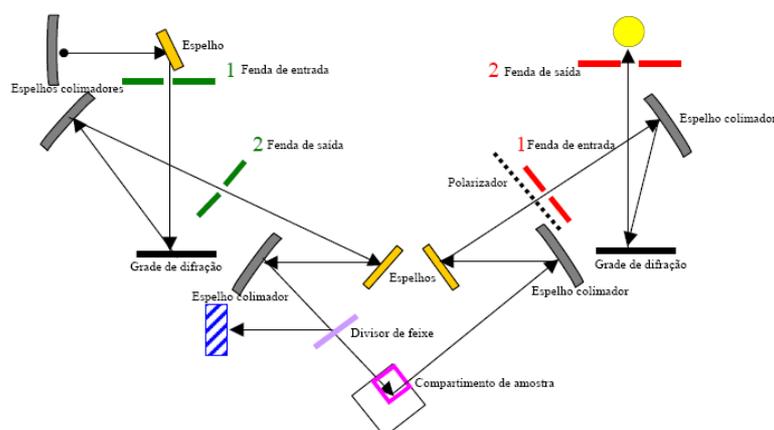


Figura 3: Esquema óptico do espectrômetro LS-45.

### Reator fotoquímico

Para o tratamento fotoquímico das amostras foi utilizado um reator construído no próprio laboratório (LEEA - Laboratório de Espectroscopia e Eletroanalítica Aplicada) figura 4. O sistema é constituído por seis lâmpadas de vapor de mercúrio de 6W (lâmpadas de esterilização) cuja emissão máxima ( $\lambda_{\max}$ ) se situa em torno de 300 nm. As lâmpadas foram dispostas na parte superior interna do reator de modo a irradiar as amostras e os substratos com as seis lâmpadas simultaneamente. Para irradiar as soluções de analito foram utilizadas tubos de quartzo (1,9 cm de diâmetro e 13,7 cm de altura). As soluções contendo as acridinas foram irradiadas por 60 min.

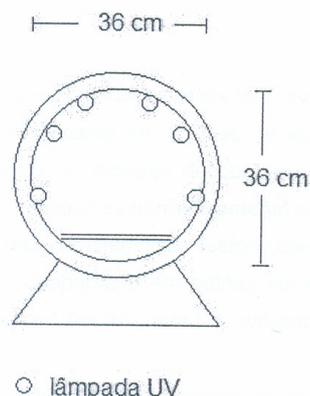


Figura 4 – Reator fotoquímico.

### Procedimentos

#### Procedimentos gerais

O material utilizado em todos os procedimentos foi previamente enxaguado com água destilada, sendo então imerso em solução de ácido nítrico 10% por um período mínimo de 24 horas. O material descontaminado foi novamente enxaguado e seco.

#### Verificação da estabilidade das soluções-estoque

Para esse experimento utilizaram-se as acridinas relacionadas a seguir: A, 9MA, 79DMBA, DBA, AO, e 9ATHA. Para cada uma foram preparadas 10mL de solução  $10^{-6}$  mol/L em 70% metanol : 30% meio aquoso (concentração final de HCl =  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  a partir de soluções-estoque ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  em etanol, guardadas em geladeira por 3 meses). Para essas soluções, fez-se uma varredura entre os comprimentos de onda de 200 e 500nm, para a obtenção do par de comprimentos de onda de excitação e emissão que gerasse o maior sinal de resposta dos analitos. A estabilidade das soluções estoque foi avaliada, pois, pela impossibilidade de análises em intervalos de tempos relativamente curtos (em alguns casos), pode-se observar algum grau de decomposição das moléculas dos analitos e a segurança dos resultados ficar comprometida. Esses dados foram colhidos utilizando um filtro de atenuação de 1% , obtendo os resultados apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de emissão, excitação e intensidade de fluorescência em meio metanol:ácido (70:30).

	$\lambda_{exc}$	$\lambda_{emi}$	$I_f$ obtido	$I_f$ esperado
A	352	484	38,9	102
9MA	252	474	70,4	217
CBZ	225	358	153	278
78BQ	276	427	14,0	81,9
DBA	298	451	212	155
9ATHA	238	359	38,0	52,1
79DMBA	291	474	33,2	90,5
AO	490	521	54,2	54,2

Os dados de  $I_f$  esperado foram obtidos assim que as soluções estoque foram preparadas, quatro meses antes, aproximadamente, do experimento acima. Analisando os resultados da tabela 1, pôde-se observar que os resultados colhidos não foram repetitivos, o que nos leva a concluir que as soluções estoque devem ser mantidas na geladeira por um período inferior a quatro meses, e recomenda-se que análises periódicas (uma vez ao mês) sejam executadas para a verificação de estabilidade das mesmas.

#### 2.4.3 Estudo dos solventes para realização das análises

Nesta etapa do estudo, propôs-se a realização de alguns experimentos para verificação das condições de seletividade promovidas por diferentes solventes. Para isso, foram feitos vários testes com concentrações e solventes diferentes. Preparou-se 10 mL de solução contendo uma mistura de acridinas, conforme mostra a tabela 2, e fez-se a leitura do sinal fluorescente, obtendo-se assim os comprimentos de onda máximos de excitação, emissão e a intensidade de fluorescência. Para a coleta dos dados de emissão e excitação, utilizou-se filtro de atenuação de 1%.

Tabela 2 - Resultados de emissão, excitação e intensidade de fluorescência em diferentes solventes.

Solvente	Acetonitrila-Tampão Fosfato <sup>a</sup>			Isoctano			HCl 5%			Metanol-Amônia <sup>c</sup>		
	Concentração $5 \times 10^{-6}$ mol.L <sup>-1</sup>			$1 \times 10^{-6}$ mol.L <sup>-1</sup>			$1 \times 10^{-6}$ mol.L <sup>-1</sup>			$1 \times 10^{-6}$ mol.L <sup>-1</sup>		
	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{emi}$ (nm)	$I_{fluor}$	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{emi}$ (nm)	$I_{fluor}$	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{emi}$ (nm)	$I_{fluor}$	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{emi}$ (nm)	$I_{fluor}$
A	246	419	20	211	290	0,6 <sup>b</sup>	-	-	-	246	417	8
9MA	247	424	50	-	-	-	-	-	-	248	421	17
CBZ	230	358	236	-	-	-	-	-	-	232	357	54
78BQ	263	366	141	-	-	-	-	-	-	264	369	45
DBA	288	400	178	290	393	150	-	-	-	290	400	362
9ATHA	238	360	84	211	290	0,6 <sup>b</sup>	-	-	-	239	368	23
79DMBA	293	396	178	-	-	-	286	476	727	278	395	70
AO	492	524	79	-	-	-	296	449	568	302	513	19

<sup>a</sup> Tampão fosfato 50mM pH 6,9 (45%)

<sup>b</sup> Sinal equivalente ao do solvente puro

<sup>c</sup> 96% Metanol - 4% Amônia

**Estudo do efeito do tratamento fotoquímico**

Após os experimentos descritos no item anterior, percebeu-se a necessidade de um maior critério para a seletividade entre as acridinas, por isso lançou-se um estudo de forma a potencializar os resultados já obtidos através da irradiação das soluções com luz UV. Para cada acridina, foram preparados 10mL de solução  $10^{-6}\text{mol.L}^{-1}$  em 70% etanol : 30% meio aquoso (concentração final de HCl =  $0,01\text{mol.L}^{-1}$ ). Uma parte de cada solução foi irradiada em tubos de quartzo previamente tratados por 0, 30 e 60 min e os espectros de fluorescência das soluções foram obtidos, onde se pôde observar os respectivos comprimentos de excitação, emissão e a intensidade de fluorescência, em todas as leituras foram usados filtros de atenuação de 1% de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de emissão, excitação e intensidade de fluorescência em solvente etanol-ácido após exposição à radiação UV.

	Tempo(UV)	$\lambda$ exc	$\lambda$ emi	If
A	0min	253	475	43
	30min	252	478	22
	60min	225	368	73
9MA	0min	253	476	80
	30min	253	476	40
	60min	279	368	3
CBZ	0min	230	358	177
	30min	230	358	5,87
	60min	223	363	4
78BQ	0min	275	429	31
	30min	274	419	27
	60min	248	435	4
DBA	0min	298	450	261
	30min	298	450	252
	60min	299	453	267
9ATHA	0min	240	361	57
	30min	239	360	41
	60min	235	389	2
79DMBA	0min	291	476	62
	30min	289	476	57
	60min	290	471	28
AO	0min	493	522	75
	30min	492	522	57
	60min	493	521	74

Seguindo o estudo, para cada acridina foram preparados 10mL de solução  $10^{-6}\text{mol.L}^{-1}$  em 70% metanol : 30% meio aquoso (concentração final de HCl =  $0,01\text{mol.L}^{-1}$ ). Uma parte de cada solução foi irradiada por 60min em tubos de quartzo previamente tratados. Após o processo de irradiação, foram feitas as varreduras de emissão e excitação para cada solução

(0min e 60min) e, utilizando o filtro de atenuação de 1%, os resultados apresentados na tabela 4 foram obtidos.

Tabela 4 - Resultados de emissão, excitação e intensidade de fluorescência em solvente metanol-ácido após exposição à radiação UV.

	Tempo(UV)	$\lambda$ exc	$\lambda$ emi	If
A	0 min	252	479	49
	60min	335	414	1,5
9MA	0 min	235	475	107
	60min	253	477	43
CBZ	0 min	229	357	167
	60min	227	355	5
78BQ	0 min	276	428	36
	60min	274	418	10
DBA	0 min	298	450	296
	60min	299	450	209
9ATHA	0 min	237	360	45
	60min	238	361	5
79DMBA	0 min	290	473	87
	60min	288	473	40
AO	0 min	492	521	75
	60min	450	494	8

Finalizando o estudo para a verificação do meio que proporcionaria maior seletividade entre acridinas, foram preparadas soluções nas concentrações de  $2 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> em solvente contendo 100% de Metanol e outras em 96%Metanol:4%NH<sub>3</sub>. Para esse experimento, uma parte de cada solução foi irradiada durante um período de 60 minutos no reator fotoquímico e os espectros de fluorescência das soluções irradiadas e não irradiadas foram obtidos usando-se um filtro de atenuação de 1%. Os comprimentos de onda de máximas excitação e emissão e as intensidades do sinal fluorescente estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de fluorescência nos solventes metanol e metanol-amônia após exposição à radiação UV.

	Tempo(UV)	$\lambda$ exc	$\lambda$ emi	If (100%MeOH)	If (4%NH <sub>3</sub> :96%MeOH)
A	0min	230	418	37	39
	60min	230	418	35	10
9MA	0min	246	420	65	74
	60min	247	417	11	12
CBZ	0min	222	360	359	340
	60min	222	361	58	80
78BQ	0 min	235	366	200	225
	60min	235	370	86	81
DBA	0min	277	400	946	615
	60min	278	402	915	591
9ATHA	0 min	243	360	180	137
	60min	243	359	73	68
79DMBA	0min	261	395	317	345
	60min	262	397	298	308
AO	0min	475	519	229	52
	60min	478	520	216	11

## Resultados e discussão

Após análise minuciosa dos dados apresentados nas tabelas anteriores, levando em consideração o solvente, o pH e o tempo de irradiação sob luz UV que proporcionasse uma maior seletividade entre as acridinas, pôde-se destacar o meio que continha 70% de Metanol e 30% de Ácido Clorídrico. Os dados referentes a esse experimento encontram-se na tabela 4, e os espectros referentes àqueles resultados podem ser observados nas figuras 5 e 6. Pode-se observar que quando expostos à radiação, a DBA e AO mantêm suas intensidades fluorescentes quase que estáveis, enquanto que os outros compostos diminuem consideravelmente suas intensidades.

Portanto, após a análise daqueles espectros, verificou-se que seria possível determinar seletivamente AO, 79DMBA e DBA na presença das outras acridinas através de varredura sincronizada, visto que seus  $\Delta\lambda$  (diferença entre os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação), após a exposição à radiação, eram muito diferentes. Porém, dando continuidade às etapas de determinação, pôde-se observar que os resultados do procedimento de irradiação para as acridinas em metanol-ácido não apresentavam repetitividade. O experimento de irradiação para a 79DMBA e AO foi realizado repetidas vezes para averiguar esse problema e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6. Pode-se observar que o

coeficiente de variação para a queda de sinal após 60 minutos de irradiação foi de 48% para a 79DMBA e de 82% para a AO.

Tabela 6 - Razão entre as intensidades máximas de emissão após sessenta e zero minutos de irradiação.

Repetição	$I_{60} / I_0$	
	79DMBA	AO
1	0,29	0,41
2	0,87	0,03
3	0,78	0,77
4	0,21	0,78
5	0,83	0,09
6	0,59	0,30
Média	0,60	0,40
Desvio Padrão	0,29	0,32
CV%	48	82

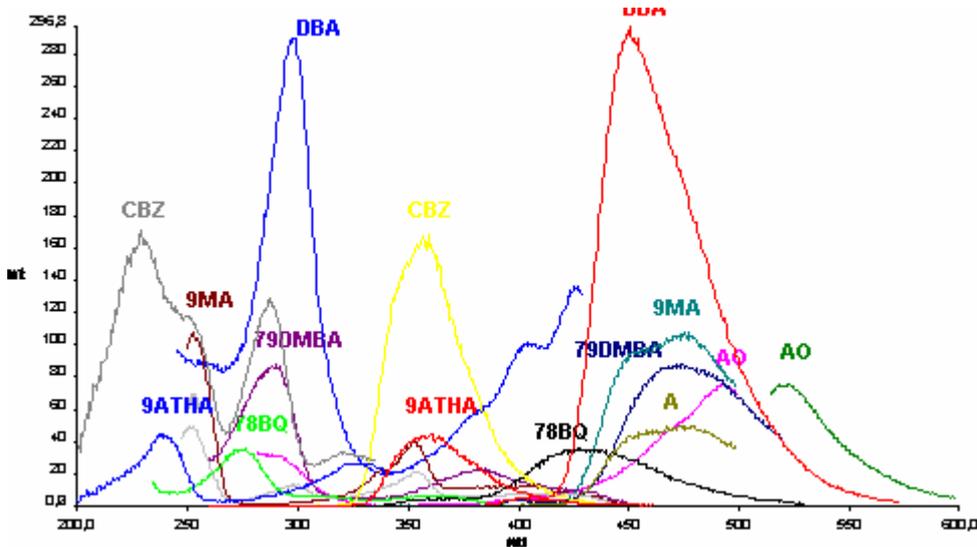


Figura 5 – Espectros das acridinas em 70% metanol : 30% meio aquoso (concentração final de HCl = 0,01 mol.L<sup>-1</sup>) sem irradiação UV.

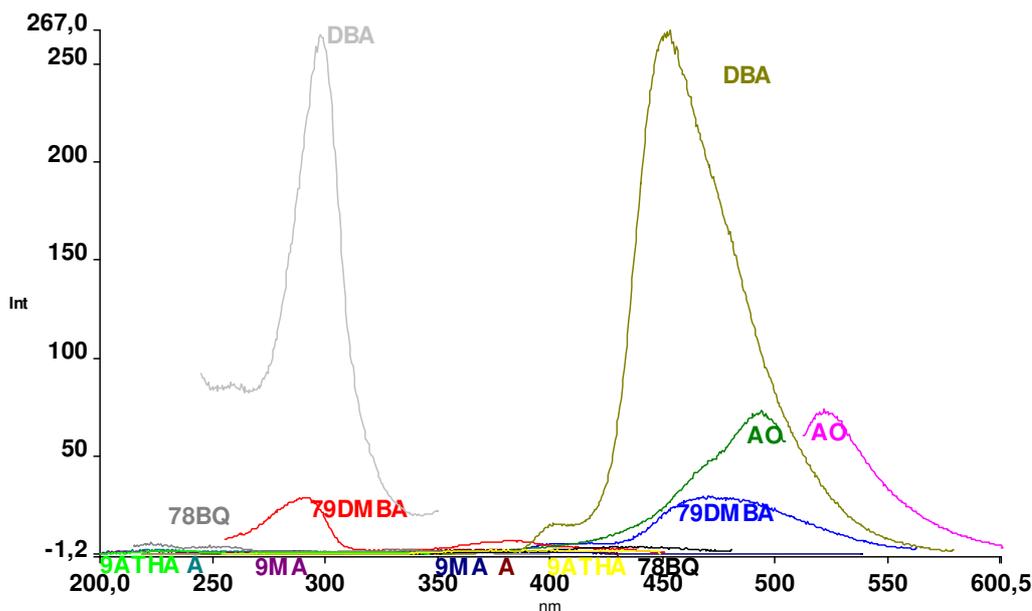


Figura 6 – Espectros das acridinas em 70% metanol : 30% meio aquoso (concentração final de HCl = 0,01mol.L<sup>-1</sup>) após 60min de irradiação UV.

Por não obter repetitividade no procedimento em pH ácido, mais dois solventes foram testados, 100% Metanol e 96%Metanol:4%NH<sub>3</sub>, cujos dados iniciais podem ser vistos na tabela 5 e os espectros referentes a estes dois meios apresentam-se nas figuras 7 a 10.

Os resultados de repetitividade para intensidade de fluorescência após 60 minutos de irradiação naqueles meios podem ser encontrados na tabela 7, onde podemos verificar que para análises feitas em triplicata, na maioria dos compostos, os coeficientes de variação (CV%) obtidos são menores que 10%, o que nos permite dizer que esse meio proporciona repetitividade.

Tabela 7 – Intensidades máximas de emissão após sessenta minutos de irradiação nos meios 100% metanol e 96%MeOH:4%NH<sub>3</sub>.

		$I_{60}/I_0$							
Repetições	Solvetes	A	9MA	CBZ	78BQ	DBA	9ATHA	79DMBA	AO
Média		0,94	0,16	0,18	0,46	.....	0,59	0,94	0,94
Desvio Padrão	100%MeOH	0,01	0,01	0,05	0,03	.....	0,17	0,01	0,02
CV%		1,5	8,8	27	6,7	.....	29	0,61	2,1
Média		0,25	0,17	0,22	0,45	.....	0,61	0,90	0,23
Desvio Padrão	4%NH <sub>3</sub>	0,02	0,02	0,05	0,12	.....	0,00	0,02	0,02
CV%	96%MeOH	6,2	10	23	27	.....	0	1,9	8,9

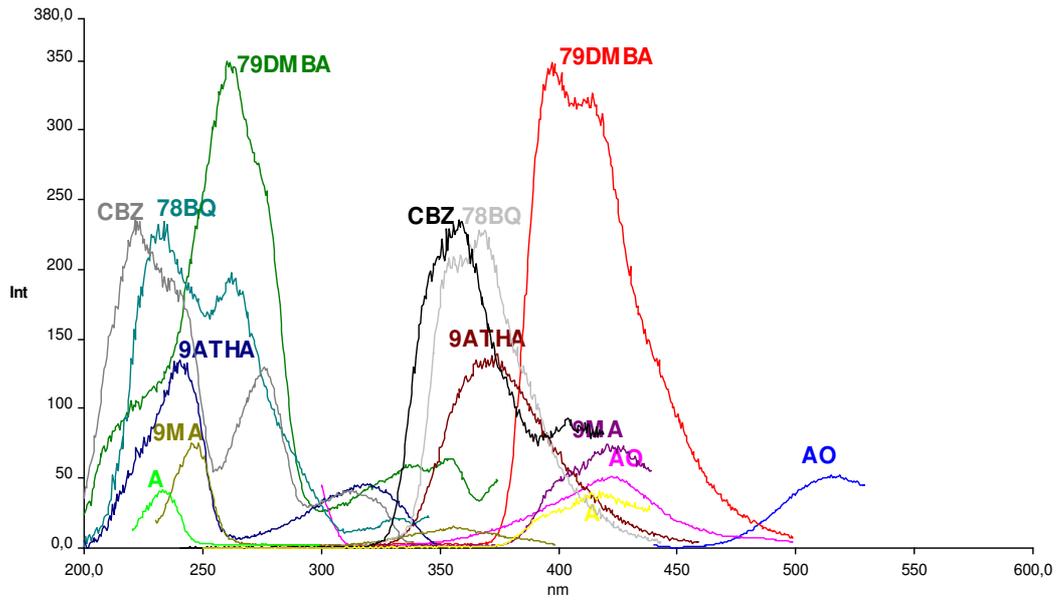


Figura 7 – Espectros das acridinas em 96%MeOH:4%NH<sub>3</sub> sem tratamento fotoquímico.

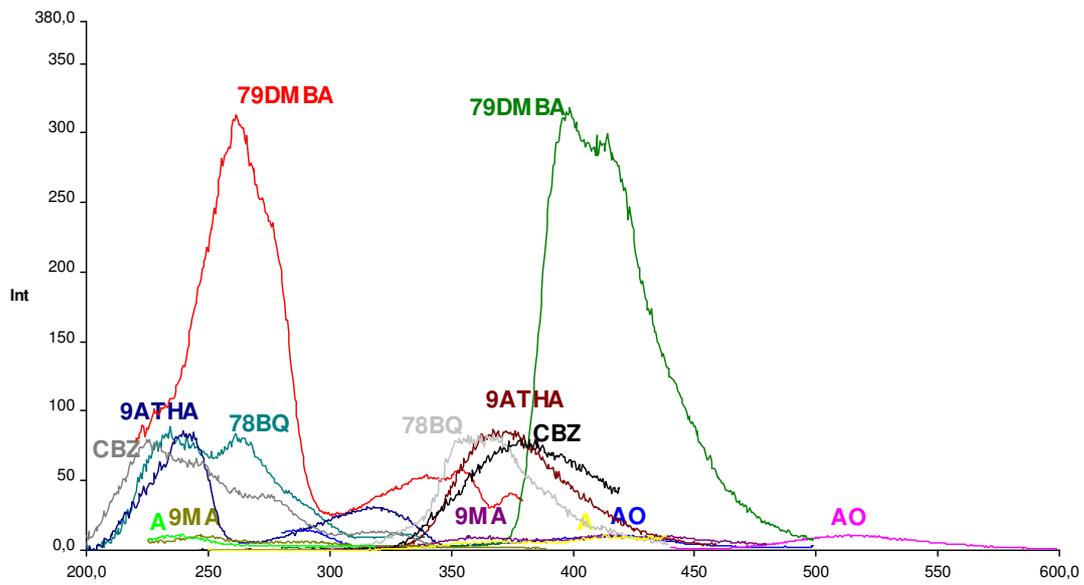


Figura 8 – Espectros das acridinas em 96%MeOH:4%NH<sub>3</sub> após 60min de tratamento fotoquímico.

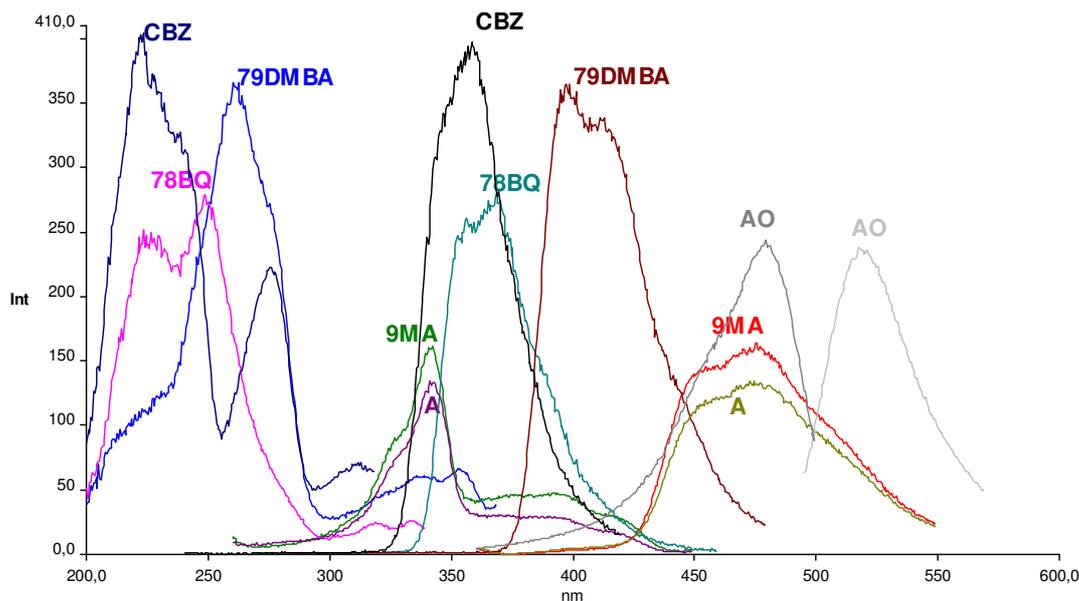


Figura 9 – Espectros das acridinas em 100% Metanol sem tratamento fotoquímico.

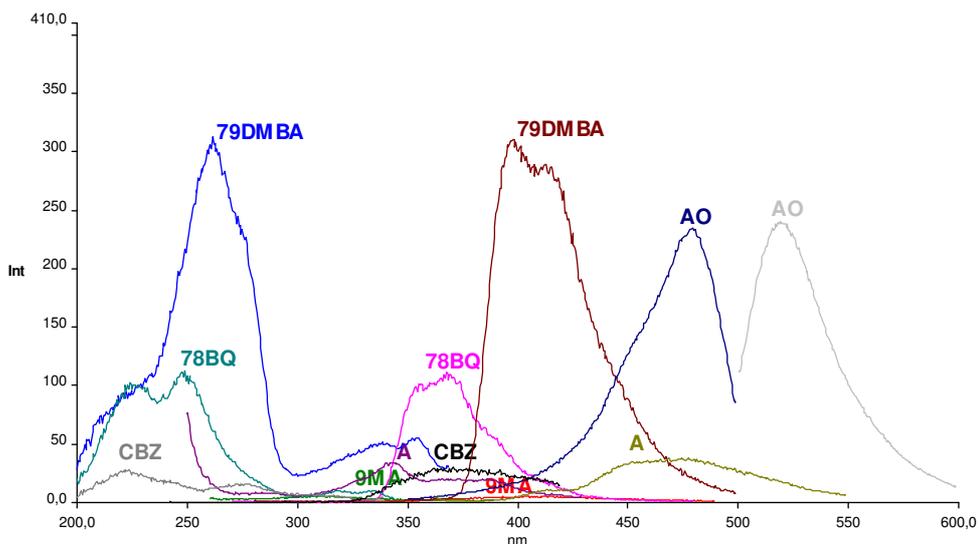


Figura 10 – Espectros das acridinas em 100% Metanol após 60min de tratamento fotoquímico.

Após análise minuciosa dos espectros em meio 96%MeOH:4%NH<sub>3</sub> e em meio 100%MeOH, pode-se observar que ambos têm capacidade de permitir a determinação seletiva de algumas acridinas via varredura sincronizada, recurso que potencializa a seletividade dos resultados obtidos. Com isso escolheu-se trabalhar com o meio 100% MeOH (figuras 9 e 10) por neste haver uma maior simplicidade no procedimento de análise. Os espectros de varredura sincronizada foram feitos para cada acridina utilizando os  $\Delta\lambda$  de cada uma e os melhores resultados podem ser encontrados nas figuras 11 a 18.

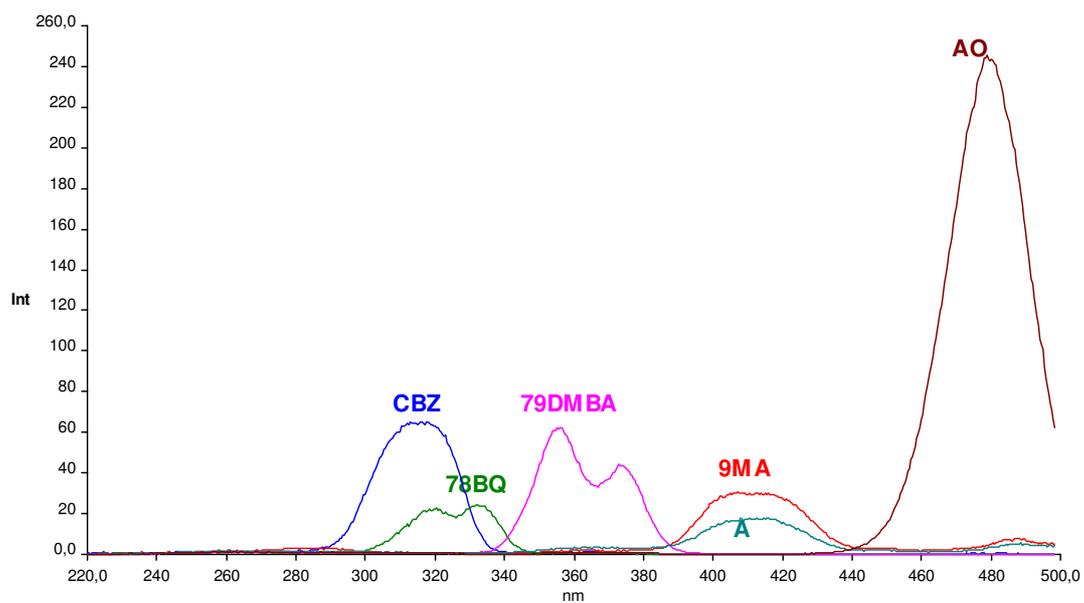


Figura 11 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da AO (38nm) para as soluções sem tratamento fotoquímico.

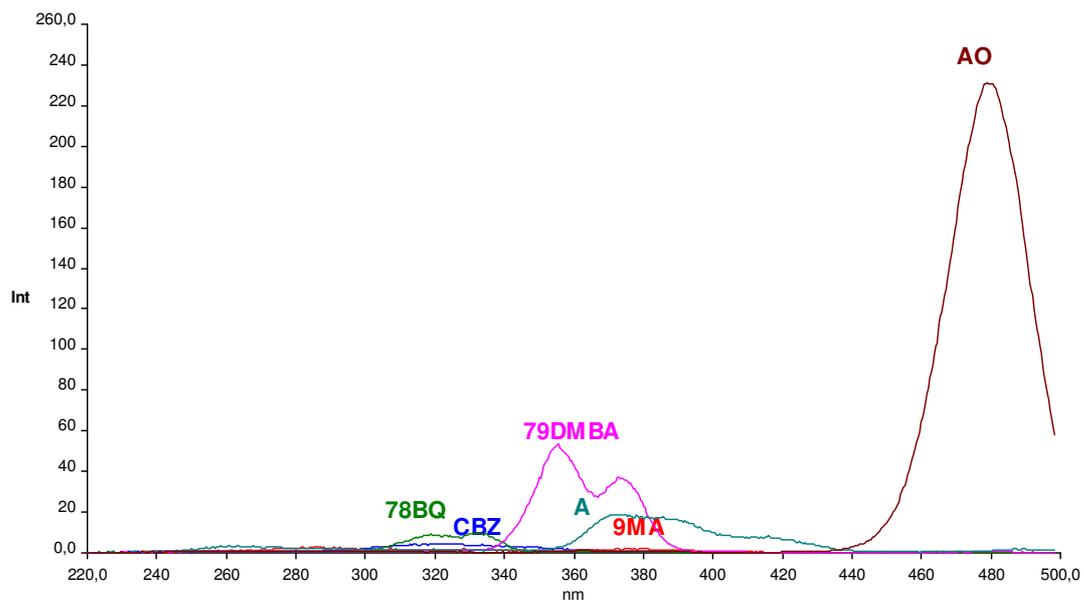


Figura 12 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da AO (38nm) após 60min de irradiação UV.

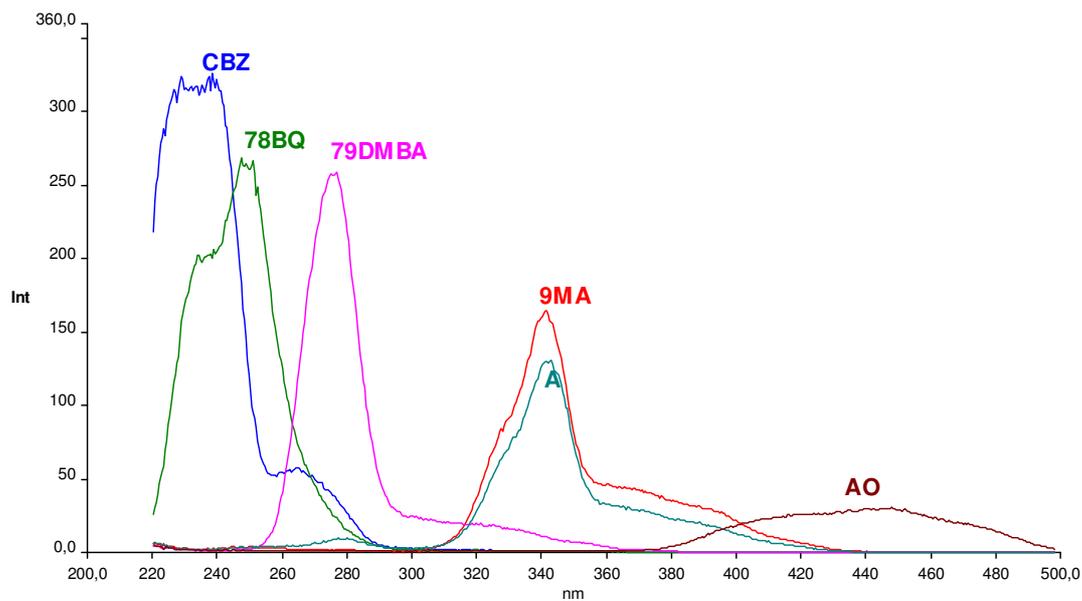


Figura 13 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da 78BQ (118nm) para as soluções sem tratamento fotoquímico.

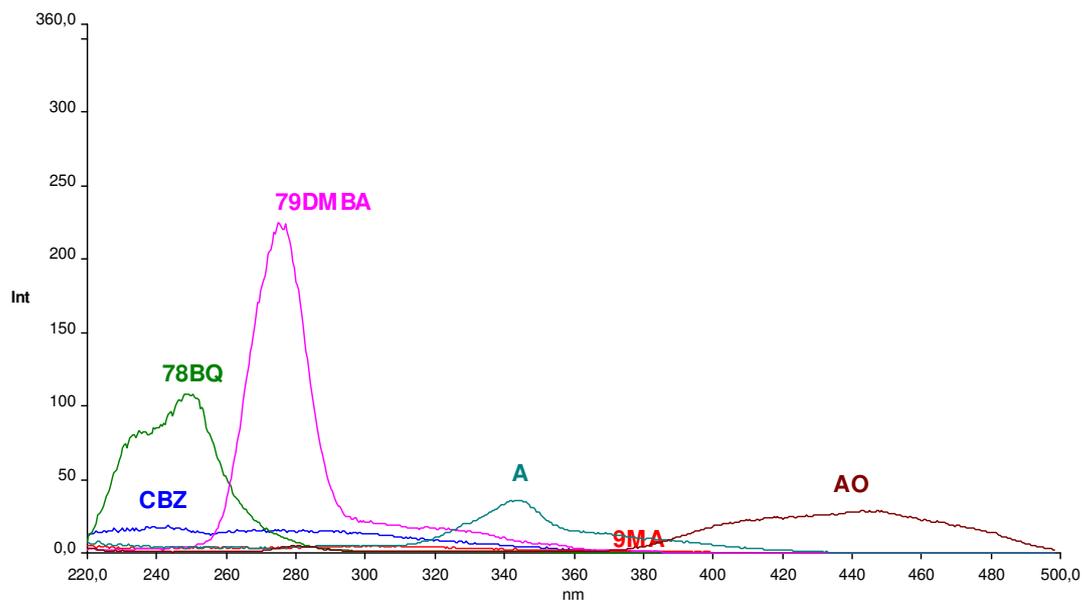


Figura 14 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da 78BQ (118nm) após 60min de irradiação UV.

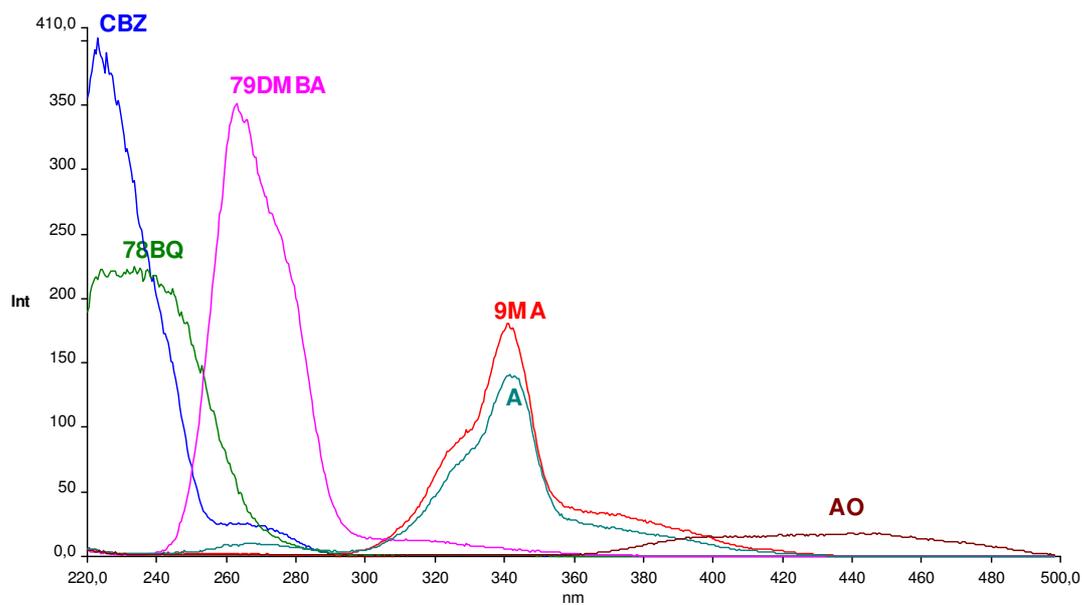


Figura 15 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da A (131nm) para as soluções sem tratamento fotoquímico.

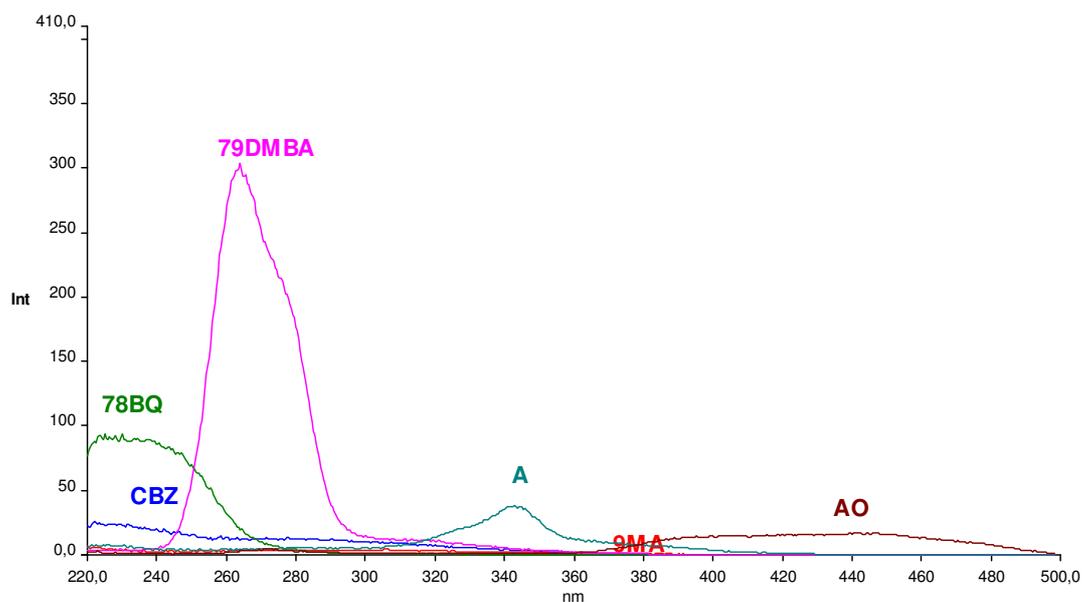


Figura 16 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da A (131nm) após 60min de irradiação UV.

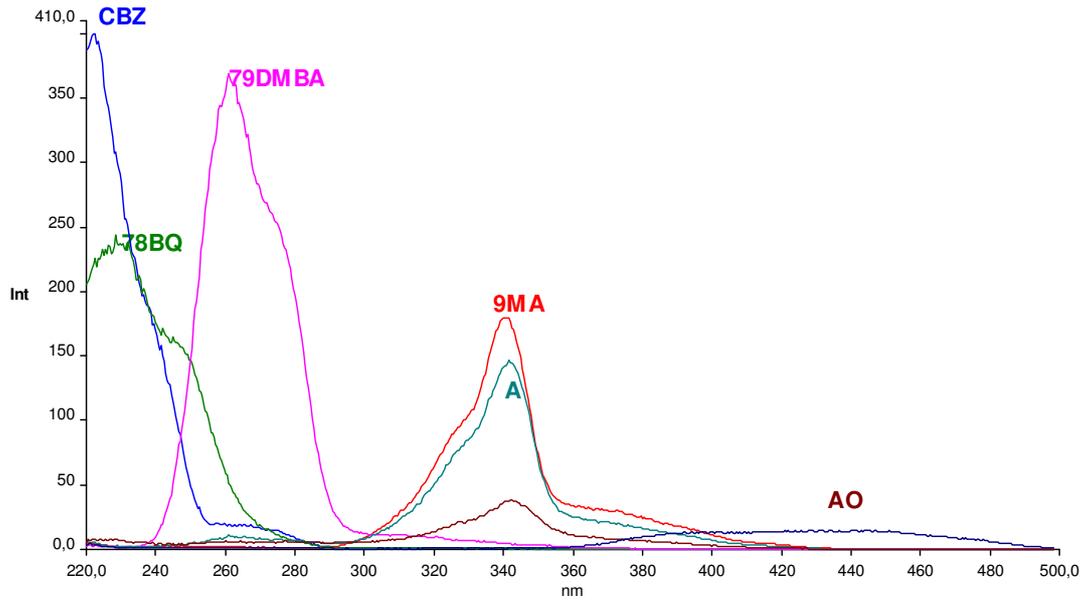


Figura 17 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da 79DMBA (136nm) para as soluções sem tratamento fotoquímico.

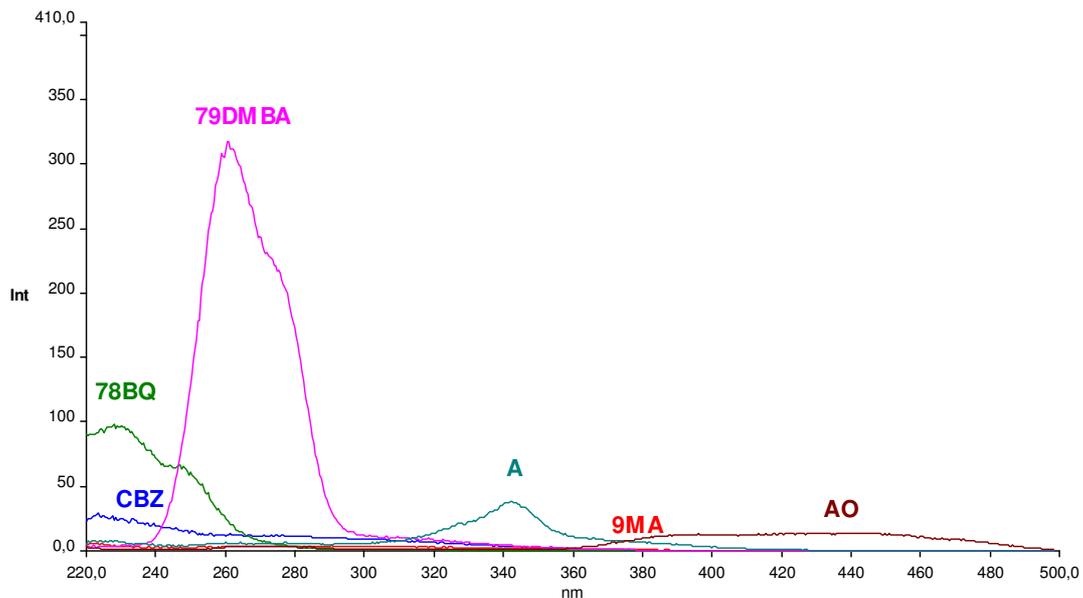


Figura 18 - Espectros de varredura sincronizada das acridinas no  $\Delta\lambda$  da 79DMBA (136nm) após 60min de irradiação UV.

Como se pode observar nos espectros acima, consegue-se fazer a determinação seletiva de algumas acridinas em várias condições como segue a relação abaixo:

- Após 60min de irradiação UV ou até mesmo sem tratamento fotoquímico, usando o  $\Delta\lambda$  da AO (38nm), consegue-se determinar AO e 79DMBA (figuras 11 e 12).
- Após 60min de irradiação UV, usando os  $\Delta\lambda$  da 78BQ, A ou 79DMBA (118, 131 e 136nm, respectivamente) consegue-se determinar A, AO e 79DMBA (figuras 14, 16 e 18).

Os dados referentes à DBA não foram incluídos nos resultados finais (figuras 11 a 18), pois se pôde observar que sua intensidade de fluorescência era muito maior que a dos outros compostos, fazendo estourar a escala limite para um filtro de 1%, e que sua banda espectral se sobrepunha às outras, o que dificultava a seletividade entre os compostos, como é mostrado na figura 19.

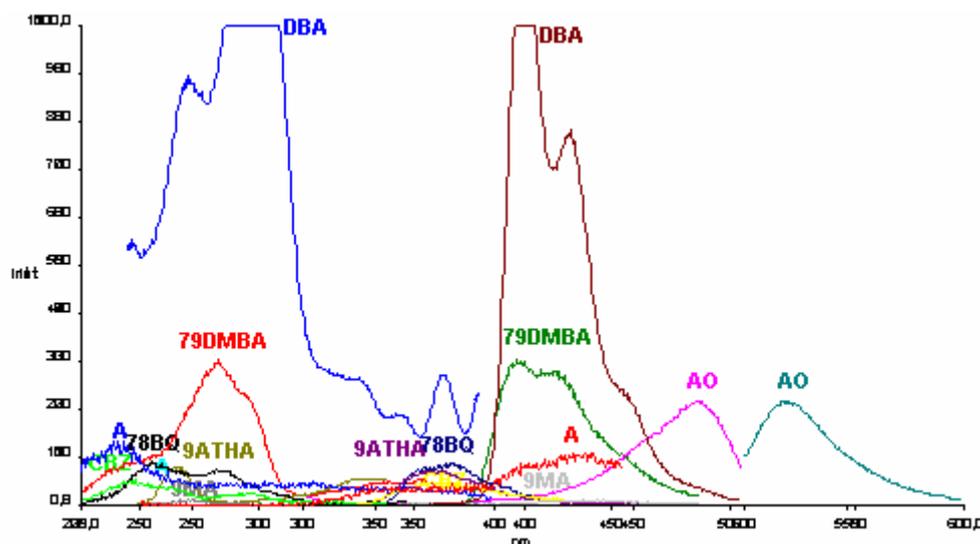


Figura 19 – Espectros das acridinas em 100% Metanol após 60min de tratamento fotoquímico na presença da DBA.

Com os experimentos realizados acima podemos concluir que não se consegue fazer a determinação seletiva das acridinas em estudo na presença de DBA nas condições estudadas, visto que seu sinal fluorescente é muito alto em relação aos outros, o que impossibilita tal seletividade. Ainda assim, podemos destacar que os estudos referentes aos tratamentos fotoquímicos e a utilização da varredura sincronizada foram essenciais para os resultados obtidos até o momento, pois permitiram uma maior seletividade entre as acridinas, possibilitando a determinação de umas na presença de outras em diversas condições de análise.

## Conclusão

Os resultados obtidos até o momento mostram que a técnica estudada é bastante simples e promissora para a determinação simultânea das acridinas, apesar das restrições inerentes à fluorescência em termos de seletividade. Em geral, sempre há alguma sobreposição espectral, principalmente quando se trata de uma família de compostos com estruturas químicas semelhantes, mas, ainda assim, foi possível encontrar uma condição na qual este problema tenha sido minimizado.

Além disso, os resultados mostraram que a sensibilidade da técnica é bastante alta, visto que na maioria das vezes trabalhou-se com concentrações na ordem de  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> e, mesmo assim, foi necessário utilizar um filtro 1%.

As próximas deste trabalho etapas incluem:

1. a investigação de um meio (solvente e pH) que permita a determinação das outras acridinas;

2. o estudo do uso de técnicas de derivada superior como ferramenta para melhorar a seletividades dos espectros;
3. a quantificação da interferência mútua entre as acridinas;
4. a construção de curvas analíticas para a quantificação das acridinas e a aplicação da técnica em alguma amostra fortificada.

### **Referências Bibliográficas**

1. ROSATTO, S. S. et al Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, 24, p. 77-86. 2001.
2. CASTRO, Y. E. V. **Fosforimetria na temperatura ambiente com o uso de microemulsões sem detergente: desenvolvimento de método e aplicação na determinação de carbazol e de dibenzotiofeno em amostras orgânicas líquidas**, Rio de Janeiro, 2006. 112p Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, PUC-Rio.
3. MAO, J. et al. Analysis of benzoquinolines and acridines in Brazilian diesel oil by particle beam LC/MS and HPLC/UV. **Journal of Liquid Chromatography**, 18, p. 903-916. 1995.
4. FINETE, V. L. M. **Desenvolvimento de métodos espectrofluorimétricos para a determinação de eritromicina e canamicina e aplicabilidade na vacina contra a febre amarela**, Rio de Janeiro, 2005 111p Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.