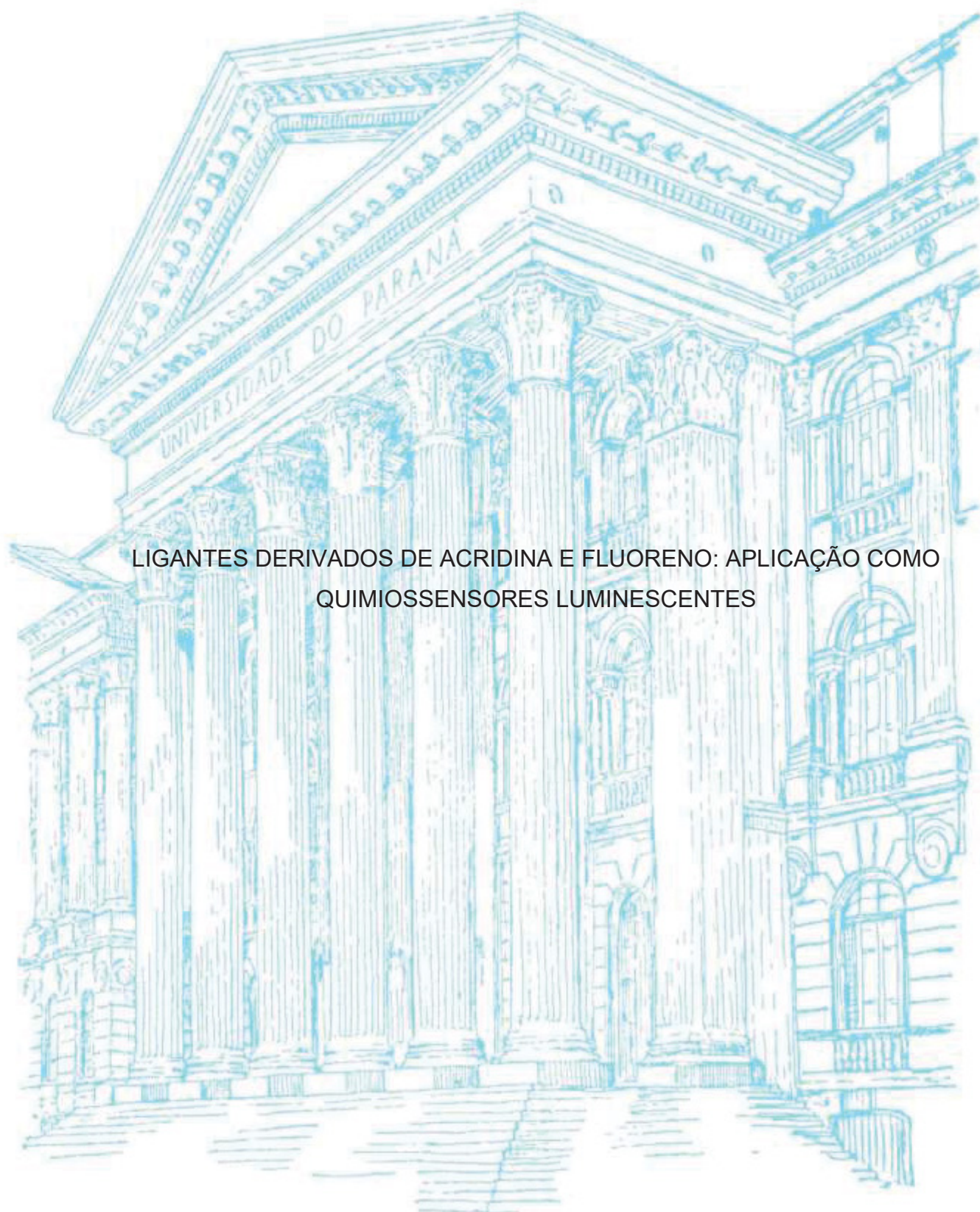


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
FABIANE DOS SANTOS CARLOS



LIGANTES DERIVADOS DE ACRIDINA E FLUORENO: APLICAÇÃO COMO
QUIMIOSENSORES LUMINESCENTES

CURITIBA – PR
2021

FABIANE DOS SANTOS CARLOS

LIGANTES DERIVADOS DE ACRIDINA E FLUORENO: APLICAÇÃO COMO
QUIMIOSENSORES LUMINESCENTES

Tese de doutorado, apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Ingresso em 09/2017.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Souza Nunes

CURITIBA – PR

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C284l Carlos, Fabiane dos Santos
Ligantes derivados de acridina e fluoreno: aplicação como
quimiossensores luminescentes [recurso eletrônico] / Fabiane dos
Santos Carlos – Curitiba, 2021.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas,
Programa de Pós-graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Souza Nunes

1. Fluorescência. 2. Química supramolecular. I. Universidade
Federal do Paraná. II. Nunes, Fábio Souza. III. Título.

CDD: 535.352

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA 40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FABIANE DOS SANTOS CARLOS** intitulada: **LIGANTES DERIVADOS DE ACRIDINA E FLUORENO: APLICAÇÃO COMO QUIMIOSENSORES LUMINESCENTES**, sob orientação do Prof. Dr. FÁBIO SOUZA NUNES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2021.

FÁBIO SOUZA NUNES

Presidente da Banca Examinadora

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SHIRLEY NAKAGAKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ROBERTO SANTANA DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO/ RIBEIRÃO PRETO)

BERNARDO ALMEIDA IGLESIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

Agradecimentos

Agradeço...

De forma muito especial e eminente, aos meus pais, Lily e Wanderlei, por terem sido pais dedicados e exemplares, dos quais me orgulho e me espelho. Por terem dado a mim e aos meus irmãos a melhor educação possível, e serem os principais responsáveis por me conduzirem até aqui.

Aos meus irmãos, Felipe e Fernando, por fazerem parte da minha vida, pelo amor e carinho que sempre compartilhamos.

Com carinho, ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Souza Nunes, por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa em 2015, e pelos muitos ensinamentos ao longo destes 6 anos de trajetória pelo “GSpeC”, os quais levarei comigo como inspiração enquanto futura professora.

Ao químico teórico, Cristiano Zanlorenzi, dono do meu coração e responsável pelos cálculos apresentados. Agradeço por todo apoio emocional e intelectual, pelas valiosas discussões e pelas boas ideias que engrandeceram este trabalho, pela dedicação incansável que sempre demonstrou pela ciência e nesta colaboração, o qual admiro e me inspiro.

A Prof^a Dr^a Shirley Nakagaki (*UFPR*) pelo convívio diário no Laboratório de Bioinorgânica, por ter aceitado participar como banca no exame de qualificação e defesa, pelas contribuições feitas ao trabalho e por ser um grande exemplo de representatividade da mulher na ciência.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate (*UFPR*) pelas relevantes contribuições no exame de qualificação e defesa, por sempre estar disponível a ajudar e pelo carinho que sempre demonstrou por mim.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (*USP*) e Bernardo Almeida Iglesias (*UFSC*) por terem aceitado o convite para participar do exame de defesa, e por suas valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. Márcio Peres de Araújo (*UFPR*) pelas valiosas contribuições desde o mestrado, do qual participou de todos os processos de avaliação, e no doutorado pela sua participação na banca de admissão, correção dos relatórios anuais e exame de qualificação; pelo carinho que sempre demonstrou por mim.

A Prof^a Dr^a Leni Campos (*UFPR*) por disponibilizar o espectrofluorímetro do Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (*LaPPS-UFPR*), por ser muito atenciosa e carinhosa comigo sempre que nos encontramos; bem como a seus alunos, pela ajuda

com o acesso e uso do equipamento.

Aos professores da pós-graduação que tive a oportunidade de conhecer e aprender mais sobre ciência ao longo destes 6 anos, representados por: Prof^a Dr^a Andrea Oliveira, Prof^a Dr^a Tatiana Renata Simões, Prof^a Dr^a Noemi Nagata, Prof^a Dr^a Jaisa Fernandes Soares, Prof^a Dr^a Clarice do Amaral, Prof. Dr. João Batista Marques Novo, Prof. Dr. Lauro Camargo Dias Júnior, Prof. Dr. Herbert Winnischofer, Prof. Dr. Bruno Gonçalves da Silva, Prof. Dr. Flávio Massao Matsumoto, Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora; além dos professores supracitados.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioinorgânica, Inorgânica Avançada (Amarelo) e ao “pessoal da analítica” (que inclui muitos grupos e laboratórios), pelo convívio diário, cafézinhos regados de boas conversas e risadas que sempre me fizeram bem, pelas contribuições e discussões agregadoras sobre o trabalho representados por: Letícia Silva, Thais Zaboenco, André Ferrarini, Rafael Frassom, Otávio Fuganti, João Stival, Everton Henrique, Caroline Geovana, Gabriela Bosa, Caroline Terzi, Renaldo Silva, Francielle Santana, José Severiano, Luana Camargo, Silvane Machado, Elthon Passos, Janaína Sehnem, Eliz Cesca, Alejandro Esteban, Letícia Bertagi, Sheila Oliveira, Eduardo Souza, Letícia Glugoski, Sandra Albornoz.

Aos amigos da vida e meus familiares, representados por: Vó Idalina, Vó Hilda, Vô João (em memória), Silmara (madrasta), dona Adelaide e seu Joel (sogros), Patrícia, Renato, Kevellyn, Vitor Derek, Daiane Quadros, Daiane Beatriz, Thaiz Antiszko, Carol Nocera, Renan Sota, Luanda Rocha.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (*PPGQ-UFPR*) pelo suporte físico e instrumental, dado através dos equipamentos da central analítica que foram utilizados para caracterização dos materiais desse trabalho, bem como, aos técnicos responsáveis pelas medidas e/ou manutenção dos mesmos.

A *CAPES* pela bolsa concedida.

RESUMO

Este trabalho apresenta dois capítulos sobre sensores químicos luminescentes, derivados de acridina e fluoreno, respectivamente. No primeiro capítulo estudaram-se três sensores macrocíclicos derivados de acridina, intitulados *MAC*, *DAC* e *TAC*, que se diferem basicamente pelo número de fluoróforos na estrutura. A partir das propriedades luminescentes dos sensores, realizou-se testes de seletividade frente a diversos cátions em solução, observando-se uma alta especificidade dos ligantes *MAC* e *DAC* a íons cádmio(II), de maior expressividade para *MAC*. Sequencialmente, obteve-se figuras de mérito importantes a fim de verificar se o quimiossensor poderia ser aplicado com efetividade assegurando não só a seletividade/especificidade, mas também reversibilidade, robustez, precisão e exatidão nas medidas. Estas foram estatisticamente aprovadas seguindo orientações de órgãos reguladores como *ANVISA* e *INMETRO* e aplicadas em matrizes reais como cachaça, saquê e extrato de fumaça de cigarro para detecção de cádmio(II) pelo ligante *MAC*. Além disso, foram realizados cálculos mecânico quânticos para explicar o comportamento emissivo apresentado na formação do complexo $[Cd(MAC)]^{2+}$ em solução. No capítulo 2 deste trabalho, realizou-se um estudo com dois derivados do fluoreno (*DEFM* e *FDC*) onde o primeiro se mostrou seletivo para íons ferro(III) e aplicado em etanol combustível. As composições químicas e as estabilidades dos complexos formados entre os sensores e os analitos foram investigadas a partir de estudos em solução, com a aplicação do método das variações contínuas de Job e dos formalismos de Stern-Volmer e Benesi-Hilberbrand. A fim de expandir o estudo com o ligante *MAC* frente à íons do bloco f, escolheu-se o lantanóide európio(III) e investigou-se um sistema misto contendo dois fluoróforos distintos em solução (acridina, presente no *MAC*; e fluoreno, presente no *FDC*) para a detecção de ânions em solução. Os compostos deste trabalho foram caracterizados por técnicas como análise elementar (*CHN*), espectroscopia vibracional (*FTIR*), ressonância magnética nuclear (*RMN*), espectrometria de massas (*ESI-MS*), difratometria de raios-X de monocristal, espectroscopia de absorção *UV-VIS* e fluorescência, incluindo também cálculos teóricos *TD-DFT*.

Palavras-chave: acridina, fluoreno, fluorescência, quimiossensor, química supramolecular, DFT

ABSTRACT

This work presents two chapters on luminescent chemical sensors, derived from acridine and fluorene, respectively. In the first chapter, three macrocyclic sensors derived from acridine were studied, called MAC, DAC and TAC, which differ basically by the number of fluorophores in the structure. Their luminescence properties were determined, as well as selectivity tests against several cations in solution, in which it was possible to identify a high specificity of MAC and DAC to cadmium(II) ions, particularly for MAC. Sequentially, analytical figures of merit were obtained in order to verify if the chemosensor could be applied effectively, ensuring not only selectivity/specificity, but also reversibility, robustness, precision and accuracy in the measurements. These were statistically approved following guidelines from regulatory centers such as ANVISA and INMETRO, and applied to real matrices such as cachaça, sake and cigarette smoke extract, to detect cadmium(II) by the MAC sensor. In addition, quantum mechanical calculations were performed to explore the $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ complex formed in solution. In the second chapter of this work, a study was carried out with fluorene derivatives (DEFM and FDC), in which the DEFM proved to be selective for iron(III) ions, and applied in ethanol fuel. The chemical compositions as well as the stabilities of the complexes formed between the sensors and the analytes were investigated in solution, using the Job's method and Stern-Volmer and Benesi-Hildebrand treatment. Also, in order to expand the study with the MAC ligand against the f block ions, the europium(III) lanthanoid was chosen. These study was carried out with a mixed system containing two different sensors (MAC, which contains acridine; and FDC, which is a fluorene derivative) to detect anions in solution. The compounds of this work were characterized by techniques such as elemental analysis (CHN), vibrational spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (ESI-MS), single crystal X-ray diffractometry, UV-VIS absorption and fluorescence, also including theoretical TD-DFT calculations.

Keywords: acridine, fluorene, fluorescence, chemosensor, supramolecular chemistry, DFT.

Sumário	viii
---------	------

Sumário	
Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice de Esquemas	xiii
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xxi
Glossário	xxvi
Lista de Estruturas	xxvii
CAPÍTULO 1	28
1. Introdução	29
1.1. Espectroscopia de Fluorescência: conceitos e subdivisões	29
1.2. Quimiossensores: aplicando a espectroscopia de fluorescência	32
1.3. Acridina: da descoberta aos quimiossensores	36
1.3.1. Descoberta, etimologia, composição e sistema de numeração	36
1.3.2. Propriedades gerais: físicas e químicas	38
1.3.3. Utilizando acridina como unidade ativa de quimiossensores	39
2. Objetivos gerais	42
2.1. Objetivos Específicos	42
3. Parte Experimental	44
3.1. Reagentes e Solventes	44
3.2. Tratamento de Solventes e Reagentes	45
3.3. Condições de Atmosfera Inerte e calibração de balões volumétricos/pipetas	45
3.4. Análise Instrumental	45
Condições nominais	49
3.5. Sínteses	52
3.5.1. Precursores	52
3.5.1.1. Síntese de 4,5-bisbromometilacridina (BBMA) - ($C_{15}H_{11}Br_2N \cdot 1,5H_2O$)	52
3.5.1.2. Síntese de 4,5-bisaminometilacridina (BAMA)	52
3.5.1.2.1. Etapa 1 – 4,5-bisphthalimidametilacridina (BPMA) - ($C_{31}H_{19}N_3O_4 \cdot 3H_2O$)	52
3.5.1.2.2. Etapa 2 – 4,5-bisaminometilacridina dihidrocloreto (BAMA) - ($C_{15}H_{15}N_3 \cdot 1,5H_2O \cdot 2HCl$)	53

3.5.2. Ligantes	54
3.5.2.1. Síntese de <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i>	54
3.5.2.2. Síntese de <i>MAC</i> : segunda rota sintética	55
3.5.2.2.1. Síntese de <i>dien-Ts</i> (Tosilação de dietilenotriamina)	55
3.5.2.2.2. Síntese de <i>MAC-Ts</i>	56
3.5.2.2.3. Síntese de <i>MAC-4HBr</i> (Destosilação)	57
4. Resultados e Discussão	59
4.1 Fluoróforo: Acridina	59
4.1.1. Análise elementar (<i>CHN</i>) e espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho (<i>FTIR</i>)	59
4.1.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN)	60
4.1.3. Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (<i>UV-VIS</i>) e Espectroscopia de Fluorescência	63
4.2. Precursores e ligantes	69
4.2.1. Síntese e caracterização de 4,5-bisbromometilacridina (<i>BBMA</i>), 4,5-bisphthalimidoacridina (<i>BPMA</i>), 4,5-bisaminometilacridina (<i>BAMA</i>) e ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i>	69
4.2.1.1. Análise elementar (<i>CHN</i>), espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho (<i>FTIR</i>) e espectroscopia de massas (<i>ESI-MS</i>)	70
4.2.1.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN)	75
4.3. Ligantes	85
4.3.1. Espectroscopia de fluorescência e espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (<i>UV-VIS</i>) para os ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i>	85
4.3.2. Teste de seletividade individual dos sensores fluorescentes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i> para detecção de íons inorgânicos	90
4.3.3. Estequiometria, estabilidade e reversibilidade: sensor <i>MAC</i> com íons cádmio(II)	95
4.3.4. Cálculos mecânico-quânticos (<i>TD-DFT</i>): sensor <i>MAC</i> com íons cádmio(II)	98
4.3.5. Obtenção de figuras de mérito para a detecção de <i>MAC</i> e íons cádmio(II)	105
4.3.5.1. Seletividade individual	106

4.3.5.2. Curva de calibração: obtenção da faixa linear, limite de detecção (<i>LOD</i>) e limite de quantificação (<i>LOQ</i>)	106
4.3.5.3. Repetibilidade e precisão intermediária: análise da precisão do sensor <i>MAC</i>	108
4.3.5.4. Robustez: Teste de Youden	111
4.3.5.5. Seletividade frente a interferentes: competição de íons	115
4.3.5.6. Ensaios de recuperação: análise da exatidão do sensor <i>MAC</i>	116
4.3.5.7. Comparação do sensor <i>MAC</i> e demais sensores para cádmio(II)	120
CAPÍTULO 2	123
5. Introdução	124
5.1. Fluoreno: da descoberta ao uso como unidade ativa em quimiossensores	124
5.1.1. Ligante derivado do fluoreno no estudo como quimiossensor	126
5.2. Complexos de Ln(III) como quimiossensores	127
5.2.1. Európio: da descoberta ao efeito antena	128
5.2.2. Tipos de quimiossensores com lantanóides	131
6. Objetivos gerais	135
6.1. SISTEMA 1 – DEFM	135
6.1. Objetivos Específicos	135
6.2. SISTEMA 2 – <i>MAC:FDC:Eu³⁺</i>	136
6.1. Objetivos Específicos	136
7. Parte Experimental	137
7.1. Reagentes e Solventes	137
7.2. Condições de atmosfera inerte, tratamento de solventes e calibração dos balões volumétricos/pipetas	137
7.3. Análise Instrumental	138
Condições nominais	140
7.4. Sínteses	143
7.4.1. Síntese de dietil-2-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno)malonato (<i>FDE</i>) - (<i>C₂₀H₁₆Br₂O₄</i>)	143
7.4.2. Síntese de 2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno (<i>FDC</i>) - (<i>C₁₆H₆Br₂Na₂O₄</i>)	144
7.4.3. Síntese de dietil 2-(9-fluorenil) malonato (<i>DEFM</i>) - (<i>C₂₀H₂₀O₄</i>)	145
8. Resultados e Discussão	147
8.1. SISTEMA 1 - DEFM (<i>C₂₀H₂₀O₄</i>)	147

8.1.1. Análise elementar (<i>CHN</i>), espectroscopia de massas (<i>ESI-MS</i>), ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) e carbono ($^{13}\text{C-RMN}$) e difratometria de raios-X de monocristal (<i>DRX</i>)	147
8.1.2. Espectroscopia de fluorescência e espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (<i>UV-VIS</i>) para o ligante <i>DEFM</i> : aplicação como quimiossensor e cálculos mecânico-quânticos <i>TD-DFT</i>	152
8.1.2.1. Obtenção de figuras de mérito do quimiossensor <i>DEFM</i> na detecção seletiva de íons ferro(III)	160
8.1.2.1.1. Seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, reversibilidade e robustez	160
8.1.2.1.2. Ensaio de recuperação: aplicação do quimiossensor <i>DEFM</i> e comparação com sensores luminescentes similares na literatura	167
8.2. SISTEMA 2 – MAC:FDC:Eu ³⁺	170
8.2.1. Síntese e caracterização de fluoreno diéster (<i>FDE</i>) e fluoreno dicarboxilato (<i>FDC</i>)	170
8.2.1.1. Análise elementar (<i>CHN</i>), espectroscopia de massas (<i>ESI-MS</i>), ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) e carbono ($^{13}\text{C-RMN}$) e difratometria de raios-X de monocristal (<i>DRX</i>)	171
8.2.1.2. Espectroscopia de fluorescência e espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (<i>UV-VIS</i>) para o ligante <i>FDC</i>	177
8.2.2 Luminescência do sistema MAC:FDC:Eu ³⁺	178
8.2.2.1. Complexos [Eu(MAC)(FDC) ₂] ⁻ e [Eu(MAC)(FDC)(X) ₂] ⁿ (X= H ₂ O, EtOH ou NO ₃ ⁻)	178
8.2.2.2. Cálculos mecânico-quânticos: nível tripleto dos ligantes <i>MAC</i> e <i>FDC</i>	183
8.2.2.3. Seletividade com ânions	185
9. Considerações Finais	188
10. Referências	191
ANEXO 1 – PUBLICAÇÕES COM AUTORIA PRINCIPAL E COLABORAÇÕES	213
ANEXO 2 – MECANISMOS DE REAÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS PRECURSORES E LIGANTES	214
ANEXO 3 – PRINCIPAIS RESULTADOS DO SENSOR BPMA	219
ANEXO 4 – ESTUDO DO SENSOR MAC COM ÂNIONS	220
ANEXO 5 – FIGURAS DE MÉRITO PARA MAC E ÍONS CÁDMIO(II)	222

ANEXO 6 – EURÓPIO: DOS LANTANÓIDES À CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE ENERGIA	230
ANEXO 7 – DISTÂNCIAS E ÂNGULOS DE LIGAÇÃO DOS MONOCRISTAIS OBTIDOS DE DEFM E FDE	236
ANEXO 8 – FIGURAS DE MÉRITO PARA DEFM E ÍONS FERRO(III)	242

Índice de Esquemas

Esquema 1. Estados de spin eletrônicos de moléculas fluorescentes e fosforescentes, sendo: S_0 = estado fundamental singleto, S_1 = primeiro estado excitado singleto, T_1 = primeiro estado excitado tripleto.....	30
Esquema 2. Ilustração dos componentes de um sensor químico fluorescente (a) , e as formas de detecção baseada na interação entre unidade de controle-analito. (b) aumento da intensidade fluorescente (efeito CHEF). (c) diminuição (supressão) da intensidade fluorescente (efeito CHEQ).	34
Esquema 3. Síntese de <i>BBMA</i>	52
Esquema 4. Síntese de <i>BPMA</i>	53
Esquema 5. Síntese de <i>BAMA</i>	54
Esquema 6. Rota de síntese dos ligantes: (a) MAC , (b) DAC e (c) TAC	55
Esquema 7. Síntese de <i>dien-Ts</i>	56
Esquema 8. Síntese de <i>MAC-Ts</i>	57
Esquema 9. Síntese de <i>MAC · 4HBr</i>	58
Esquema 10. Esquema simplificado das duas rotas sintéticas para obtenção de <i>MAC</i>	58
Esquema 11. Síntese de FDE.	144
Esquema 12. Síntese de FDC.	145
Esquema 13. Síntese de DEFM.	146
Esquema 14. Modo de coordenação proposto para os complexos formados em solução para o sistema (<i>MAC:FDC:Eu³⁺</i>).	183
Esquema 15. Mecanismo de reação para obtenção de <i>BBMA</i>	215
Esquema 16. Mecanismo de reação para obtenção de <i>BPMA</i>	215
Esquema 17. Mecanismo de reação para obtenção de <i>BAMA</i>	215
Esquema 18. Mecanismo de reação para obtenção de <i>MAC</i>	216
Esquema 19. Mecanismo de reação para obtenção de FDE.	217
Esquema 20. Mecanismo de reação para obtenção de FDC.	218
Esquema 21. Mecanismo de reação para obtenção de DEFM.	218

Índice de Figuras

Figura 1. (a) Diagrama de Jablonski. Sendo: S_0 : estado fundamental singlete; S_1 e S_2 = primeiro e segundo estados excitados singlete, respectivamente; T_1 e T_2 = primeiro e segundo estados excitados tripleto, respectivamente; C.I.= conversão interna; C.IS.= cruzamento intersistemas; R.V.= relaxação vibracional; setas retas contínuas= absorção e emissão de energia radiante (fluorescência ou fosforescência); setas onduladas= processos não-radiativos; linhas horizontais grossas= níveis eletrônicos; linhas horizontais finas= níveis vibracionais (Adaptado) [1]. (b) Ilustração do fenômeno de Deslocamento Stokes de uma molécula hipotética. As bandas azuis representam as bandas de absorção do estado fundamental para o primeiro e segundo estados excitados singletos ($S_0 \rightarrow S_1$; $S_0 \rightarrow S_2$); a banda amarela representa a emissão fluorescente ($S_1 \rightarrow S_0$); a banda vermelha representa a emissão fosforescente ($T_1 \rightarrow S_0$) (Adaptado) [1].	32
Figura 2. Número de publicações envolvendo as palavras-chave “ <i>chemosensor(s)</i> ” e “ <i>fluorescent chemosensor(s)</i> ” no decorrer (a) das décadas compreendidas entre 1960 a 2020, e (b) dos últimos anos (2010-2020) (Fonte: Web of Science).	35
Figura 3. Exemplos de fluoróforos que atuam como unidade ativa de sensores encontrados na literatura, e seus respectivos rendimentos quânticos (ϕ) em água.	36
Figura 4. (a) Sistema de numeração (<i>Graebe</i>) adotado desde 1937 para <i>acridina</i> . (b) Densidade eletrônica para cada posição na molécula da <i>acridina</i> .	38
Figura 5. (a) ligante triaminomonoacridina (MAC); (b) ligante tetraaminodiacridina (DAC); (c) ligante tetraaminotetraacridina (TAC).	43
Figura 6. Espectro <i>FTIR</i> em pastilha de <i>KBr</i> de <i>acridina</i> .	60
Figura 7. Espectro de ^1H -RMN para <i>acridina</i> .	61
Figura 8. Espectro de ^{13}C -RMN da <i>acridina</i> em: a) sem <i>DEPT135</i> ; b) com <i>DEPT135</i> .	62
Figura 9. (a) Espectro de absorção <i>UV-VIS</i> de <i>acridina</i> ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em <i>EtOH</i> (preto), <i>EtOH</i> em meio ácido ($\sim \text{pH } 2$) (azul) e <i>EtOH</i> em meio básico ($\sim \text{pH } 11$) (vermelho). (b) Espectro de absorção <i>UV-VIS</i> da <i>acridina</i> em <i>EtOH</i> . (c) e (d) Espectro de absorção <i>UV-VIS</i> simulado (<i>TD-DFT</i>) da <i>acridina</i> (<i>Ac</i>) e <i>acridínio</i> (<i>AcH</i>), respectivamente.	65
Figura 10. (a) Espectro de emissão fluorescente em diferentes concentrações de <i>acridina</i> (meio básico): $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (vermelho), $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (preto), $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (azul), $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (verde), $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (rosa). (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm). Slit	

3-3 nm. (b) Espectro de emissão fluorescente de <i>acridina</i> (1×10^{-4} mol L ⁻¹) em <i>EtOH</i> (preto), <i>EtOH</i> em meio ácido (azul), <i>EtOH</i> em meio básico (vermelho). (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm (meio básico) e 477 nm (meio ácido)). Slit 3-3 nm. (Inset: fotografias das cubetas no momento da obtenção dos espectros em meio ácido e em meio básico).	67
Figura 11. (a) Ciclo de Förster para o equilíbrio <i>acridina</i> (<i>Ac</i>) e <i>acridínio</i> (<i>AcH</i>), representando o estado fundamental e excitado (asterisco). Sendo: pK_a e pK_a^* = logaritmo negativo da constante de equilíbrio ácida, no estado fundamental e excitado, respectivamente. ΔH e ΔH^* = entalpia de dissociação do ácido, no estado fundamental e excitado, respectivamente. (b) Composição dos orbitais <i>HOMO</i> e <i>LUMO</i> para <i>acridina</i> e <i>acridínio</i> , envolvidos nas transições de emissão fluorescente.	68
Figura 12. (a) Espectro de absorção UV-VIS (azul), excitação fluorescente (linha preta) e emissão fluorescente (linha vermelha) de <i>acridina</i> ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em <i>EtOH</i> em meio básico (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm). Slit 3-3 nm. (b) Comportamento Fluorescente de <i>acridina</i> ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes solventes (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm). Slit 3-3 nm.	69
Figura 13. Espectro de ^{13}C -RMN de <i>BBMA</i> em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.	79
Figura 14. Espectro de ^{13}C -RMN de <i>BPMA</i> em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.	80
Figura 15. Espectro de ^{13}C -RMN de <i>BAMA</i> em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.	81
Figura 16. Espectros de ^{13}C -RMN para o ligante $[\text{MAC}]^+$ em D_2O acidificado com HCl, em (a) com e (b) sem DEPT90.	82
Figura 17. Espectro de ^1H -RMN para <i>BBMA</i> .	83
Figura 18. Espectro de ^1H -RMN para <i>BPMA</i> .	83
Figura 19. Espectro de ^1H -RMN para <i>BAMA</i> .	84
Figura 20. Espectro de ^1H -RMN “pré-saturado” para o ligante $[\text{MAC}]^+$ em D_2O acidificado com HCl.	84
Figura 21. (a) Espectro de absorção UV-VIS dos ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i> em CHCl_3 . Em “inset” os espectros de absorção UV-VIS simulados (TD-DFT) para os ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i> , respectivamente. (b) Relação entre as absorvidades molares (banda em 258 nm) dos ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i> (ilustrado através do número de <i>acridinas</i> por ligante) com os valores da força do oscilador obtido teoricamente (TD-	

<i>DFT</i>). (c) Espectro de absorção <i>UV-VIS</i> (banda em 258 nm) em diferentes concentrações dos ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i>	86
Figura 22. Estruturas otimizadas em (a' – c') dos ligantes (a) <i>MAC</i> , (b) <i>DAC</i> , (c) <i>TAC</i> , respectivamente.	88
Figura 23. (a) Espectro de emissão fluorescente (linha pontilhada) (λ_{em} = 416 nm), excitação fluorescente (linha preta contínua) (λ_{ex} = 400 nm), e absorbância (linha azul contínua) do ligante <i>MAC</i> a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Comparação dos perfis espectrais de emissão fluorescente dos ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i> a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. λ_{em} : 416 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 3 e 5 nm. Solvente: clorofórmio. (Medidas em triplicatas).	90
Figura 24. Investigação da seletividade dos ligantes frente a diversos cátions: (a) <i>MAC</i> , (a') fotografia das soluções de <i>MAC</i> com os diversos íons testados, sendo ao centro com íons cádmio(II) sob luz UV (λ =365 nm). (b) <i>DAC</i> , (c) <i>TAC</i> . λ_{em} : 450 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 1,5 nm para ambas as fendas. $\text{CHCl}_3\text{:EtOH}$ (1:99 v/v). Ligantes e metais: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Medidas em triplicatas. (d) Competição de cátions dos ligantes <i>MAC</i> e <i>DAC</i> na presença e ausência de cádmio(II). λ_{em} : 450 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 1,5 nm para ambas as fendas. $\text{CHCl}_3\text{:EtOH}$ (1:99 v/v). Ligantes e metais: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Medidas em quintuplicatas.	92
Figura 25. Polarizabilidade atômica e molecular ($\text{\AA}^3$) dos ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i>	95
Figura 26. (a) Gráfico de Job para o sistema de detecção de <i>MAC</i> e íons cádmio(II). Com monitoramento da banda de emissão em 450 nm. (b) Gráfico de Benesi-Hildebrand para a obtenção da constante de formação do complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$. (c) Teste de reversibilidade com ligante EDTA. Monitoramento da banda de emissão em 450 nm. Concentrações equimolares do sensor e EDTA de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e de íons cádmio(II) de 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	98
Figura 27. (a) Espectro de absorção normalizado para o sensor <i>MAC</i> , e os íons cádmio(II) e mercúrio(II). Geometrias otimizadas (TD-DFT) para: (b) sensor <i>MAC</i> , (c) $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e (d) $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$	103
Figura 28. Orbitais de fronteira do sensor <i>MAC</i> , e seus complexos $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$	104
Figura 29. (a) Ilustração do diagrama de energia dos orbitais de fronteira associados a emissão fluorescente do ligante <i>MAC</i> , e seu complexo com cádmio(II). (b) Fotografia das soluções do ligante <i>MAC</i> e complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}(\text{CHCl}_3\text{:EtOH}$ (1:99 v/v), 100	

$\mu\text{mol L}^{-1}$) sob excitação de lâmpada UV em 365 nm. (c) Complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$...	105
Figura 30. (a) Ilustração de uma curva de calibração (faixa de trabalho), com destaque para a faixa linear e os pontos de determinação de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). (b) Curva de calibração do sensor MAC com diferentes concentrações de íons cádmio(II), e em “inset” a faixa linear.	108
Figura 31. (a) Ilustração dos níveis 1, 2 e 3 de concentração do analito com base em uma faixa linear hipotética, utilizados para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. (b) Medidas de repetibilidade e precisão intermediária em 3 níveis de concentração de íons cádmio(II), com barra de desvio padrão obtida por decaplicatas. Sendo o analista 1 (rosa) responsável pela curva de calibração e repetibilidade, e o analista 2 (azul) responsável pelo ensaio de precisão intermediária. Níveis de concentração: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.	109
Figura 32. Gráfico de Pareto, ilustrando os efeitos das variações de 7 condições experimentais no método analítico. A concentração de MAC e íons cádmio(II) são 100 e $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.	114
Figura 33. Esquema da montagem de extração alcoólica da fumaça de três unidades de cigarro.	120
Figura 34. Sistema de numeração (<i>Patterson</i>) adotado desde 1925 para <i>fluoreno</i> , e principal estrutura de ressonância para a molécula de <i>fluoreno</i>	124
Figura 35. (a) Ligante DEFM. (b) Rota de síntese para obtenção de: 1. DEFM, 2. Ligante dioxotetraamina a partir de DEFM, 3. Complexo de cobre derivado de DEFM (Adaptado de [184]).....	127
Figura 36. Diagrama de energia hipotético ilustrando os processos de: 1= absorção; 2= relaxações não-radiativas (conversão interna/externa e relaxação vibracional); 3= fluorescência; 4= cruzamento interssistema; 5= fosforescência; 6= transferência de energia; 7= fluorescência atrasada (retardada).....	130
Figura 37. (a) ligante FDC. (b) Exemplos de ligantes-antena para o íon európio(III) [192].	131
Figura 38. Esquema simplificado dos tipos de quimiossensores com complexos de Ln(III)	133
Figura 39. (a) complexo de európio(III) quimiossensor para ânions quelantes. (b) complexo de európio(III) quimiossensor para cátions.	134
Figura 40. Ligante dietil 2-(9-fluorenil) malonato (DEFM).	135
Figura 41. Ligante fluoreno-dicarboxilato (FDC).	136

Figura 42. (a) Espectro de massas (ESI-MS) no modo positivo, experimental e simulado, e (b) atribuição do pico molecular para o ligante DEFM.	148
Figura 43. Espectro de ^1H -RMN de DEFM.	148
Figura 44. Espectro de ^{13}C -RMN de DEFM em: (a) sem DEPT135; (b) com DEPT135.	149
Figura 45. Representação ORTEP dos monocristais de DEFM em (a) polimorfo 1 e (b) polimorfo 2, com suas respectivas celas unitárias. Elipsóides termais com 50% de probabilidade.	152
Figura 46. Arranjo eletrônico d^5 para o íon ferro(III) em campo fraco (multiplicidade sexteto) e campo forte (multiplicidade dubleto).	155
Figura 47. (a) Espectro de absorção UV-VIS, excitação e emissão fluorescente. 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; slits 3 nm. (b) Teste de seletividade de DEFM e diferentes cátions. [DEFM]=[cátions]=100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; slits 3 e 5 nm. (c) Competição de cátions de DEFM na presença e ausência de ferro(III). (d) Gráfico de Job. [DEFM]=[ferro(III)]=10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (e) Gráfico de Benesi-Hildebrand. (f) Gráfico de linearização de Stern-Volmer. λ_{ex} =296 nm; λ_{em} =316 nm, meio: EtOH.	157
Figura 48. (a) Espectros de absorção experimentais para o ligante livre e seu complexo de ferro(III) em etanol. Perfil de absorção simulados para (b) ligante DEFM livre; (c) complexo no estado de spin sexteto.	158
Figura 49. Estruturas otimizadas para (a) DEFM livre e (b) complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$	158
Figura 50. (a) Orbitais de fronteira do sensor DEFM, e seu complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$. (b) Ilustração do diagrama de energia dos orbitais de fronteira associados a emissão fluorescente do ligante DEFM, e seu complexo com ferro(III).	159
Figura 51. (a) Curva de calibração de DEFM em diferentes concentrações de ferro(III). λ_{em} =316 nm, EtOH; [DEFM]=100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; slits 3 e 5 nm. (b) Repetibilidade e precisão intermediária. λ_{em} =316 nm, EtOH; [DEFM]=100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [ferro(III)]=LOQ; slits 1,5 nm. (c) Gráfico de Pareto. λ_{em} =316 nm, EtOH; [DEFM]=100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [ferro(III)]=1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; slits 3 e 5 nm. (d) Teste de reversibilidade com EDTA. λ_{em} =316 nm, EtOH; [DEFM]=[EDTA]=100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [ferro(III)]=1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; slits 3 e 3 nm.	166
Figura 52. Espectros de (a) ^1H -RMN e (b) ^{13}C -RMN para FDE em CDCl_3	175
Figura 53. Espectros de (a) ^1H -RMN e (b) ^{13}C -RMN para FDC em D_2O	176
Figura 54. (a) Espectros de excitação, emissão fluorescente e UV-VIS (em inset com	

concentrações que variam de $4,24$ a $2,86 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) para o ligante FDC ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em EtOH. (b) Intensidades médias de fluorescência (triplicatas) para o ligante FDC em diferentes concentrações, 10^{-3} a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em EtOH (slits 3 e 5 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 268 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$).....	177
Figura 55. (a) Espectros de emissão em diferentes proporções MAC:FDC:Eu ³⁺ . (b) Espectros de emissão da mistura MAC:FDC (1:2) e para o complexo [Eu(MAC)(FDC) ₂] ⁻ formado em solução. (c) Espectros normalizados de emissão dos ligantes livres MAC e FDC, e para o complexo [Eu(MAC)(FDC) ₂] ⁻ formado em solução. ($\lambda_{\text{ex}} = 268 \text{ nm}$, slits 3 e 5 nm, CHCl ₃ :EtOH (1:99 v/v)). [ligantes]=[Eu ³⁺]=100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (c') fotografia das soluções dos ligantes livres MAC e FDC, das misturas MAC:Eu ³⁺ (2:1), FDC:Eu ³⁺ (4:1), e do complexo [Eu(MAC)(FDC) ₂] ⁻ sob luz UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$)... 182	182
Figura 56. (a) Espectros de emissão dos ligantes livres MAC e FDC com íon európio(III) ([MAC]=[FDC]=[Eu ³⁺]= 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; CHCl ₃ :EtOH (1:99 v/v), slits 3 e 5 nm). (b) Diagrama de energia com os níveis tripletos estimados para os ligantes MAC e FDC.....	185
Figura 57. Teste de seletividade do complexo (a) [Eu(MAC)(FDC)(X)₂]ⁿ e (b) [Eu(MAC)(FDC)₂]⁻ frente à diversos ânions, por ordem: acetato, benzoato, brometo, cianato, cloreto, hidrogenofosfato, iodeto, oxalato, perclorato, salicilato, sulfato e tiocianato. (condições: $\lambda_{\text{ex}} = 268 \text{ nm}$, slits 3 e 5 nm, CHCl₃:EtOH (1:99 v/v), [ânions]= 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	187
Figura 58. (a) Espectro de emissão fluorescente do ligante MAC em diferentes valores de pH com seus comprimentos de onda máximo em cada condição. (b) Investigação da seletividade do ligante MAC em meio aquoso e pH = 1,5, frente a diversos ânions. λ_{em} : 483 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 1,5 nm para ambas as fendas. Ligante e ânions: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Medidas em triplicatas.....	221
Figura 59. Gráfico de dispersão residual dos pontos da faixa linear do quimiossensor MAC e íons cádmio(II).....	226
Figura 60. Espectro de emissão de [Eu(tta)₃(phen)] a 77K, que mostra os sub-níveis das transições ⁷F₀ a ⁷F₂ (Retirado de [201]).....	233
Figura 61. Diagrama de energia do íon európio(III), (a) do termo fundamental ⁷F₀₋₆ ao excitado ⁵D₃. (b) Transições a partir do estado excitado ⁵D₀ para os 7 níveis do termo fundamental.....	235
Figura 62. Gráfico de dispersão residual dos pontos da faixa linear do quimiossensor	

<i>DEFM</i> e íons ferro(III).....	246
------------------------------------	-----

Índice de Tabelas

Tabela 1. Valores de rendimento quântico (ϕ) da <i>acridina</i> encontrados na literatura para misturas (v/v) de solventes, à 18 °C em pH básico. (Retirado de [73]).	39
Tabela 2. Ligantes derivados da acridina seletivos a íons metálicos e ânions.	41
Tabela 3. Parâmetros e suas condições nominais de análise para o sistema <i>MAC</i> e cádmio(II).	50
Tabela 4. Atribuição tentativa das principais bandas do espectro FTIR do composto <i>acridina</i> .	59
Tabela 5. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN da <i>acridina</i> . (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT135 da <i>acridina</i> .	61
Tabela 6. Transições eletrônicas obtidas por TD-DFT para <i>Acridina/Acridínio</i> (<i>Ac/AcH</i>). Sendo: f = força do oscilador.	63
Tabela 7. Orbitais de fronteira participantes das transições observadas nos espectros de absorção UV-VIS e estruturas otimizadas de <i>acridina</i> (<i>Ac</i>) e <i>acridínio</i> (<i>AcH</i>), obtidos por TD-DFT. As cores indicam as fases de função de onda calculada.	64
Tabela 8. Energias (eV) dos orbitais HOMO e LUMO para <i>acridina</i> (<i>Ac</i>) e íon <i>acridínio</i> (<i>AcH</i>) obtidos teoricamente (TD-DFT), e sua relação com o comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) obtido experimentalmente para ambas as espécies.	67
Tabela 9. Atribuição tentativa das principais bandas do espectro FTIR dos ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> , <i>TAC</i> , e precursores <i>BBMA</i> , <i>BPMA</i> e <i>BAMA</i> .	71
Tabela 10. Espectros de massas (modo positivo) para os precursores <i>BBMA</i> (a), <i>BPMA</i> (b), <i>BAMA</i> (c), e ligantes <i>MAC</i> (d), <i>DAC</i> (e), <i>TAC</i> (f); com as atribuições dos sinais obtidos referentes a relação massa/carga, e as comparações do perfil dos padrões isotópicos experimentais e calculados.	71
Tabela 11. Análise elementar (CHN) de <i>MAC</i> , <i>DAC</i> , <i>TAC</i> , <i>BBMA</i> , <i>BPMA</i> e <i>BAMA</i> , atribuída com base em suas fórmulas moleculares ilustradas.	75
Tabela 12. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de <i>BBMA</i> . (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT135 de <i>BBMA</i> .	76
Tabela 13. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de <i>BPMA</i> . (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT135 de <i>BPMA</i> .	77
Tabela 14. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -	

<i>RMN</i> de <i>BAMA</i> . (b) Deslocamento químico de ^{13}C - <i>RMN</i> com e sem <i>DEPT135</i> de <i>BAMA</i>	77
Tabela 15. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H - <i>RMN</i> do ligante $[\text{MAC}]^+$. Entre parênteses o valor esperado aproximado. (b) Deslocamento químico de ^{13}C - <i>RMN</i> com e sem <i>DEPT90</i> de $[\text{MAC}]^+$. Entre parênteses o valor esperado aproximado.	78
Tabela 16. Transições eletrônicas obtidas por <i>TD-DFT</i> para os ligantes <i>MAC</i> , <i>DAC</i> e <i>TAC</i> . Sendo: f = força do oscilador.....	86
Tabela 17. Orbitais de fronteira participantes das transições observadas nos espectros de absorção <i>UV-VIS</i> dos ligantes.	87
Tabela 18. Dados de rendimento quântico dos ligantes, padrão quântico e acridina.	90
Tabela 19. Quimiossensores derivados da acridina do tipo <i>CHEF</i> seletivos para cádmio(II) encontrados na literatura.	93
Tabela 20. Distâncias de ligação (Å), metal-nitrogênio, nos complexos $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$ obtidos por cálculos mecânico-quânticos (<i>DFT</i>).	100
Tabela 21. Atribuição das transições de absorção do ligante <i>MAC</i> e seus respectivos complexos de cádmio(II) e mercúrio (II).	102
Tabela 22. Transições eletrônicas (<i>TD-DFT</i>) para sensor <i>MAC</i> , e seus complexos $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$	103
Tabela 23. Teste de Dixon (teste <i>Q</i>) para analisar valores anômalos das medidas no teste de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II). Níveis de concentração: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.	110
Tabela 24. Dados estatísticos para análise de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II). Níveis de concentração: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.	111
Tabela 25. Parâmetros e suas condições nominais/variadas no teste de Youden para o quimiossensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II). Sendo: <i>TA</i> = temperatura ambiente.	112
Tabela 26. Combinações fatoriais usadas no teste de Youden para o quimiossensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II). Para cada combinação, A-H, o quadro em amarelo em destaque representa a condição nominal (CN) usada e o quadro em branco representa a condição variada (CV).	112
Tabela 27. Valores de $F_{\text{calculado}}$ para cada condição analisada e seus respectivos	

resultados de robustez para o quimiossensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II).	113
Tabela 28. Dados estatísticos do ensaio de “ <i>competição de íons</i> ” para o sistema de detecção do ligante <i>MAC</i> e íons cádmio(II).	116
Tabela 29. Combinações para o teste de Fisher (teste <i>F</i>) usados no ensaio de “ <i>competição de íons</i> ” do sistema de detecção do ligante <i>MAC</i> e íons cádmio(II). ...	116
Tabela 30. Valores de recuperação (%) do sensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II) em diferentes matrizes.	119
Tabela 31. Resultados gerais do sensor <i>MAC</i>	121
Tabela 32. Dados analíticos de alguns sensores fluorescentes de efeito CHEF para íons cádmio(II) publicados recentemente. Sendo: L= sensor/ligante.	122
Tabela 33. Ligantes derivados de fluoreno seletivos a íons metálicos e ânions.	126
Tabela 34. Energia dos níveis tripleto dos ligantes-antena para o íon európio(III) [202] [203] [204].	131
Tabela 35. Parâmetros e suas condições nominais de análise para o sistema <i>DEFM</i> e ferro(III).	141
Tabela 36. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ¹ H-RMN de <i>DEFM</i> . (b) Deslocamento químico de ¹³ C-RMN com e sem <i>DEPT135</i> de <i>DEFM</i>	150
Tabela 37. Principais dados cristalográficos dos monocristais de <i>DEFM</i>	151
Tabela 38. Principais transições eletrônicas obtidas por TD-DFT para o ligante livre <i>DEFM</i> e seu complexo [FeCl ₂ (<i>DEFM</i>) ₂] ⁺	160
Tabela 39. Dados estatísticos do ensaio de “ <i>competição de íons</i> ” para o sistema de detecção do ligante <i>DEFM</i> e íons ferro(III).	161
Tabela 40. Combinações para o teste de Fisher (teste <i>F</i>) usados no ensaio de “ <i>competição de íons</i> ” do sistema de detecção do ligante <i>DEFM</i> e íons ferro(III). ...	162
Tabela 41. Teste de Dixon (teste <i>Q</i>) para analisar valores anômalos das medidas no teste de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III).	164
Tabela 42. Dados estatísticos para análise de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III).	165
Tabela 43. Valores de <i>F</i> _{calculado} para cada condição analisada e seus respectivos resultados de robustez para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III).	165
Tabela 44. Parâmetros e suas condições nominais/variadas no teste de Youden para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III). Sendo: TA= temperatura ambiente.	165

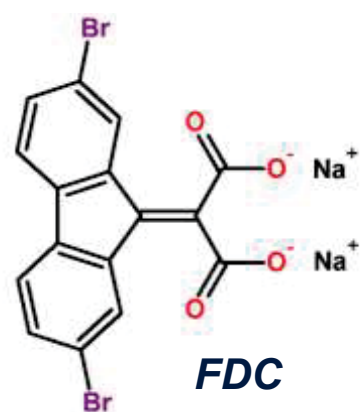
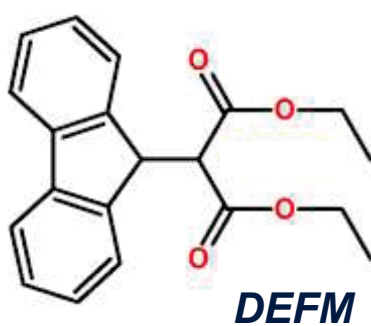
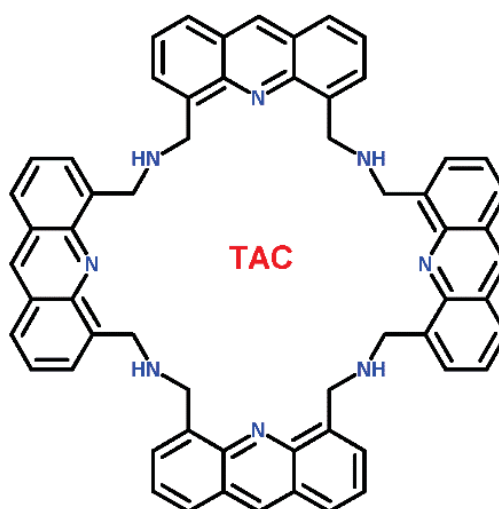
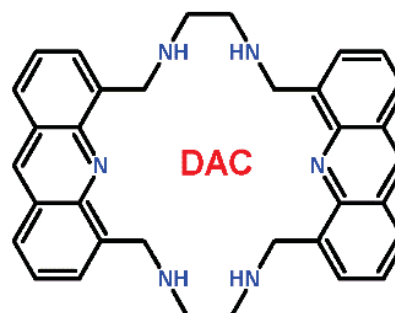
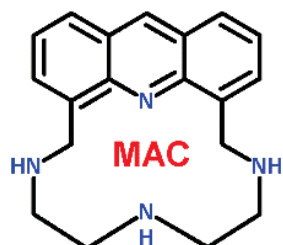
Tabela 45. Combinações fatoriais usadas no teste de Youden para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III). Para cada combinação, A-H, o quadro em amarelo em destaque representa a condição nominal (CN) usada e o quadro em branco representa a condição variada (CV).....	167
Tabela 46. Valores de recuperação (%) para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III) em etanol combustível.	169
Tabela 47. Resultados gerais do sensor <i>DEFM</i>	169
Tabela 48. Dados analíticos de sensores fluorescentes seletivos para íons ferro(III). Sendo: FM= figuras de mérito.	170
Tabela 49. Análise elementar (<i>CHN</i>) de <i>FDE</i> e <i>FDC</i> . Entre parênteses dos valores calculados.	171
Tabela 50. Espectros de massas (modo positivo) para os compostos (a) <i>FDE</i> e (b) <i>FDC</i> com as atribuições dos sinais obtidos referentes a relação massa/carga, e as comparações do perfil dos padrões isotópicos experimentais e calculados.	172
Tabela 51. Principais dados cristalográficos do monocristal de <i>FDE</i> . Representação <i>ORTEP</i> e elipsóides termais com 50% de probabilidade.	173
Tabela 52. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de <i>FDE</i> . (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN de <i>FDE</i>	174
Tabela 53. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de <i>FDC</i> . (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN de <i>FDC</i>	174
Tabela 54. Energia do nível tripleto estimado para os ligantes MAC e <i>FDC</i>	185
Tabela 55. Valores das intensidades fluorescentes médias das triplicatas (IFM), desvio padrão amostral (s) e desvio padrão relativo (RSD%) para o teste de seletividade individual do ligante MAC com íons metálicos.	222
Tabela 56. Teste de Grubbs aplicado a faixa linear para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).	223
Tabela 57. Dados de média e desvio padrão (s) das intensidades de emissão em triplicata da faixa linear, e resultado do teste de Fisher para análise das variâncias de cada conjunto de replicatas ($F_{\text{tabelado}}=7,15$) do quimiossensor MAC e íons cádmio(II).	224
Tabela 58. Médias teóricas obtidas pelo modelo de regressão da faixa linear para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).....	225
Tabela 59. Valores residuais das replicatas de cada concentração da faixa linear, e teste de Grubbs dos resíduos para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).....	226

Tabela 60. Teste de Cochran para avaliação residual dos pontos da faixa linear para o quimiossensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II).....	227
Tabela 61. Teste de Durbin-Watson para avaliação residual dos pontos da faixa linear do quimiossensor <i>MAC</i> e íons cádmio(II).....	229
Tabela 62. (a) Transições do estado excitado $^5D_0$ para os níveis de 0-6 do termo fundamental ^7F e suas regiões de emissão no espectro [201]. (b) Energia de cada termo espectroscópico no diagrama de energia para o íon európio(III) [201].	234
Tabela 63. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o polimorfo I de DEFM. ...	236
Tabela 64. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o polimorfo II de DEFM. ..	238
Tabela 65. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do monocristal de FDE.....	239
Tabela 66. Valores das intensidades fluorescentes médias das triplicatas (IFM), desvio padrão amostral (s) e desvio padrão relativo (RSD%) para o teste de seletividade individual do ligante <i>DEFM</i> com íons metálicos.	242
Tabela 67. Teste de Grubbs aplicado a faixa linear para o quimiossensor DEFM e íons ferro(III).....	243
Tabela 68. Dados de média e desvio padrão (s) das intensidades de emissão em triplicata da faixa linear, e resultado do teste de Fisher para análise das variâncias de cada conjunto de replicatas ($F_{\text{tabelado}}=4,026$) do quimiossensor DEFM e íons ferro(III).	244
Tabela 69. Médias teóricas obtidas pelo modelo de regressão da faixa linear para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III).....	246
Tabela 70. Valores residuais das replicatas de cada concentração da faixa linear, e teste de Grubbs dos resíduos para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III).....	247
Tabela 71. Teste de Cochran para avaliação residual dos pontos da faixa linear para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III).....	248
Tabela 72. Teste de Durbin-Watson para avaliação residual dos pontos da faixa linear para o quimiossensor <i>DEFM</i> e íons ferro(III).....	249

Glossário

¹³C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
¹H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
BAMA	4,5-bisaminometilacridina
BBMA	4,5-bisbromometilacridina
BMME	Bromometilmetiléter
BPMA	4,5-bisftalimidometilacridina
DAC	Ligante macrocíclico di-acridina
DEFM	Dietil 2-(9-fluorenil) malonato
DEPT135	Do inglês “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer on 135°”
Deta	dietilenotriamina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difratometria de raios X
en	Etilenodiamina
Et₂O	Dietil éter
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Álcool etílico
FDC	2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno, nomeado como fluoreno-dicarboxilato
FDE	dietil-2-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno)malonato, nomeado como fluoreno-diéster
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier, do inglês “Fourier Transform Infrared”
HMP	N-hidroximetilftalimida
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAC	Ligante macrocíclico mono-acridina
MeOH	Álcool metílico
RSD	Desvio padrão relativo
TAC	Ligante macrocíclico tetra-acridina
TMS	Tetrametilsilano
UV-VIS	Ultravioleta Visível

Lista de Estruturas



CAPÍTULO 1

**Ligantes macrocíclicos luminescentes
derivados de acridina: aplicação como
quimiossensores na detecção seletiva de íons**

1. Introdução

1.1. Espectroscopia de Fluorescência: conceitos e subdivisões

Segundo Valeur [1], *“luminescência é a emissão de fótons na região ultravioleta, visível ou infravermelho de espécies excitadas eletronicamente”*. Sendo o prefixo *“lumen”* originário do latim, que significa *“luz”*. O físico Eilhardt Wiedemann (1888) foi quem primeiro usou o termo *“luminescentz”* para descrever um processo diferente da incandescência, se referindo a um *“fenômeno de luz que não está condicionado ao aumento da temperatura para ocorrer”*. Existem diversos tipos de luminescência, que se diferem pelo modo como se dá a excitação das espécies, como termoluminescência (variação na temperatura), eletroluminescência (campo elétrico), sonoluminescência (ultrassom), entre outros, como a fotoluminescência (excitação a partir de radiação eletromagnética), fenômeno que será majoritariamente abordado nesse trabalho. Desta forma, a espectroscopia pode ser usada para quantificar a energia usada na absorção, bem como na emissão de interesse, [2].

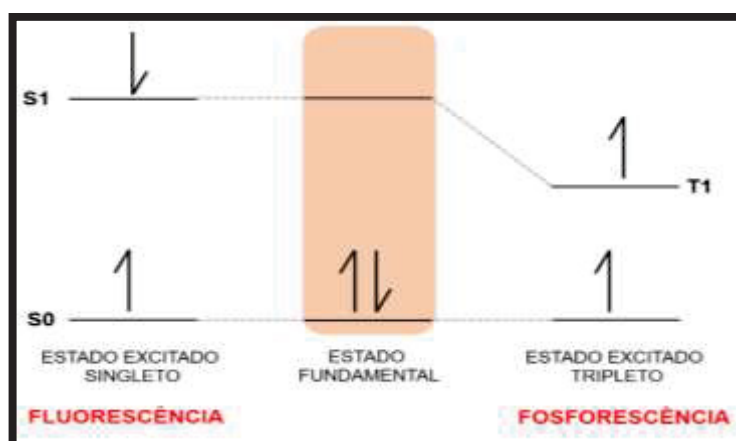
A fotoluminescência subdivide-se em outros 2 fenômenos: **fluorescência e fosforescência** [1]. O termo em inglês *“phosphorescence”* tem origem grega, no qual o prefixo *“phosphor”* significa *“aquele que carrega luz”*, e é usado desde a Idade Média para se referir aos materiais que *“brilhavam”* no escuro depois de serem expostos à luz [1]. O termo *“fluorescence”* foi introduzido pelo físico George Gabriel Stokes, que usou o prefixo *“fluor”* se referindo ao fenômeno observado no minério fluorita (fluoreto de cálcio), que emite luz quando excitado, e de maneira análoga ao termo *“opalescência”*, que é derivado do nome de um mineral [1].

O parâmetro de medida da eficiência quântica dos fenômenos fotoluminescentes, é conhecido como *“rendimento quântico”*, representado pelo símbolo Φ (letra *“phi”* em grego), e calculado pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos no processo radiativo [3-6]; desta forma, um composto altamente fluorescente terá um rendimento quântico próximo à unidade ($\Phi \rightarrow 1$).

A característica que distingue de modo mais correto os fenômenos de fluorescência e fosforescência, segundo Lakowicz [7], diz respeito à diferença da multiplicidade de spin ($2S+1$) dos estados de energia envolvidos na transição eletrônica, quando a molécula é excitada por meio de radiação. Na fluorescência, os estados fundamental e excitado possuem a mesma multiplicidade de spin (**Esquema 1**). Desta forma, o retorno ao estado fundamental é permitido por spin, obedecendo

as “*regras de seleção*” e ocorre muito rapidamente, na ordem de 10^{-7} a 10^{-9} s. De modo contrário, a emissão fosforescente ocorre quando um elétron no estado excitado de energia possui a mesma orientação de spin em relação ao elétron isolado, na configuração do estado fundamental [2] (**Esquema 1**). Desta forma, o retorno ao estado fundamental não é permitido por spin [8-11], conforme as regras de seleção, e quando ocorre, a emissão de luz é mais demorada em comparação à fluorescência, na ordem de 10^{-3} a 1 s, podendo apresentar tempos ainda maiores.

De acordo com a Regra de Hund [12], o estado de menor energia possui a maior multiplicidade de spin ($2S + 1$), por isso o estado tripleto é menos energético quando comparado ao estado excitado singleto de energia, como mostra o **Esquema 1**, e é por isso, que as emissões fosforescentes sempre irão apresentar comprimentos de onda maiores (menos energéticas) em relação aos comprimentos de emissão fluorescente, independente da transição de absorção envolvida.



Esquema 1. Estados de spin eletrônicos de moléculas fluorescentes e fosforescentes, sendo: S_0 = estado fundamental singleto, S_1 = primeiro estado excitado singleto, T_1 = primeiro estado excitado tripleto.

Como a maioria das transições de absorção de energia envolvem estados mais energéticos que o primeiro estado excitado, que é o estado de maior relevância para os fenômenos fotoluminescentes, para que haja emissão radiante há inicialmente dissipação da energia excedente por outros mecanismos até o primeiro estado excitado; a esses mecanismos dá-se o nome de **processos fotofísicos não-radiativos** [1,2,7,13], pois não envolvem emissão de luz, e podem ser do tipo: *relaxação vibracional, conversão interna e cruzamento intersistemas*. Normalmente,

ocorrem mais rapidamente (escala de tempo de picosegundos) quando comparados a processos fotoluminescentes; portanto, para que a emissão radiante ocorra é necessária uma “competição” com os diversos mecanismos de perda de energia existentes, e o processo que ocorrer em menor tempo será favorecido. Esse fato justifica o fenômeno de fosforescência ser mais raro de se observar, principalmente em solução, pois normalmente, possui tempo de vida longo no estado excitado. Esse processo de perda de energia para o meio, sem emissão radiante, é mais comumente observado em **espécies moleculares**, que possuem além dos níveis eletrônicos, os níveis vibracionais e rotacionais da molécula; e são ilustrados através do **Diagrama de Jablonski**, também chamado de “*Diagrama de Perrin-Jablonski*” [7]. O diagrama ilustra de maneira simples (**Figura 1(a)**), os caminhos possíveis para: *absorção de fótons*, *relaxação vibracional (RV)*, *conversão interna (CI)*, *cruzamento intersistemas (CIS)*, *fluorescência* e *fosforescência*. Uma propriedade muito importante dos fenômenos fotoluminescentes é o fato de que o espectro de emissão será o mesmo, independente do comprimento de onda de excitação; pois como a emissão radiante depende apenas dos dois estados de menor energia; qualquer energia absorvida superior a essa diferença, será rapidamente dissipada por processos não-radiativos [1]. Dessa forma, a emissão fotoluminescente, seja ela fluorescência ou fosforescência, sempre terá valores de comprimentos de onda maiores, ou seja, de menor energia, em relação ao comprimento de onda de excitação; esse fenômeno chama-se **Deslocamento Stokes** [1,2,7,13,14], que é ilustrado na **Figura 1(b)**; e corresponde à diferença de energia entre o máximo da banda de absorção e o máximo da banda de emissão. No caso da fosforescência, em geral, o Deslocamento Stokes é ainda mais acentuado e depende do grau de distorção do estado excitado em relação ao estado fundamental.

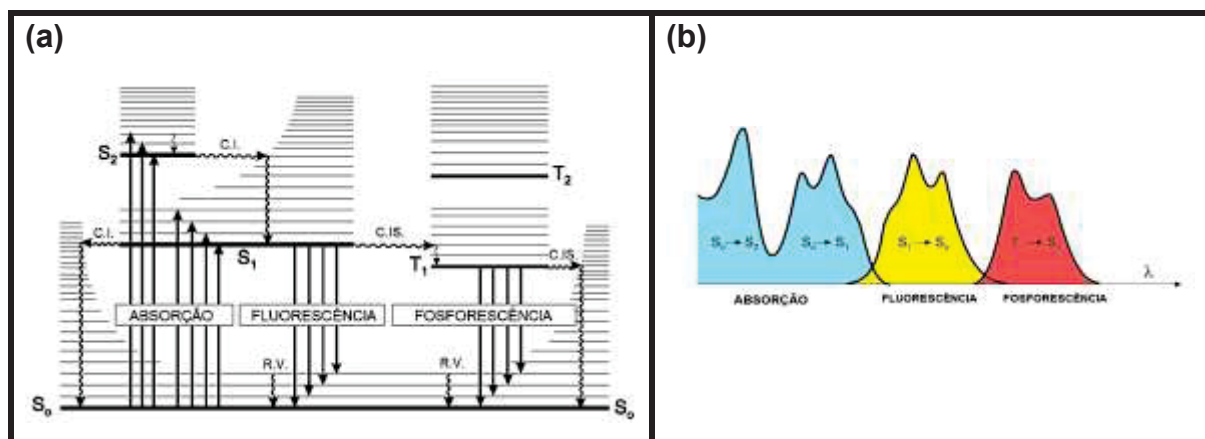


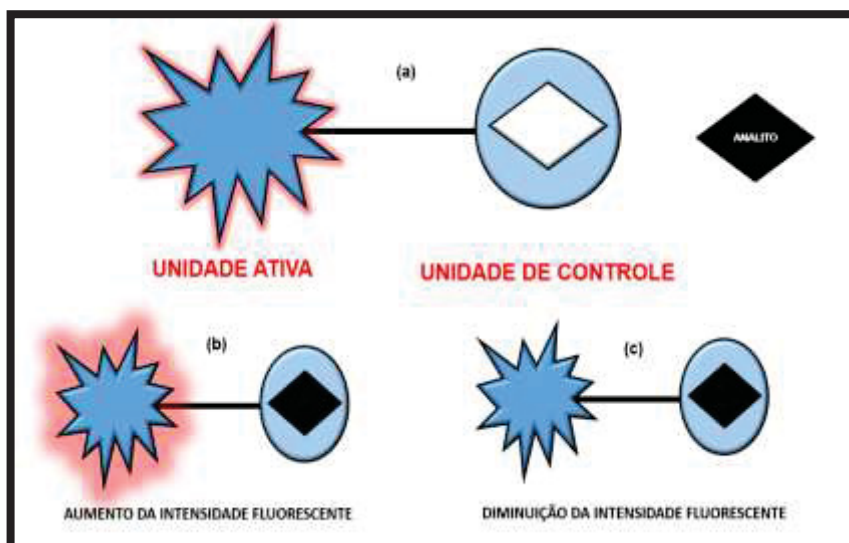
Figura 1. (a) Diagrama de Jablonski. Sendo: S_0 : estado fundamental singlete; S_1 e S_2 = primeiro e segundo estados excitados singlete, respectivamente; T_1 e T_2 = primeiro e segundo estados excitados tripleto, respectivamente; C.I.= conversão interna; C.I.S.= cruzamento intersistemas; R.V.= relaxação vibracional; setas retas contínuas= absorção e emissão de energia radiante (fluorescência ou fosforescência); setas onduladas= processos não-radiativos; linhas horizontais grossas= níveis eletrônicos; linhas horizontais finas= níveis vibracionais (Adaptado) [1]. **(b)** Ilustração do fenômeno de Deslocamento Stokes de uma molécula hipotética. As **bandas azuis** representam as bandas de absorção do estado fundamental para o primeiro e segundo estados excitados singletos ($S_0 \rightarrow S_1$; $S_0 \rightarrow S_2$); a **banda amarela** representa a emissão fluorescente ($S_1 \rightarrow S_0$); a **banda vermelha** representa a emissão fosforescente ($T_1 \rightarrow S_0$) (Adaptado) [1].

1.2. Quimiossensores: aplicando a espectroscopia de fluorescência

Quimiossensores, ou sensores químicos, são definidos como “*moléculas ou íons moleculares capazes de se ligar seletivamente a uma espécie de interesse com uma mudança concomitante em uma ou mais propriedades do sistema*” [1]. No caso deste trabalho, os quimiossensores serão estudados pelas alterações no comportamento fluorescente do mesmo, ou seja, através da fluorimetria. Na química moderna há uma tendência generalizada em usar palavras tiradas do cotidiano para nomear moléculas inspiradas em sua forma, ou para explicar as propriedades e funções que desempenham. Uma dessas palavras é “SWITCH” (do inglês “interruptor” ou chave), no qual muitos artigos usam a expressão “*switched on-off*” para explicar os efeitos de aumento ou diminuição das propriedades fluorescentes de um quimiossensor [15]. Segundo Fabbrizzi e colaboradores [16], sensores fluorescentes são constituídos por dois componentes principais: **unidade fluorescente ativa (unidade transdutora) e unidade de controle (unidade receptora)**, que podem ou não estar separadas por um terceiro componente, chamado **espaçador**. A unidade ativa do sensor contém o grupo fluoróforo, que são grupos funcionais e/ou unidades

que conferem fluorescência à molécula a qual estão incorporados quando submetidas à radiação eletromagnética [17], portanto, devem possuir propriedade fluorescente detectável. A unidade de controle interage com analitos, por exemplo, cátions, ânions ou moléculas neutras [1] (**Esquema 2**), promovendo uma alteração na banda de emissão fluorescente do sensor que pode ser a intensificação (tipo *CHEF*, do inglês “*chelation-enhanced fluorescence*”), ou diminuição (supressão) (tipo *CHEQ*, do inglês “*chelation enhancement quenching*”), e desta forma, usado para a detecção seletiva de algumas espécies químicas [1,3-14,18-20].

Além dos efeitos *CHEQ* e *CHEF*, que são a resposta espectral da interação sensor-analito, para os quimiossensores é importante entender as diferentes explicações dos comportamentos observáveis destes, ou seja, quais os mecanismos que dão suporte à detecção. Desta forma, existem dois mecanismos que ajudam na compreensão destes processos fotofísicos baseados na transferência de elétrons (abreviado como eT, do inglês, “*electron transfer*”) e transferência de energia (abreviado como ET, do inglês, “*energy transfer*”), conhecidos como: *mecanismo de Dexter* e *mecanismo coulômbico ou ressonante de Förster* [1,7]. O mecanismo de Dexter, também conhecido como “*mecanismo de troca*” envolve o acoplamento eletrônico entre doador e receptor, e normalmente está associado à diminuição (supressão) da intensidade fluorescente do sensor (efeito *CHEQ*), bem como, é operante em curtas distâncias entre as unidades (menores que 15 Å). Geralmente é atribuído a transferência de elétron fotoinduzida (abreviado como *PET*, do inglês, “*photoinduced electron transfer*”). O mecanismo de Förster, por sua vez, está associado a maiores distâncias entre as unidades ativa e de controle, podendo ir de 15 até 120 Å, e normalmente é atribuído a processos de transferência de carga intramolecular fotoinduzida (abreviado como *PICT*, do inglês, “*photoinduced intramolecular charge transfer*”), e transferência de energia por ressonância (abreviado como *RET*, do inglês, “*resonance energy transfer*”; também conhecido como *FRET*, do inglês, “*Förster resonance energy transfer*”). Estas atribuições podem ser confirmadas por meio de medidas espectroscópicas complementares, e, como normalmente é observado na literatura, através de cálculos mecânico-quânticos, com a construção de diagramas de energia dos orbitais de fronteira e suas composições, que aliados aos testes experimentais podem explicar com clareza os mecanismos e processos de transferências envolvidos.



Esquema 2. Ilustração dos componentes de um sensor químico fluorescente **(a)**, e as formas de detecção baseada na interação entre unidade de controle-analito. **(b)** aumento da intensidade fluorescente (efeito CHEF). **(c)** diminuição (supressão) da intensidade fluorescente (efeito CHEQ).

No início dos anos 70, após a introdução do conceito da supramolecularidade e os trabalhos de Lehn [21], Pederson e Cram [22]; a criação de moléculas capazes do reconhecimento molecular ganhou grande impulso e vários trabalhos foram descritos com ligantes multidentados lineares, tripodais e macrocíclicos. Sob o ponto de vista da química supramolecular, a interação da unidade de controle de um sensor fluorescente com o analito e sua interferência nas propriedades da unidade ativa e, portanto, na emissão de luz do fluoróforo pode ser usada quantitativamente e/ou qualitativamente na estimativa da afinidade sensor:analito. Fazendo uma busca na plataforma de pesquisa “Web of Science” com as palavras-chave “*fluorescent chemosensor(s)*” e “*chemosensor(s)*” no decorrer das décadas de 60 até os dias atuais, foi possível traçar um perfil do avanço nas pesquisas envolvendo essa temática, sumarizada na **Figura 2(a)**. É possível notar que as primeiras pesquisas envolvendo sensores fluorescentes foram registradas a partir da década de 80, e ganharam força no início do século XXI. Também é interessante ressaltar que a fluorescência é a forma de transdução mais comum dos quimiossensores na literatura, correspondendo a mais de 73% de todos os tipos de quimiossensores registrados na plataforma na última década (2011-2020). A **Figura 2(b)** ilustra como os quimiossensores fluorescentes estão vivenciando, nos dias atuais, o grande interesse do meio científico pela pesquisa, por serem mais baratos, de fácil preparo e não-

destrutivos [23], como são outras técnicas analíticas, por exemplo, *ICP OES* (do inglês “*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*”).

Devido o maior interesse na temática dos quimiossensores e o número de publicações aumentando no decorrer dos anos, os estudos passaram da detecção simples de alterações no pH do sistema, com monitoramento do deslocamento ou intensidade da banda de emissão [24-26]; aos trabalhos atuais, que procuram o desenvolvimento de sensores mais sensíveis, seletivos e/ou específicos, reversíveis e aplicáveis à matrizes reais, com apelos biológicos, ambientais, na indústria alimentícia, cosmetológica, entre outros, utilizando diferentes fluoróforos como unidade ativa (como mostra a **Figura 3**) em diversas funcionalizações da unidade de controle, para detecção seletiva de diferentes analitos [23,27-46].

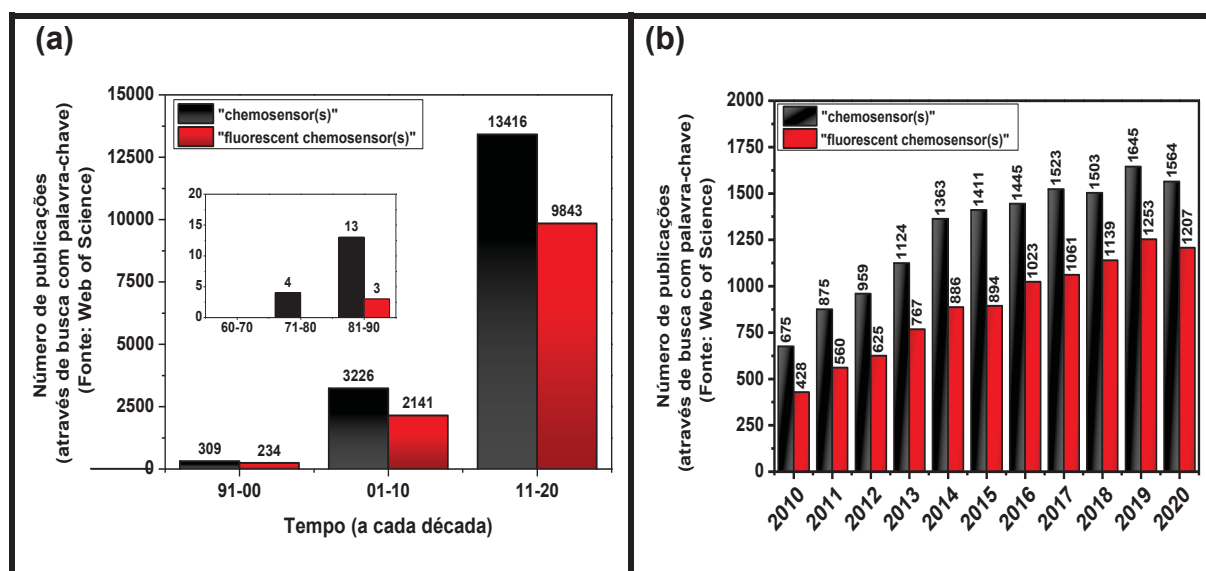


Figura 2. Número de publicações envolvendo as palavras-chave “*chemosensor(s)*” e “*fluorescent chemosensor(s)*” no decorrer **(a)** das décadas compreendidas entre 1960 a 2020, e **(b)** dos últimos anos (2010-2020) (Fonte: Web of Science).

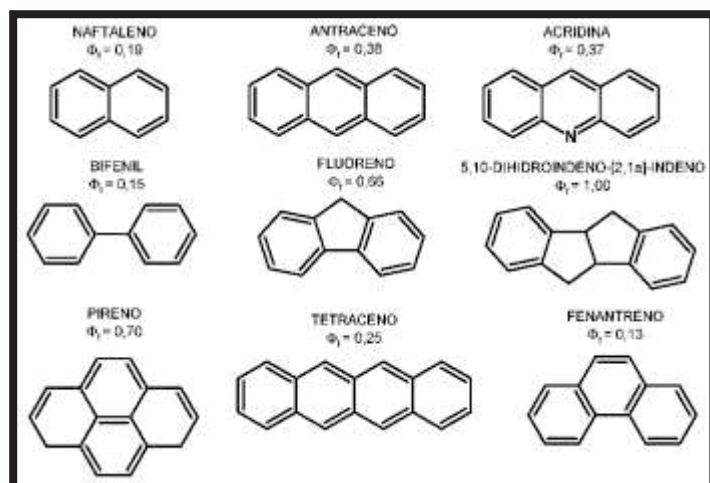


Figura 3. Exemplos de fluoróforos que atuam como unidade ativa de sensores encontrados na literatura, e seus respectivos rendimentos quânticos (Φ) em água.

1.3. Acridina: da descoberta aos quimiossensores

1.3.1. Descoberta, etimologia, composição e sistema de numeração

Carl Graebe e Henrich Caro, em 1870, ao trabalharem com o alcatrão de hulha, também conhecido como alcatrão de carvão, durante uma extração obtiveram uma fração particular que lhes chamou atenção pelo fato de causar irritabilidade aos olhos e garganta. O composto posteriormente foi isolado como um cristal puro, e nomeado como “*acridina*”, no qual “*acris*” significa pungente ou cáustico, derivado do latim [47-52].

Inicialmente a fórmula molecular foi designada como sendo $C_{12}H_9N$ [53-55], no entanto desconfiava-se que a caracterização poderia estar incompleta devido a quantidade pequena de material disponível para análise a partir das extrações [48]. Somente em 1883, Riedel [56] sugeriu que a fórmula correta fosse $C_{13}H_9N$, como mostra a **Figura 4**, por meio de algumas observações empíricas da oxidação do composto. No entanto, a composição da *acridina* só foi oficialmente comprovada mais tarde, 1892, através de muitas considerações experimentais das variadas rotas sintéticas, que até o momento se tinha conhecimento, para obtenção da mesma e alguns de seus derivados, como acridona [57-59], dando suporte à observação de Riedel. As *amino-acridinas* são os derivados mais investigados devido ao grande número de corantes sintéticos que rendem normalmente tons de amarelo ao marrom-alaranjado, como por exemplo, o composto 3,6-dimetilaminoacridina, popularmente conhecido como laranja de acridina (do inglês *acridine orange*). A *crisanilina* é o corante acridínico mais antigo reportado na literatura (1892) [48]. Outra característica das *amino-acridinas* que desperta grande interesse de estudo nos pesquisadores, são

suas propriedades antibacterianas, anticancerígenas e antimaláricas, no qual os exemplos mais conhecidos são: a “*proflavina*” (3,6-diaminoacridina) e a “*atebrina*” (9-aminoacridina substituído) [48]. Alguns derivados da *acridina*, como a proflavina por exemplo, são usados como intercaladores de DNA, através de interações $\pi-\pi$ (ou $\pi-\pi$ *stacking*) que estabilizam as conformações estruturais do sistema [60]. A síntese e caracterização da *acridina* se desenvolveu de tal forma, que métodos de obtenção, extração e purificação, são conhecidos e usados até os dias atuais [61-63]; sendo a rota de síntese mais frequentemente utilizada por meio da *9-acridanona* ou *9-cloroacridina* [48].

Após sua descoberta, muitos pesquisadores propuseram diferentes formas de numeração para a molécula da *acridina*, como Hess e Bernthsen (1885) [64], Schöpf (1892) [65], o seu próprio descobridor Graebe (1893) [66] baseado no sistema adotado para a molécula de antraceno (similar a *acridina*), mais tarde Von Richter (1900) [67] sugeriu outra forma não muito bem aceita pela comunidade científica, e no mesmo ano M.M.Richter [68] adotou em seu livro um sistema de numeração que teve certa popularidade; Borsche (1910) [69], Stelzner (1921) [70] e Patterson (1925) [71] inventaram ainda outras formas. No entanto, desde 1937 (*Chemical Abstract*) [48,72,73], a numeração adotada e aceita até o presente momento é a que foi proposta por Graebe, ilustrado na **Figura 4(a)**.

Do ponto de vista da química inorgânica, uma das maiores vantagens de se trabalhar com derivados de *acridina* ($\phi = 3,2\%$ em etanol [74]) ao invés de derivados do antraceno ($\phi = 27\%$ em etanol [75]) que possui eficiência quântica superior em condições comparáveis, bem como, é um fluoróforo muito conhecido na literatura e similar à *acridina*, composto por 3 anéis benzênicos, se deve à presença do heteroátomo de nitrogênio na molécula de *acridina*. A maior reatividade permite a funcionalização dessa molécula, principalmente a partir dos carbonos 4 e 5 que podem sofrer ataques eletrofílicos mais facilmente (**Figura 4(b)**), resultando em derivados di-substituídos, como os compostos estudados neste trabalho. Além de fornecer um átomo doador passível de coordenação com um íon metálico.

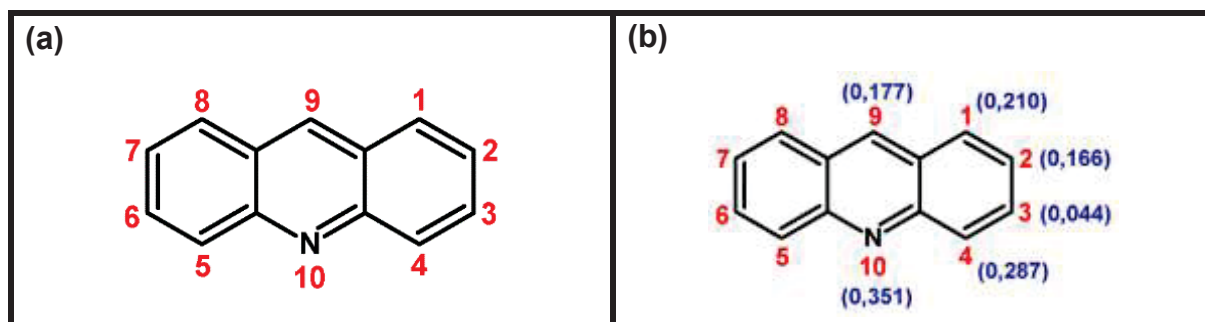


Figura 4. (a) Sistema de numeração (*Graebe*) adotado desde 1937 para *acridina*. (b) Densidade eletrônica para cada posição na molécula da *acridina*.

1.3.2. Propriedades gerais: físicas e químicas

A *acridina* é um composto heterocíclico de 3 anéis, perfeitamente planar, seu anel central é piridínico e condensado a outros dois anéis benzênicos [51,76]. Pela Regra de Hückel um composto cíclico é considerado aromático se possuir $(4N+2)$ elétrons π (sendo N um número inteiro superior a zero), logo, a *acridina* que possui 14 elétrons π e $N=3$ é um composto aromático, e sua energia de ressonância é aproximadamente $106 \text{ kcal mol}^{-1}$ [51,76]. Encontrada na forma sólida, de cor amarelo pálido, apresenta ponto de fusão de $\sim 107^\circ\text{C}$, ebulição de $\sim 360^\circ\text{C}$ e cristaliza bem em *EtOH* e benzeno. *Acridina* é uma base moderadamente fraca, de força comparável à anilina, piridina e quinolina, possui baixa solubilidade em água ($1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), mas em geral solubiliza bem em solventes orgânicos [77]. Todas essas propriedades da *acridina* se parecem com as observadas para a molécula de *antraceno*, inclusive seus espectros de absorção e estrutura fina das bandas [48,51,78,79]. Alguns estudos mostram que a dose letal de *acridina* em humanos é de aproximadamente $0,5\text{-}5,0 \text{ g kg}^{-1}$ [80]. Segundo o “banco de dados de substâncias perigosas”, abreviado como *HSDB* (do inglês, “*hazardous substances data bank*”) a *acridina*, de registro número 634 na plataforma, embora não seja considerada um composto excessivamente perigoso, é considerada um poderoso irritante que, em contato com a pele ou mucosa, causa coceira, queimação, espirro, lacrimejação e irritação na conjuntiva [81].

A *acridina* apresenta propriedades fluorescentes, sendo também um composto triboluminescente (fracto ou mecanoluminescente), ou seja, que apresenta luminescência através do atrito [48]. Embora apresente fluorescência em solução aquosa e em meio alcoólico, a emissão não é observada na forma cristalina ou em soluções de benzeno e acetato de etila, devido às ligações de hidrogênio no estado

excitado. Outro comportamento fluorescente interessante da *acridina* se refere as diferentes regiões de emissão em meio básico (azul-violeta) e em meio ácido (protonada) (verde-azul), bem como, alguns de seus derivados, como as *amino-acridinas* (amarelo-laranja), permitindo facilmente sua distinção [48,82].

A literatura mostra que o rendimento quântico (ϕ) da *acridina* em água é de aproximadamente 0,37 (a 18 °C, podendo apresentar valores diferentes em outras condições), sendo o maior valor de eficiência fluorescente para a substância, e um valor considerado alto (de maneira geral compostos que apresentam 10% de eficiência já são considerados relevantes) [48]. No entanto, devido a sua baixa solubilidade em água, é comum estudos utilizando outros solventes em misturas aquosas, como ilustra a **Tabela 1** [74,77].

Tabela 1. Valores de rendimento quântico (ϕ) da *acridina* encontrados na literatura para misturas (v/v) de solventes, à 18 °C em pH básico. (Retirado de [74]).

PROPORÇÃO (água/solvente)	RENDIMENTO QUÂNTICO			
	ETANOL	FORMAMIDA	DIOXANO	DIMETILFORMAMIDA
10/0	0,37	0,37	0,37	0,37
9/1	0,34	0,33	0,32	0,31
8/2	0,28	0,29	0,23	0,24
7/3	0,18	0,24	0,13	0,18
6/4	0,11	0,19	0,086	0,12
5/5	0,079	0,15	0,055	0,084
4/6	0,062	0,10	0,035	0,053
3/7	0,048	0,073	0,019	0,022
2/8	0,036	0,047	0,012	0,000
1/9	0,034	0,023	0,006	0,000
0/10	0,032	0,012	0,000	0,000

1.3.3. Utilizando acridina como unidade ativa de quimiossensores

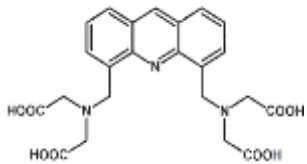
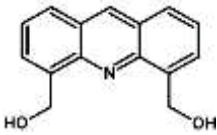
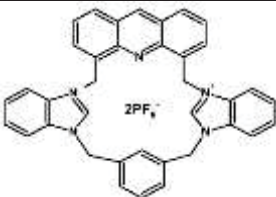
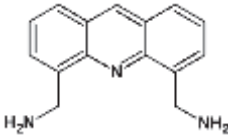
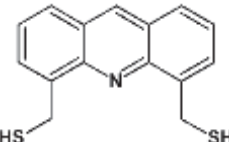
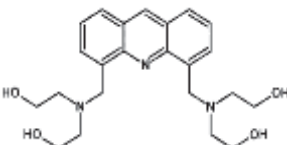
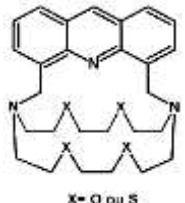
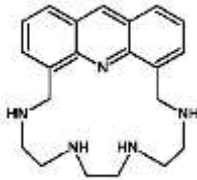
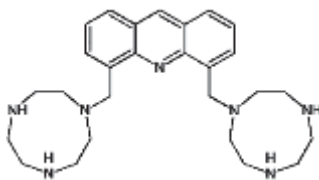
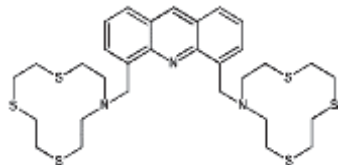
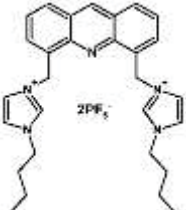
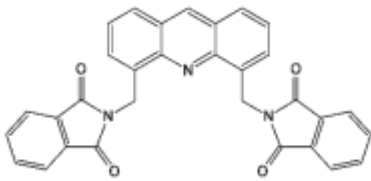
A *acridina* e seus derivados tem despertado interesse devido a sua eficiência quântica [83-85], no qual as primeiras publicações envolvendo a *acridina* como unidade ativa datam do início dos anos 2000 e vem crescendo desde então, na detecção de íons Fe(III) [86], H₂PO₄⁻ [87-90], Zn(II) [36], Cu(II) [91-92], F⁻ [93], Cd(II) [94-95], entre outros [96]. Porém, são poucos os relatos do seu uso para o desenvolvimento de sensores químicos na detecção seletiva e específica a íons

metálicos e/ou ânions, com reversibilidade e ainda aplicabilidade justificável em métodos analíticos estatisticamente robustos. A **Tabela 2** mostra exemplos encontrados na literatura de quimiossensores derivados de *acridina* ao longo das últimas duas décadas, no qual observa-se que a maioria deles não aborda questões como a obtenção de figuras de mérito, com o estudo da sensibilidade ou especificidade, trazendo dados como limite de detecção (abreviado como *LOD*, do inglês “*limit of detection*”, que expressa a detectabilidade do sistema), nem traz o sensor estudado aplicado a matrizes reais, como o **exemplo 4**, seletivo para íons cádmio(II) com *LOD* de $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e o **exemplo 11** aplicado para a detecção de íons mercúrio(II) e cádmio(II) em células mamárias através do efeito *CHEF*.

Com base nas lacunas existentes na literatura, no presente trabalho teve-se como objetivo principal sintetizar ligantes macrocíclicos derivados da *acridina*, ilustrados na **Figura 5**, aumentando o número de fluoróforo por fórmula a fim de favorecer os eventos de absorção e emissão. Como já discutido, a *acridina* apresenta três anéis planares e aromáticos, e permite a sua funcionalização e inserção de grupos doadores que atuam como base de Lewis, permitindo investigar sua química de coordenação ainda pouco explorada.

A funcionalização se dará por meio da substituição nos carbonos 4 e 5 da *acridina*, gerando precursores simétricos 4,5-dissubstituídos, seguida de reações de condensação com reagentes comerciais, como etilenodiamina (*en*) e dietilenotriamina (*deta* ou *dien*). Objetiva-se estudar os processos fotofísicos de excitação e de emissão de ligantes luminescentes inéditos e de seus complexos em solução, para a aplicação como possíveis sensores moleculares fluorescentes na detecção seletiva e quantificação de íons metálicos em diversas matrizes, incluindo aqui a obtenção de figuras de mérito a fim de atestar a adequação dos métodos de detecção.

Tabela 2. Ligantes derivados da acridina seletivos a íons metálicos e ânions.

SENSOR		Analito [ref]	SENSOR		Analito [ref]
1		Cu(II) [97]	8		Pd(II) [98]
2		H ₂ PO ₄ ⁻ [99]	9		Zn(II) [100]
3		H ₂ PO ₄ ⁻ [87]	10		Hg(II) [101]
4		Cd(II) [94]	11		Hg(II) e Cd(II) [102]
5		Zn(II) [36]	12		Sensível a mudança de pH [103]
6		Zn(II) [104]	13		Cd(II) [104]
7		H ₂ PO ₄ ⁻ [88]	14		Al(III) [105]

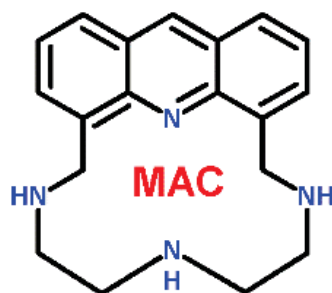
2. Objetivos gerais

Preparar e caracterizar ligantes macrocíclicos derivados de *acridina* que possuem propriedades luminescentes. Investigar a possível aplicação na detecção seletiva de íons inorgânicos e se o número de unidades de *acridina* por molécula de ligante interfere nos processos de absorção e de emissão desses compostos.

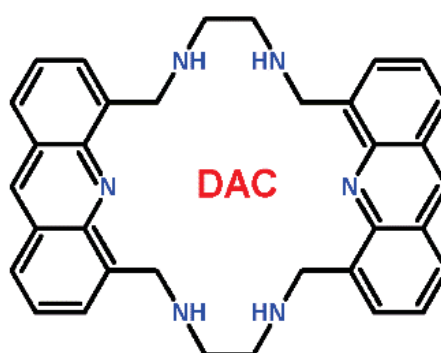
2.1. Objetivos Específicos

1. Sintetizar ligantes macrocíclicos contendo o grupo luminescente *acridina* como mostrado na **Figura 5**.
2. Investigar se o número de fluoróforos (*acridina*) por ligante altera as propriedades de absorção e de emissão dos compostos.
3. Caracterizar os produtos por análise elementar, por técnicas espectroscópicas (fluorescência, ultravioleta-visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear) e espectrometria de massas.
4. Sempre que possível, determinar as estruturas dos produtos por difratometria de raios X de monocristal (*DRX* de monocristal).
5. Utilizar cálculos teóricos (*TD-DFT*) a fim de confrontá-los com os resultados experimentais, no que diz respeito aos processos de absorção *UV-VIS*, na elucidação do mecanismo de transferência de energia no estado excitado, e das geometrias otimizadas dos compostos estudados (quando da ausência de resultados de difração de raios X de monocristal).
6. Estudar a capacidade dos sensores para a detecção seletiva de íons inorgânicos.
7. Investigar o modo de coordenação destes ligantes polifuncionais.
8. Avaliar figuras de mérito a fim de aplicar o método desenvolvido do possível sensor estudado.

(a)



(b)



(c)

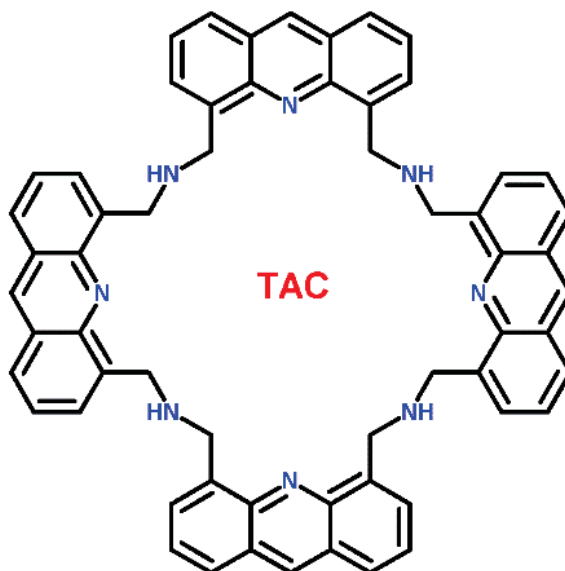


Figura 5. (a) ligante triaminomonoacridina (**MAC**); (b) ligante tetraaminodiacridina (**DAC**); (c) ligante tetraaminotetraacridina (**TAC**).

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e Solventes

9-Bromofluoreno (Aldrich)	Cloreto de paládio (Vetec)
Acetato de Sódio (Carlo Erba)	Cloreto de potássio (Merck)
Acetonitrila (Vetec)	Cloreto de rutênio(III) (Aldrich)
Ácido clorídrico 37% (FMAia)	Cloreto de sódio (Vetec)
Ácido sulfúrico 98% (Biotec)	Cloreto de térbio hexahidratado (Aldrich)
Acridina 97% (Sigma-aldrich)	Cloreto de zinco (Vetec)
Álcool etílico (Química Moderna)	Clorofórmio (Synth)
Álcool metílico (Biotec)	Diclorometano (Sigma-aldrich)
Azida sódica (Synth)	Dicromato de sódio (Carlo Erba)
Benzoato de sódio (Merck)	Dietil éter (Ecibra)
Brometo de potássio (Vetec)	Dietilenotriamina (Sigma-aldrich)
Brometo de sódio (EEL)	Etilenodiamina (Vetec)
Bromometilmetiléter 90% (Acros)	Hidrazina hidratada 64% (Acros Organic)
Carbonato de potássio (Riedel-de Haen)	Hidreto de cálcio (Aldrich)
Carbonato de sódio anidro (Synth)	Hidrogenofosfato de sódio (Vetec)
Celite (Synth)	Hidrossulfito de sódio (Vetec)
Cianato de sódio (Acros Organic)	Hidróxido de sódio (Biotec)
Cloreto de amônio (Dinâmica)	Iodeto de sódio (Synth)
Cloreto de cádmio (Vetec)	N,N-Dimetilformamida (Synth)
Cloreto de cálcio anidro (Cinética Química)	N-hidroximetilphtalimida (Aldrich)
Cloreto de cálcio anidro (Vetec)	Nitrato de magnésio hexahidratado (Vetec)
Cloreto de cobalto(II) hexahidratado (Dinâmica)	Nitrato de sódio (Vetec)
Cloreto de cobre dihidratado (Vetec)	Oxalato de sódio (Vetec)
Cloreto de cromo(III) (Aldrich)	Perclorato de sódio (Vetec)
Cloreto de estanho (Ecibra)	Piridina (Synth)
Cloreto de európio hexahidratado (Aldrich)	Salicilato de sódio (Merck)
Cloreto de ferro(III) hexahidratado (Sigma-aldrich)	Sulfato de magnésio anidro (Merck)
	Sulfato de sódio anidro (Êxodo Científica)

Cloreto de lítio hidratado (Vetec)	Tetrahidrofurano (Biotec)
Cloreto de magnésio (Vetec)	Tiocianato de sódio (Riedel)
Cloreto de manganês(II) (Vetec)	Trietilamina (Vetec)
Cloreto de mercúrio (Reagen)	
Cloreto de níquel hexahidratado (Synth)	

3.2. Tratamento de Solventes e Reagentes

Alguns dos solventes e reagentes foram previamente tratados baseados nos métodos descritos por Armarego e Perrin [106] sobre purificação de compostos químicos, com algumas adaptações. Etilenodiamina (*en*) e dietilenotriamina (*deta*) foram destilados antes de serem usados nas sínteses. Brometo de potássio (*KBr*) usado como meio dispersante para as análises de Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (*FTIR*), foi macerado e deixado na mufla à 350 °C por 4 horas, antes de ser usado para as medidas realizadas neste trabalho.

3.3. Condições de Atmosfera Inerte e calibração de balões volumétricos/pipetas

As sínteses de 4,5-bisbromometilacridina (*BBMA*) e 4,5-bisaminometilacridina (*BAMA*) foram realizadas em atmosfera de argônio (grau industrial, White Martins) e vácuo de 10^{-4} Torr. A calibração dos balões volumétricos (5 e 10 mL) e pipetas automáticas (100 e 1000 μ L), utilizadas para o preparo das soluções do trabalho, foram realizadas da seguinte forma: o volume total foi preenchido com água destilada, e pesado em balança analítica, medidas em triplicatas. A média das medidas de calibração apresentaram desvio menor que 5% do volume máximo, e foram repetidas a cada dois meses durante o período do trabalho. Após o uso, as vidrarias calibradas eram lavadas e secas ao ar.

3.4. Análise Instrumental

Análise Elementar e Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região Ultravioleta-Visível (*UV-VIS*)

As análises elementares, visando a determinação em porcentagem de C, H e N, foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (*USP*), em um equipamento Perkin-Elmer, modelo *CHN* 2400. Para a

obtenção dos espectros eletrônicos *UV-VIS* em solução foi utilizado um espectrofotômetro *HP 8452A – Diode Array* do Laboratório de Bioinorgânica (*UFPR*) e uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono ($^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$)

As análises de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$ foram realizadas no Laboratório de *RMN* do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica, em um espectrômetro Bruker 400 MHz Avance HD, ou ainda no Laboratório de *RMN* do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, em um espectrômetro Bruker 200 MHz Avance HD, ambos com Tetrametilsilano (*TMS*) como referência interna.

Espectroscopia de Fluorescência e lavagem de cubeta e frascos

Para as análises de excitação/emissão fluorescente e a determinação de rendimento quântico foi utilizado um espectrofluorímetro *Shimadzu* modelo *RF5301-PC*, do Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (*LAPPS*) – *UFPR* e uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A abertura de fenda (o “*slit*” de entrada e de saída) foi variado de 1,5 à 5 nm dependendo do teste, a potência do detector foi fixada em 800 volts (alta) e velocidade de varredura em 600 nm min⁻¹ (média). Após as medidas, a cubeta de quartzo usada nos testes e os frascos de vidro usados no armazenamento das soluções preparadas, eram mantidos em água-régia por um dia, a fim de evitar adsorção do produto nos recipientes e posterior contaminação nos demais testes.

Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (*FTIR*)

Para a obtenção dos espectros *FTIR* foi utilizado o espectrômetro Bio-Rad Excalibur Series, modelo *FTS3500GX*, na região de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, utilizando brometo de potássio (*KBr*) como meio dispersante e aproximadamente 2 mg de amostra.

Difratometria de Raios X de monocristal

Os dados de difração, para análise de cela unitária, foram coletados

empregando um difratômetro *Bruker – D8 Venture* equipado com detector de área *Photon 100 CMOS*, duas fontes de radiação monocromática de *Mo-K α* ($\gamma = 0,7107 \text{ \AA}$) e *Cu-K α* ($\gamma = 1,5418 \text{ \AA}$), e dispositivo *Kryoflex II*, para realização de coletas à baixa temperatura. Os dados foram processados utilizando o programa *APEX3* 1. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do *CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre)*. A resolução das estruturas cristalinas foi executada pela técnica e doutoranda Francielle Sousa Santana.

Cálculos Teóricos

Para estimar a geometria no estado fundamental e a energia dos orbitais de fronteira dos ligantes e complexos estudados realizou-se cálculos teóricos *TD-DFT* (abreviatura do inglês “*Time Dependent Density Functional Theory*”), utilizando o funcional *B3LYP* com a função de base 6-311g(d,p) para os átomos C,N,H e o conjunto de base Lanl2dz para os íons metálicos. A partir das estruturas otimizadas calculou-se as energias livres dos compostos. Os espectros de absorção foram obtidos usando cálculos *TD-DFT*. Os dados foram obtidos utilizando o programa *GAUSSIAN 2009* [107]; e os cálculos foram executados pelo Dr. Cristiano Zanlorenzi em parceria com o Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (*LAPPS*) – *UFPR*.

Espectrometria de massas (*ESI-MS*)

Os espectros de massas foram registrados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (*USP*), em um equipamento MicroTof Bruker Daltonics de fonte *ESI* (Ionização por Eletrospray, do inglês “*EletroSpray Ionization*”) com analisador *TOF* (traduzido como tempo de voo, do inglês “*time of flight*”) de alta resolução (10000 FWHM), no modo positivo e negativo, com injeção de amostra por infusão direta no equipamento.

Teste de seletividade individual dos ligantes fluorescentes *MAC*, *DAC* e *TAC* com cátions

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L⁻¹ do ligante em clorofórmio e 50 μL de uma solução equimolar do cátion (sal cloreto) em etanol, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol, tornando-a de proporção *CHCl₃:EtOH* (1:99 v/v). As

concentrações finais do ligante e do cátion foram de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, e as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicata para cada íon.

Teste de competição de íons

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante em clorofórmio e 50 μL de solução equimolar de 20 cátions diferentes (sais cloretos) em etanol, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol, tornando-a de proporção $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:99 v/v). As concentrações finais do ligante e de cada cátion foram de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, e as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em quintuplicatas: para a amostra do ligante livre e amostras contendo ligante com adição de 22 cátions na ausência e presença de íons cádmio(II).

Determinação do pKa do ligante MAC

Para realização dessas medidas, previamente preparou-se solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando água ultrapura, a partir da qual foram obtidas soluções ácidas de pH 1 a 5, em intervalos de 0,5 com adição de NaOH . O monitoramento e controle do pH foi realizado com o uso de um *pHmetro Ohaus ST2100F*, do laboratório de Analítica Avançada do Departamento de Química (UFPR). Em seguida, utilizando uma balança analítica pesou-se aproximadamente 4 mg de MAC em 9 frascos distintos, no primeiro frasco adicionou-se 5 mL da solução ácida pH 1, tornando-a uma solução amarela intensa de concentração final aproximadamente $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. O mesmo procedimento foi realizado para os demais valores de pH, em cada frasco contendo MAC. Assim, obteve-se soluções de pH variados porém com a mesma concentração do ligante. As soluções ácidas foram avaliadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas.

Teste de seletividade individual do ligante MAC com ânions

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução aquosa a 10 mmol L^{-1} do ligante MAC em pH 1,5 e 50 μL de uma solução aquosa equimolar do ânion (contra-íon sódio), em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com solução de HCl pH 1,5. As concentrações finais do ligante e do ânion foram de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, e as soluções foram analisadas por

espectroscopia de fluorescência em triplicata para cada íon.

Determinação da estequiometria do complexo de MAC formado em solução

O teste foi baseado no formalismo de Job, também conhecido como método das variações contínuas, no qual preparou-se soluções equimolares do ligante e do metal de concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:99 v/v), em seguida, realizou-se a mistura de diferentes volumes de cada solução, mantendo-se constante o volume final em 10 mL para todas. As determinações foram efetuadas em triplicatas e analisadas por espectroscopia de fluorescência.

Estudo da reversibilidade do complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$

No teste de reversibilidade, conhecido como “teste de ciclagens”, escolheu-se um ligante que possui uma constante de formação superior ao do sensor estudado com o mesmo íon metálico, neste caso os testes foram realizados com o ligante EDTA. As ciclagens consistem no preparo de soluções com as seguintes concentrações finais: **1ª medida**= somente MAC a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$; **2ª medida**= MAC ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Cd^{2+} ($0,5 \text{ nmol L}^{-1}$); **3ª medida**= MAC e EDTA (ambos a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Cd^{2+} ($0,5 \text{ nmol L}^{-1}$); **4ª medida**= MAC e EDTA (ambos a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Cd^{2+} (1 nmol L^{-1}); **5ª medida**= MAC ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Cd^{2+} (1 nmol L^{-1}) + EDTA ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$); e assim por diante com a adição alternada do metal e EDTA, mantendo-se a concentração do sensor constante ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Todas as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas em meio $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:99 v/v).

Figuras de mérito: MAC e cádmio(II)

Condições nominais

Para a obtenção das “figuras de mérito” deste trabalho, como seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez, as condições de todas as medidas foram padronizadas, para atenuar erros aleatórios de análise. Tais condições padrões são chamadas “nominais” e estão sumarizadas na **Tabela 3**, estas foram respeitadas em todos os testes relacionados à parametrização do método aplicado a um sensor.

Tabela 3. Parâmetros e suas condições nominais de análise para o sistema MAC e cádmio(II).

Parâmetros	Condição Nominal
Fenda de entrada e saída	1,5 nm
Velocidade de varredura	Muito rápida (500 nm min ⁻¹)
λ_{ex} e λ_{em}	400 e 450 nm
Temperatura da medida	Temperatura ambiente (20-25°C)
Temperatura de armazenamento	Geladeira (10-15°C)
Atmosfera de argônio	Não
Tempo entre o preparo de amostra e a medida	2 h
Meio (proporção)	Etanol:Clorofórmio (99:1)
Concentração dos metais (teste de seletividade individual)	1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
Concentração de íons cádmio(II) (teste de repetibilidade e precisão intermediária)	Nível 1 = 1x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹
	Nível 2 = 5x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹
	Nível 3 = 1x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹
Concentração de íons cádmio(II) (teste de robustez)	5x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹
Calibração de balões volumétricos e pipetas automáticas	Mensal
Lavagem da cubeta antes e depois das medidas	Água-régia/1 dia
Lavagem da cubeta entre as medidas	3 vezes
	2x Etanol e 1x Acetona

Testes estatísticos

Ferramentas estatísticas foram utilizadas a fim de identificar resultados anômalos, tendenciosos e não-homogêneos, para garantir que o sensor corresponda a um sistema estatisticamente robusto, preciso e exato, conforme os parâmetros adotados e recomendados por órgãos regulamentadores como ANVISA [108] [109] e INMETRO [110]. Para a seletividade e linearidade realizou-se uma análise da curva de calibração com cálculo do desvio padrão, *RSD*, determinação do limite de detecção (*LOD*) e quantificação (*LOQ*), testes de *Grubbs*, *Fisher*, *Cochran* e *Durbin-Watson*. Os dados de repetibilidade e precisão intermediária foram analisados com a estimativa do *RSD* de *Horwitz* e o cálculo de *Horrat*, além do teste de *Dixon*. Os testes estatísticos para análise da robustez consistiram no *Teste de Youden*, com a produção do gráfico de Pareto.

Curva de calibração

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante em clorofórmio e 50, 40, 25, 15 μL de soluções a 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 mmol L^{-1} do cátion cádmio(II) (sal cloreto) em etanol, respectivamente, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol, tornando-a de proporção $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:99 v/v). A concentração final do ligante foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as medidas, e do cátion foram de 0,01 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. As soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicata para cada concentração do metal.

Testes de repetibilidade, precisão intermediária e robustez

Estes testes foram realizados em concentrações pré-estabelecidas de cádmio(II), segundo a curva de calibração obtida. Para repetibilidade e precisão intermediária analisou-se 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto da faixa linear), e para o teste de robustez analisou-se o nível intermediário de concentração da faixa linear. Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante em clorofórmio e 50, 250 e 500 μL de uma solução a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do cátion (sal cloreto) em etanol, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol, tornando-a de proporção $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:99 v/v). A concentração final do ligante foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as medidas, e do cátion cádmio(II) foi de 0,10, 0,50 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. As soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicata para cada íon, e para os testes de precisão intermediária as soluções foram preparadas e medidas por um segundo analista.

Recuperação em amostras reais

A figura de mérito que representa a exatidão do método utilizado com o sensor MAC para a detecção de íons cádmio(II) foi investigada com testes de recuperação em matrizes reais como: cachaça, saquê e extrato alcoólico de cigarro. As amostras foram preparadas da seguinte forma: em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante em clorofórmio, 150, 250 e 400 μL de uma solução de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cádmio(II) em etanol (3 níveis de concentração), e o volume final foi completado com as matrizes (cachaça, saquê

ou extrato de cigarro). As concentrações finais de cádmio(II) adicionado foram de 300, 500 e 800 nmol L⁻¹, e do ligante 100 µmol L⁻¹. As amostras foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas.

3.5. Sínteses

3.5.1. Precursores

3.5.1.1. Síntese de 4,5-bisbromometilacridina (BBMA) - (C₁₅H₁₁Br₂N · 1,5H₂O)

A síntese foi realizada conforme o método descrito por Zhang e colaboradores [111], conforme ilustra o **Esquema 3**. Uma solução de 25 g de bromometilmetiléter (0,2 mol) e 8,96 g de *acridina* (0,05 mol) em 110 mL de H₂SO₄ (98%), foi mantida em atmosfera inerte (argônio) sob agitação à 50 °C, por aproximadamente 24 horas. Em seguida, o sistema foi deixado resfriar e adicionou-se ao mesmo cerca de 300 g de gelo (água destilada), observando-se formação de precipitado amarelo instantaneamente. A mistura foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora, em seguida foi filtrada e o sólido diluído com aproximadamente 2 L de clorofórmio. A fase orgânica da solução foi separada e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após a remoção do solvente por rotoevaporador, um precipitado amarelo intenso foi obtido, lavado com dietil éter e seco sob vácuo. **Rendimento:** 16,81 g (86%), calculado pela fórmula molecular C₁₅H₁₄Br₂NO_{1,5}, 392,09 g mol⁻¹. **Análise elementar:** C% 45,64 (45,95); H% 3,20 (3,60); N% 3,57 (3,57) (valores calculados entre parênteses).



Esquema 3. Síntese de BBMA.

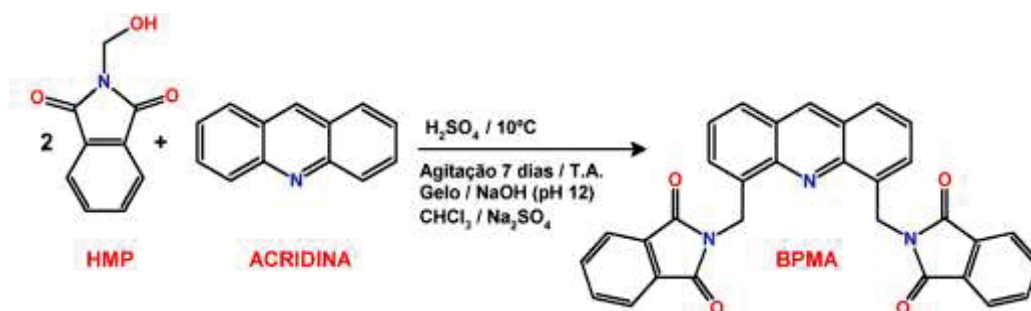
3.5.1.2. Síntese de 4,5-bisaminometilacridina (BAMA)

3.5.1.2.1. Etapa 1 – 4,5-bisftalimidametilacridina (BPMA) - (C₃₁H₁₉N₃O₄ · 3H₂O)

Essa síntese foi realizada baseada no trabalho de Hess e Stewart [112], com pequenas modificações, conforme mostra o **Esquema 4**. Inicialmente solubilizou-se 19,77 g de *N*-hidroximetilftalimida (0,112 mol) em 100 mL de H₂SO₄ (98%) resfriado à aproximadamente 10 °C, com o auxílio de um banho de gelo. Em seguida, em

pequenas porções, adicionou-se à solução 10 g de *acridina* (0,056 mol). A solução amarela foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por 7 dias.

Após transcorrido o tempo de agitação, o sistema foi despejado lentamente à aproximadamente 1 kg de gelo (água destilada), formando um precipitado amarelo intenso instantaneamente. Em seguida a mistura foi tratada com hidróxido de sódio até atingir pH 12, e filtrada. O sólido obtido da filtração foi lavado sucessivas vezes com água gelada, e seco sob vácuo, para depois ser solubilizado em 1 L de clorofórmio. A fase orgânica da solução foi separada e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após a remoção de 90% do solvente por rotoevaporador, o sistema foi resfriado com a ajuda de um banho de gelo, e um precipitado amarelo fosco foi obtido, lavado com dietil éter e álcool metílico gelados, e seco sob vácuo. **Rendimento:** 30,5 g (99%), calculado pela fórmula molecular $C_{31}H_{25}N_3O_7$, 551,55 g mol⁻¹. **Análise elementar:** C% 67,10 (67,51); H% 4,38 (4,57); N% 7,44 (7,62) (valores calculados entre parênteses).



Esquema 4. Síntese de *BPMA*.

3.5.1.2.2. Etapa 2 – 4,5-bisaminometilacridina dihidrocloro (BAMA) - ($C_{15}H_{15}N_3 \cdot 1,5H_2O \cdot 2HCl$)

Essa síntese foi realizada com base no método utilizado por Laronze-Cochard e colaboradores [113], como ilustra o **Esquema 5**. Uma solução de 17,8 g de 4,5-bisphthalimidoacridina (*BPMA*) (0,032 mol) e 57 mL de hidrazina hidratada 64% (1,152 mol) em 500 mL de álcool metílico, foi mantida sob atmosfera inerte (argônio) por 20 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, removeu-se o solvente através de rotoevaporador, resultando em um sólido amarelo que foi extraído com 3 porções de 100 mL de diclorometano e lavado com 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio (1 mol L⁻¹). A fase orgânica foi separada e seca sobre sulfato de magnésio anidro. Após a remoção do solvente,

um óleo laranja foi obtido, e em seguida dissolvido em 200 mL de *MetOH* e tratado com uma solução de *MetOH* saturado com ácido clorídrico, resultando em um precipitado amarelo intenso, que foi lavado com dietil éter e *MetOH* gelados, e seco sob vácuo. **Rendimento:** 7,61 g (70%), calculado pela fórmula molecular $C_{15}H_{20}Cl_2N_3O_{1,5}$, 337,25 g mol⁻¹. **Análise elementar:** C% 53,54 (53,42); H% 5,93 (5,98); N% 12,24 (12,46) (valores calculados entre parênteses).



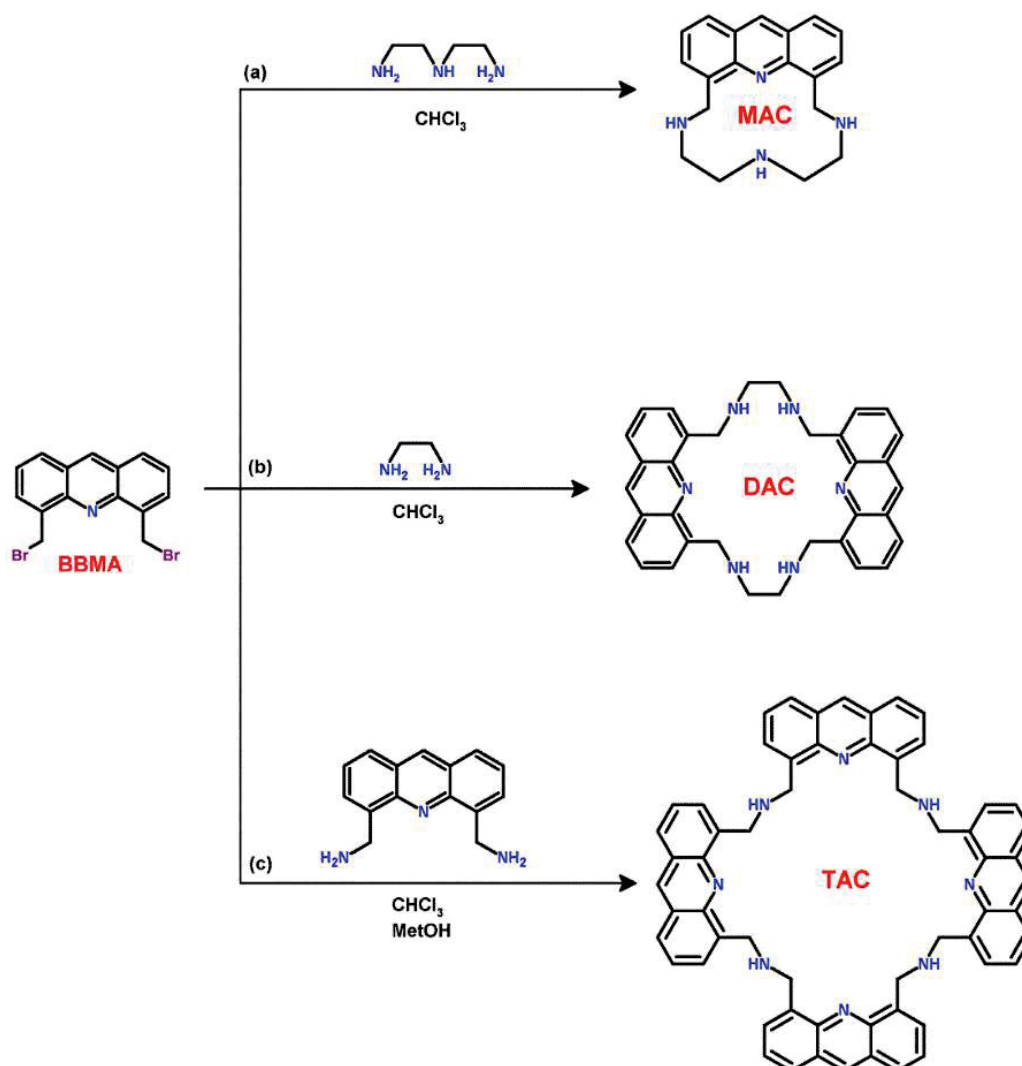
Esquema 5. Síntese de BAMA.

3.5.2. Ligantes

3.5.2.1. Síntese de MAC, DAC e TAC

Os ligantes foram preparados com base nos métodos descritos por Puccioni [103], Park [36], Carole [114] e colaboradores, para obtenção de compostos análogos. As sínteses de MAC e DAC foram realizadas de maneira similar, no qual 1 g (2,56 mmol) de 4,5-bisbromometilacridina (BBMA) foi dissolvido em 30 mL de clorofórmio sob condições de refluxo e a esta solução foi adicionada, gota-a-gota, 0,26 g (2,56 mmol) de dietilenotetraamina recém destilada, para proporcionar a formação de MAC (**Esquema 6 (a)**); e 0,15 g (2,56 mmol) de etilenodiamina recém destilada, para dar DAC (**Esquema 6 (b)**). Ambos os sistemas foram mantidos sob refluxo por 24 horas, com o auxílio de carbonato de potássio. Após o tempo transcorrido, a mistura foi filtrada para remover o sal, e o filtrado concentrado até 1/3 do volume, para se obter um precipitado amarelo claro, em ambas as sínteses, que foi lavado com dietil éter e seco sob vácuo. A síntese de TAC (**Esquema 6(c)**), foi realizada a partir de 1 g (2,56 mmol) de 4,5-bisbromometilacridina (BBMA) dissolvido em 30 mL de clorofórmio sob condições de refluxo e a esta solução, foi adicionada outra de 4,5-bisaminometilacridina (BAMA), previamente neutralizada com NaOH até sua completa dissolução em 20 mL de *MetOH*. Após 48 horas sob refluxo, o solvente foi removido por rotoevaporador, para obtenção de um sólido marrom, que foi lavado com dietil éter (Et_2O) e seco sob vácuo. **Rendimento MAC:** 52 %, calculado pela fórmula molecular

$C_{19}H_{22}N_4 \cdot 1Me_2CO \cdot 0,5CHCl_3$, 427,27 g mol⁻¹. **Análise elementar MAC:** C% 64,07 (63,71); H% 6,26 (6,77); N% 13,05 (13,21). **Rendimento DAC:** 55 %, calculado pela fórmula molecular $C_{34}H_{34}N_6 \cdot 3H_2O \cdot 1Me_2CO \cdot 0,5CHCl_3$, 638,80 g mol⁻¹. **Análise elementar DAC:** C% 60,19 (60,20); H% 6,16 (6,25); N% 10,39 (11,08). **Rendimento TAC:** 42 %, calculado pela fórmula molecular $C_{60}H_{48}N_8 \cdot 3CHCl_3$, 1240,22 g mol⁻¹. **Análise elementar TAC:** C% 61,56 (61,06); H% 4,87 (4,15); N% 8,84 (9,05) (valores calculados de análise elementar entre parênteses).



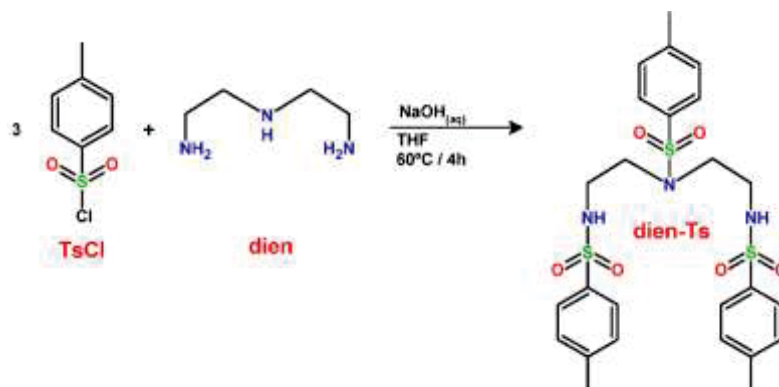
Esquema 6. Rota de síntese dos ligantes: (a) **MAC**, (b) **DAC** e (c) **TAC**.

3.5.2.2. Síntese de **MAC**: segunda rota sintética

3.5.2.2.1. Síntese de *dien-Ts* (Tosilação de dietilenotriamina)

Essa síntese foi realizada com base nos métodos utilizados por Hiroyuki [115], Wilson [116], Chen [117] e colaboradores, conforme ilustra o **Esquema 7**. Em um

balão redondo adicionou-se 7 mL (6,69 g; 0,065 mol) de dietilenotriamina recém destilada e 10,4 g (0,260 mol) de NaOH em 100 mL de água destilada. O sistema foi mantido a 60 °C, e a ele adicionou-se 36,99 g (0,194 mol) de cloreto de 4-toluenossulfonila em 100 mL de *THF*, gota-a-gota, por aproximadamente 10 minutos. A agitação e aquecimento foram mantidos por 4h, em seguida removeu-se o solvente da fase orgânica através de rotoevaporador. O sólido branco obtido foi suspenso sob refluxo em 100 mL de etanol por 5 h, filtrado, lavado com etanol e seco sob vácuo. **Rendimento:** 82 %, calculado pela fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_3$, 565,73 g mol⁻¹. **Análise elementar:** C% 52,85 (53,08); H% 5,32 (5,52); N% 7,21 (7,43) (valores calculados entre parênteses). **ESI-MS(modos positivos) em m/z:** $[\text{Na}(\text{dien-Ts})]^+ = 588,13$ (pico molecular). **¹H-RMN (δ_{H}) em CDCl_3 , 400 MHz:** 3,16 (m) (1-2); 5,27 (s) (3); 7,27-7,78 (m) (4-5); 2,43 (s) (6).

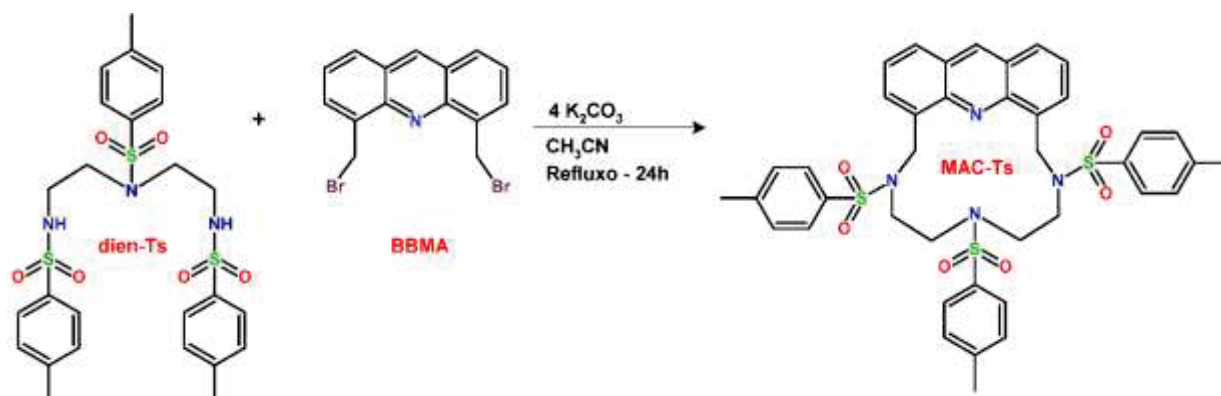


Esquema 7. Síntese de *dien-Ts*.

3.5.2.2.2. Síntese de *MAC-Ts*

Essa síntese foi realizada baseada no trabalho de Bencini e colaboradores [118], como mostra o **Esquema 8**. Em um balão de 250 mL, adicionou-se 1 g (1,77 mmol) de *dien-Ts* e 1 g (7,08 mmol) de K_2CO_3 em 50 mL de acetonitrila, e aquecido até refluxo. Em seguida, foi adicionado lentamente 0,65 g (1,77 mmol) de *BBMA* em 50 mL de acetonitrila. O sistema de refluxo foi mantido por 24 h, passando de um amarelo fraco à cor de caramelo, filtrado e o solvente removido através de rotoevaporador rendendo um sólido marrom escuro. A purificação foi realizada através de coluna cromatográfica em sílica, utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (99:1) como eluente, obtendo-se um sólido caramelo. **Rendimento:** 63%, calculado pela fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_3 \cdot 4,5\text{H}_2\text{O}$, 850,04 g mol⁻¹. **Análise elementar:** C% 56,51 (56,52); H% 5,30 (5,81); N% 5,92 (6,49) (valores calculados entre parênteses). **ESI-MS(modos positivos) em m/z:** $[\text{MAC-Ts}]^+ = 769,22$ (pico molecular). **¹H-RMN (δ_{H}) em CDCl_3 , 400**

MHz: 8,71 (s) (1); 8,07 (d) (2); 7,90 (dd) (3); 7,11 (d) (4); 5,03 (s) (5); 2,85 (s) (6); 3,34 (m) (7); 7,30-7,73 (m) (8-9); 2,39 (s) (10).

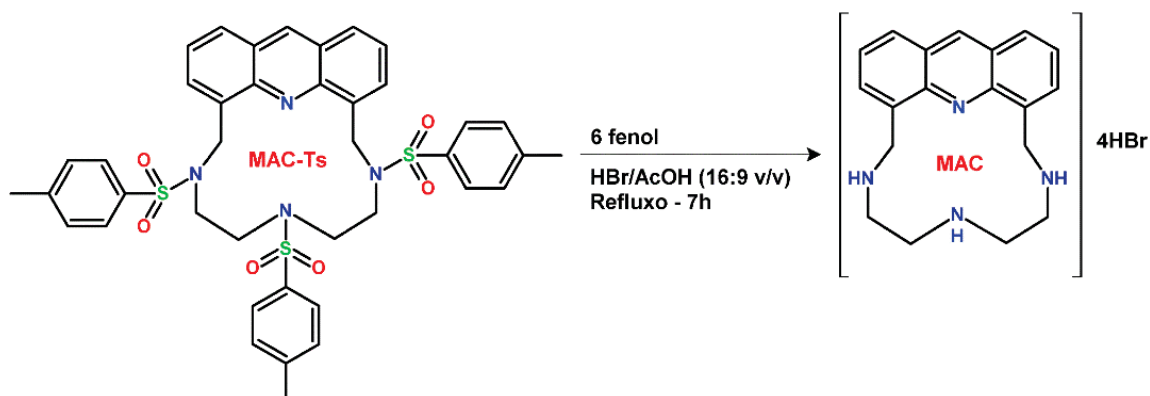


Esquema 8. Síntese de MAC-Ts.

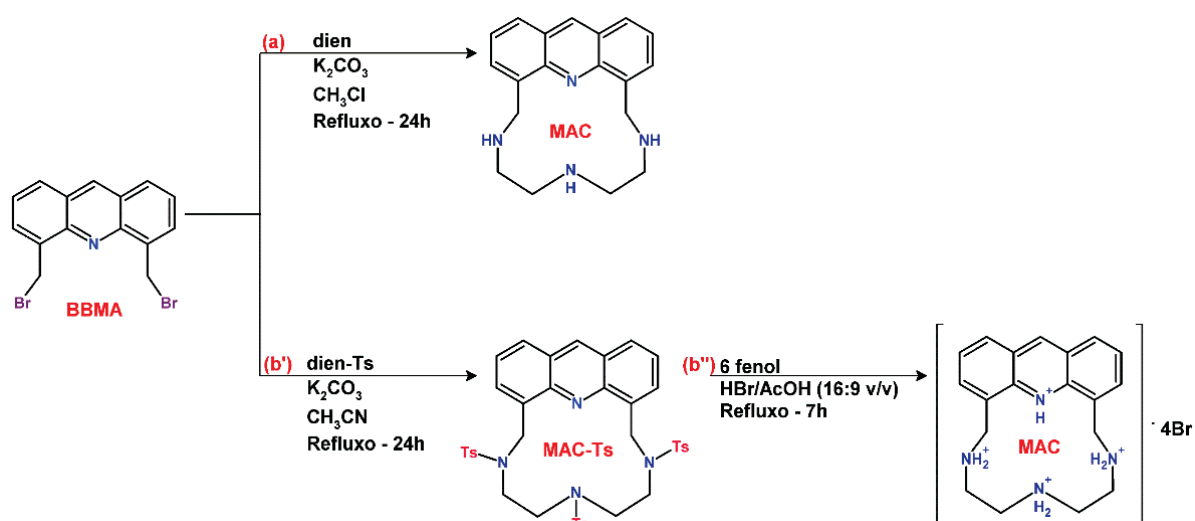
3.5.2.2.3. Síntese de MAC-4HBr (Destosilação)

Essa síntese foi realizada com base no método utilizado por Delgado e colaboradores [119], conforme ilustra o **Esquema 9**. Em um balão de 50 mL adicionou-se 0,150 g (0,195 mmol) de MAC-Ts em 3,8 mL de ácido bromídrico 48%/ácido acético glacial (16:9 v/v), tornando a solução amarela intensa, e 0,11 g (1,17 mmol) de *fenol*. O sistema foi mantido sob refluxo por 7 h e em seguida, o volume foi reduzido e extraído com 4 porções de 10 mL de CHCl₃. A fase aquosa foi concentrada e um precipitado amarelo-queimado foi obtido após adição de dietil éter (Et₂O). A purificação foi realizada através de coluna cromatográfica em sílica, utilizando CH₂Cl₂/AcOEt (99:1) como eluente, obtendo-se um sólido marrom escuro. **Rendimento:** 42%, calculado pela fórmula molecular C₁₉H₂₆Br₄N₄, 630,05 g mol⁻¹. **Análise elementar:** C% 36,39 (36,22); H% 3,80 (4,16); N% 8,33 (8,89) (valores calculados entre parênteses). **¹H-RMN (δ_H)** em D₂O, 400 MHz: 8,92 (s) (1); 7,28-8,10 (m) (2-4); 3,23-3,47 (m) (6-7).

O **Esquema 10** ilustra de forma simplificada as duas rotas realizadas para obtenção do ligante MAC.



Esquema 9. Síntese de *MAC · 4HBr*.



Esquema 10. Esquema simplificado das duas rotas sintéticas para obtenção de *MAC*.

4. Resultados e Discussão

A caracterização dos precursores e ligantes foi realizada por análise elementar, técnicas espectroscópicas, como fluorescência, ultravioleta-visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear, bem como, por espectrometria de massas e cálculos mecânico-quânticos. Os mecanismos de reação para obtenção dos precursores e ligantes são trazidos no **ANEXO 2**, e alguns resultados estão sumarizados e se encontram nos **ANEXOS 3-5** deste relatório.

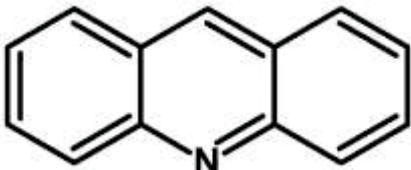
4.1 Fluoróforo: Acridina

Os estudos do comportamento fluorescente dos ligantes investigados neste trabalho estão centrados majoritariamente na porção do fluoróforo *acridina*, desta forma destaca-se a importância na compreensão do perfil de absorção e emissão do mesmo, bem como, em sua caracterização através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (*RMN*) e de absorção no infravermelho (*FTIR*), espectrometria de massas, facilitando assim o entendimento e caracterização dos compostos obtidos posteriormente.

4.1.1. Análise elementar (*CHN*) e espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho (*FTIR*)

Foi realizada a análise elementar (*CHN*), obtendo-se os seguintes resultados C%, 86,66 (87,12); H%, 4,94 (5,06); N%, 7,83 (7,82); sendo os valores entre parênteses os valores calculados com base na fórmula $C_{13}H_9N$, estando de acordo com os valores experimentais. A **Figura 6** mostra o espectro vibracional (*FTIR*) [120-121] da *acridina*, que se mostra coerente com a literatura [122], e a **Tabela 4** ilustra a atribuição tentativa das principais bandas no espectro do composto.

Tabela 4. Atribuição tentativa das principais bandas do espectro FTIR do composto acridina.

	Número de onda (cm ⁻¹)	Modo vibracional
	3072 – 3006	ν (C-H _{aromático})
	1616	ν (C=N _{imina})
	1554 – 1514 – 1461	ν (C=C _{aromático})
	1139	ν (C-N)
	958 – 910 – 860 – 792 – 736	π (C=C _{aromático})

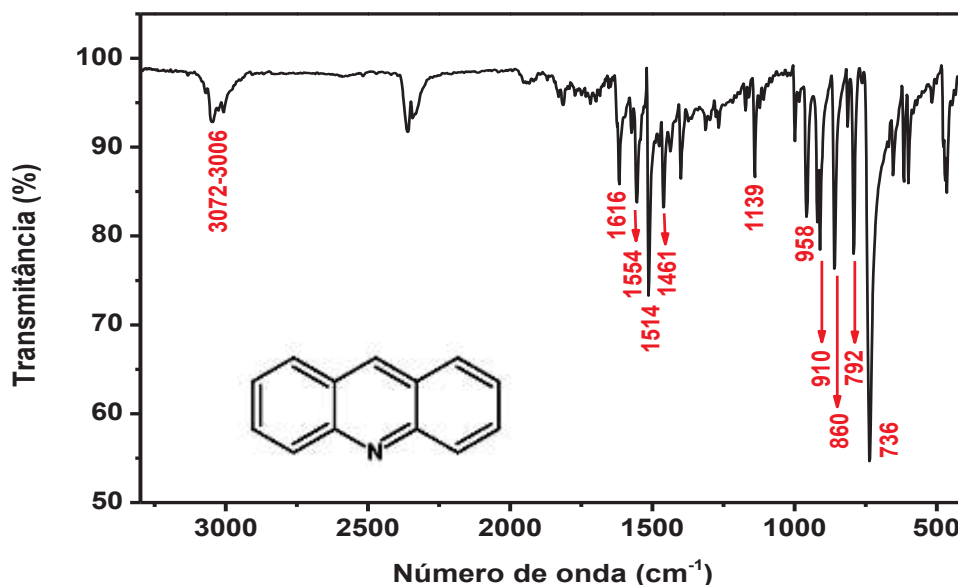
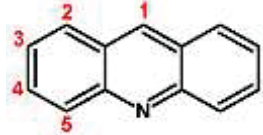
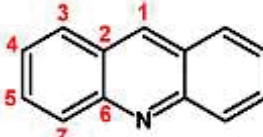


Figura 6. Espectro *FTIR* em pastilha de *KBr* de *acridina*.

4.1.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN)

As **Figuras 7 e 8** mostram os espectros de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN referente à *acridina*, respectivamente. Os deslocamentos químicos juntamente com a integração dos sinais são coerentes com as atribuições realizadas e com a composição apresentada na **Tabela 5**. Os sinais que foram obtidos na região de 7,26 ppm (singleto), 76 à 77 ppm (triplete) correspondem ao solvente clorofórmio usado nas análises [123]. O perfil espectral obtido, para ambos os espectros, foi comparado com os valores encontrados na literatura [122,124], e estão entre parênteses nas tabelas ao lado dos valores obtidos, mostrando coerência nas atribuições. Os espectros sem **(a)** e com **(b)** *DEPT135* mostrado na **Figura 8** se diferem pelo fato dos carbonos quaternários não aparecerem no espectro **(b)** (para *acridina*, carbonos 2 e 6), bem como os carbonos secundários possuem sinal negativo **(b)** (como a *acridina* não possui carbono secundário, logo não é possível verificar sinal negativo) em comparação ao espectro **(a)**, que mostra todos os sinais, positivos [120,125].

Tabela 5. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN da *acridina*. (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT135 da *acridina*.

(a)		^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
		3	7,43 – 7,47 (7,54)	Tripleto (t)	2,00 (2H)
		4	7,70 – 7,74 (7,78)	Tripleto (t)	2,04 (2H)
		2	7,87 – 7,90 (7,99)	Dubleto (d)	2,07 (2H)
		5	8,21 – 8,23 (8,25)	Dupleto (s)	1,83 (2H)
		1	8,62 (8,77)	Singleto (s)	1,00 (1H)
(b)		^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm) (DEPT 135)	
		4	125,57 (125,61)	125,58	
		2	126,51 (126,55)	(NÃO APARECE)	
		3	128,13 (128,15)	128,14	
		7	129,39 (129,34)	129,39	
		5	130,18 (130,24)	130,19	
		1	135,89 (135,98)	135,90	
		6	149,04 (149,01)	(NÃO APARECE)	

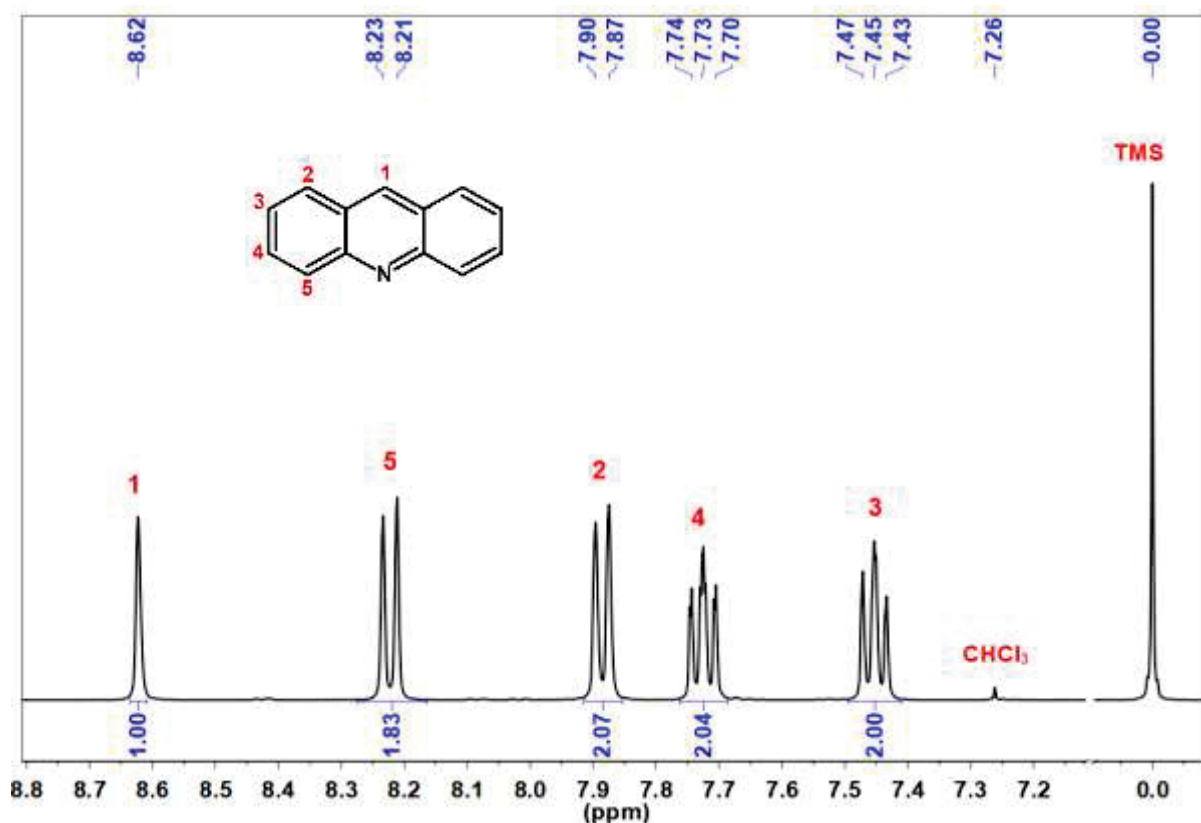


Figura 7. Espectro de ^1H -RMN para *acridina*.

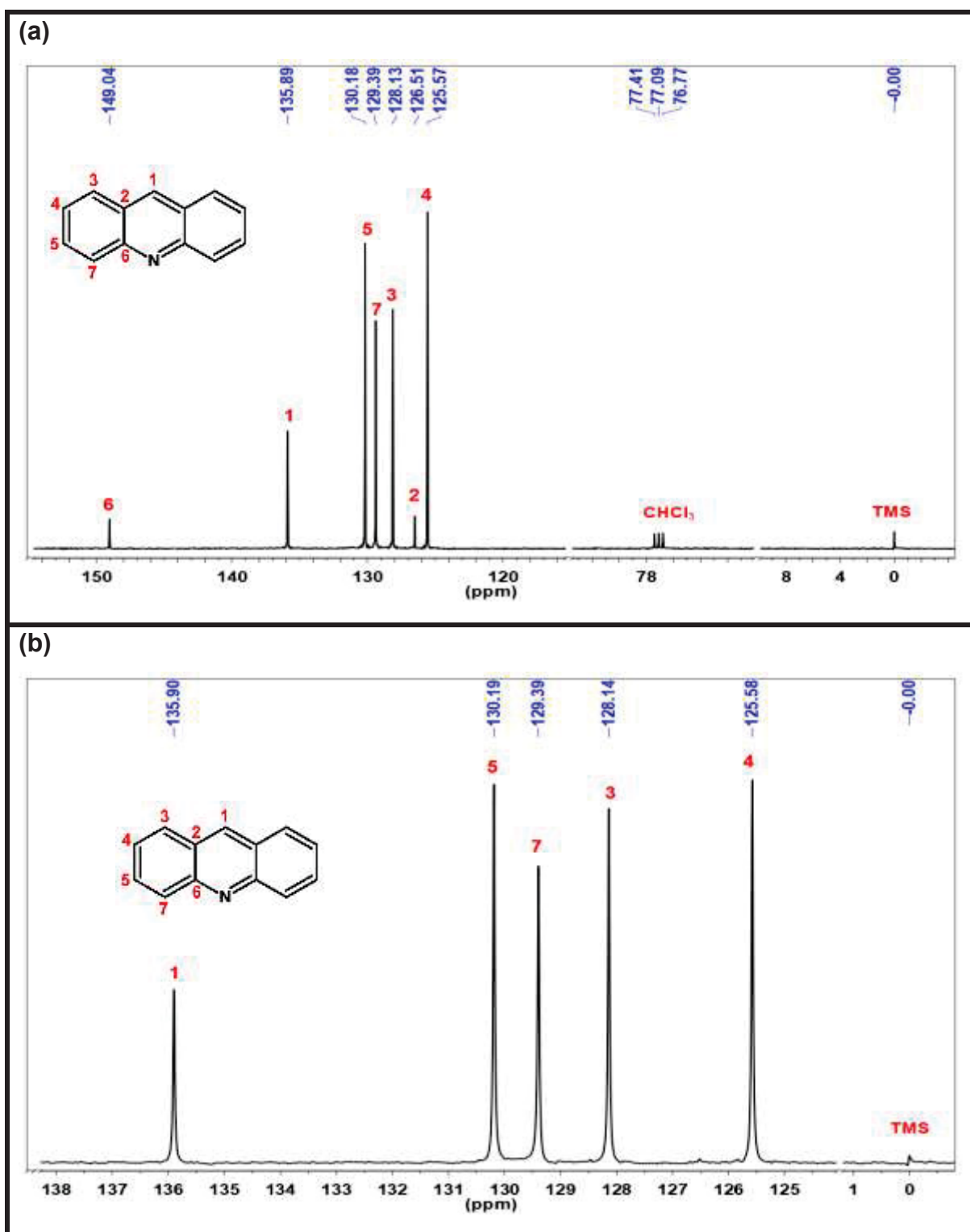


Figura 8. Espectro de ^{13}C -RMN da acridina em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.

4.1.3. Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS) e Espectroscopia de Fluorescência

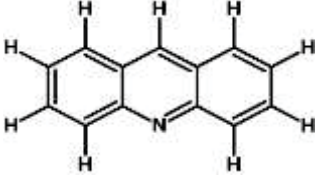
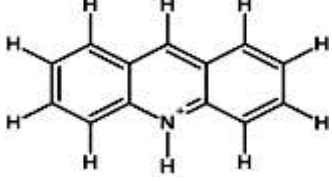
Na **Figura 9(a)** estão representados os espectros UV-VIS da *acridina* à 1×10^{-4} mol L⁻¹ em *EtOH* e com a adição de ácido clorídrico (*HCl*) (1 mol L⁻¹), mostrando os comprimentos de onda máximos de absorção em 250 e 356 nm, além de uma extensão da banda acima de 400 nm em meio ácido, o que não ocorre em meio neutro. Com isso, pode-se inferir que a *acridina* em meio ácido, possivelmente esteja protonada como íon *acridínio*, resultando em um perfil de absorção diferenciado da forma não-protonada da *acridina*. Além disso as bandas foram atribuídas à transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, observadas em sistemas aromáticos, com valores de absorvidade molar de 5×10^3 e 2×10^3 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente para as bandas (**Figura 9 (b)**) [125].

Alguns trabalhos da literatura já mostram esse perfil espectral para o fluoróforo [1,7,48,126], e com o objetivo de esclarecer essa atribuição, realizou-se cálculos teóricos *TD-DFT* (*time dependent density functional theory*) para obter os espectros de absorção UV-VIS simulados da *acridina* (**Figura 9 (c)**) e íon *acridínio* (**Figura 9 (d)**). Os espectros simulados mostraram que a protonação da *acridina* leva a um aumento da intensidade da banda em aproximadamente 300 nm. O espectro experimental mostrou uma intensificação da banda em torno de 350 nm. A diferença observada pode ser atribuída a efeitos do solvente, uma vez que os cálculos foram realizados com a molécula no vácuo. Além disso, foi possível fazer a atribuição dessas transições com relação aos orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO*, como mostra a **Tabela 6**, bem como na **Tabela 7** observar os orbitais envolvidos nas transições e as estruturas otimizadas das espécies *acridina* e *acridínio*, por CAM-B3LYP/6-311G(D,P).

Tabela 6. Transições eletrônicas obtidas por *TD-DFT* para *Acridina/Acridínio* (Ac/AcH). Sendo: f= força do oscilador.

λ (nm)	f	Transição
329 / 365	0,075 / 0,05	HOMO $\rightarrow$ LUMO
297 / 304	0,060 / 0,26	HOMO -1 $\rightarrow$ LUMO
220 / 220	1,904 / 1,36	HOMO $\rightarrow$ LUMO +1

Tabela 7. Orbitais de fronteira participantes das transições observadas nos espectros de absorção *UV-VIS* e estruturas otimizadas de *acridina* (Ac) e *acridínio* (AcH), obtidos por *TD-DFT*. As cores indicam as fases de função de onda calculada.

	ACRIDINA	ACRIDÍNIO
COMPOSTO		
ESTRUTURA OTIMIZADA		
HOMO-1		
HOMO		
LUMO		
LUMO+1		

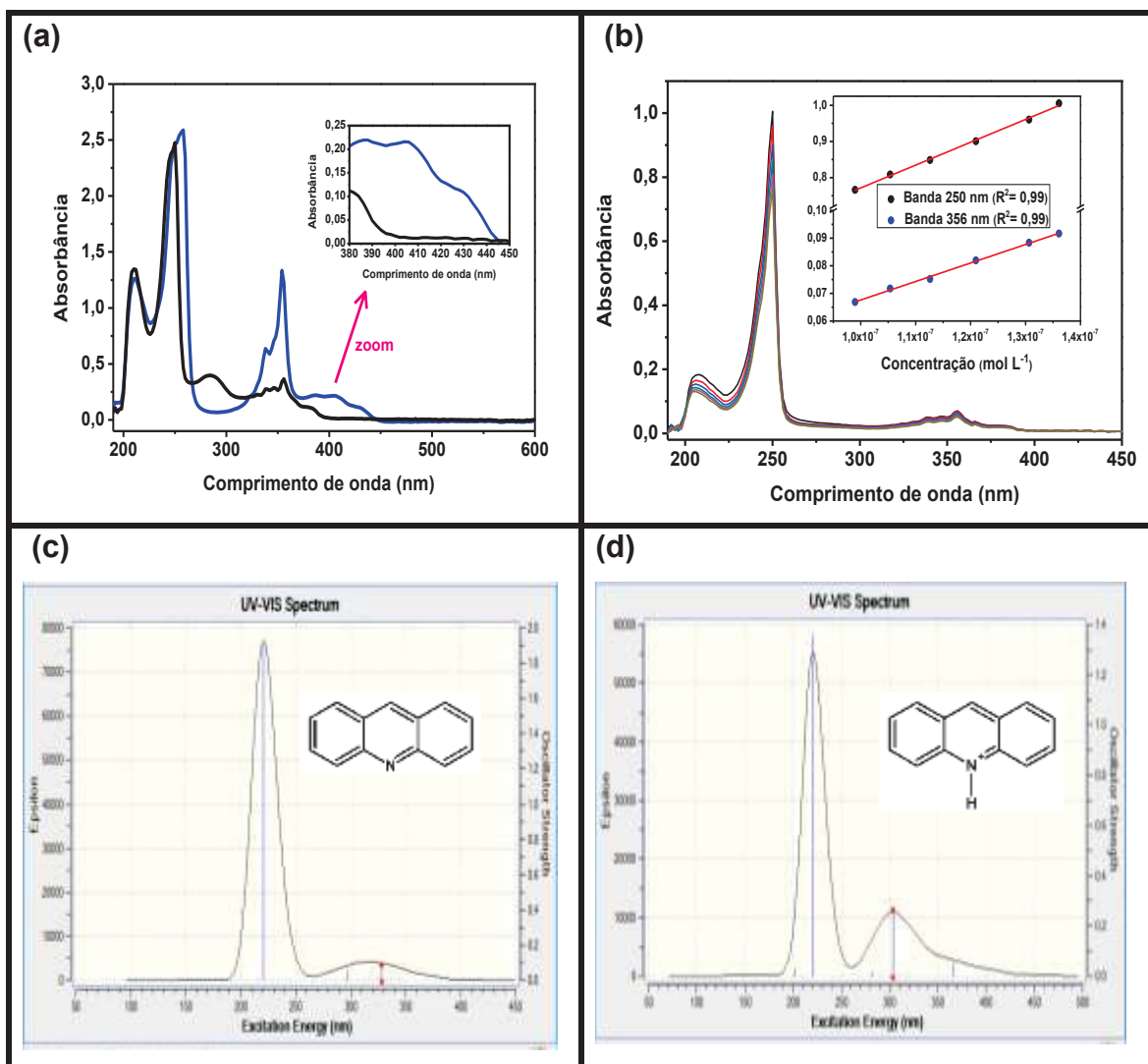


Figura 9. (a) Espectro de absorção UV-VIS de *acridina* (1×10^{-4} mol L $^{-1}$) em *EtOH* (preto) e *EtOH* em meio ácido (~pH 2) (azul) e *EtOH*. (b) Espectro de absorção UV-VIS da *acridina* em *EtOH*. (c) e (d) Espectro de absorção UV-VIS simulado (TD-DFT) da *acridina* (Ac) e *acridínio* (AcH), respectivamente.

Foi realizado um estudo do comportamento fluorescente da *acridina* em diversas concentrações, de 1×10^{-2} à 1×10^{-6} mol L $^{-1}$, em *EtOH* com a adição de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) (1 mol L $^{-1}$); com isso foi possível observar que o composto em meio básico apresenta maior intensidade fluorescente quando comparado aos demais casos, no qual a concentração que fornece o maior rendimento quântico é igual a 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ (**Figura 10(a)**). Isto é observado muito provavelmente devido ao fato de que em meio básico a *acridina* esteja desprotonada, apresentando menor grau de liberdade, portanto, estando mais rígida, e desta forma acaba perdendo menos energia por processos não-radiativos

(conversão interna, cruzamento intersistemas e/ou relaxação vibracional) e aumentando sua eficiência quântica [1,7]. A **Figura 10(b)** mostra os espectros de emissão fluorescente da *acridina* à 1×10^{-4} mol L⁻¹ nos diferentes meios, no qual o comprimento de onda máximo de emissão em 415 nm corresponde a solução em meio básico, e em 477 nm para meio ácido, o que nos permite observar um deslocamento batocrômico (*red-shift*) de 62 nm para o íon *acridínio* [48,51].

Além dos resultados teóricos inicialmente descritos para o comportamento de absorção UV-VIS, pode-se também discutir o perfil dos espectros de emissão fluorescente das espécies *acridina* e *acridínio*, e relacionar os comprimentos de onda máximos obtidos experimentalmente com o “*band gap*” de energia entre os orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO*, obtidos pelos cálculos teóricos realizados (*TD-DFT*). A **Figura 11(b)** ilustra os orbitais *HOMO* e *LUMO* para *acridina* e *acridínio* envolvidos nas transições de emissão fluorescente, com as suas respectivas energias dadas em elétron-volt (eV). O deslocamento batocrômico do íon *acridínio* pode ser explicado com base no trabalho de Förster, em 1949, a fim de compreender a alteração do espectro de emissão em função do pH de *1-naftilamina-4-sulfonato* [127-131]. A **Figura 11(a)** mostra o diagrama do *Ciclo de Förster* [1,132] em que no estado excitado o equilíbrio ácido-base gera um pK_a maior ($pK_a^* = 10,7$) que no estado fundamental ($pK_a = 5,45$), sugerindo que haja maior tendência da protonação da *acridina* após a absorção de energia [1].

Sabendo que o espectro de emissão da *acridina* em meio ácido e em meio básico são diferentes (deslocadas ≈ 62 nm), pode-se sugerir que o decaimento fluorescente ocorre muito mais rapidamente do que o processo de associação ou dissociação de prótons no estado excitado. Logo, os resultados sugerem que as moléculas excitadas que emitem têm sua origem em moléculas de *acridina* que sofreram equilíbrio de protonação e desprotonação no estado fundamental, e o espectro de emissão pode ser usado para distingui-las.

Tabela 8. Energias (eV) dos orbitais *HOMO* e *LUMO* para *acridina* (Ac) e íon *acridínio* (AcH) obtidos teoricamente (*TD-DFT*), e sua relação com o comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) obtido experimentalmente para ambas as espécies.

DADOS	<i>Acridina</i>	<i>Acridínio</i>
HOMO (eV)	-7,232	-11,778
LUMO (eV)	-1,089	-5,869
Band gap (eV) (teórico)	6,143	5,909
λ_{em} (máx) (experimental)	415	477

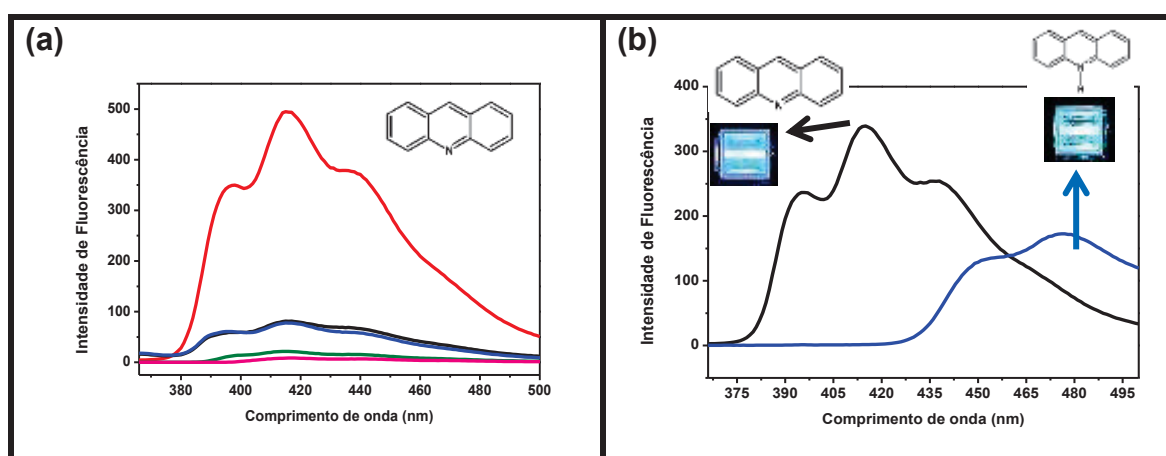


Figura 10. (a) Espectro de emissão fluorescente em diferentes concentrações de *acridina*: 1×10^{-4} mol L⁻¹ (vermelho), 1×10^{-5} mol L⁻¹ (preto), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (azul), 1×10^{-3} mol L⁻¹ (verde), 1×10^{-2} mol L⁻¹ (rosa). (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm). Slit 3-3 nm. (b) Espectro de emissão fluorescente de *acridina* (1×10^{-4} mol L⁻¹) em EtOH (preto), EtOH em meio ácido (~pH 2) (azul), EtOH em meio básico (~pH 11) (vermelho). (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm (meio básico) e 477 nm (meio ácido)). Slit 3-3 nm. (Inset: fotografias das cubetas no momento da obtenção dos espectros em meio ácido e em meio básico).

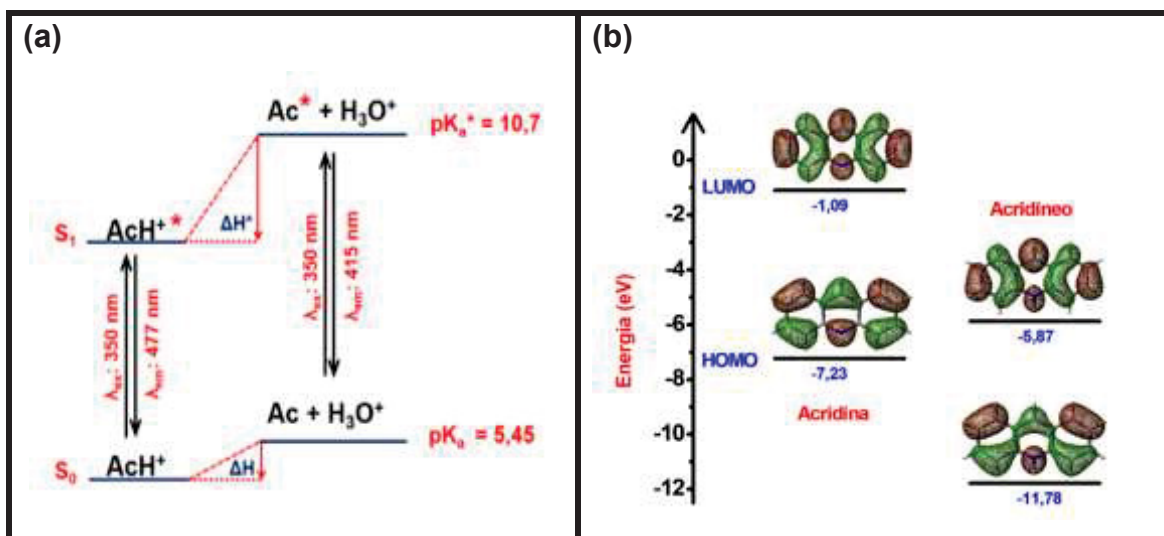


Figura 11. (a) Ciclo de Förster para o equilíbrio *acridina* (Ac) e *acridínio* (AcH), representando o estado fundamental e excitado (asterisco). Sendo: pK_a e pK_a^* = logaritmo negativo da constante de equilíbrio ácida, no estado fundamental e excitado, respectivamente. ΔH e ΔH^* = entalpia de dissociação do ácido, no estado fundamental e excitado, respectivamente. (b) Composição dos orbitais *HOMO* e *LUMO* para *acridina* e *acridínio*, envolvidos nas transições de emissão fluorescente.

A **Figura 12(a)** mostra a relação entre os espectros de absorção *UV-VIS*, excitação e emissão fluorescente nas mesmas condições, portanto, concentração 1×10^{-4} mol L⁻¹, em *EtOH*, justamente para que a comparação dos espectros fosse aceitável, tendo interferências mínimas nas medidas. Neste caso, os máximos de absorção e excitação fluorescente, bem como a estrutura fina das bandas, praticamente não apresentam diferença significativa, o que nos permite supor que o mesmo estado excitado participe nos dois eventos ópticos.

Também testou-se o efeito que diferentes solventes poderiam acarretar na emissão fluorescente da *acridina*. A **Figura 12(b)** mostra que, na concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹, os solventes etanol e metanol (álcoois) favorecem os processos radiantes quando comparados com solventes como dimetilsulfóxido (*DMSO*), tetraidrofurano (*THF*), *N,N*-dimetilformamida (*DMF*), acetonitrila, clorofórmio e acetona. Essa propriedade pode ser explicada pelo fato da ocorrência de ligações de hidrogênio no estado excitado, conferidas pelos álcoois. Sabe-se que a solubilidade da *acridina* em água é baixa ($1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), indicando que as ligações de hidrogênio no estado fundamental são negligenciáveis [74], e como já discutido anteriormente, o estado excitado é mais básico que o estado fundamental, no

equilíbrio ácido-base do composto, desta maneira há um favorecimento das ligações de hidrogênio no estado excitado, o que explica a maior eficiência quântica da *acridina* observada em álcoois, especialmente etanol.

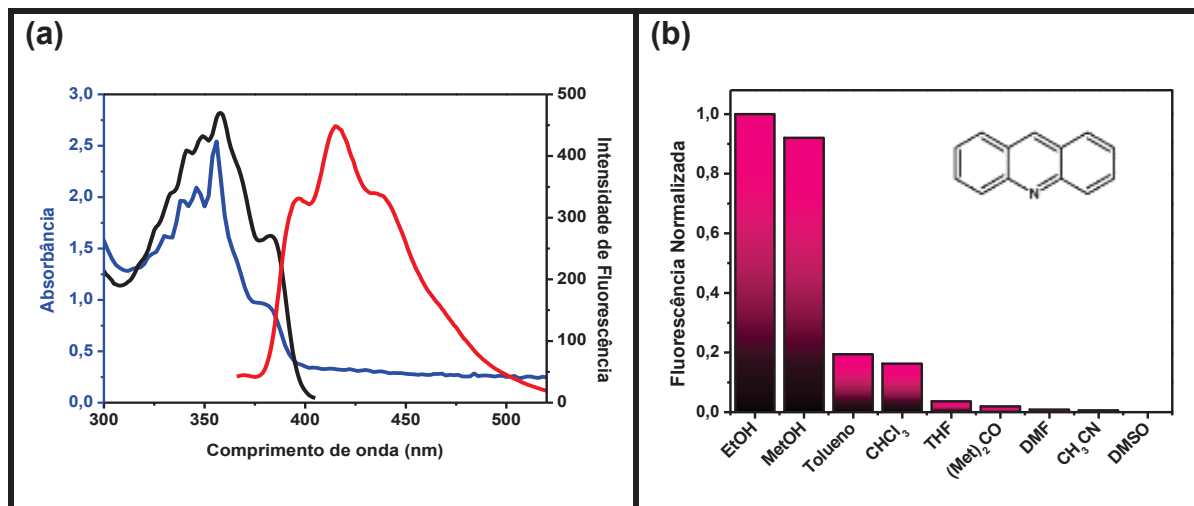


Figura 12. (a) Espectro de absorção UV-VIS (azul), excitação fluorescente (linha preta) e emissão fluorescente (linha vermelha) de *acridina* ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em *EtOH* (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm). Slit 3-3 nm. (b) Comportamento Fluorescente de *acridina* ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes solventes (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 415 nm). Slit 3-3 nm.

4.2. Precursores e ligantes

4.2.1. Síntese e caracterização de 4,5-bisbromometilacridina (BBMA), 4,5-bisphthalimidoacridina (BPMA), 4,5-bisaminometilacridina (BAMA) e ligantes MAC, DAC e TAC

Por se tratarem de ligantes inéditos na literatura, a síntese de MAC, DAC e TAC tiveram como base alguns compostos análogos trazidos por autores como Puccioni [103], Park [36], Carole [114] e colaboradores. A síntese de MAC foi realizada com 2 rotas sintéticas distintas, na qual o objetivo principal era aumentar o rendimento final em massa do ligante. No entanto, a primeira rota, de etapa única, apresentou rendimento superior à segunda, assim, toda caracterização discutida nessa sessão acerca deste ligante e sua investigação fluorescente, foi realizada a partir da rota 1 descrita para MAC na sessão experimental. A caracterização dos ligantes se deu por meio de análise elementar (CHN), espectroscopia vibracional (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (ESI-MS), espectroscopia de absorção UV-VIS e fluorescência, incluindo cálculos teóricos. A síntese dos

compostos *BBMA*, *BPMA* e *BAMA* se deu com base em trabalhos já descritos na literatura, como Zhang e colaboradores [111], Hess e Stewart [112], Laronze-Cochard e colaboradores [113]; no entanto, tiveram que ser adaptadas, baseadas em outras rotas de obtenção desses compostos [133-135]; o que rendeu muitos testes até atingirmos rendimentos satisfatórios em sínteses robustas. É interessante pontuar que em 2019 nosso grupo de pesquisa, através do trabalho de mestrado do aluno Marcelo Nunes, publicou um estudo do precursor *BAMA* como quimiossensor para íons zinco(II) em água [100]. Mais recentemente, em 2020, pela autora deste trabalho, o precursor *BPMA* foi estudado na aplicação como quimiossensor de íons alumínio(III) em meio orgânico [105]. Os principais resultados estão sumarizados no **ANEXO 3** deste trabalho e não serão discutidos aqui de forma aprofundada. Ambos foram validados através de testes estatísticos mostrando serem altamente sensíveis, robustos, reversíveis, repetitivos, reprodutíveis, e os testes de recuperação mostraram resultados satisfatórios para o uso do sensor *BAMA* na identificação de íons zinco(II) em várias fontes de água, bem como, para o uso do sensor *BPMA* na detecção de íons alumínio(III) em amostras alcoólicas.

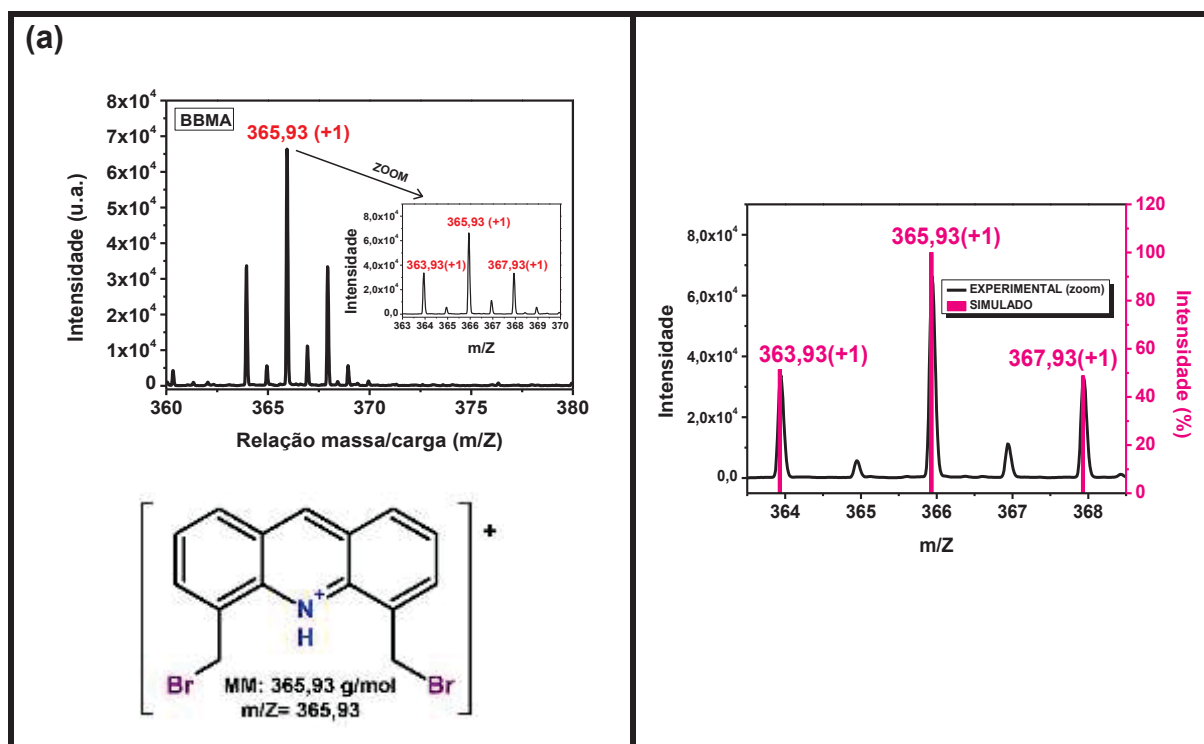
4.2.1.1. Análise elementar (*CHN*), espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho (*FTIR*) e espectroscopia de massas (*ESI-MS*)

A **Tabela 9** apresenta a atribuição tentativa das principais bandas dos espectros de *FTIR* (juntamente com os precursores) no qual suas energias estão de acordo com os grupos funcionais esperados em cada caso e corroboram com a proposta de formação dos compostos. Os espectros de massas obtidos (*ESI-MS+*) para os ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC*, sumarizados na **Tabela 10**, mostram que a obtenção dos ligantes foi confirmada, e suas atribuições estão coerentes com os picos moleculares e seus fragmentos, bem como, condizentes com a distribuição isotópica esperada e calculada pelo programa ChemDraw. A análise elementar (*CHN*) realizada forneceu os resultados mostrados na **Tabela 11**, respectivamente; sendo os valores entre parênteses os valores calculados com base em suas fórmulas moleculares esperadas, estando de acordo com os valores experimentais.

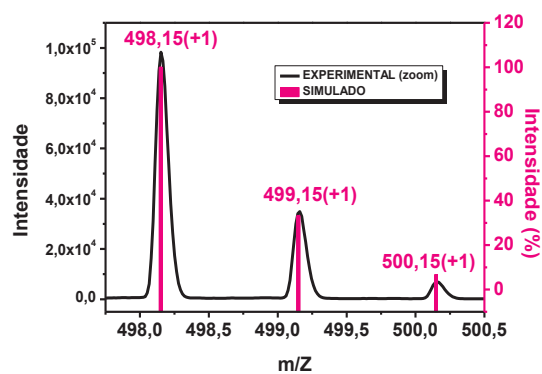
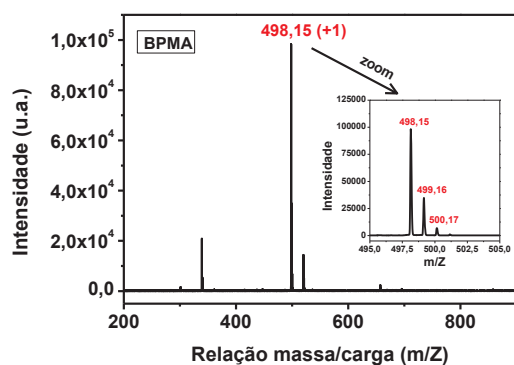
Tabela 9. Atribuição tentativa das principais bandas do espectro *FTIR* dos ligantes MAC, DAC, TAC, e precursores BBMA, BPMA e BAMA.

Modo vibracional	MAC Número de onda (cm ⁻¹)	DAC Número de onda (cm ⁻¹)	TAC Número de onda (cm ⁻¹)	precursores Número de onda (cm ⁻¹)
ν (C-H _{aromático})	3093 – 3010	3082 – 3007	3082 – 3007	3093 – 3010 –
ν (C=N _{imina})	1620	1615	1615	1625
ν (C=C _{aromático})	1554 – 1514 – 1461	1558 – 1530 - 1480	1558 – 1530 - 1480	1554 – 1514 – 1461
ν (C-N)	1139	1152	1152	1145
π (C=C _{aromático})	958 – 910 – 792 – 736	960 – 925 – 811 – 727	960 – 925 – 811 – 727	962 – 901 – 847 – 805 –

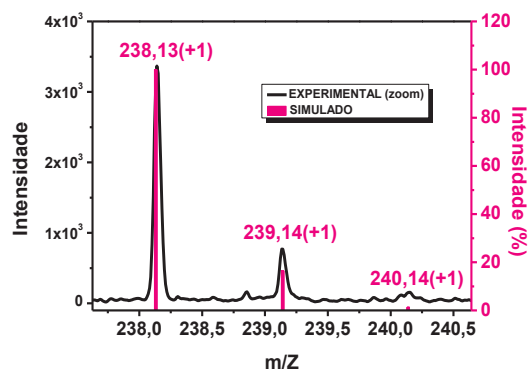
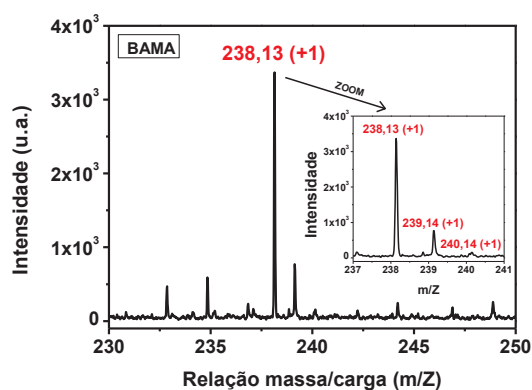
Tabela 10. Espectros de massas (modo positivo) para os precursores BBMA (a), BPMA (b), BAMA (c), e ligantes MAC (d), DAC (e), TAC (f); com as atribuições dos sinais obtidos referentes a relação massa/carga, e as comparações do perfil dos padrões isotópicos experimentais e calculados.

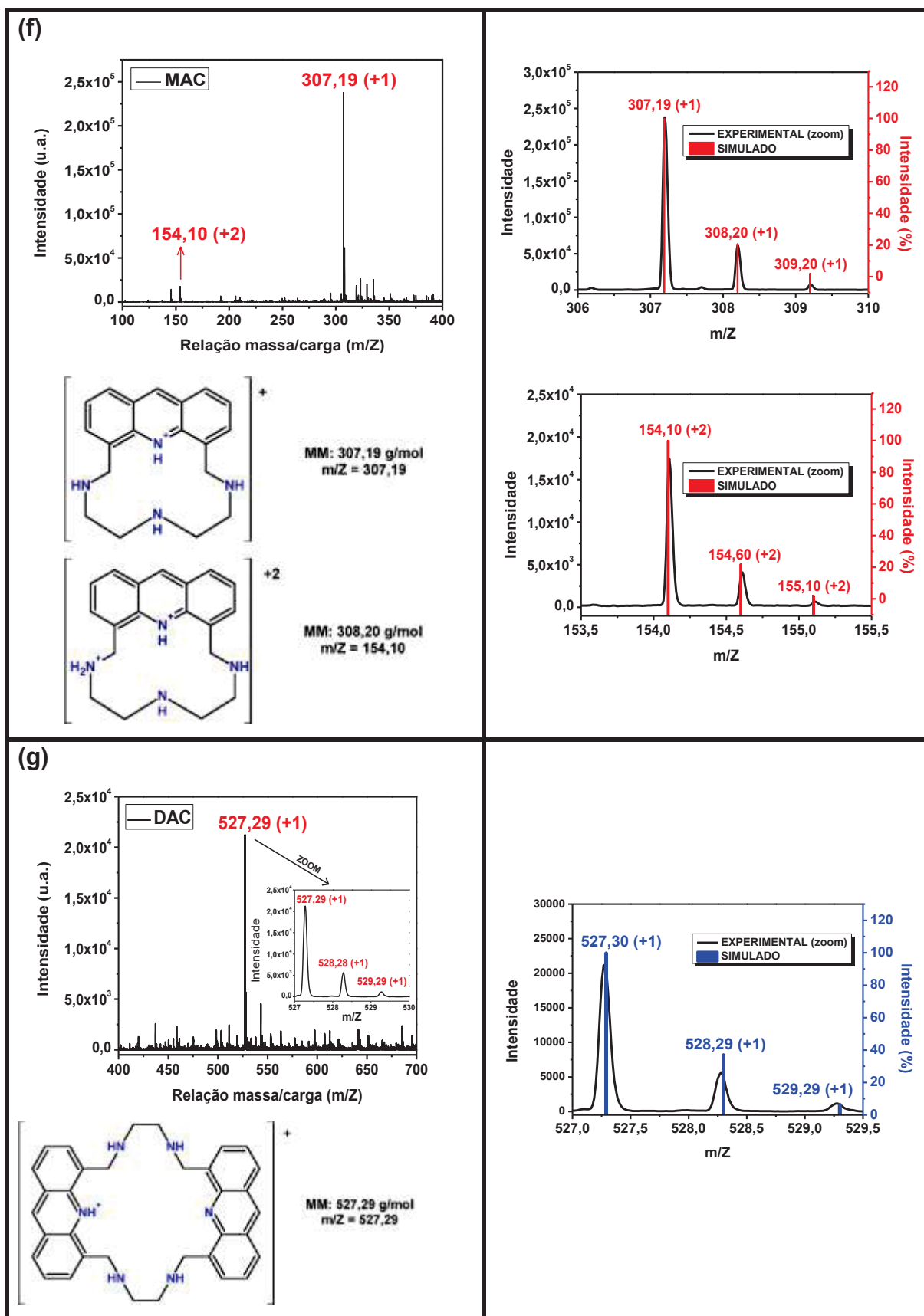


(b)



(c)





(h)

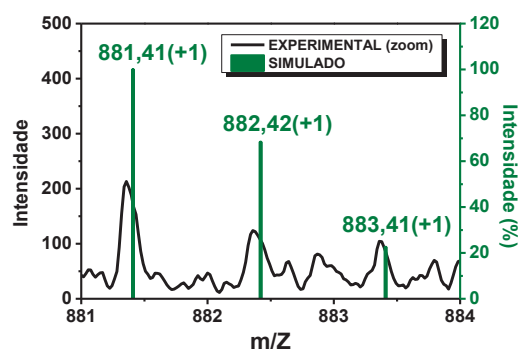
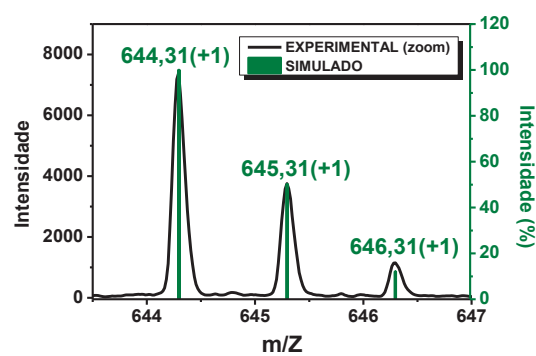
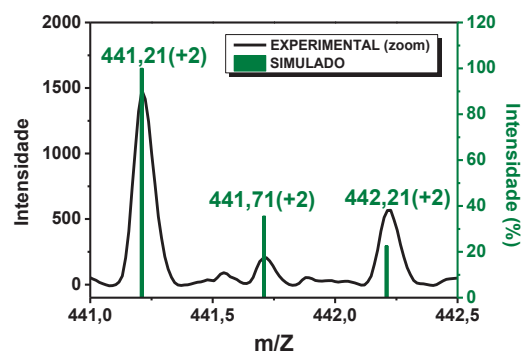
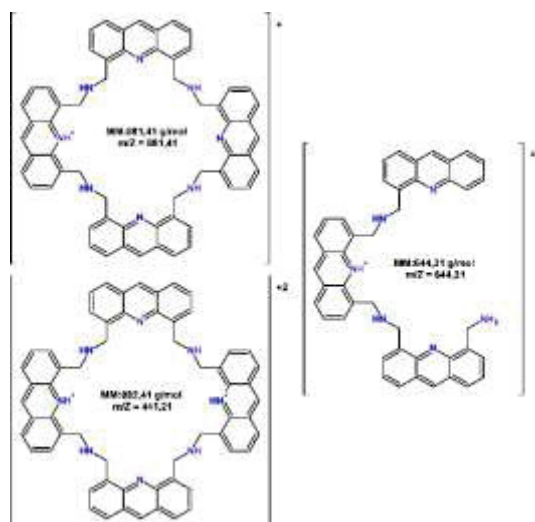
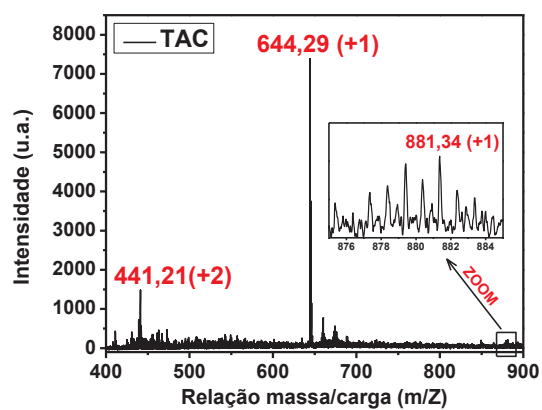


Tabela 11. Análise elementar (CHN) de MAC, DAC, TAC, BBMA, BPMA e BAMA, atribuída com base em suas fórmulas moleculares ilustradas.

COMPOSTOS	FÓRMULA	%C	%H	%N
MAC	$C_{19}H_{22}N_4 \cdot 1Me_2CO \cdot 0,5CHCl_3$	64,07 (63,71)	6,26 (6,77)	13,05 (13,21)
DAC	$C_{34}H_{34}N_6 \cdot 3H_2O \cdot 1Me_2CO \cdot 0,5CHCl_3$	60,19 (60,20)	6,16 (6,25)	10,39 (11,08)
TAC	$C_{60}H_{48}N_8 \cdot 3CHCl_3$	61,56 (61,06)	4,87 (4,15)	8,84 (9,05)
BBMA	$C_{15}H_{11}Br_2N \cdot 1,5H_2O$	45,64 (45,95)	3,20 (3,60)	3,57 (3,57)
BPMA	$C_{31}H_{19}N_3O_4 \cdot 3H_2O$	67,10 (67,51)	4,38 (4,57)	7,44 (7,62)
BAMA	$C_{15}H_{15}N_3 \cdot 1,5H_2O \cdot 2HCl$	53,54 (53,42)	5,93 (5,98)	12,24 (12,80)

4.2.1.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN)

As Figuras 13-15 e 17-19 mostram os espectros de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN referente aos precursores BBMA, BPMA e BAMA, respectivamente. Os deslocamentos químicos juntamente com a integração dos sinais são coerentes com as atribuições realizadas e com as composições apresentadas nas Tabelas 12-14. Os sinais que foram obtidos na região entre 7,26 ppm (singleto), 76 à 77 ppm (triplete) correspondem ao solvente clorofórmio usado nas análises [123]. Os perfis espectrais obtidos, para ambos os espectros, foram comparados com os valores encontrados na literatura e em simuladores [122] (incluindo o programa ChemDraw), e estão entre parênteses nas tabelas ao lado dos valores obtidos, mostrando coerência nas atribuições.

Como os ligantes macrocíclicos apresentam baixa solubilidade na maioria dos solventes, sendo solúveis apenas em $CHCl_3$ e com alguma dificuldade, a medida de RMN nesse solvente deuterado os torna ainda menos solúveis e impossibilita a obtenção de espectros com boa resolução. A alternativa encontrada foi promover a protonação dos ligantes, com ácido clorídrico, para que a medida pudesse ser

realizada em meio aquoso (D_2O). É importante salientar, que o ácido adicionado também contém água, mesmo que pouca, o que torna os sinais referente ao composto mais alargados, e a solubilidade ainda que favorecida não é totalmente alcançada, desta forma, os sinais dos espectros para *DAC* e *TAC* foram pouco distinguíveis. Essa estratégia foi bem empregada para o ligante *MAC*, e as **Figuras 16 e 20** ilustram o perfil espectral obtido nessas condições. Os deslocamentos químicos juntamente com a integração dos sinais são coerentes com as atribuições realizadas, e com a composição apresentada na **Tabela 15**. O sinal que foi obtido na região de 4,70 ppm (singleto alargado) corresponde ao sinal da água usado na análise [123]. O perfil espectral foi comparado com os valores encontrados na literatura para sistemas análogos [103] e estão entre parênteses nas tabelas ao lado dos valores obtidos, mostrando coerência nas atribuições.

Tabela 12. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de *BBMA*. (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem *DEPT135* de *BBMA*.

(a)	^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
	5	5,40 (4,56)	Singleto (s)	4,00 (4H)
	3	7,44 – 7,48 (7,54)	Multipleto (m)	2,00 (2H)
	4	7,89 – 7,94	Multipleto (m)	4,12 (4H)
	2	(7,78 – 7,99)		
	1	8,70 (8,77)	Singleto (s)	1,00 (1H)
(b)	^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm) (DEPT 135)	
	8	30,11 (30,8)	30,10	
	4	125,76 (125,61)	125,75	
	2	126,70 (126,55)	(NÃO APARECE)	
	7	127,45 (129,34)	(NÃO APARECE)	
	3	128,98 (128,15)	128,97	
	5	131,09 (130,24)	131,08	
	1	136,41 (135,98)	136,40	
	6	145,70 (149,01)	(NÃO APARECE)	

Tabela 13. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de BPMA. (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT135 de BPMA.

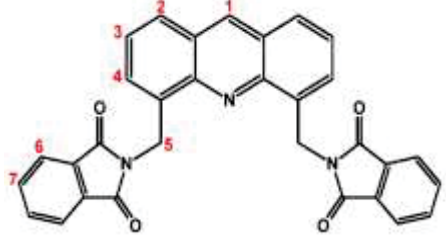
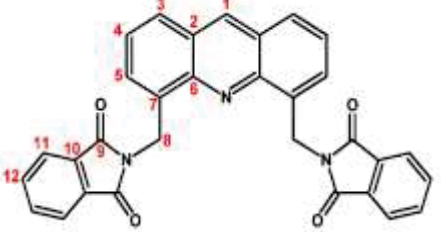
(a)		^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
		5	5,81 (5,65)	Singleto (s)	4,00 (4H)
		3	7,39 – 7,56 (7,54 – 7,78)	Multiplete (m)	4,20 (4H)
		4			
		6	7,70 – 7,92 (7,80 – 7,99)	Multipletos (m)	6,05 – 4,10 (10H)
		7			
		2			
		1	8,71 (8,77)	Singleto (s)	1,00 (1H)
(b)		^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm) (DEPT 135)	
		8	38,91 (40,5)	38,89 (NEGATIVO)	
		11	123,37	123,35	
		5	125,36	125,32	
		2	126,44	(NÃO APARECE)	
		4	127,54	127,44	
		3	127,69	127,66	
		10	132,34	(NÃO APARECE)	
		12	133,98	133,97	
		7	134,12	(NÃO APARECE)	
		1	136,26	136,23	
		6	146,03	(NÃO APARECE)	
		9	168,44	(NÃO APARECE)	

Tabela 14. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de BAMA. (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT135 de BAMA.

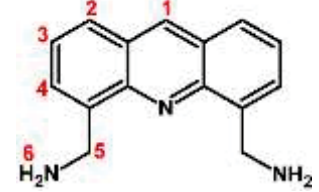
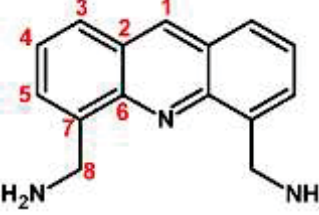
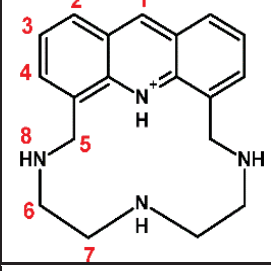
(a)		^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
		5	4,83 (4,36)	Singleto (s)	4,10 (4H)
		3	7,62 – 7,66 (7,54)	Tripleto (t)	2,05 (2H)
		4	7,94 – 7,96 (7,78)	Dubleto (d)	2,15 (2H)
		2	8,12 – 8,14 (7,99)	Dubleto (d)	2,10 (2H)
		1	8,62 (8,77)	Singleto (s)	1,00 (1H)
		6	NA	NA	NA (4H)
(b)		^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm) (DEPT 135)	
		8	40,28 (44,0)	40,28	
		4	125,75 (125,61)	125,74	
		2	126,42 (126,55)	(NÃO APARECE)	
		3	130,75 (128,15)	130,44	
		7	129,32 (129,34)	(NÃO APARECE)	
		5	132,62 (130,24)	132,61	
		1	138,68 (135,98)	138,67	
		6	145,53 (149,01)	(NÃO APARECE)	

Tabela 15. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN do ligante $[\text{MAC}]^+$. Entre parênteses o valor esperado aproximado. **(b)** Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT90 de $[\text{MAC}]^+$. Entre parênteses o valor esperado aproximado.

(a)	^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
	8	Ausente	-	- (4H)
	7	3,23-3,25 (3,35)	Tripleto (t)	4,10 (4H)
	6	3,47-3,50 (3,57)	Tripleto (t)	4,27 (4H)
	5	4,90 (5,07)	Singleto (s)	3,93 (4H)
	3	7,70-7,67 (7,71)	Tripleto (t)	2,14 (2H)
	4	8,04-8,06 (8,05)	Dupleto (d)	2,14 (2H)
	2	8,25-8,27 (8,30)	Dupleto (d)	1,99 (2H)
	1	9,14 (9,21)	Singleto (s)	1,00 (1H)
(b)	^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm) (DEPT 90)	
	10	42,97 (42,00)	42,97	
	9	47,03 (46,90)	47,03	
	8	47,49 (47,94)	47,49	
	3	125,86 (126,17)	125,85	
	7	126,73 (126,82)	(NÃO APARECE)	
	6	128,35 (128,08)	(NÃO APARECE)	
	4	131,22 (131,51)	131,21	
	5	134,52 (133,91)	134,51	
	2	134,87 (135,06)	(NÃO APARECE)	
	1	139,35 (140,84)	(NÃO APARECE)	

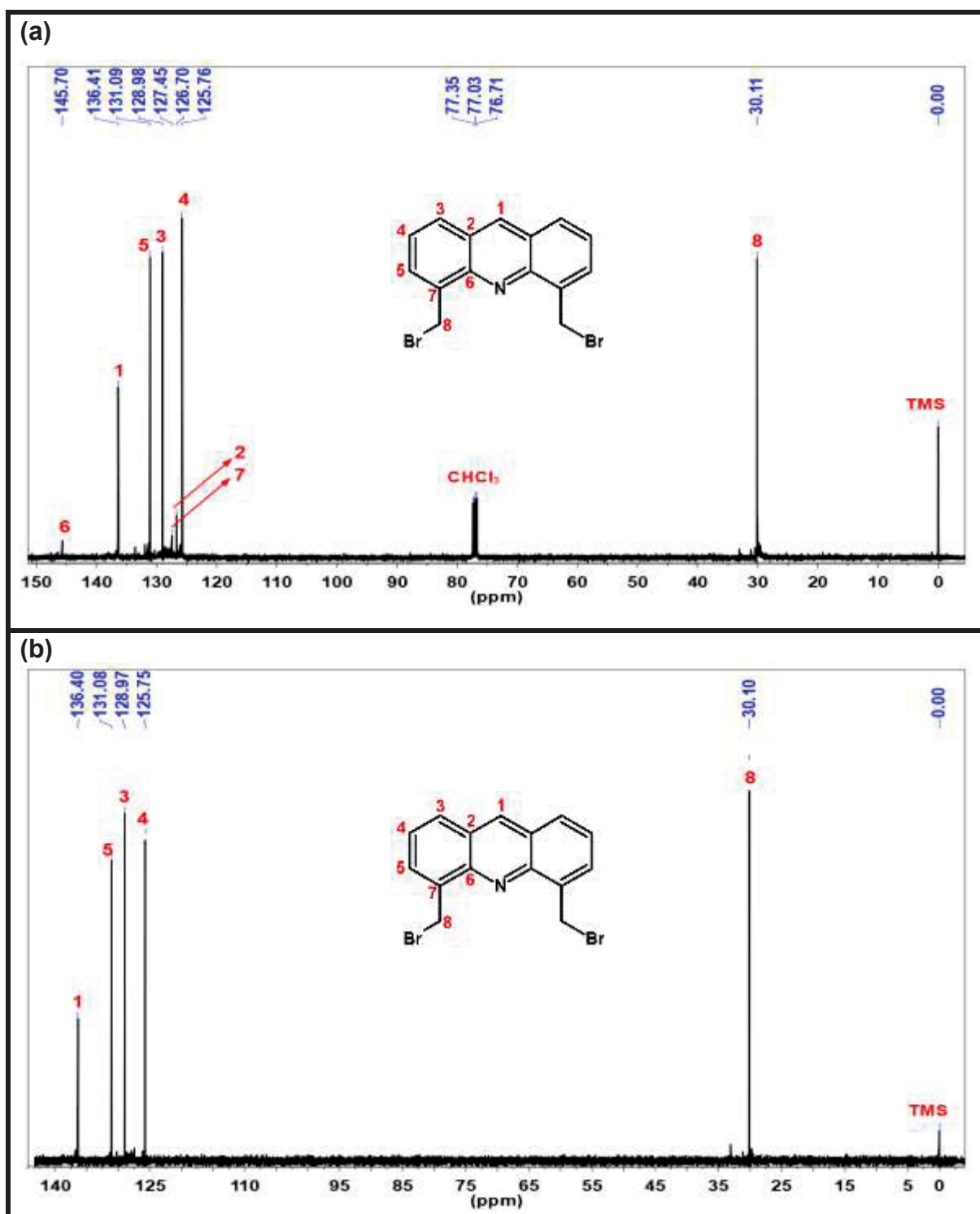


Figura 13. Espectro de ^{13}C -RMN de BBMA em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.

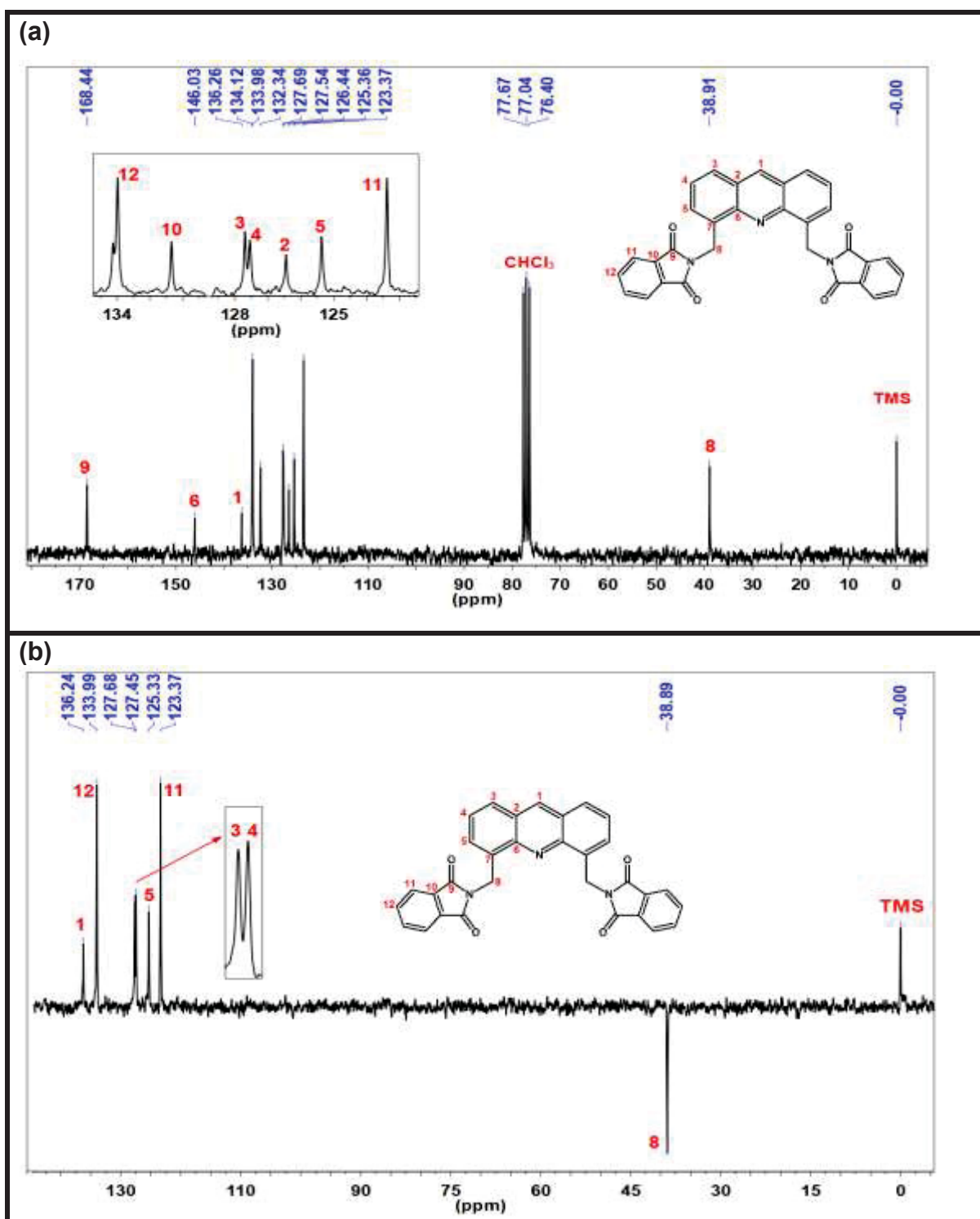


Figura 14. Espectro de ^{13}C -RMN de BPMA em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.

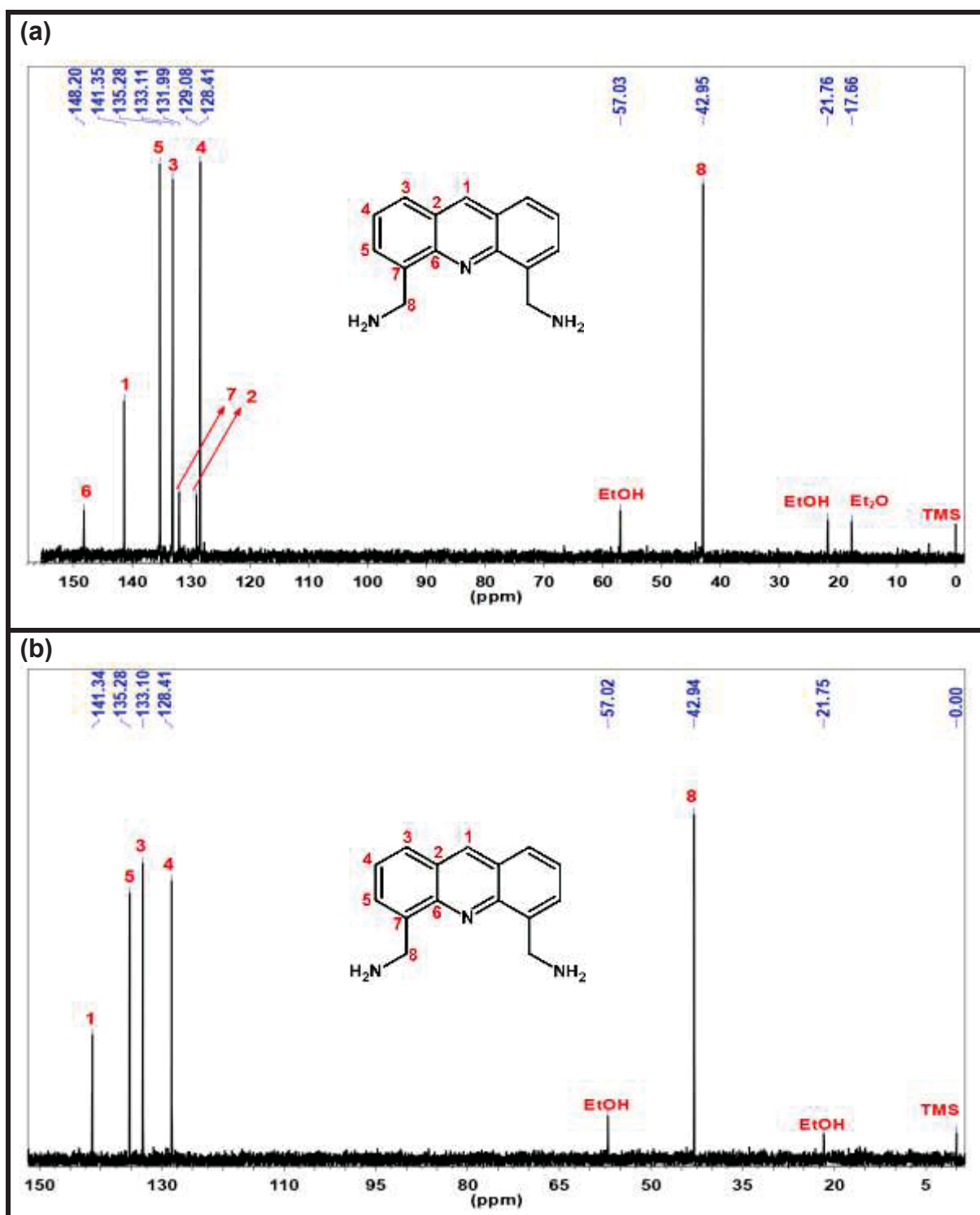


Figura 15. Espectro de ^{13}C -RMN de BAMA em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.

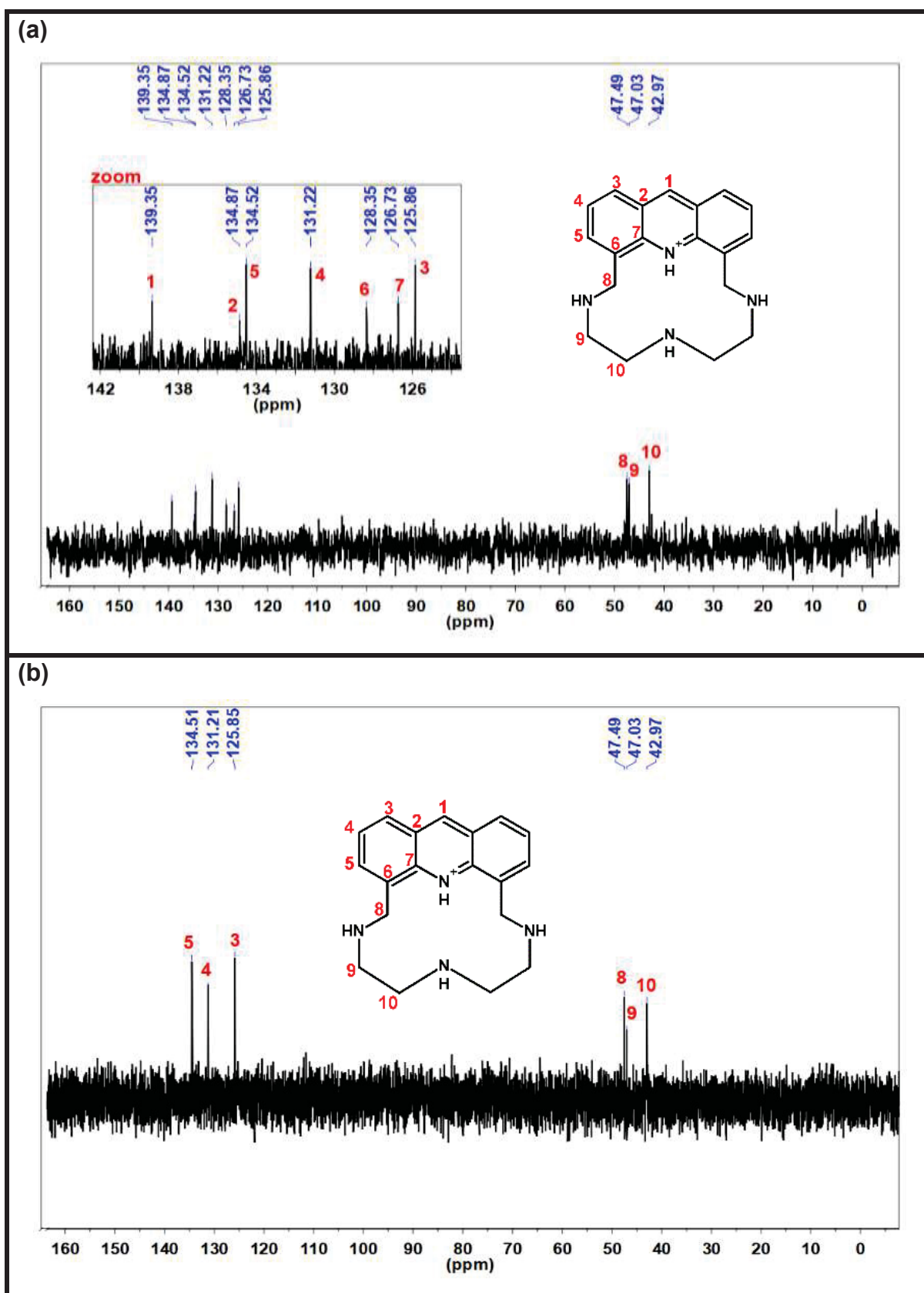


Figura 16. Espectros de ^{13}C -RMN para o ligante $[\text{MAC}]^+$ em D_2O acidificado com HCl , em (a) com e (b) sem DEPT90 .

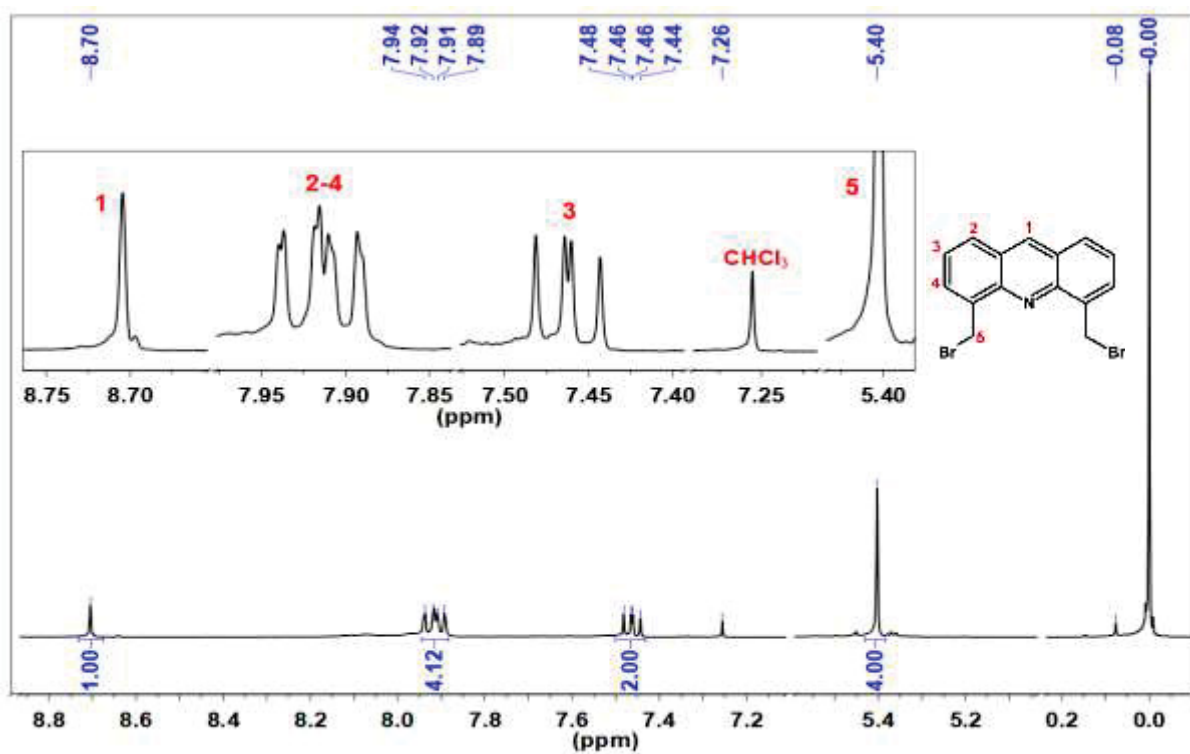


Figura 17. Espectro de ^1H -RMN para BBMA.

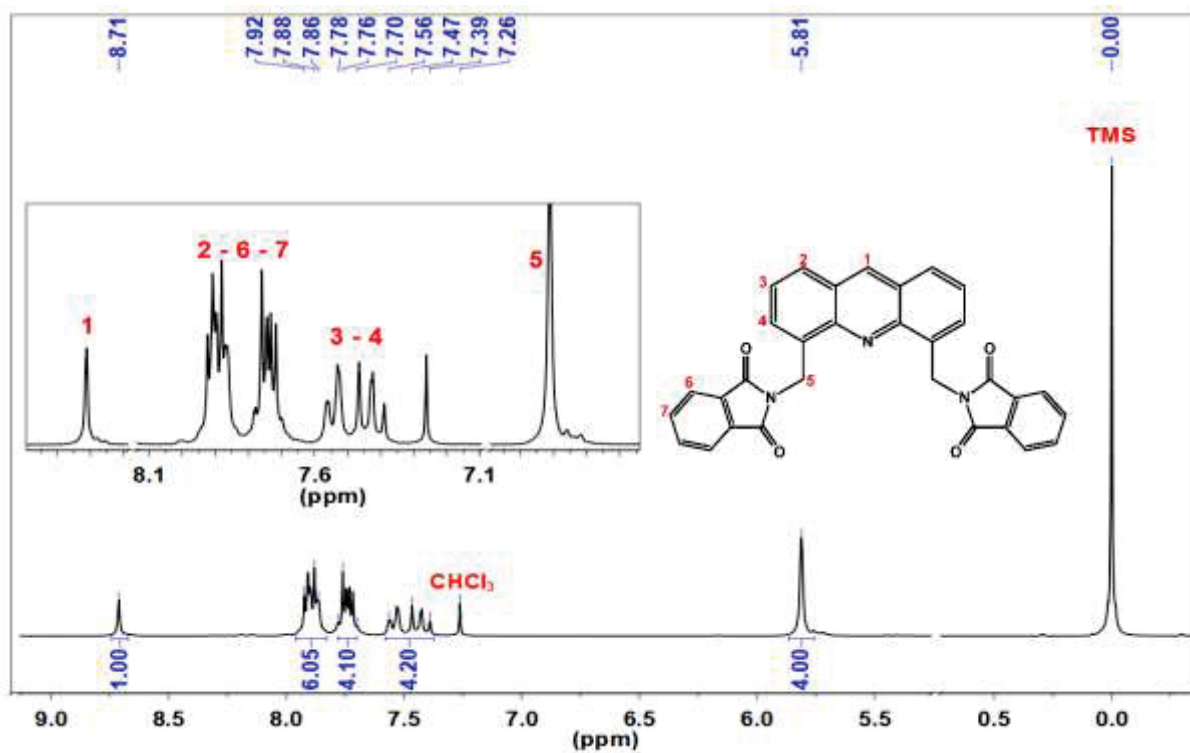


Figura 18. Espectro de ^1H -RMN para BPMA.

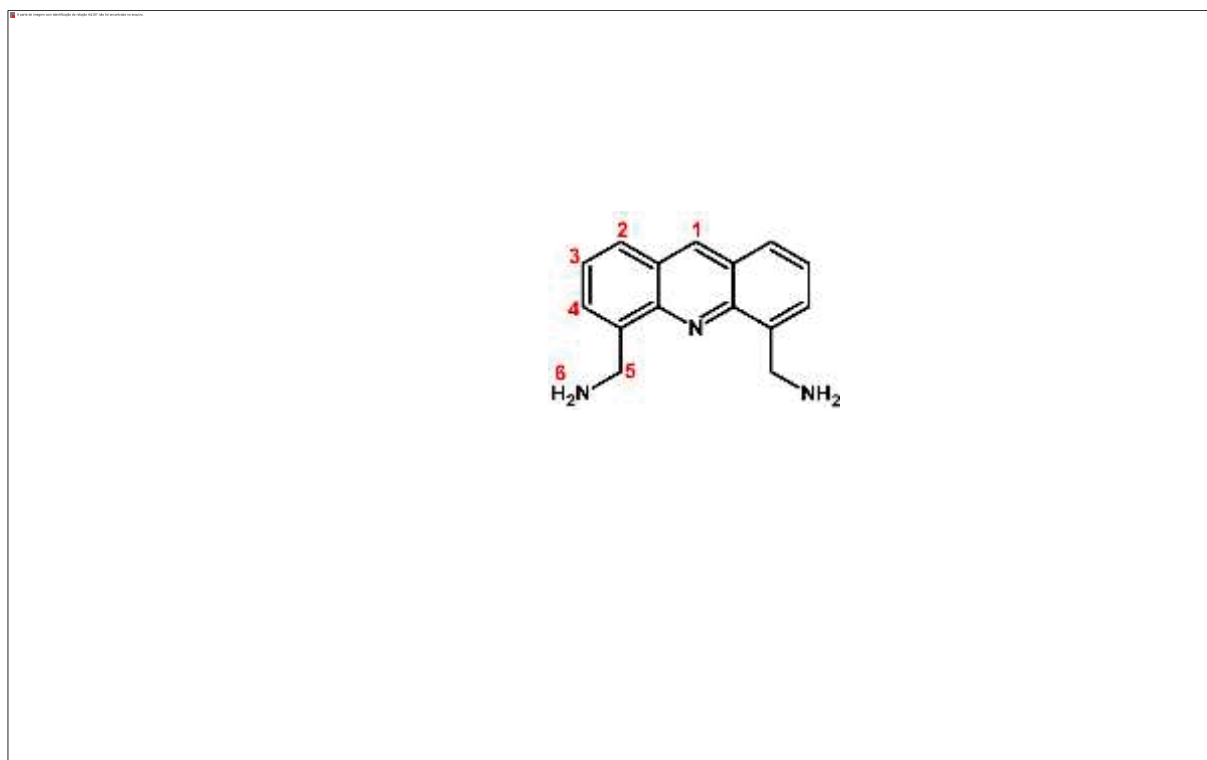


Figura 19. Espectro de ^1H -RMN para BAMA.

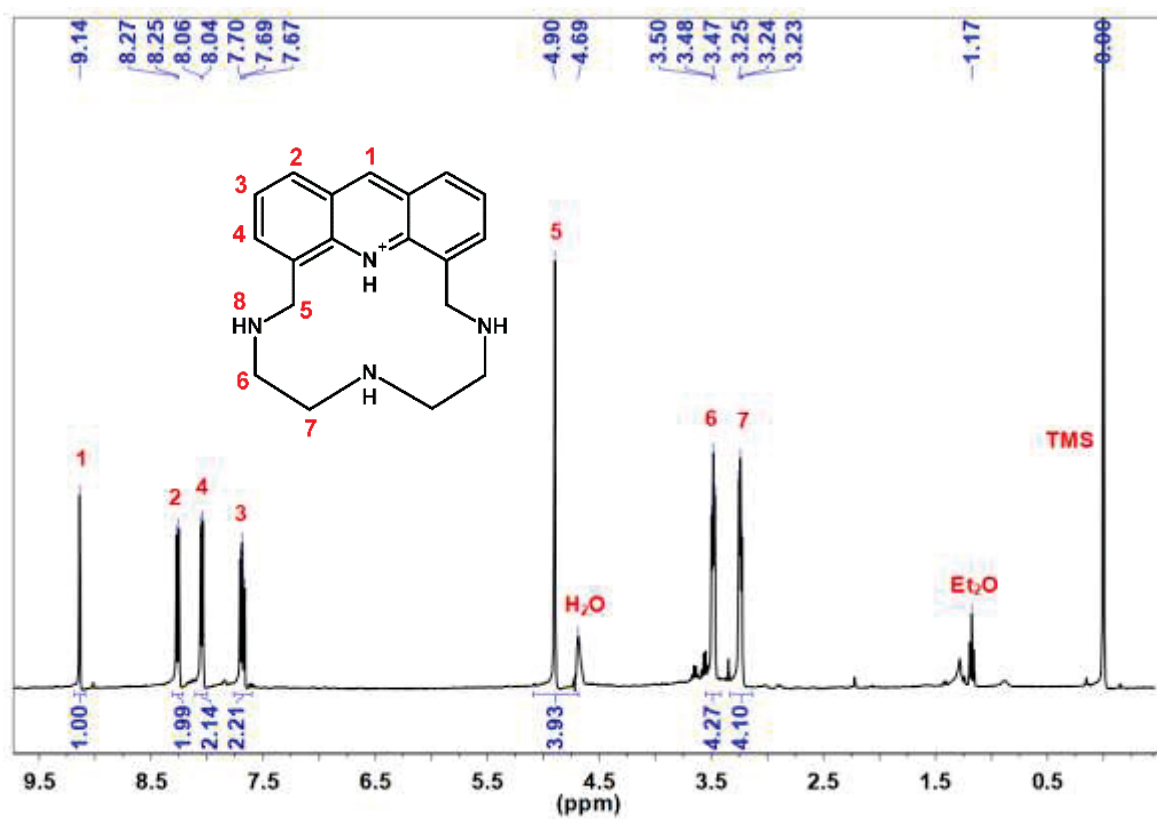


Figura 20. Espectro de ^1H -RMN “pré-saturado” para o ligante $[\text{MAC}]^+$ em D_2O acidificado com HCl .

4.3. Ligantes

4.3.1. Espectroscopia de fluorescência e espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS) para os ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC*

A **Figura 21(a)** ilustra o espectro de absorção UV-VIS dos ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC*, no qual é possível observar que o perfil espectral é muito semelhante entre eles, com uma banda mais intensa em 258 nm e valores de absorvidade molar de $1,27$, $2,38$ e $2,42 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente, bem como, outra banda de menor intensidade na região de 360 nm com valores de absorvidade molar de $1,40$, $2,33$ e $3,71 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente. As bandas foram atribuídas à transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, observadas em sistemas aromáticos [125], e coincidente com o perfil do fluoróforo (*acridina*). Para uma melhor compreensão das transições eletrônicas observadas nos ligantes macrocíclicos *MAC*, *DAC* e *TAC*, realizou-se cálculos mecânico-quânticos e após etapa de otimização de geometria utilizando a teoria do funcional densidade (B3LYP/6-311g(d,p)), foram simulados os espectros de eletrônicos utilizando a *TD-DFT* [136]. Os espectros simulados (**Figura 21(a)**) mostraram grande similaridade com os perfis experimentais, e possibilitou a atribuição das transições com relação aos orbitais de fronteira, como mostra a **Tabela 16**. É interessante notar que os orbitais envolvidos em todas as transições são do mesmo tipo e forma para todos os ligantes. A **Tabela 17** ilustra a composição dos orbitais envolvidos nas transições, e a **Figura 22** traz as estruturas otimizadas das espécies *MAC*, *DAC* e *TAC*, por *DFT*.

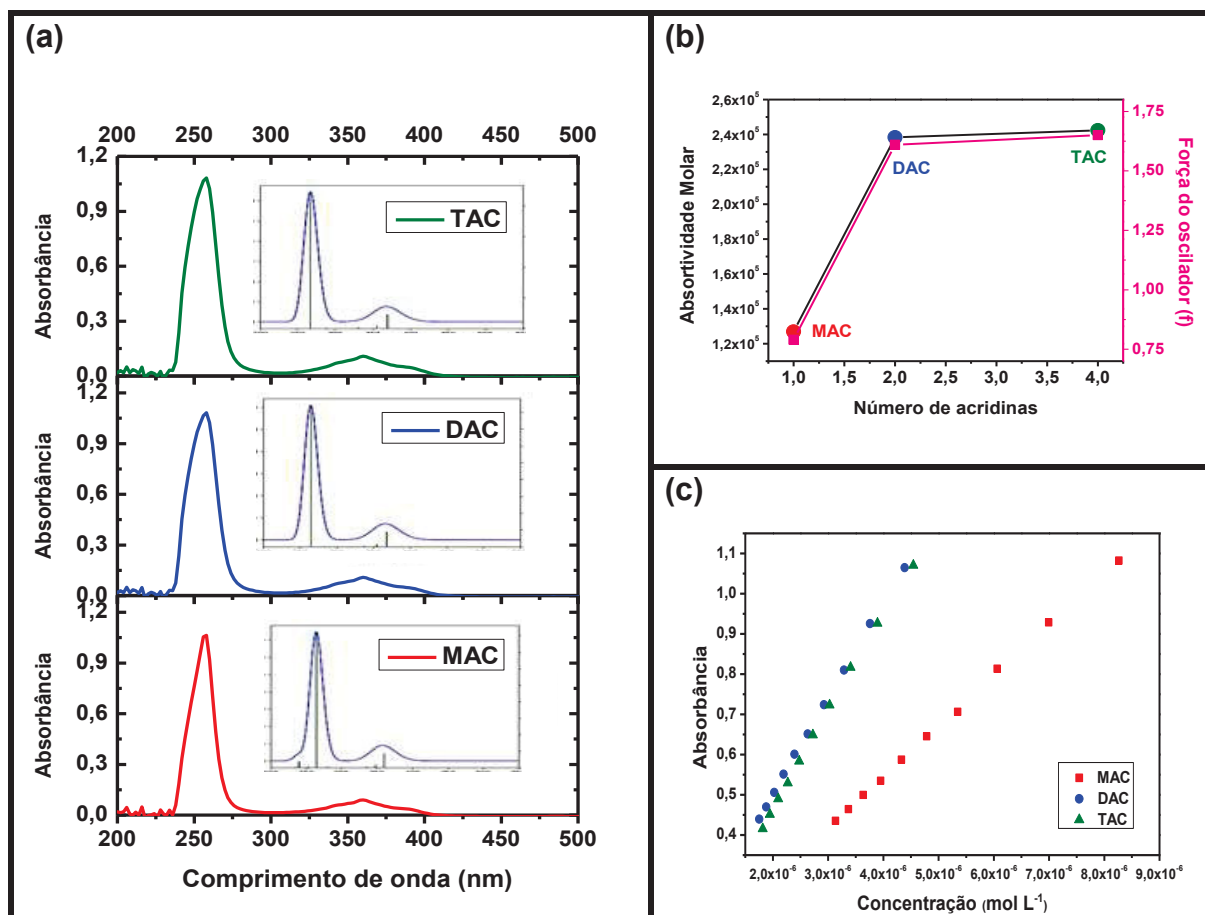
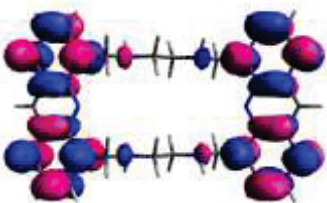
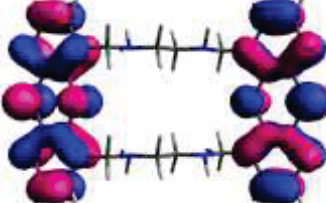
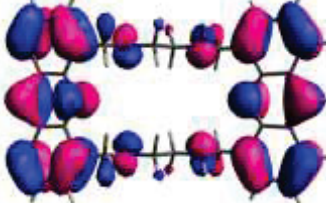
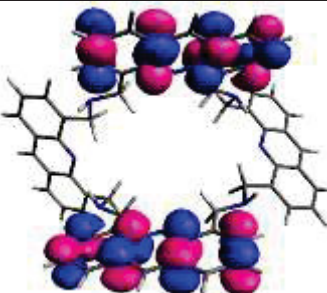
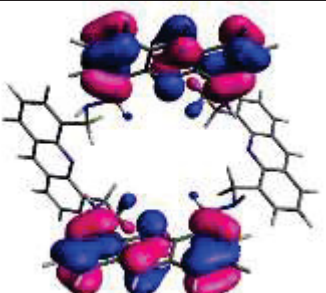


Figura 21. (a) Espectro de absorção UV-VIS dos ligantes MAC, DAC e TAC em CHCl_3 . Em “inset” os espectros de absorção UV-VIS simulados (TD-DFT) para os ligantes MAC, DAC e TAC, respectivamente. (b) Relação entre as absorptividades molares (banda em 258 nm) dos ligantes MAC, DAC e TAC (ilustrado através do número de acridinas por ligante) com os valores da força do oscilador obtido teoricamente (TD-DFT). (c) Valores de absorbância (banda em 258 nm) em diferentes concentrações dos ligantes MAC, DAC e TAC.

Tabela 16. Transições eletrônicas obtidas por TD-DFT para os ligantes MAC, DAC e TAC. Sendo: f= força do oscilador.

LIGANTES	λ (nm)	f	Transição
MAC	255	0,79	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+1
	387	0,09	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO
DAC	236	1,61	HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO+4
	377	0,14	HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO+1
TAC	242	1,65	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+6
	379	0,04	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+2

Tabela 17. Orbitais de fronteira participantes das transições observadas nos espectros de absorção *UV-VIS* dos ligantes.

	LUMO+1	LUMO	HOMO-1
MAC			
DAC	LUMO+4	LUMO+1	HOMO-2
			
TAC	LUMO+6	LUMO+2	HOMO-1
			

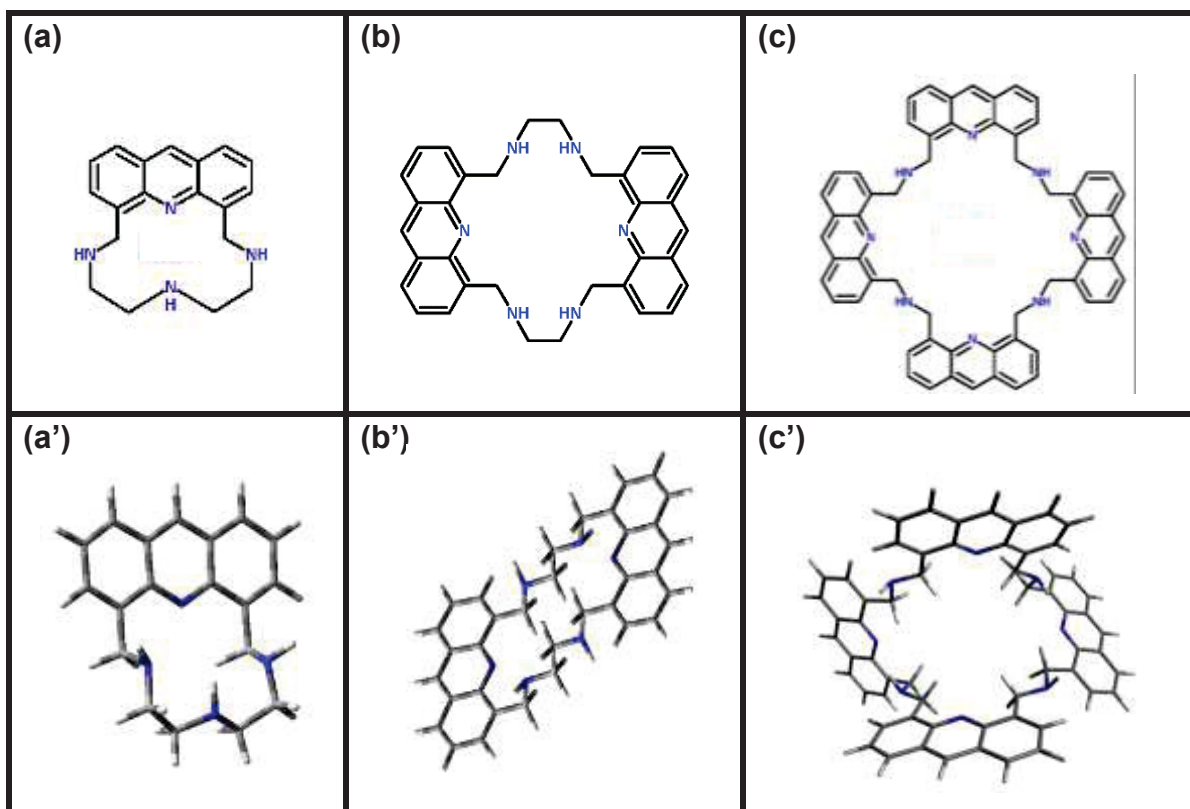


Figura 22. Estruturas otimizadas em (a' – c') dos ligantes (a) MAC, (b) DAC, (c) TAC, respectivamente.

A **Figura 21(b)** apresenta uma comparação entre os valores de absortividade molar da banda em 258 nm, obtido experimentalmente, para os ligantes MAC, DAC e TAC, com os valores da força do oscilador (f) obtidos através dos cálculos teóricos. Sendo a *acridina* o fluoróforo em comum aos 3 ligantes, pode-se inferir que atua como grupo responsável pelos processos de absorção de energia dos compostos, fato que se concorda com a similaridade dos espectros de absorção obtidos.

Na **Figura 21(c)** é interessante observar que as absortividades molares dos ligantes MAC e DAC são diretamente proporcionais ao número de moléculas de acridina na estrutura. Ou seja, o ligante MAC, que possui uma única porção de acridina, é a espécie que apresenta menor valor de absortividade molar, assim como o menor valor da força do oscilador entre os ligantes, e esses valores são aproximadamente duas vezes maiores para o ligante DAC. No entanto, o comportamento não se estende para o ligante TAC (com quatro moléculas de acridina), sugerindo que a intensidade de absorção não é sensível para os ligantes que contêm duas ou mais moléculas de acridina na sua composição química.

A **Figura 23(a)** ilustra os espectros de absorção, excitação e emissão

fluorescente para o ligante *MAC*, sendo um perfil semelhante para os demais ligantes. A fim de investigar a concentração que apresenta maior intensidade fluorescente, realizou-se um estudo das emissões dos ligantes em diversas concentrações, de 1×10^{-3} a 1×10^{-7} mol L⁻¹, em *CHCl*₃; com isso foi possível observar que a concentração que fornece o maior rendimento quântico é igual a 1×10^{-4} mol L⁻¹ para todos os ligantes. A **Figura 23(b)** compara as intensidades fluorescentes dos ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC* nas mesmas condições, no comprimento de onda máximo de emissão (416 nm), usando 400 nm como comprimento de onda de excitação. Desta forma, observou-se a seguinte ordem crescente de intensidade de fluorescência: *MAC*>*DAC*>*TAC*, que é diferente da ordem crescente de absortividade molar *TAC*≈*DAC*>*MAC*. Esse comportamento, muito provavelmente, se deve aos mecanismos de relaxação não radiativos que as moléculas estão expostas, e que competem com os processos radiativos; principalmente ligantes grandes e volumosos que apresentam muitos modos de vibração, como é o caso dos ligantes *DAC* e *TAC*. O ligante *MAC* por apresentar menos modos vibracionais e ser mais rígido, favorece os processos de emissão radiativa [7].

Para o cálculo de rendimento quântico dos ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC*, o padrão quântico escolhido foi o “9,10-difenilantraceno” (*DFA*), pois o mesmo segue os pré-requisitos para a escolha do padrão mais adequado com base nos compostos de interesse, para que erros nos cálculos de rendimento quântico sejam atenuados, logo, o padrão deve ser puro, de fácil manipulação (por exemplo, não ser higroscópico) [3], ter um rendimento quântico conhecido e bem estabelecido na literatura, apresentar composição química similar a amostra de interesse, assim como, ser estável em solução e apresentar espectros de excitação e emissão fluorescente em região coincidente (ou próxima) da amostra de interesse [4]. A **Tabela 18** traz os valores calculados de eficiência quântica para os ligantes em *CHCl*₃, que segue a seguinte ordem crescente: *MAC*(4%)>*DAC*(3%)>*TAC*(2%), compatível com a ordem esperada, com base no cálculo mostrado na **Equação 1**. Quando são comparados os valores obtidos com o rendimento quântico da acridina livre [74], observa-se que fatores como a rigidez das moléculas macrocíclicas possam favorecer os processos emissivos desses sistemas, sem grandes perdas de energia por mecanismos de relaxação não-radiativa, mesmo se tratando de ligantes tão volumosos.

$$\phi_a = \frac{F_a f_p n_a^2}{F_p f_a n_p^2} \phi_p \quad \text{Equação 1}$$

Sendo: ϕ = rendimento quântico da amostra de interesse (a) e do padrão (p); n = índice de refração do solvente usado para a medida na amostra (a) e no padrão (p); F = absorbância da medida na amostra (a) e no padrão (p); f = área integrada da banda de emissão fluorescente da medida na amostra (a) e no padrão (p).

Tabela 18. Dados de rendimento quântico dos ligantes, padrão quântico e acridina.

COMPOSTOS	ϕ	Índice de refração	Faixa de emissão (nm)	Faixa de excitação (nm)
MAC	4% (CHCl ₃)	1,45 (CHCl ₃)	416	400
DAC	3% (CHCl ₃)	1,45 (CHCl ₃)	416	400
TAC	2% (CHCl ₃)	1,45 (CHCl ₃)	416	400
DFA	95% (EtOH)	1,36 (EtOH)	400-500	275-380
Acridina	3% (EtOH)	1,36 (EtOH)	350	415

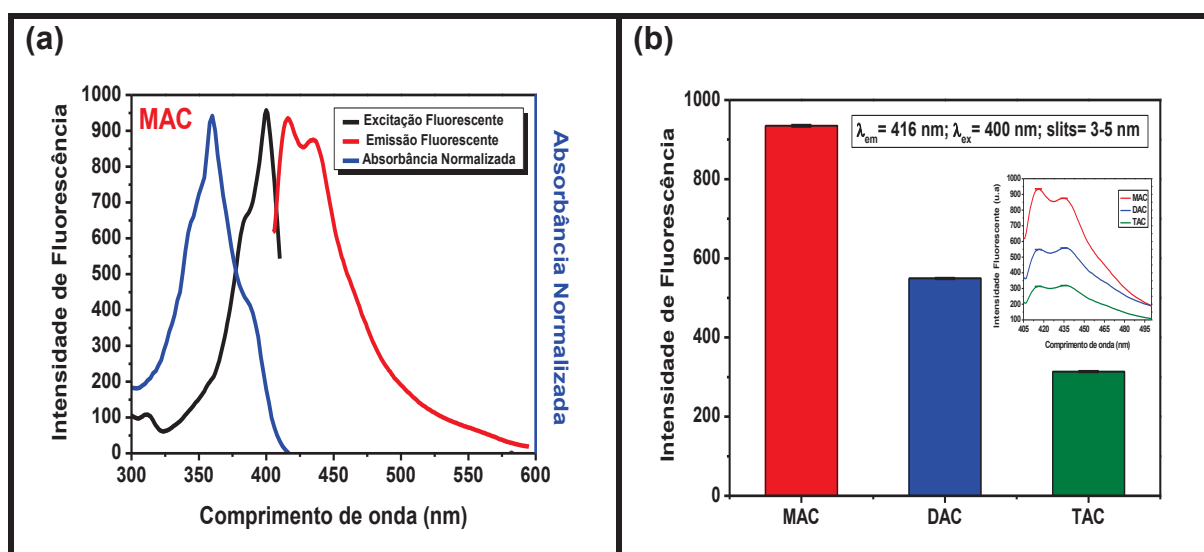


Figura 23. (a) Espectro de emissão fluorescente (linha vermelha) (λ_{em} = 416 nm), excitação fluorescente (linha preta contínua) (λ_{ex} = 400 nm), e absorbância (linha azul contínua) do ligante MAC a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Comparação dos perfis espectrais de emissão fluorescente dos ligantes MAC, DAC e TAC a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. λ_{em} : 416 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 3 e 5 nm. Solvente: clorofórmio. (Medidas em triplicatas).

4.3.2. Teste de seletividade individual dos sensores fluorescentes MAC, DAC e TAC para detecção de íons inorgânicos

A Figura 24 ilustra as intensidades fluorescentes médias dos ligantes na investigação para a detecção seletiva de íons metálicos. As condições das medidas

foram otimizadas em testes prévios, e todas foram realizadas em triplicata. A **Figura 24** mostra que os sensores *MAC* e *DAC* são seletivos e específicos para cádmio(II), com aumento muito expressivo da intensidade fluorescente de 8,46 e 7,95 vezes em relação aos sensores isolados, respectivamente. Ou seja, *MAC* e *DAC* atuam como sensores fluorescentes para o íon metálico cádmio(II), do tipo *CHEF* (do inglês “*chelation-enhanced fluorescence*”), pois intensificam (ou melhoram) a intensidade fluorescente na presença do analito (**Figura 24(a)**).

Um estudo de “*competição de íons*”, que analisa a seletividade do sensor frente a interferentes, com amostras complexas (com 20 íons metálicos na mesma solução, com a mesma concentração do sensor ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$)) (**Figura 24(d)**), mostrou que os ligantes *MAC* e *DAC* na presença de todos os íons metálicos testados, com e sem cádmio(II), continuam seletivos e específicos para o íon metálico, além disso, observou-se que as amostras complexas mantiveram, em média, a intensidade fluorescente aumentada em 8,1 e 7,4 vezes em relação aos sensores *MAC* e *DAC* sozinhos, respectivamente.

Fazendo uma pesquisa de sistemas similares derivados de *acridina* para a detecção seletiva de cádmio(II) na literatura (**Tabela 19**), envolvendo aumento da intensidade fluorescente do sensor, ou seja, efeito *CHEF*, é possível observar que os sensores *MAC* e *DAC* se mostram interessantes pela sua originalidade sintética, além da combinação duplamente satisfatória para o campo da detecção de íons, que corresponde a seletividade aliada a especificidade, ou seja, possuem capacidade de determinar um íon metálico dentre vários, através da fluorimetria, e além disso, não apresentam interferentes em potencial. Um detalhe curioso, mostrado na **Tabela 19**, é que para os exemplos encontrados na literatura de derivados de *acridina* seletivos para íons cádmio(II), os interferentes são normalmente da mesma família que o cádmio, ou seja, zinco e mercúrio. Essa característica muito provavelmente está associada a melhor acomodação do íon cádmio(II) às cavidades macrocíclicas *MAC* e *DAC*, quando comparado aos íons zinco(II) e mercúrio(II) em relação ao tamanho das cavidades macrocíclicas [73]. Com base nisso, os sensores *MAC* e *DAC* mostram um comportamento diferenciado e mais eficiente em relação aos sensores similares, sem interferência de outros íons, tão pouco, de íons como zinco(II) e mercúrio(II). O estudo do comportamento fluorescente em água ultrapura do ligante *MAC* está contido no **ANEXO 4** deste trabalho, e não apresentou seletividade a nenhum dos ânions testados.

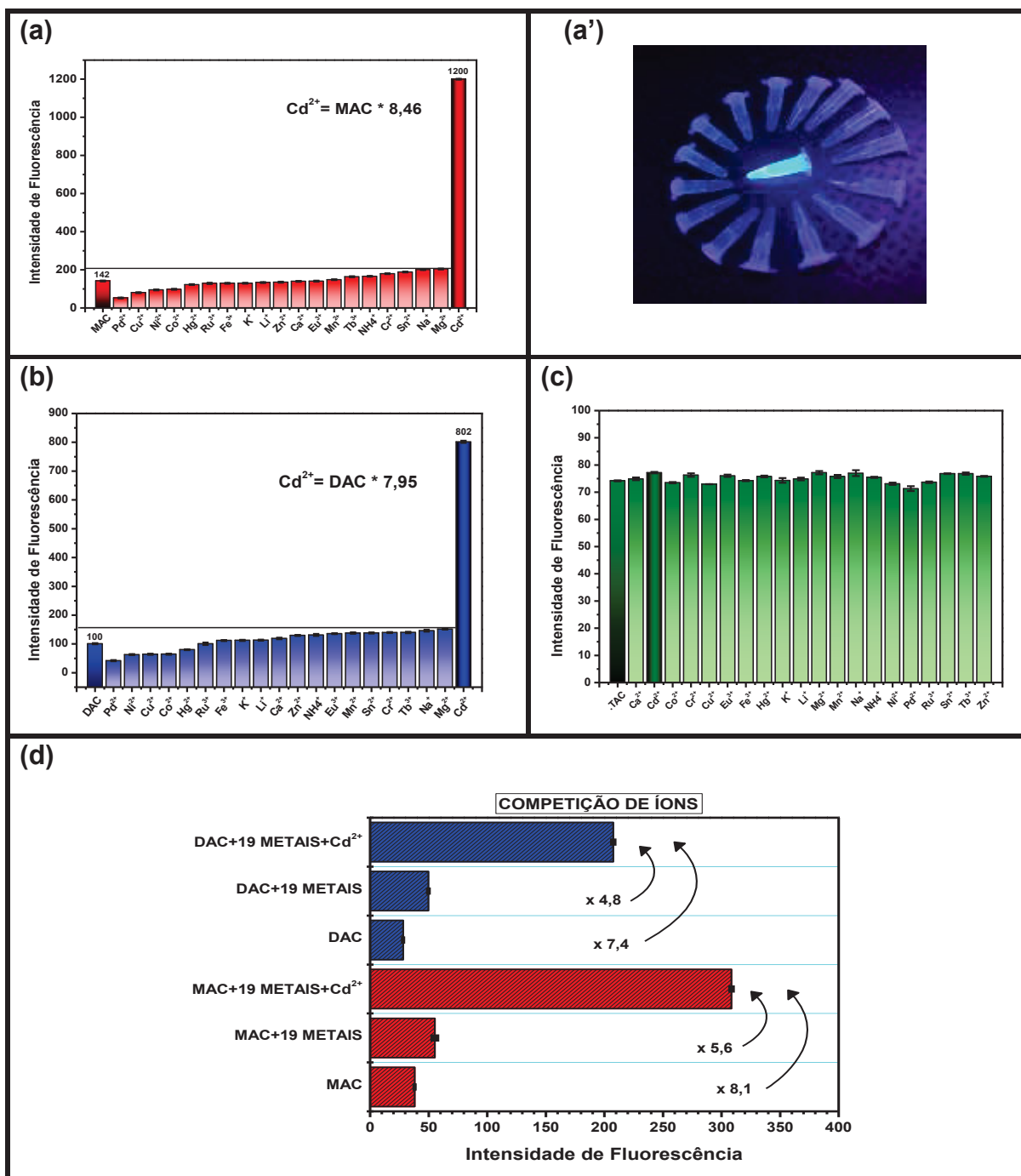


Figura 24. Investigação da seletividade dos ligantes frente a diversos cátions: **(a)** MAC, **(a')** fotografia das soluções de MAC com os diversos íons testados, sendo ao centro com íons cádmio(II) sob luz UV ($\lambda=365$ nm). **(b)** DAC, **(c)** TAC. λ_{em} : 450 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 1,5 nm para ambas as fendas. $CHCl_3:EtOH$ (1:99 v/v). Ligantes e metais= c 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Medidas em triplicatas. **(d)** Competição de cátions dos ligantes MAC e DAC na presença e ausência de cádmio(II). λ_{em} : 450 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 1,5 nm para ambas as fendas. $CHCl_3:EtOH$ (1:99 v/v). Ligantes e metais= c 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Medidas em quintuplicatas.

Tabela 19. Quimiossensores derivados da acridina do tipo *CHEF* seletivos para cádmio(II) encontrados na literatura.

LIGANTE	Interferentes	ANO [ref]	LIGANTE	Interferentes	ANO [ref]
MAC	AUSENTE	[este trabalho] [137]	DAC	AUSENTE	[este trabalho]
	Zn ²⁺	2016 [138]		Zn ²⁺ e Hg ²⁺	2011 [94]
	Hg ²⁺	2012 [139]		Hg ²⁺	2008 [102]

Íons cádmio(II) normalmente formam complexos com ligantes doadores O, N, S, e com haletos [140]. Como possui configuração $[Kr]4d^{10}$, no qual os orbitais d estão totalmente preenchidos, sua energia de estabilização de campo cristalino é nula (EECC=0). De maneira geral seus complexos são tetraédricos, tais como: $[CdCl_4]^{2-}$, $[Cd(H_2O)_4]^{2+}$, $[Cd(NH_3)_4]^{2+}$ [140]. Raramente forma complexos bi- ou tricoordenados, e apresenta diversos complexos octaédricos hexacoordenados, como por exemplo: $[Cd(H_2O)_6]^{2+}$, $[Cd(en)_3]^{2+}$. Complexos pentacoordenados também não são comuns, mas tem exemplos como $[CdCl_5]^{3-}$ cuja estrutura é bipirâmide trigonal [140].

Considerando a teoria de acidez e basicidade de Pearson [141], ácidos macios como o metal cádmio(II) tendem a se ligar mais facilmente à bases mais polarizáveis. Sendo a polarizabilidade molecular (representado pela letra grega “ α ”) definida como a “*facilidade com que a distribuição de carga de uma molécula pode ser distorcida por um campo elétrico externo*”. Os ligantes por serem moléculas grandes com muitos elétrons circundantes, a polarizabilidade pode ser suficientemente alta para justificar a grande afinidade dos ligantes *MAC* e *DAC* na interação com íons cádmio(II). Com base nisso, utilizando o programa *MARVIN*® [142] foi possível estimar a polarizabilidade de cada átomo nos ligantes, ilustrado na **Figura 25**, e a partir desses valores obter as polarizabilidades moleculares ($\bar{\alpha}$), que se mostraram relativamente altas e que aumentam proporcionalmente com a massa molar dos ligantes (TAC>DAC>MAC). Assim, a princípio, a teoria de Pearson pode

ser usada para explicar a afinidade dos ligantes, que atuam como bases macias, na interação com ácidos macios de Pearson, como íons cádmio(II) ($\alpha_{\text{atômica}} = 7,2$) [73]. Mas além disso, a especificidade dos ligantes *MAC* e *DAC* com íons cádmio(II), e a falta de seletividade do ligante *TAC* com íons metálicos também deve ser tratada considerando o tamanho do anel macrocíclico e os átomos doadores capazes de se ligar ao metal. O ligante *MAC* apresenta, em sua geometria otimizada, átomos com orientações e distâncias que possibilitam o modo mais comum de coordenação tetracoordenado do metal [140], com os átomos de nitrogênio da molécula (**ver seção 4.3.4**). Além disso, um ligante quelante como *MAC* permite a formação de um complexo de alta estabilidade em solução, o que pode justificar sua elevada especificidade, observada na **Figura 24(a)**. Considerando a geometria do ligante *DAC*, as orientações e distâncias dos seus átomos pode admitir três ligações do metal com os nitrogênios do composto, porém esse modo de coordenação é incomum para átomos volumosos como cádmio(II) (raio iônico=0,78Å para NC=4) [73] [140], o que sugere que sua esfera de coordenação seja suprida com cloretos ou ainda moléculas de água, ambos ligantes reconhecidos na literatura por suas propriedades supressoras de emissão [7], o que pode justificar a diferença nas intensidades fluorescentes de *DAC* com cádmio(II), mostrada na **Figura 24(b)**, quando comparado a *MAC*. Para o ligante *TAC* é importante observar que o maior tamanho da cavidade macrocíclica, as distâncias e principalmente as orientações dos átomos na molécula otimizada, tornam pouco efetivas as ligações com quaisquer metais, o que também pode justificar a falta de seletividade deste ligante com íons metálicos, trazido na **Figura 24(c)**, considerando a formação de complexos pouco estáveis em solução.

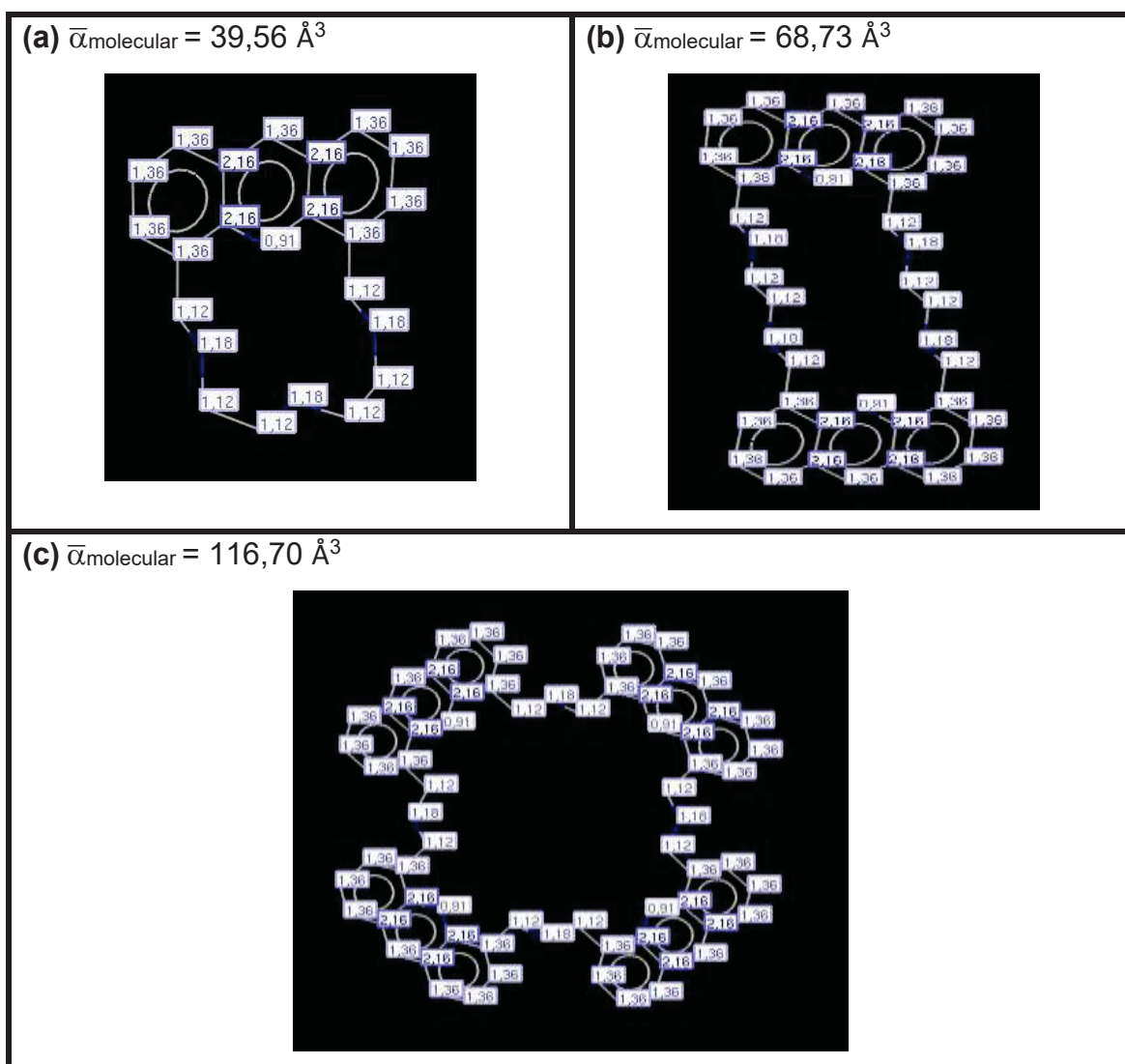


Figura 25. Polarizabilidade atômica e molecular ($\text{\AA}^3$) dos ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC*.

4.3.3. Estequiometria, estabilidade e reversibilidade: sensor *MAC* com íons cádmio(II)

Com a investigação sobre a seletividade realizada, sabendo que os ligantes *MAC* e *DAC* atuam como quimiossensores na detecção seletiva e específica de íons cádmio(II) em solução, escolheu-se *MAC* para realizar uma investigação mais minuciosa a fim de investigar sua estequiometria, ou seja, a proporção *sensor:metal* no complexo formado, bem como, a constante de estabilidade (K_f) deste complexo, e ainda, a capacidade de reuso do sensor (ou reversibilidade) sem perda de eficiência quântica. Este estudo com o ligante *DAC* e cádmio(II) não foi realizado devido a grande similaridade dos ligantes e, sob a perspectiva de aplicabilidade e eficiência, o ligante *MAC* se mostrou superior em muitos aspectos, com destaque para o maior rendimento quântico (ϕ) e maior especificidade com íons cádmio(II).

O *formalismo de Job*, também conhecido como “*método das variações contínuas*”, é uma das metodologias mais empregadas no campo da detecção “*in situ*” para a determinação da estequiometria do complexo formado em solução [143]. No método, entende-se que o composto $[M_xL_y]$ é o único a ser formado, logo, é o responsável pela variação da propriedade espectroscópica observada, no caso a fluorescência; sendo: M= metal, L= ligante, x e y= proporção estequiométrica. O gráfico de Job é construído a partir da medição de amostras com diferentes frações molares do analito, sem alterar a concentração total dos reagentes, ou seja, a soma das concentrações de MAC (sensor) e de íons cádmio(II) (analito) é constante em todas as medidas. Logo, espera-se encontrar um ponto máximo ou mínimo no gráfico, que indica a fração molar do analito em relação ao sensor, sinalizando a proporção estequiométrica $[x:y]$ do complexo.

Para o teste, preparou-se soluções equimolares de MAC e de cádmio(II), ou seja, de concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:99 v/v), e as amostras foram feitas com a mistura de diferentes volumes de cada solução, com um volume final de 5 mL para todas, realizadas em triplicatas. A **Figura 26(a)** mostra o perfil do gráfico de Job obtido para o complexo de MAC e cádmio(II), no qual é possível observar que o máximo da intensidade fluorescente ocorreu com uma fração molar de 0,5 do metal, logo, pode-se concluir que a proporção estequiométrica é 1:1 (metal:ligante), podendo ser representado pela forma: $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$. Desta forma, será considerado um ambiente de coordenação tetracoordenado, comum para íons cádmio(II) [140], pela formação de um complexo catiônico de carga 2+ tendo como contra-íon cloretos para o balanceamento de carga.

Sabendo a estequiometria do complexo, pode-se obter a constante de formação (ou estabilidade) através do gráfico de Benesi-Hildebrand (**Equação 2**) [144,145]. Como mostra a **Figura 26(b)**, o gráfico relaciona diferentes concentrações do metal com as variações da intensidade fluorescente, e a reta obtida gera um valor de intercepto e inclinação que dão origem (intercepto/inclinação) ao valor de $K_f = 1,05 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ ($\log K = 9,02$). Elevados valores de constante de formação indicam alta estabilidade do complexo formado, como, sabidamente, os complexos com o ligante quelante EDTA que apresentam constantes entre 1×10^7 (Ag^+) até 1×10^{25} (Fe^{3+}) [18]. Logo, pode-se inferir que o complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ possui estabilidade relativamente alta, o que pode justificar a grande detectabilidade em relação aos demais íons testados.

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{(F_{\infty} - F_0) K [\text{analito}]} + \frac{1}{(F_{\infty} - F_0)} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo: F= intensidade fluorescente do sensor em uma determinada concentração do analito; F_0 = intensidade fluorescente do sensor na ausência de analito; K= constante de Benesi-Hildebrand (constante de formação do complexo); [analito]= concentração do analito.

Por fim, para o teste de reversibilidade, conhecido como “*teste de ciclagens*” na área dos quimiossensores, escolhe-se um ligante que apresente uma constante de formação superior ao do sensor estudado, e faz-se medidas após adições consecutivas do novo ligante e do analito ao sistema, mantendo-se a concentração do sensor constante ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Assim, para este teste neste trabalho foi utilizado o ligante EDTA, uma vez que sua constante de formação do complexo com íons cádmio é cerca de 1×10^{16} , portanto, consideravelmente superior ao encontrado para $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$. A **Figura 26(c)** ilustra como o teste foi realizado com 4 ciclos de EDTA ao sistema, mostrando que o ligante MAC possui capacidade de reuso sem perda de rendimento quântico, portanto, pode-se concluir que este atua como um sensor eficientemente reversível.

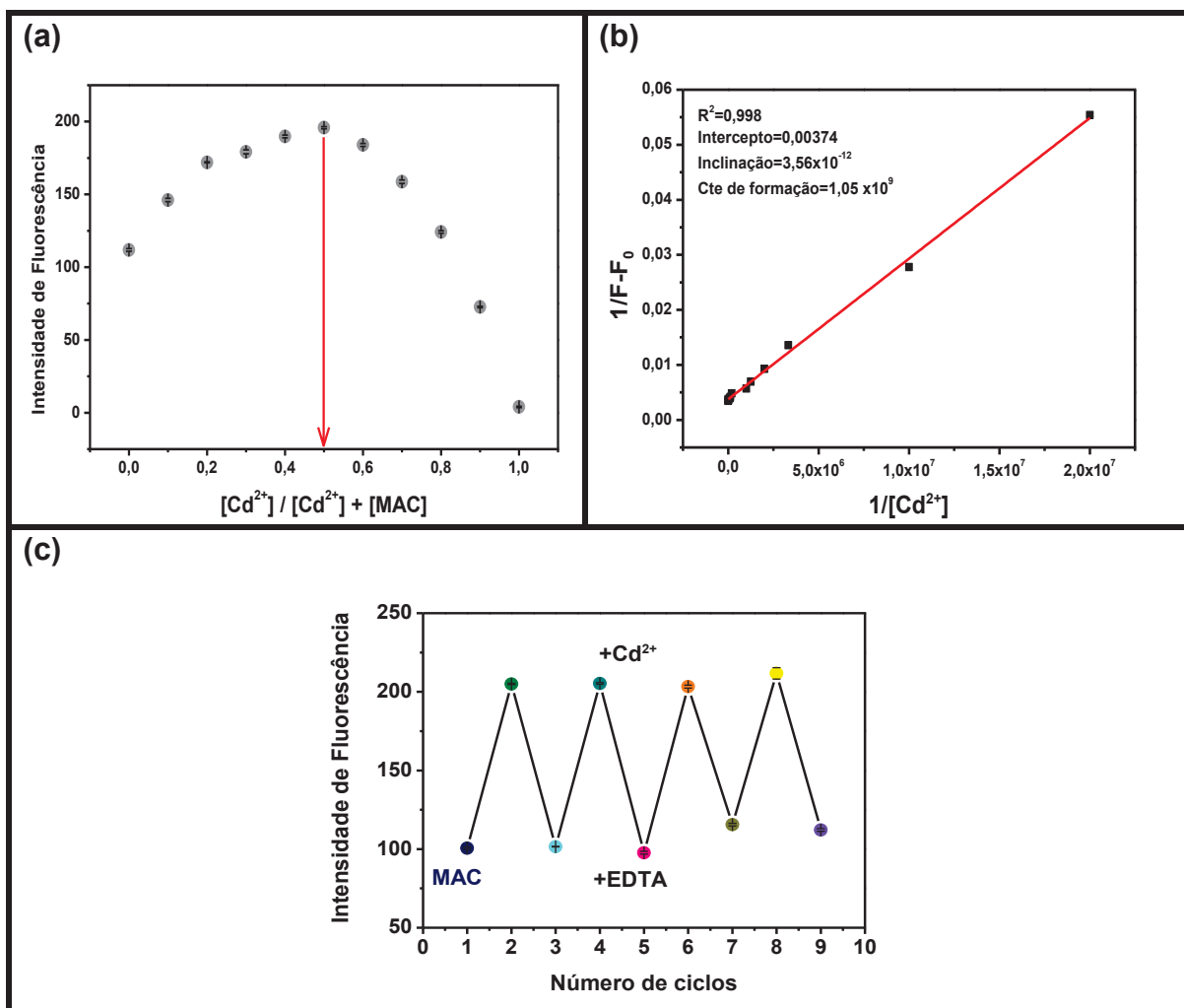


Figura 26. (a) Gráfico de Job para o sistema de detecção de MAC e íons cádmio(II). Com monitoramento da banda de emissão em 450 nm. (b) Gráfico de Benesi-Hildebrand para a obtenção da constante de formação do complexo $[Cd(MAC)]^{2+}$. (c) Teste de reversibilidade com ligante EDTA. Monitoramento da banda de emissão em 450 nm. Concentrações equimolares do sensor e EDTA de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, e de íons cádmio(II) de $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.4. Cálculos mecânico-quânticos (TD-DFT): sensor MAC com íons cádmio(II)

Os cálculos da mecânica quântica são uma ferramenta valiosa para entender os processos de absorção e emissão em nível molecular, pois permitem o acesso às energias dos orbitais de fronteira e densidades eletrônicas relacionadas às transições. Logo, alterações nas composições dos orbitais moleculares afetam as propriedades do estado fundamental eletrônico, e os estados excitados correspondentes. Dessa forma, a partir de cálculos *TD-DFT* foram obtidas as geometrias do estado fundamental (**Figura 27**), diagrama dos orbitais moleculares (**Figura 28**) e transições

eletrônicas, sumarizadas na **Tabela 21**, do sensor *MAC* e seus complexos com íons cádmio(II) e mercúrio(II), para fins comparativos. O modo de coordenação tetracoordenado dos complexos nos cálculos realizados corrobora a atribuição dada até o momento, sugerindo que esta seja a configuração mais estável nos compostos de coordenação estudados, bem como, indica que a probabilidade de ligação dos cloretos ao metal seja baixa embora não excludente. Os complexos, portanto, serão tratados como $[Cd(MAC)]^{2+}$ e $[Hg(MAC)]^{2+}$, e apresentam geometria tetraédrica distorcida.

A “*Teoria do Campo Cristalino*” (TCC) permite prever que o desdobramento das energias em complexos tetraédricos é bem menor que no caso de octaédricos [140]. Como há apenas 4 ligações ao invés de 6, o campo ligante tem apenas 2/3 da intensidade observada nos complexos octaédricos, além disso, a orientação dos orbitais não coincide com a aproximação dos ligantes, isso reduz o desdobramento em outros 2/3 aproximadamente. Desta forma, a magnitude de desdobramento de um campo tetraédrico é aproximadamente 4/9 menor que em octaédricos. Por isso, normalmente o campo tetraédrico é considerado fraco [140]. Além disso, íons cádmio(II) e mercúrio(II) possuem configuração d^{10} , muito comum em complexos tetraédricos [140], que também são favorecidos quando o ligante é grande e volumoso como *MAC*, que pode apresentar incompatibilidade espacial na formação de complexos octaédricos. No entanto, mesmo não apresentando geometria tetraédrica perfeita e por se tratar de metais pesados $4d$ e $5d$, respectivamente, essas espécies não afetam o campo ligante e seus complexos com *MAC* são, portanto, de spin baixo.

Os raios iônicos das espécies cádmio(II) e mercúrio(II) em um ambiente tetracoordenado são de 0,78 e 0,96 Å [73], respectivamente, assim pode-se inferir que o íon cádmio(II), por ser menor, é incorporado de modo mais efetivo na cavidade macrocíclica do ligante *MAC*. As distâncias de ligação $Cd^{2+}-N$ e $Hg^{2+}-N$ foram obtidas a partir da otimização de suas estruturas, e estão sumarizadas na **Tabela 20**. A partir desses valores, pode-se observar que as ligações $Hg^{2+}-N$ são mais longas que $Cd^{2+}-N$, portanto mais fracas, o que pode justificar a alta estabilidade do ligante com íons cádmio(II). Observando as distâncias no complexo de cádmio(II), e com base nas polarizabilidades atômicas do nitrogênio no ligante livre *MAC*, trazidos na **Figura 25** e **Tabela 20**, nota-se que há boa correlação entre os dois valores. Logo, a menor distância de ligação observada entre $Cd^{2+}-N_B$ (2,38 Å) para o complexo $[Cd(MAC)]^{2+}$, também apresenta maior polarizabilidade atômica para N_B (1,18 Å³), o que

corresponde a uma ligação mais forte nesses nitrogênios amínicos laterais da molécula quando comparado, por exemplo, ao nitrogênio do anel acridínico N_A , que possui menor polarizabilidade ($0,91 \text{ \AA}^3$) e maior distância de ligação $\text{Cd}^{2+}-N_A$ ($2,41 \text{ \AA}$). Destaca-se ainda que os valores das distâncias de ligação $\text{Cd}^{2+}-N$ apresentados na **Tabela 20** estão coerentes com valores encontrados na literatura para derivados similares de acridina com íons cádmio(II). Considerando a molécula 4,5-bis(N,N-di(2-hidroxietil)iminometil)acridina (BHIA), que também é um quimiossensor para íons cádmio(II) [94] mostrado na **Tabela 19**, em outro trabalho sobre o complexo os autores apresentam dados de sua estrutura cristalina. Desta forma, a distância $\text{Cd}^{2+}-N_A$ encontrada no composto de coordenação foi de $2,46 \text{ \AA}$ e $\text{Cd}^{2+}-N_B$ teve média de $2,30 \text{ \AA}$ [146], mostrando concordância com os valores obtidos para o complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$.

Além disso, podemos observar que as distâncias entre os átomos N–N no ligante livre MAC é afetada com a formação dos complexos $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$. A distância entre N_A-N_C aumenta cerca de 5% nos dois complexos quando comparados ao ligante livre, no entanto, a distância entre N_B-N_B diminui em aproximadamente 6% no complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e em 5% para $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$. Desta forma, entende-se que essa seja mais uma evidência de que os nitrogênios amínicos N_B se liguem mais fortemente ao metal, e quando comparamos cádmio(II) e mercúrio(II), a ligação $\text{Cd}^{2+}-N_B$ é ainda mais fortalecida, o que também pode justificar a maior afinidade $\text{MAC}-\text{Cd}^{2+}$.

Tabela 20. Distâncias de ligação ($\text{\AA}$), metal-nitrogênio, nos complexos $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$ obtidos por cálculos mecânico-quânticos (DFT).

DISTÂNCIAS DE LIGAÇÃO 	POLARIZABILIDADE ATÔMICA DO NITROGÊNIO NO LIGANTE MAC (N_{A-C}) (α)	MAC LIVRE ($\text{\AA}$)	$[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ ($\text{\AA}$)	$[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$ ($\text{\AA}$)
$N_A - N_C$	-	4,01	4,21	4,21
$N_B - N_B$	-	4,81	4,51	4,55
METAL- N_A	0,91	-	2,41	2,75
METAL- N_B	1,18	-	2,38	2,56
METAL- N_C	1,18	-	2,42	2,64

O espectro de absorção experimental do sensor *MAC* livre, e com os íons cádmio(II) e mercúrio(II) são mostrados na **Figura 27(a)**, no qual pode ser observado uma banda intensa em 250 nm para os três casos, coerente com os resultados teóricos trazidos na **Tabela 22**, e atribuídos às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, com densidade eletrônica centrada no fluoróforo dos *acridina*. Segundo o diagrama da **Figura 28**, os orbitais moleculares envolvidos nesta transição são: **HOMO-1**→**LUMO+1** (para *MAC*), **HOMO**→**LUMO+2** (para $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$). As demais bandas espectrais em 358 nm mostram dois conjuntos de excitações relevantes, a partir da inspeção dos orbitais moleculares e suas composições, e foram sumarizadas na **Tabela 21**.

A transição **HOMO**→**LUMO+1** atribuída a uma transição LMCT, apenas observada para $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$, representa um comportamento muito particular e, mesmo se tratando de fenômenos de absorção, pode justificar a maior fluorescência do complexo de cádmio(II), considerando que a participação de íons metálicos nos orbitais de fronteira é o um fator relevante que pode determinar a eficiência emissiva [42]. Além disso, a estabilidade dos complexos de $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$ também foi investigada com base nos cálculos de energia livre. Utilizando geometrias no estado fundamental de todas as espécies, a energia livre calculada obtida para $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$ foi de -80,93 e -7,15 kJ mol⁻¹, respectivamente. Logo, é possível inferir que a maior estabilidade ou espontaneidade de formação do complexo de $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$, dado o menor valor de ΔG estimado pelos cálculos, pode justificar a detecção seletiva e específica desse sistema em relação aos demais íons, aqui representados pelo íon mercúrio(II), escolhido para comparação justamente por ser um metal pesado e um ácido macio de Pearson [141], assim como cádmio(II). Neste caso, sabendo que o ligante *MAC* tende a se ligar mais facilmente a ácidos macios, quando interage com íons cádmio(II) se liga mais espontaneamente, quando comparado aos íons metálicos de mesma natureza, o que também explica a alta constante de formação ($\log K_f = 9,02$) do complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ formado em solução, obtido pelo formalismo de Benesi-Hildebrand.

A baixa intensidade fluorescente do sensor livre *MAC* pode ser explicada por meio do processo de transferência de carga intramolecular fotoinduzida, abreviado como **PET** do inglês “*photoinduced electron transfer*” [1,7,147]. No caso, se faz necessário a comunicação entre dois estados eletrônicos excitados, um centrado no sistema aromático da *acridina*, e o outro de maior contribuição localizado no(s)

grupamento(s) amínico(s). Na **Figura 29(a)** é possível observar a composição dos orbitais de fronteira envolvidos nas transições, obtidos a partir de cálculos mecânico-quânticos (*TD-DFT*), que reforçam a proposta do processo **PET** na detecção, sob inspeção das energias dos orbitais moleculares e as contribuições dos fragmentos doador (porção amínica) e aceitador (acridina) do sensor *MAC*.

A esquerda da **Figura 29(a)**, observa-se que ocorre uma transferência de densidade eletrônica do orbital molecular centrado nas aminas (HOMO = -5,87 eV) do sensor *MAC* para o orbital molecular centrado na *acridina* (HOMO-1 = -5,97 eV), que possui uma vacância após a sua excitação. Assim, o elétron excitado da *acridina* torna-se impossibilitado de retornar ao estado fundamental tão imediatamente como demanda os processos fluorescentes, e como consequência, o sistema apresenta baixa intensidade fluorescente, perde eficiência quântica. No entanto, quando se tem a complexação do sensor *MAC* com íons cádmio(II) (**Figura 29 (a-direita)**) por meio dos grupamentos amínicos, ocorre uma estabilização do orbital molecular HOMO-2 (-7,61 eV), fazendo com que o complexo apresente elevada emissão fluorescente, pois o elétron excitado da *acridina* retorna ao seu estado fundamental de maneira rápida e mais eficiente. Logo, é possível inferir que o complexo formado com o íon cádmio(II) produz maior estabilização em contraste aos demais íons.

Tabela 21. Atribuição das transições de absorção do ligante *MAC* e seus respectivos complexos de cádmio(II) e mercúrio (II).

TRANSIÇÃO	COMPOSTO	BANDA 250 nm	BANDA 358 nm
$\pi \rightarrow \pi^*$	MAC	HOMO-1→LUMO+1	HOMO -1→LUMO HOMO -4→LUMO
	[Cd(MAC)] ²⁺	HOMO→LUMO+2	HOMO→LUMO HOMO -1→LUMO
	[Hg(MAC)] ²⁺ .	HOMO→LUMO+2	HOMO→LUMO HOMO -2→LUMO
LMCT	[Cd(MAC)] ²⁺	-	HOMO→LUMO+1

Tabela 22. Transições eletrônicas (*TD-DFT*) para sensor MAC, e seus complexos $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$.

COMPOSTO	Comprimento de onda (nm)	Força do oscilador	Maior contribuição
MAC	386,76	0,09	HOMO-1→LUMO (97%)
	316,71	0,05	HOMO-4→LUMO (65%)
	267,62	0,03	HOMO-2→LUMO+1 (99%)
	253,97	0,79	HOMO-1→LUMO+1 (45%)
$[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$	409,00	0,05	HOMO→LUMO (92%)
	368,72	0,02	HOMO→LUMO+1 (93%)
	320,53	0,10	HOMO-1→LUMO (79%)
	249,67	0,40	HOMO→LUMO+2 (50%)
$[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$	398,04	0,08	HOMO→LUMO (88%)
	322,18	0,07	HOMO-2→LUMO (77%)
	247,87	1,59	HOMO→LUMO+2 (58%)
	242,74	0,22	HOMO→LUMO+3 (82%)

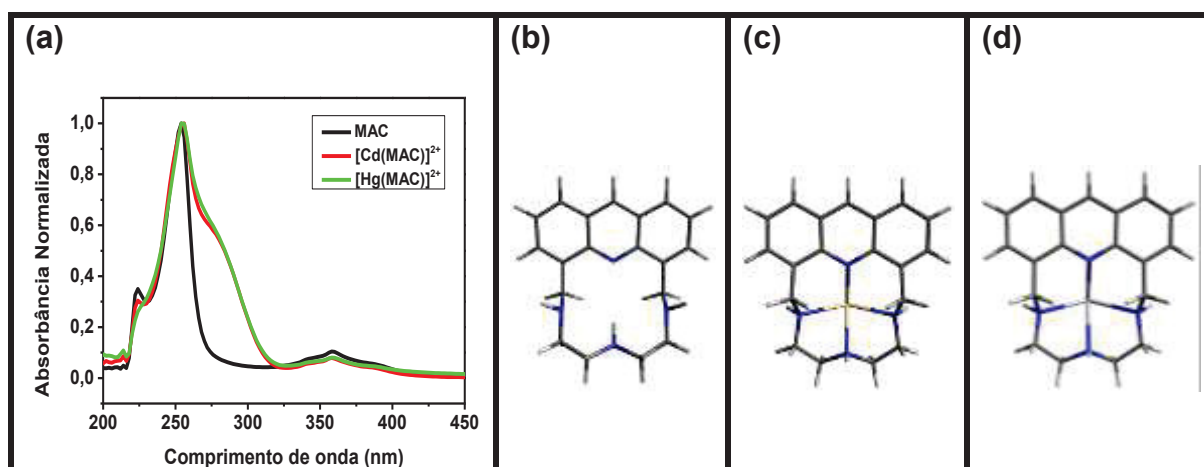


Figura 27. (a) Espectro de absorção normalizado para o sensor MAC, e os íons cádmio(II) e mercúrio(II). Geometrias otimizadas (*TD-DFT*) para: (b) sensor MAC, (c) $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e (d) $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$.

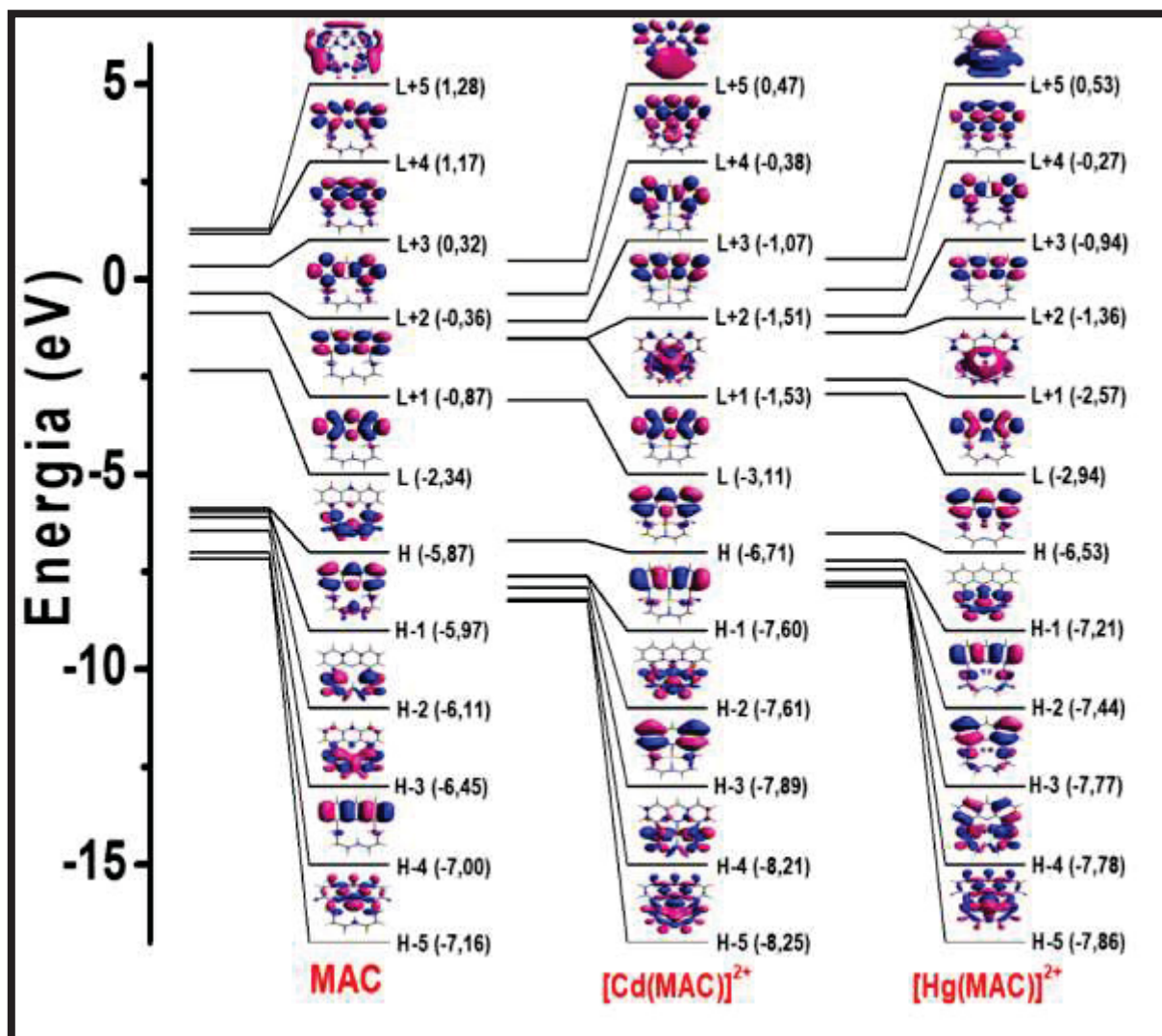


Figura 28. Orbitais de fronteira do sensor MAC, e seus complexos $[Cd(MAC)]^{2+}$ e $[Hg(MAC)]^{2+}$.

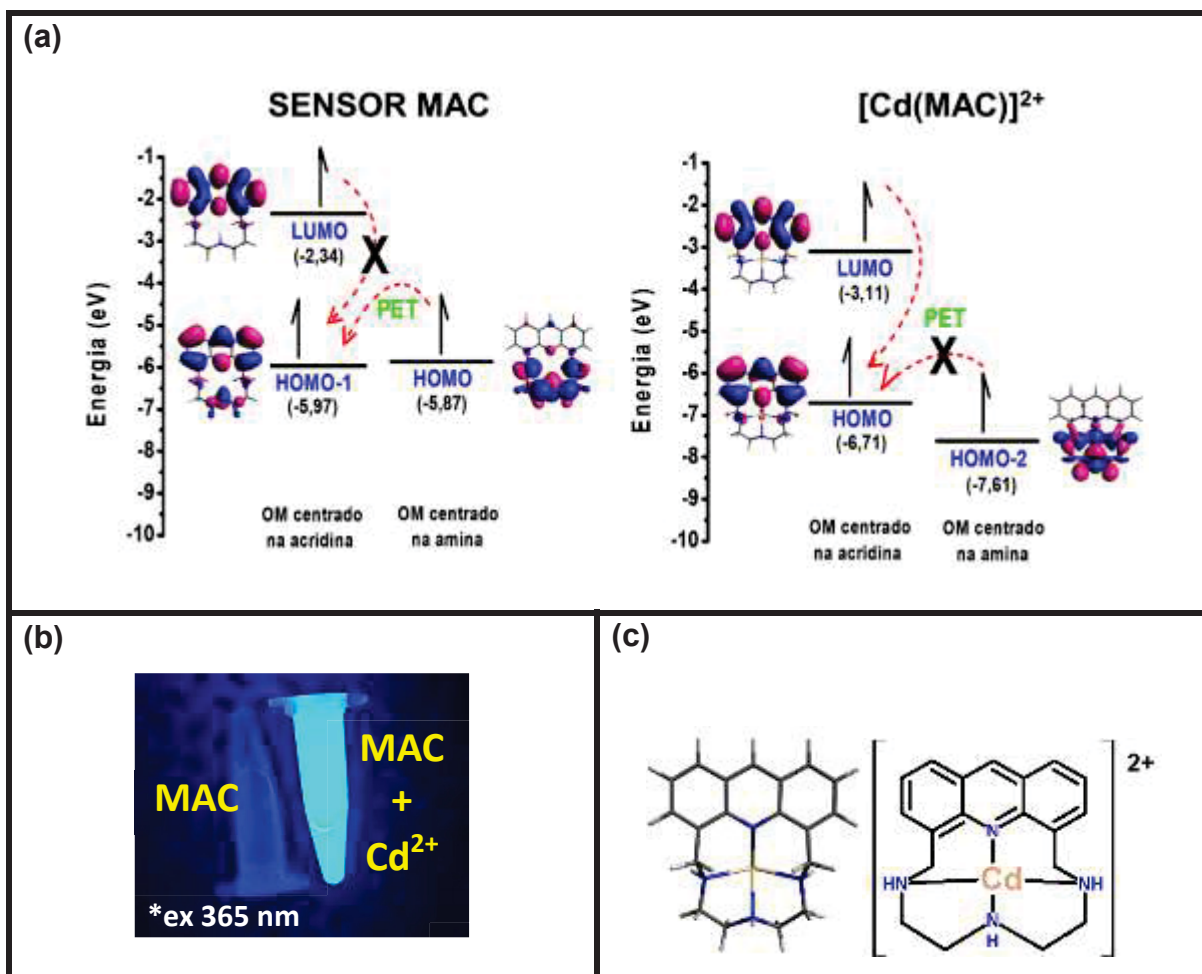


Figura 29. (a) Ilustração do diagrama de energia dos orbitais de fronteira associados a emissão fluorescente do ligante *MAC*, e seu complexo com cádmio(II). (b) Fotografia das soluções do ligante *MAC* e complexo $[Cd(MAC)]^{2+}(CHCl_3:EtOH (1:99 v/v), 100 \mu mol L^{-1})$ sob excitação de lâmpada UV em 365 nm. (c) Complexo $[Cd(MAC)]^{2+}$.

4.3.5. Obtenção de figuras de mérito para a detecção de *MAC* e íons cádmio(II)

Quando se tem interesse em validar um método analítico através da avaliação de “*figuras de mérito*”, o objetivo é atestar sua adequação à finalidade pretendida [148], o que para esse trabalho corresponde à detecção de íons cádmio(II) com o ligante *MAC*. Nesse sentido é importante que as condições de todas as medidas sejam padronizadas, para atenuar erros aleatórios de análise. Portanto, essas condições chamadas “*nominais*” foram apresentadas na **Tabela 3** (seção experimental), e foram respeitadas em todos os experimentos realizados. As figuras de mérito obtidas nesse trabalho correspondem a seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez, e serão discutidas separadamente abaixo trazendo os resultados obtidos para o sistema de detecção do ligante *MAC*, uma vez que este apresentou-se mais sensível à

presença do analito. Ferramentas estatísticas foram utilizadas a fim de identificar resultados anômalos, tendenciosos e não-homogêneos, para garantir que o sensor corresponda a um sistema estatisticamente robusto, preciso e exato, conforme os parâmetros adotados e recomendados por órgãos regulamentadores como ANVISA [108-109] e INMETRO [110].

4.3.5.1. Seletividade individual

Os testes de seletividade individual foram efetuados de maneira isolada entre o sensor com o analito (cátion/ânion), a fim de observar alguma alteração do comportamento fluorescente do sistema, e possível seletividade a um analito específico. Como mostrado na **seção 4.3**, o sensor MAC apresentou seletividade para íons cádmio(II), com aumento da intensidade fluorescente de 8,5 vezes em relação ao sensor livre. Para essas medidas de seletividade feitas em triplicatas, calculou-se o desvio padrão relativo ou **RSD**, do inglês “*relative standard deviation*”, também conhecido como “*coeficiente de variação*” (CV) ou apenas “*variância*” (**Equação 3**). Órgãos regulamentadores como ANVISA [108,109] e INMETRO [110] adotam nos testes valores de **RSD** máximo aceitáveis que normalmente variam de 10 a 20%. Os testes de seletividade individual, **Figura 24**, mostraram valores de desvio padrão relativamente baixos (ilustrado pela barra de desvio no gráfico) e, uma vez que o maior valor de desvio padrão amostral foi menor que 2, logo, o maior **RSD** para o teste de seletividade individual foi de aproximadamente 1,5%, ou seja, um valor muito abaixo dos valores máximos aceitáveis e recomendados pelos órgãos regulamentadores supracitados. Todos os dados obtidos no teste estão sumarizados no **ANEXO 5**.

$$RSD = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Sendo: s= desvio padrão amostral, $\bar{x}$ = média amostral (realizado em triplicatas)

4.3.5.2. Curva de calibração: obtenção da faixa linear, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito no qual o método pode ser aplicado em um nível desejado de exatidão, precisão e linearidade, **Figura 30(a)**. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal deverá ter uma relação linear

com o analito. De acordo com as agências reguladoras (ANVISA [108], INMETRO [110]) a faixa linear deve ter no mínimo 5 pontos, e o coeficiente de determinação (R^2) deve ser igual ou superior a 0,990 para ser considerado aceitável. Após o teste de seletividade individual, e sabendo que o sensor foi específico e seletivo a íons cádmio(II), fez-se a curva de calibração (ou faixa de trabalho) em diversas concentrações de cádmio(II). Nesse caso foram investigadas 15 concentrações diferentes desse íon, na faixa de 0,01 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e a faixa linear foi encontrada entre 0,1 a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, como mostra a **Figura 30(b)**. A partir da faixa linear, com o valor de coeficiente angular (inclinação da reta), e o desvio padrão das medidas em decaplicata do sensor (branco analítico), pode-se obter os valores de limite de detecção (**Equação 4**) e quantificação do sistema (**Equação 5**). Neste caso, os valores obtidos foram 9,98 e 33,31 nmol L^{-1} , respectivamente, sendo valores expressivamente baixos demonstrando, portanto, apropriada detecção. Os testes estatísticos que foram realizados para a **faixa linear** estão agrupados e discutidos no **ANEXO 5** deste relatório, e correspondem ao: teste de Grubbs (**Equação 11**), teste de Fisher (**Equação 8**), e ainda uma avaliação dos resíduos de cada ponto do gráfico com os testes de Cochran (**Equação 18-ANEXO 5**) e Durbin-Watson (**Equação 19-ANEXO 5**), com a obtenção do gráfico de dispersão residual, trazida na **Figura 59 (ANEXO 5)**. Os resultados dos testes estatísticos confirmam que a faixa linear obtida foi adequada sob o ponto de vista estatístico com 95% de nível de confiança.

$$\text{LOD} = \frac{3 * s_{\text{branco analítico}}}{\text{coeficiente angular da reta}} \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 * s_{\text{branco analítico}}}{\text{coeficiente angular da reta}} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo: s = desvio padrão amostral do branco analítico em decaplicata (sensor)

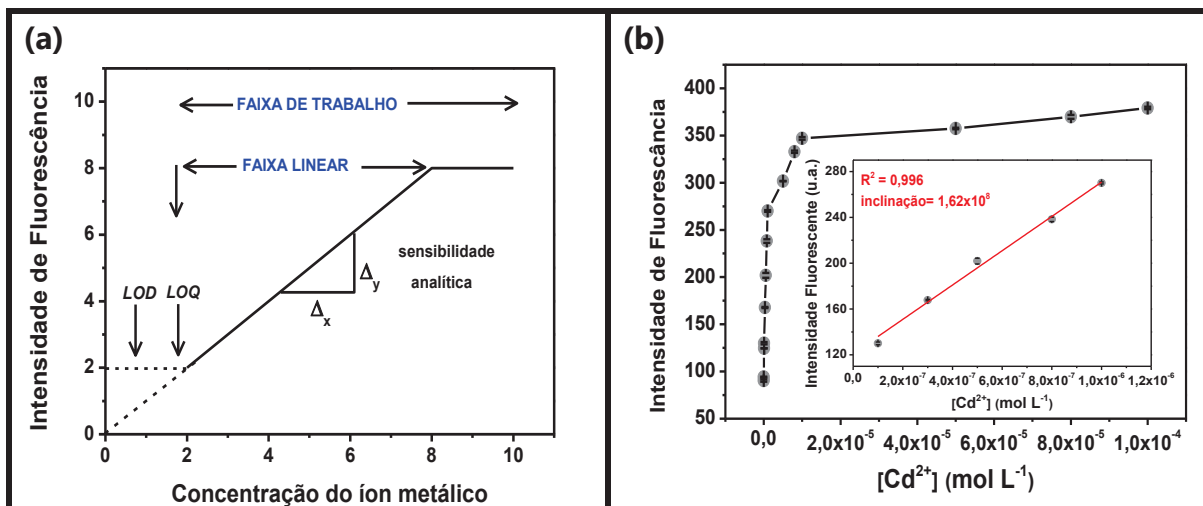


Figura 30. (a) Ilustração de uma curva de calibração (faixa de trabalho), com destaque para a faixa linear e os pontos de determinação de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). **(b)** Curva de calibração do sensor MAC com diferentes concentrações de íons cádmio(II), e em “inset” a faixa linear.

4.3.5.3. Repetibilidade e precisão intermediária: análise da precisão do sensor MAC

Após a obtenção da curva de calibração, e tendo a faixa linear analisada com todos os testes e avaliações de resíduos, o analista responsável pela curva deve constatar se a faixa linear apresenta adequada repetibilidade. Para isso foram selecionados 3 níveis de concentração distintos na faixa linear: baixo, médio e alto (**Figura 31(a)**). Para cada nível escolhido, foram conduzidas 10 replicatas respeitando as condições nominais da curva de calibração, incluindo o mesmo analista, equipamento, técnicas, ou seja, repetindo as medidas nas mesmas condições a fim de se atestar a repetibilidade do método. A faixa será considerada repetível se para cada nível de concentração analisado for obtido uma média semelhante à obtida na faixa linear para aquele nível, com a aprovação de testes estatísticos como Dixon (identificação de “*outliers*”) e Horrat [149-152]. Em seguida ao teste de repetibilidade, pode ser realizado para os mesmos níveis de concentração em decaplicatas, a avaliação quanto a precisão intermediária da faixa linear. Nesse caso, é verificado se o método é reprodutível por outro analista, diferente do analista responsável pela curva de calibração, e compara-se os resultados dos dois analistas. As medidas são realizadas no mesmo equipamento, porém o novo analista é responsável por todas as etapas, desde o preparo das soluções-mãe e das amostras de interesse até a medição

no equipamento, com lavagens de cubeta entre medidas, e por fim o tratamento dos dados. Novamente, a faixa é considerada reprodutível se para cada nível de concentração analisado for obtido uma média semelhante à obtida na faixa linear para aquele nível em relação ao primeiro analista, com a aprovação dos mesmos testes estatísticos. Como mostra a **Tabela 23**, os níveis de concentração (1-3) de íons cádmio(II) estudados para obtenção dessas figuras de mérito foram: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e 1×10^{-6} mol L⁻¹, respectivamente. A **Figura 31(b)** mostra os valores médios obtidos pelos dois analistas para os três níveis de concentração, e pode-se observar de imediato uma semelhança nos dados bem como um desvio padrão baixo para ambos operadores.

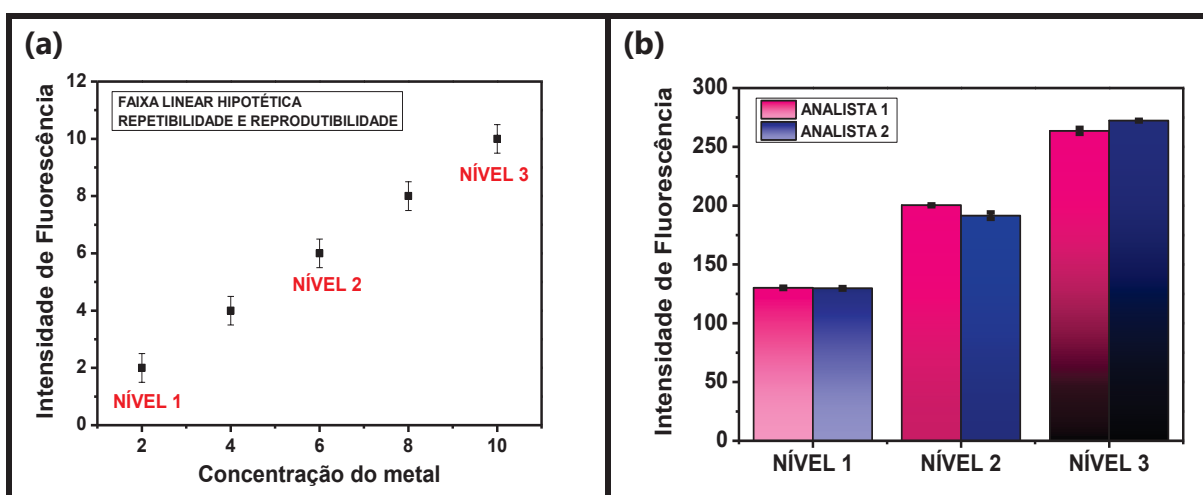


Figura 31. (a) Ilustração dos níveis 1, 2 e 3 de concentração do analito com base em uma faixa linear hipotética, utilizados para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. (b) Medidas de repetibilidade e precisão intermediária em 3 níveis de concentração de íons cádmio(II), com barra de desvio padrão obtida por decaplicatas. Sendo o analista 1 (rosa) responsável pela curva de calibração e repetibilidade, e o analista 2 (azul) responsável pelo ensaio de precisão intermediária. Níveis de concentração: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e 1×10^{-6} mol L⁻¹, respectivamente.

Os testes estatísticos realizados nesses ensaios foram: *média*, *desvio padrão*, *desvio padrão relativo (RSD)*, *Horwitz (RSD teórico)*, *teste de Dixon (verificação de outliers)* e *HORRAT*, das decaplicatas em cada nível de concentração testado de cada analista. O *teste de Dixon*, ou *teste Q (Equação 6)*, identifica o valor entre as replicatas que apresenta uma grande discrepância com os demais valores, os “outliers”. Por isso, as replicatas são ordenadas de forma crescente, e os valores analisados são os

extremos do ordenamento, ou seja, o valor mais alto e o mais baixo obtidos do conjunto de dados. Similar ao teste de Grubbs (**Equação 11**), também identifica resultados anômalos, o valor de $Q_{\text{calculado}}$ é comparado a um valor de referência, Q_{tabelado} , e para ser considerado um valor estatisticamente aprovado o resultado calculado deve ser inferior ou igual ao tabelado, de acordo com nível de confiança e o grau de liberdade [149-152]. Neste caso, para três replicatas com 95% de nível de confiança, o valor de $Q_{\text{tabelado}} = 0,970$. A **Tabela 23** mostra que para cada nível de concentração analisado pelos analistas, não houve “outlier” entre as replicatas.

$$Q_{\text{CALCULADO}} = \frac{|x_n - x_{n+1}|}{|x_{\text{valor mais alto}} - x_{\text{valor mais baixo}}|} \quad \text{Equação 6}$$

Sendo: x_n = valor suspeito, x_{n+1} = valor próximo ao suspeito, $x_{\text{valor mais alto}}$ = valor mais alto das replicatas e $x_{\text{valor mais baixo}}$ = valor mais baixo das replicatas.

Tabela 23. Teste de Dixon (teste Q) para analisar valores anômalos das medidas no teste de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II). Níveis de concentração: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e 1×10^{-6} mol L⁻¹, respectivamente.

Analistas	Nível	Média ($\bar{x}$)	Valor mais alto	Outlier Dixon?	Valor mais baixo	Outlier Dixon?
1	1	130,085	131,475	NÃO	128,587	NÃO
	2	200,310	201,072	NÃO	199,071	NÃO
	3	263,592	269,357	NÃO	260,803	NÃO
2	1	126,660	131,168	NÃO	128,206	NÃO
	2	191,449	194,605	NÃO	186,549	NÃO
	3	272,277	273,703	NÃO	271,248	NÃO

O desvio padrão de *Horwitz*, ou RSD teórico, é obtido como mostra a **Equação 7**, e simboliza o desvio padrão máximo esperado para o conjunto de dados analisados. O mais importante desses testes é observar o valor encontrado de HORRAT ($RSD_{\text{experimental}}/RSD_{\text{HORWITZ}}$), que deve ser menor ou igual a 1, mostrando que o desvio padrão relativo experimental obtido do método não ultrapassa o desvio padrão relativo máximo teórico [149-152]. Na **Tabela 24** são apresentados os resultados dos dois analistas, com seus valores de HORRAT consideravelmente abaixo da unidade, estando de acordo com um método estatisticamente repetível e reprodutível considerando um intervalo de 95% de confiança.

$$RSD_{HORWITZ} = 2^{(1-(0,5 \cdot \text{LOG}[\text{ANALITO}]))}$$

Equação 7

Sendo: [analito] se refere a concentração mássica do analito em $\mu\text{g kg}^{-1}$

Tabela 24. Dados estatísticos para análise de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor *MAC* e íons cádmio(II). Níveis de concentração: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} e 1×10^{-6} mol L⁻¹, respectivamente.

	Nível 1		Nível 2		Nível 3	
	<i>Analista</i>	<i>Analista</i>	<i>Analista</i>	<i>Analista</i>	<i>Analista</i>	<i>Analista 2</i>
Média	130,085	129,660	200,310	191,449	263,592	272,277
Desvio	0,913	1,029	0,801	2,754	2,535	0,682
RSD (%)	0,702	0,794	0,400	1,439	0,962	0,250
RSD Horwitz (%)	28,187		22,123		19,931	
HORRAT	0,025	0,028	0,018	0,065	0,048	0,013

4.3.5.4. Robustez: Teste de Youden

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar quão sensível o resultado é frente às variações em algumas condições nominais desse procedimento. Se as variações não acarretarem mudanças estatisticamente discrepantes, pode-se considerar o procedimento analítico robusto. Um método robusto sugere resultados mais reproduzíveis ao longo do tempo e maior portabilidade para ser aplicado em outros laboratórios, por outros analistas [149-152]. Desta forma, a fim de avaliar a robustez para o sistema do ligante *MAC* com íons cádmio(II), realizou-se um planejamento fatorial fracionário a partir de 8 combinações diferentes de sete condições nominais alteradas, baseado no conhecido “*Teste de Youden*”, mantendo fixo as concentrações de *MAC* e cádmio(II) em 100 e 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, em todas as combinações. Os ensaios das combinações fatoriais foram feitos em duplicatas e aleatoriamente, inclusive entre as replicatas de cada combinação, pois a autenticidade das repetições e a ordem aleatória da realização dos ensaios garantem a independência estatística dos resultados. Esse teste permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o grau de influência de cada uma dessas variações. A **Tabela 25** mostra as sete condições e suas respectivas alterações para o teste da avaliação de robustez do método, e a **Tabela 26** traz as

oito combinações realizadas, de modo a variar quatro vezes cada condição escolhida em quatro combinações distintas.

Tabela 25. Parâmetros e suas condições nominais/variadas no teste de Youden para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II). **Sendo:** TA= temperatura ambiente.

PARÂMETROS		CONDIÇÃO NOMINAL	CONDIÇÃO VARIADA
1	Temperatura	TA	~10°C
2	Marca do sal	VETEC	MERCK
3	Tempo entre o preparo da amostra e a medida	2h	1,5h
4	Marca do etanol	DINAMICA	BIOTEC
5	Armazenamento das amostras antes das medidas	TA	Geladeira (~15°C)
6	Borbulhamento de gás argônio (~10 min antes das medidas)	NÃO	SIM
7	Lavagem da cubeta entre as medidas	2x etanol + 1x acetona	1x acetona

Tabela 26. Combinações fatoriais usadas no teste de Youden para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II). Para cada combinação, A-H, o quadro em amarelo em destaque representa a condição nominal (CN) usada e o quadro em branco representa a condição variada (CV).

PARÂMETROS		A	B	C	D	E	F	G	H
1	Temperatura	CN	CN	CN	CN	CV	CV	CV	CV
2	Marca do sal	CN	CN	CV	CV	CN	CN	CV	CV
3	Tempo entre o preparo da amostra e a medida	CN	CV	CN	CV	CN	CV	CN	CV
4	Marca do etanol	CN	CN	CV	CV	CV	CV	CN	CN
5	Armazenamento das amostras	CN	CV	CN	CV	CV	CN	CV	CN
6	Borbulhamento de gás argônio	CN	CV	CV	CN	CN	CV	CV	CN
7	Lavagem da cubeta entre as medidas	CN	CV	CV	CN	CV	CN	CN	CV

Com a média obtida das duplicatas das combinações fatoriais, realizou-se um teste F (*teste de Fisher*), que analisa as variâncias de cada conjunto de dados obtidos das medidas e relaciona estas variâncias para estimar quão preciso foram os

resultados (**Equação 8**). Sabendo que cada condição nominal escolhida foi variada 4 vezes ao longo das 8 combinações, agrupam-se os 4 resultados obtidos das combinações no qual se usou a condição nominal, e em um segundo grupo os 4 resultados das combinações com condição variada, calcula-se as variâncias de cada grupo (nominal e variada), e a relação entre elas (maior/menor) gera o valor de $F_{\text{calculado}}$, que não deve ultrapassar o valor de F_{tabelado} para ser considerado robusto (para grau de liberdade 3 e intervalo de confiança de 95%, tem-se $F_{\text{tabelado}}=15,44$). A **Tabela 27** traz os valores de Fisher obtidos para cada condição variada, mostrando que nenhuma das alterações realizadas nas condições nominais testadas apresentaram discrepâncias estatisticamente significativas, e a partir do teste das variâncias, o método desenvolvido mostrou-se robusto.

$$F_{\text{CALCULADO}} (n=a;n=b) = \frac{s_a^2}{s_b^2} \quad \text{Equação 8}$$

Sendo: s= desvio padrão amostral

Tabela 27. Valores de $F_{\text{calculado}}$ para cada condição analisada e seus respectivos resultados de robustez para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).

CONDIÇÕES		$F_{\text{calculado}}$	RESULTADO
1	Temperatura	1,81	ROBUSTO
2	Marca do sal	3,92	ROBUSTO
3	Tempo entre o preparo da amostra e a medida	1,12	ROBUSTO
4	Marca do etanol	1,65	ROBUSTO
5	Armazenamento das amostras antes das medidas	2,99	ROBUSTO
6	Borbulhamento de gás argônio	2,42	ROBUSTO
7	Lavagem da cubeta entre as medidas	14,76	ROBUSTO

O “Gráfico de Pareto”, ilustrado na **Figura 32** para o sistema do MAC, traz em barras o valor do desvio padrão de cada condição variada no teste de Youden [149-152]. A **Equação 9** exemplifica o cálculo para obter o desvio padrão das alterações feitas nas condições de “temperatura” das medidas, sendo de maneira análoga para as demais condições. A “linha de significância” do gráfico, no qual a barra dos desvios não deve ultrapassar, é obtida a partir da **Equação 10**.

Na **Figura 32** é possível notar que todas as alterações das condições nominais no teste de Youden não apresentaram discrepâncias significativas nas

medidas, e o método desenvolvido pode ser considerado robusto segundo o gráfico de Pareto, pois nenhum valor de desvio padrão de cada condição analisada ultrapassou a linha de significância calculada para o sistema de 1,73. Além disso, é possível ordenar as condições nominais a partir dos desvios obtidos das medidas, indicando as condições que foram mais afetadas com as alterações realizadas, assim, obteve-se o seguinte ordenamento: 6>1>4>7>2>3>5. Portanto, o borbulhamento de argônio apresentou uma alteração maior com a variação na condição (número 6), bem como, a alteração na forma de armazenamento das amostras após o preparo mostrou a menor das variações nos resultados (número 5).

$$\text{Efeito da TEMPERATURA} = \frac{A+B+C+D}{4} - \frac{E+F+G+H}{4} \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{Linha de significância} = t_{\text{crítico}} * \sqrt{\frac{4 * s_{\text{média}}^2}{N}} \quad \text{Equação 10}$$

Sendo: $s_{\text{média}}^2$ = média das variâncias das 8 combinações fatoriais; N= número total de medidas de todas as combinações fatoriais (N=16); t_{tabelado} = valor de “*t de Student*” para uma distribuição normal de uma cauda (não direcional) para um intervalo de 95% de confiança ($t_{\text{tabelado}}(N=8)=2,36$).

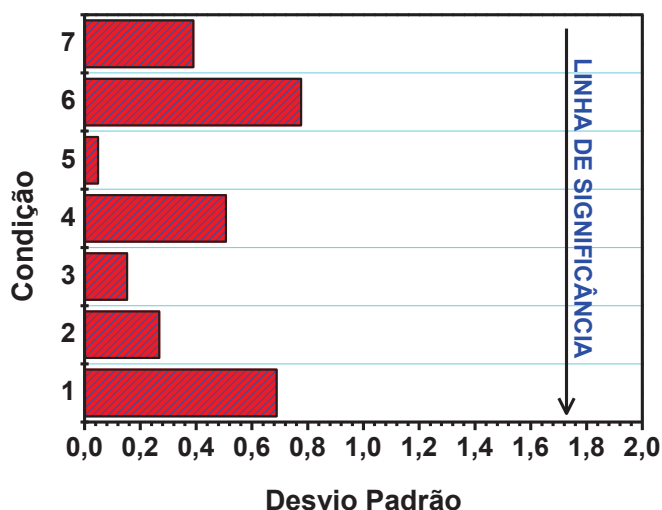


Figura 32. Gráfico de Pareto, ilustrando os efeitos das variações de 7 condições experimentais no método analítico. A concentração de MAC e íons cádmio(II) foram de 100 e 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.3.5.5. Seletividade frente a interferentes: competição de íons

Após a investigação da seletividade individual do sensor, um teste mais complexo com possíveis interferentes é de extrema importância para se atestar a especificidade e o grau de seletividade do sistema. Comumente chamado apenas de “teste de seletividade” pelos químicos analíticos, e em outras áreas também é conhecido como “competição de íons”. O teste tem como finalidade analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença da espécie de interesse, e pode ser feito de duas maneiras: **i)** de forma individual para cada possível interferente, quando a intenção é descobrir o grau de interferência de um potencial analito, **ii)** com todos os possíveis interferentes reunidos na mesma amostra, quando a intenção é atestar a especificidade do sensor. É importante que a “fortificação” em nível relevante de concentração das amostras do sensor com os suspeitos interferentes seja suficiente para avaliar os seguintes aspectos: **1. Se a presença das substâncias adicionadas leva a uma falsa identificação do analito; 2. Se a identificação do analito é dificultada na presença de um ou mais compostos avaliados como interferentes; 3. Se a quantificação do analito é influenciada pelos suspeitos interferentes** [149-152].

O teste de *Grubbs* tem como propósito a identificação de dados anômalos ou “outliers”. Estes valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados, um erro no cálculo ou até mesmo um erro na preparação da amostra ou aquisição do resultado. A **Equação 11** traz o cálculo do teste estatístico de *Grubbs*, e o valor de $G_{\text{calculado}}$ é comparado com um valor de G_{tabelado} em função do número de replicatas e do nível de significância adotado (normalmente 95%). Naturalmente, o valor calculado (obtido) deve ser inferior ou igual ao valor tabelado (referência), para ser considerado estatisticamente aprovado [149-152].

$$G_{\text{calculado}} = \left| \frac{x - \bar{x}}{s} \right| \quad \text{Equação 11}$$

Sendo: $\bar{x}$ = média amostral, x = valor suspeito e s = desvio padrão amostral.

Como mostrado na **seção 4.3**, no caso do ligante *MAC* seletivo a íons cádmio(II), realizou-se o teste contendo 19 íons interferentes suspeitos na presença da espécie de interesse, portanto 20 íons metálicos, no qual a concentração do sensor e de todos os metais era a mesma, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguindo as condições nominais já

listadas anteriormente. Desta forma foi possível observar que o sensor *MAC* é altamente seletivo e específico para íons cádmio(II), pois o efeito *CHEF* do sensor fluorescente na presença e na ausência desse metal permite sua distinção e detecção específica sem interferentes. Testes estatísticos, **Tabela 28**, não apresentaram nenhum “outlier” dos resultados (*teste de Dixon* e *teste de Grubbs*, sendo $Q_{\text{tabelado}} = 0,71$ e $G_{\text{tabelado}} = 1,715$), bem como nenhuma discrepância entre as variâncias das medidas (*teste de Fisher*, sendo $F_{\text{tabelado}} = 9,605$), **Tabela 29**, considerando um intervalo de 95% de confiança, grau de liberdade igual a 4 e número de replicatas igual a 5, com monitoramento da banda de emissão em 450 nm.

Tabela 28. Dados estatísticos do ensaio de “competição de íons” para o sistema de detecção do ligante *MAC* e íons cádmio(II), realizadas em quintuplicatas. $c_{\text{MAC}} = c_{\text{íons}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Soluções	Média	Desvio padrão	RSD (%)	Variância (s^2)	Outlier?	
					DIXON	GRUBBS
1 MAC	37,970	0,223	0,588	0,050	NÃO	NÃO
2 MAC + 19 METAIS	54,948	0,308	0,561	0,095	NÃO	NÃO
3 MAC + 19 METAIS + cádmio(II)	309,673	0,250	0,081	0,063	NÃO	NÃO

Tabela 29. Combinações para o teste de Fisher (*teste F*) usados no ensaio de “competição de íons” do sistema de detecção do ligante *MAC* e íons cádmio(II).

COMBINAÇÕES TESTADAS DAS VARIÂNCIAS DAS SOLUÇÕES		TESTE F ($F_{\text{tab}} = 9,605$)	
		$F_{\text{CALCULADO}}$	RESULTADO
1:2	MAC livre <u>versus</u> MAC + 19 METAIS	1,905	Aprovado
1:3	MAC livre <u>versus</u> MAC + 19 METAIS + cádmio(II)	1,255	Aprovado
2:3	MAC + 19 METAIS <u>versus</u> MAC + 19 METAIS + cádmio(II)	0,659	Aprovado

4.3.5.6. Ensaios de recuperação: análise da exatidão do sensor *MAC*

Cádmio é um dos íons metálicos mais tóxicos da natureza, listado como carcinogênico de classe I pela “Agência Internacional de Pesquisa do Câncer” (abreviado como *IARC*, do inglês “*International Agency for Research on Cancer*”), com

representatividade na “*Organização Mundial da Saúde*” (OMS) [153], logo, sua extensa distribuição pode causar inúmeros danos irreversíveis ao meio ambiente e à saúde humana. As queimas de combustíveis fósseis, mineração, fundição, atividades industriais (como metal, cimento, cerâmica, têxtil, galvanoplastia, baterias de níquel-cádmio) e atividades agrícolas (fertilizantes químicos), são as fontes de poluição mais comuns desse metal [154-155]. O acúmulo de cádmio(II), por um longo período de tempo, através dos alimentos [156], causa danos graves aos tecidos moles, principalmente fígado e rins, e tem sido relacionado a doenças neurodegenerativas, como por exemplo, Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla [157]. Estima-se que a vida biológica do cádmio nos humanos varie de 10 a 40 anos [158-159]. A doença “*itai-itai*”, denominada pela expressão de dor em japonês no início do século XX de origem ainda desconhecida à época, atingiu grande parte dos moradores às margens do Rio Jinsu no Japão na década de 60, devido à uma séria contaminação da água de irrigação das plantações de arroz por cádmio, oriundo de efluentes de uma mineração próxima ao rio. Em abril de 2012, a prefeitura de Toyama no Japão, cidade na qual se localiza o Rio Jinsu, inaugurou o “*Museu da doença itai-itai*”, devido as preocupações com a perda das memórias do infeliz evento devido a dispersão dos materiais relevantes a ele e o envelhecimento das pessoas contaminadas [160].

As concentrações máximas admissíveis de íons cádmio(II) na água potável e bebidas, são reguladas pela “*Organização Mundial da Saúde*” (OMS), e devem ser de até $3 \mu\text{g L}^{-1}$ [161]. Portanto, é particularmente importante identificar e quantificar os níveis de cádmio(II) em amostras relacionadas ao meio ambiente e à saúde humana. Sabendo disso, quando se trata de atestar a exatidão de um método analítico existem procedimentos variados, como o uso de *MRC* (material de referência certificado), ensaios de proficiência, comparação com métodos já validados, ou então, ensaios de recuperação, que são comuns quando não se tem *MRC* ou um método validado para fins comparativos [149-152]. Neste trabalho, utilizou-se amostras como cachaça e saquê (de origens brasileiras) e ainda, extrato alcoólico da fumaça de três unidades de cigarro para os ensaios de adição e recuperação, com adição do sensor *MAC* e uma concentração conhecida de íons cádmio(II), escolhida baseada na faixa linear, ou seja, concentração baixa, média e alta da faixa, e analisadas em triplicatas.

As matrizes alcoólicas foram escolhidas devido ao apelo da indústria alimentícia de bebidas tradicionais, como a cachaça e o saquê, e mostrou-se aplicável

devido ao fato de todos os testes de detecção deste trabalho, terem sido realizados em meio a 99% de etanol, o que facilita o preparo das amostras para os ensaios de recuperação com bebidas alcoólicas dentro das condições nominais trabalhadas. No caso do extrato de fumaça de cigarro, é sabido que os tabacos possuem uma grande concentração de metais pesados em sua composição, como cádmio(II), que pode ser absorvido do solo ou água subterrânea, e acumulado nas folhas durante o seu cultivo, representando um grande risco à saúde dos fumantes ou não-fumantes, uma vez que a fumaça inalada de um cigarro aceso contém cerca de 5 a 10% da quantidade total de cádmio(II) [162-164]. O nível médio de cádmio(II) no tabaco varia de 0,6 a 3,6 mg kg⁻¹, o que transforma o fumo em uma das principais fontes de contaminação por cádmio(II) dos seres humanos [163-164]. Desta forma, simulando o que um fumante inalaria se utilizasse três unidades de cigarro, o teste com o extrato e as bebidas teve como propósito: *1. investigar se a extração e as bebidas, podem agregar interferentes desconhecidos à matriz, sabendo, por exemplo, que o cigarro possui cerca de cinco mil substâncias em sua composição* [162-164]; *2. investigar se a concentração de íons cádmio(II) nas matrizes deste ensaio é demasiadamente grande a ponto de interferir nos resultados de recuperação.* O extrato alcoólico da fumaça de cigarro foi obtido a partir do esquema ilustrado na **Figura 33**, com um total de 50 mL de etanol, que ficou levemente amarelado após a extração, contido no balão para a “captura” da fumaça. O cálculo de recuperação é feito como mostra a **Equação 12**, também chamado de “*veracidade*” [149-152], e é dado em porcentagem, pois estima o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito, com base na fração mássica (µg kg⁻¹) do analito no teste.

$$\text{RECUPERAÇÃO(\%)} = \left(\frac{\text{IF1}-\text{IF2}}{\text{IF3}} \right) * 100 \quad \text{Equação 12}$$

Sendo: IF1= intensidade fluorescente da amostra fortificada com íons cádmio(II) na matriz; IF2= intensidade fluorescente da amostra sem fortificação de íons cádmio(II) na matriz; IF3= intensidade fluorescente de sensor *MAC* com íons cádmio(II) sem matriz.

As amostras foram preparadas da seguinte maneira: em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, foram adicionados 50 µL do sensor *MAC* em clorofórmio (10 mmol L⁻¹), 150, 250 e 400 µL de uma solução de cádmio(II) de

concentração $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol (3 níveis de concentração), e o volume final foi completado com as matrizes (cachaça, saquê ou extrato de cigarro). Os resultados estão reunidos na **Tabela 30**, na qual é possível observar valores satisfatórios de recuperação, na faixa de 70 a 114%, que é consideravelmente superior à faixa mínima aceitável (20 a 50%) segundo as normas do Mercosul [108,109], para a fração mássica ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de cádmio(II) utilizada nos experimentos de recuperação. Logo, é possível afirmar que o sensor *MAC* pode ser utilizado na quantificação de íons cádmio(II) em matrizes complexas, como bebidas alcoólicas e extrato de fumaça de cigarro. Além disso, o método avaliado permitiu obter resultados altamente satisfatórios com valores de precisão e exatidão que indicam um método analítico verossímil de detecção, sem íons interferentes.

Tabela 30. Valores de recuperação (%) do sensor *MAC* e íons cádmio(II) em diferentes matrizes.

MATRIZES	c (Cd^{2+}) (nmol L^{-1})	RECUPERAÇÃO (%)
CACHAÇA (origem brasileira)	300	$71,5 \pm 0,5$
	500	$87,5 \pm 0,2$
	800	$107,2 \pm 0,2$
SAQUÊ (origem brasileira)	300	$78,8 \pm 0,6$
	500	$90,3 \pm 0,4$
	800	$114,4 \pm 0,3$
Extrato alcoólico da fumaça de cigarro (três unidades)	300	$70,6 \pm 0,7$
	500	$81,0 \pm 0,2$
	800	$103,5 \pm 0,1$

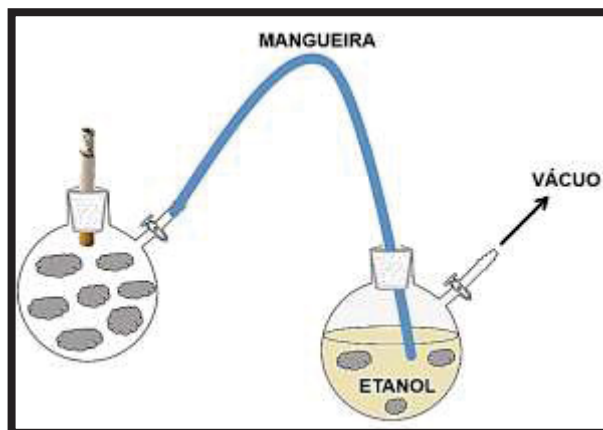


Figura 33. Esquema da montagem de extração alcoólica da fumaça de três unidades de cigarro.

4.3.5.7. Comparação do sensor *MAC* e demais sensores para cádmio(II)

A partir de todos os dados supracitados para a detecção de íons cádmio(II) com o ligante *MAC*, sumarizado na **Tabela 31**, foi possível fazer um comparativo com alguns sensores para detecção do mesmo íon, também baseados na fluorimetria como transdução e com efeito *CHEF* na sinalização. Os dados mais importantes de cada exemplo são apresentados na **Tabela 32**. Com base nisso, alguns resultados do quimiossensor *MAC* destacam a originalidade e o grande diferencial deste trabalho em relação aos encontrados na literatura, tais como:

1. alta especificidade, ou seja, não possui íons interferentes na detecção;
2. baixo limite de detecção e quantificação (em nmol L^{-1});
3. a formação do seu complexo de estequiometria 1:1 (metal:ligante) com alto valor de constante de formação (K_f), indica alta estabilidade em solução;
4. detecção em meio orgânico, uma vez que a maioria das pesquisas buscam a produção de sensores hidrossolúveis para aplicações biológicas;
5. ser uma molécula macrocíclica, o que oferece ao ligante *MAC* um diferencial interessante agregado a um forte efeito quelato que influencia na afinidade de ligação sensor:analito;
6. obtenção de figuras de mérito a fim de atestar a adequação do método de detecção proposto, que obedecem as normas vigentes da *ANVISA* e *INMETRO* [108-110].

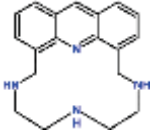
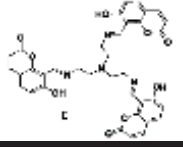
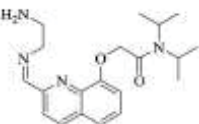
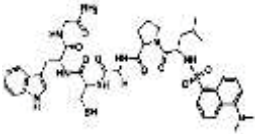
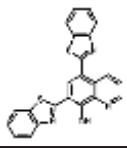
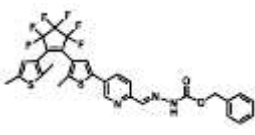
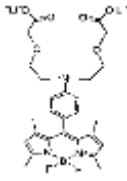
Em um trabalho de revisão, Dutta e Das [165] em 2012 abordaram um histórico sobre sensores fluorescentes para a detecção seletiva de íons tóxicos como

cádmio(II), alumínio(III), mercúrio(II), zinco(II), entre outros, e já destacavam a falta de trabalhos com a obtenção de figuras de mérito. Realizando uma busca na plataforma de pesquisa “*Web of Science*” com as palavras-chave: figuras de mérito e quimiossensores ou sensores fluorescentes, dentro do período que compreende 1945-2021, pode-se reforçar ainda mais a originalidade do presente trabalho quanto a sua aplicabilidade. Os artigos encontrados na busca correspondem aos quimiossensores do nosso grupo de pesquisa que datam dos últimos dois anos (2020/2021), portanto, sensores para detecção de ferro(III) [166], zinco(II) [100], mercúrio(II) [101], alumínio(III) [105] (ligante *BPMA*) e cádmio(II) [137] (ligante *MAC*). Além destes, foram encontrados outros poucos exemplos. Como o trabalho de Shahamirifard e Ghaedi, em 2017, que apresentou repetibilidade e precisão intermediária para um sensor de mercúrio(II), com ensaio de recuperação em três diferentes fontes de água [167], porém sem realizar testes estatísticos dentro das replicatas de suas medidas nas figuras de mérito abordadas no trabalho. Mais recentemente, Aydin e colaboradores [168], em 2020, usaram como referência um trabalho do nosso grupo de pesquisa [105] para orientá-los na obtenção de figuras de mérito do seu respectivo sensor na detecção de alumínio(III). Isso reafirma que atualmente ainda não há muitos trabalhos que apresentam figuras de mérito no estudo com quimiossensores para detecção de íons em solução, utilizando-se de testes estatísticos para assegurar a seletividade, veracidade e precisão do sensor.

Tabela 31. Resultados gerais do sensor *MAC*.

TESTES REALIZADOS	Resultado obtido
Seletividade individual (efeito CHEF)	Íons cádmio(II)
Competição de íons	Sem interferentes (altamente específico)
Estequiometria	1:1 (metal:ligante)
Constante de formação	$K_f = 1,05 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ (log $K_f = 9,021$)
Reversibilidade	4 ciclos com <i>EDTA</i>
LOD e LOQ	9,98 e 33,31 nmol L ⁻¹ (respectivamente)
Repetibilidade, Precisão intermediária e Robustez	Estatisticamente aprovados
Teste de adição e recuperação (3 matrizes)	Estatisticamente aprovados

Tabela 32. Dados analíticos de alguns sensores fluorescentes de efeito *CHEF* para íons cádmio(II) publicados recentemente. **Sendo:** L= sensor/ligante.

Sensor	Ano [ref]	LOD (mol L ⁻¹)	Íons interferentes	Meio	logK	L:Cd ²⁺
	2020 [este trabalho] [137]	9,98x10 ⁻⁹	nenhum	EtOH/CHCl ₃ 99:1	9,02	1:1
	2019 [169]	1,17x10 ⁻⁹	nenhum	MeCN/H ₂ O 9:1	11,14	1:2
	2019 [170]	2,7x10 ⁻⁹	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	H ₂ O/MeOH 9:1	-	1:1
	2019 [171]	27,5x10 ⁻⁹	nenhum	H ₂ O	10,96	2:1
	2019 [172]	1x10 ⁻⁷	Al ³⁺ , Zn ²⁺	MeOH/H ₂ O 99:1	-	2:1
	2019 [173]	1,71x10 ⁻⁷	Cu ²⁺	THF	3,11	1:1
	2019 [174]	1,80x10 ⁻⁷	nenhum	H ₂ O	5,41	1:1

CAPÍTULO 2

Quimiossensores baseados na luminescência do fluoreno

5. Introdução

5.1. Fluoreno: da descoberta ao uso como unidade ativa em quimiossensores

Marcellin Berthelot, em 1867, ao trabalhar com o alcatrão de hulha, descreveu a obtenção de um novo hidrocarboneto, e notou que sua solução alcoólica diluída exibiu uma forte fluorescência, nomeando-a “*fluoreno*” [175]. Essa nomenclatura não sistemática é adotada até os dias atuais pela IUPAC, incluindo para seus derivados, e já gerou algumas discussões e polêmicas sobre sua etimologia e por não acompanhar a nomenclatura padronizada [176]. Alguns cientistas entendem que o prefixo “*fluore*”, que em latim significa “*fluir*”, não está de acordo com as propriedades do composto de fluoreno. No entanto, é preciso entender que seu nome não está intimamente ligado ao seu significado etimológico, e sim ao fato de apresentar fluorescência em solução, que, como já discutido no capítulo 1, é um fenômeno que também teve seus primeiros estudos datados da mesma época. A determinação da estrutura da molécula de fluoreno foi confirmada somente em 1878 por R. Fittig [177], e o sistema de numeração foi proposto em 1925 por Patterson [71], sendo aceito e usado até os dias atuais pela IUPAC, como mostra a **Figura 34**.

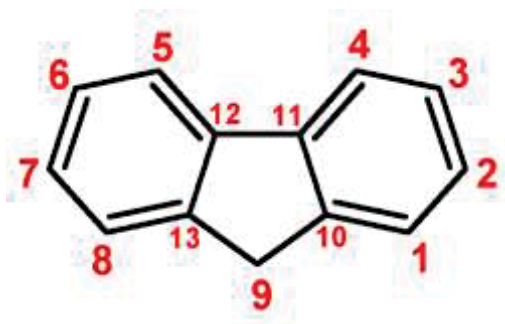


Figura 34. Sistema de numeração (Patterson) adotado desde 1925 para *fluoreno*, e principal estrutura de ressonância para a molécula de *fluoreno*.

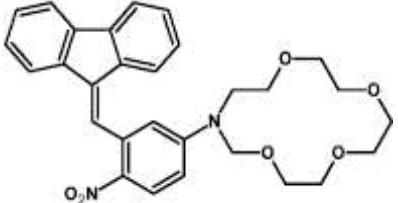
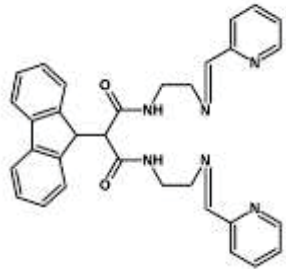
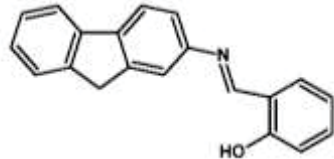
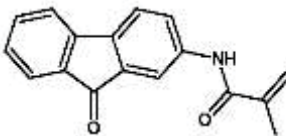
Fluoreno é um composto planar e rígido, seu anel central é de 5 membros e condensado a outros dois anéis benzênicos, possui massa molar igual a 166,22 g/mol e fórmula molecular $C_{13}H_{10}$. Existem 2 formas de ressonância na molécula de *fluoreno*, a **Figura 34** mostra a principal delas. Dados de cristalografia de raios-X identificam que a distância de ligação entre os carbonos 10-11 e 13-12 são ligeiramente maiores (1,397 Å) do que entre os carbonos 1-10 e 8-13 (1,386 Å). Devido a não homogeneidade de ressonância, é muito comum encontrar derivados di-substituídos nos carbonos 2 e 7, principalmente em polímeros [178]. No entanto, a substituição na posição do carbono 9 também é amplamente explorada, a fim de melhorar a

solubilidade de derivados do fluoreno, com a substituição por grupos alquílicos de cadeia longa, bem como, dificultar ataques oxidativos à molécula [178]. Sua solubilidade em água é aproximadamente $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ a 25°C , considerada relativamente baixa, no entanto, superior a outros fluoróforos similares nas mesmas condições, como por exemplo: acridina, antraceno, fenantreno e pireno [73].

A literatura mostra que o rendimento quântico (ϕ) de *fluoreno* em etanol tende à unidade, por isso é considerado um dos cromóforos mais eficientes [2], diferente, por exemplo, do composto bifenil, muito similar em estrutura, porém nas mesmas condições apresenta baixa intensidade de fluorescência ($\phi \sim 0,2$) [2,7]. A região de emissão do *fluoreno* e seus derivados normalmente ocorre na faixa de 300 a 350 nm. Como o fluoreno livre apresenta alta fluorescência, umas das estratégias interessantes para seus derivados é tentar manter a alta eficiência quântica. Para que isso ocorra, a funcionalização deve conferir rigidez a estrutura molecular, assim os processos radiativos são favorecidos em detrimento dos mecanismos de relaxação. Além disso, derivados que atuem como agentes quelantes são muito interessantes para o ponto de vista dos quimiossensores, pois, quando complexados com íons metálicos, por exemplo, podem modular a emissão do sistema, aumentando ou diminuindo a intensidade fluorescente de forma seletiva, atuando como sensores químicos do tipo *CHEF* (do inglês “*chelation-enhanced fluorescence*”) ou tipo *CHEQ* (do inglês “*chelation enhancement quenching*”) respectivamente (como discutido no capítulo 1).

Ligantes derivados do fluoróforo fluoreno são amplamente estudados na literatura, com aplicações diversas, inclusive como quimiossensores para detecção seletiva de íons inorgânicos [179-189] alguns exemplos são trazidos na **Tabela 33**, no qual o fluoreno atua como unidade ativa do sensor químico. Sabendo disso, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de quimiossensores que abordem questões como sensibilidade e/ou especificidade aplicados a matrizes reais, testados estatisticamente quanto à reversibilidade, robustez, precisão intermediária e repetibilidade.

Tabela 33. Ligantes derivados de fluoreno seletivos a íons metálicos e ânions.

1	SENSOR	Analito [ref]	2	SENSOR	Analito [ref]
		Ba(II) [180]			Cu(II) [45]
2		Zn(II) e F ⁻ [182]	4		Hg(II) [185]

5.1.1. Ligante derivado do fluoreno no estudo como quimiossensor

Nosso grupo de pesquisa apresenta experiência no estudo do comportamento emissivo de ligantes derivados de fluoreno. Em 2017, três trabalhos com ligantes derivados acíclicos foram publicados, sendo um deles sobre a detecção seletiva de íons cobre(II) em solução [45,46,143]. A **Figura 35(a)** mostra o composto *diethyl 2-(9-fluorenil) malonato*, abreviado como *DEFM*, no qual podemos observar que o fluoróforo fluoreno está ligado, através de seu carbono 9, ao carbono α da porção dietilmalonato. O estudo com derivados malônicos em compostos de coordenação com metais de transição é de grande interesse para muitos pesquisadores, pois estes ligantes possuem capacidade quelante e tendem a formar complexos de alta estabilidade. Beukeleer e colaboradores, por exemplo, estudaram o ácido malônicodiamida (abreviado como *AcdMal*) como ligante em complexos hexa e tetracoordenados com ferro(III), cobre(II), níquel(II), zinco(II), manganês(II) e cobalto(II) [190]. Rodrigues-Martin e colaboradores estudaram complexos análogos inserindo ainda bipyridina (*bipy*) como um segundo tipo de ligante na esfera de coordenação dos complexos [191]. O ligante *DEFM* foi usado como precursor da rota sintética dos ligantes acíclicos supracitados estudados pelo nosso grupo, bem como, de outros ligantes descritos na literatura no estudo de complexos com diferentes metais de transição, como cobre(II), níquel(II), ferro(III) e cobalto(II) [192-196]. A síntese de *DEFM* foi descrita em 1999 por Qin-Hui Luo e colaboradores [192], como

mostra a **Figura 35(b)**, e seu grupo de pesquisa ainda o utiliza como precursor de seus ligantes dioxotetraaminas estudados recentemente [197].

Sabendo que o ligante *DEFM* pode atuar como ligante quelante na formação de complexos altamente estáveis, e possui em sua composição um fluoróforo com alta eficiência quântica (fluoreno), um dos objetivos desse capítulo foi o estudo deste ligante como quimiossensor luminescente para íons metálicos, uma vez que não há registro dessa investigação para *DEFM*, incluindo o uso de ferramentas estatísticas, conforme os parâmetros adotados e recomendados por órgãos regulamentadores como ANVISA [108-109] e INMETRO [110], a fim de garantir que o quimiossensor estudado corresponda a um sistema estatisticamente robusto, preciso, exato e de alta seletividade sem interferentes em potencial.

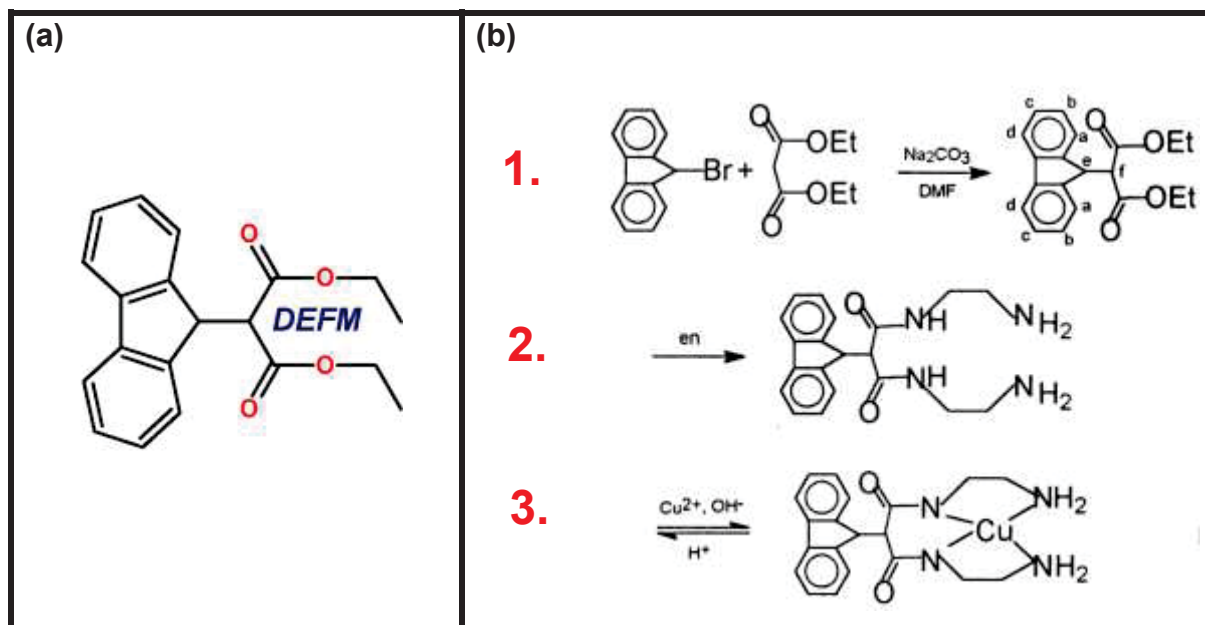


Figura 35. (a) Ligante *DEFM*. (b) Rota de síntese para obtenção de: 1. *DEFM*, 2. Ligante dioxotetraamina a partir de *DEFM*, 3. Complexo de cobre derivado de *DEFM* (Adaptado de [192]).

5.2. Complexos de Ln(III) como quimiossensores

Até o momento foi abordada a temática dos quimiossensores para a detecção de íons do *bloco d*, no entanto, os metais do *bloco f* também ganham destaque nessa área de pesquisa, considerando seus compostos de coordenação. Os íons lantanóides são classificados como “ácidos duros”, seguindo a “teoria de acidez e basicidade de Pearson” [141,198], assim a coordenação ocorre de forma mais iônica,

o que leva a uma forte preferência por grupos doadores O e N, com carga negativa ou neutra [199]. Logo, podem coordenar-se com moléculas de água, solventes orgânicos e/ou ânions diversos a fim de completar sua esfera de coordenação, que normalmente apresentam números altos. Para entender os tipos de quimiossensores com íons lantanóides é necessário compreender como se dá a construção de um diagrama de energia (discutida no **ANEXO 6**) e a transferência de energia para a sensibilização indireta da emissão desses íons, conhecido como “efeito antena”. Desta forma, a discussão a seguir abordará tais aspectos relacionados ao íon európio(III), que foi o lantanóide usado na investigação deste trabalho.

5.2.1. Európio: da descoberta ao efeito antena

Apesar das técnicas espectroscópicas dos íons lantanóides serem pouco afetadas com o ambiente químico, estes apresentam propriedades de absorção e emissão muito ricos e complexos, conhecidos por suas linhas finas e comprimentos de onda discretos (específicos) [200]. O európio foi descoberto em 1900 por Eugène-Antole Demarçay, quando observou que as linhas espectrais do concentrado de samário e gadolínio não condiziam com tais elementos, e o nomeou em homenagem ao continente europeu [201]. A emissão do íon de európio(III) ocorre na região do infravermelho do espectro eletromagnético, mais precisamente entre 570-840 nm, e a grande característica da maioria dos seus compostos é a emissão de luz vermelha, com algumas derivações para o rosa [201]. Em 1937, J.K. Van Vleck definiu em seu trabalho que o estado fundamental dos elementos lantanídicos tinha relação com o preenchimento dos orbitais 4f e que suas transições eletrônicas eram do tipo $f \rightarrow f$ [202].

De fato, as transições eletrônicas envolvendo os íons trivalentes desses elementos estão centradas no orbital 4f que está parcialmente preenchido (exceto La^{3+} e Lu^{3+}), no entanto tais transições ***f-f*** são proibidas pela “*regra de seleção*” de Laporte, e como o íon lantanóide está embutido em um meio diferente da fase gasosa na qual a regra é empregada, com efeito de campo cristalino, a regra é relaxada e a transição pode ser observada [200].

A excitação direta dos elementos da série é possível, porém pouco eficiente pois, de maneira prática, ocorrem com a utilização de lasers e em altas concentrações do íon [199,203]. No entanto, o comportamento luminescente dos lantanóides pode ser estudado através da “*sensibilização indireta do íon*”. Em 1942, Weissman foi o primeiro a retratar a alta luminescência de compostos de európio(III) após a excitação

numa região associada ao ligante [204], confirmada em 1951 por Sevchenko e Trofimov [205]. Em 1958, o trabalho de Crosby e Kasha com compostos de itérbio, mostrou que a excitação direta não era a responsável pela emissão do íon lantanóide, e sim um processo de transferência de energia dos estados eletrônicos do ligante para os estados 4f do metal [206].

Desta forma, a efetividade dos processos de emissão dos íons lantanóides pode ser explorada com o uso de um ligante ligado ao metal, que contenha um grupo cromóforo ou sensibilizador (que absorve energia) em sua composição, conhecido como *“ligante-antena”*. Assim, as famosas linhas de emissão dos elementos da série são observadas quando o ligante-antena, após o processo de absorção, e por possuir níveis de energia no estado excitado *“suficientemente altos”*, promove o que chamamos de *“transferência de energia”*, amplamente conhecido como *“efeito antenna”*, para o estado emissor do íon lantanóide [199].

O efeito antenna pode ser definido, portanto, como a transferência de energia do estado tripleto do ligante, para o estado excitado do íon lantanóide, dito *“estado emissor”*. Desta forma, após a transferência, a energia pode ser relaxada com emissão de luz para o estado fundamental do íon. O diagrama de energia hipotético, ilustrado na **Figura 36**, mostra os principais processos que podem ocorrer após a absorção (processo 1) até a transferência de energia (processo 6) e então a emissão do íon lantanóide (processo 7), representado na figura pelos níveis de energia do íon európio(III). É importante ressaltar que a transferência de energia só será possível se o nível tripleto do ligante for superior em energia ao nível excitado do lantanóide. Alguns estudos mostram que a maior eficiência do efeito antenna se dá com diferenças de energia, entre esses níveis, superiores a 3000 cm^{-1} [199]. Além dessa condição importante, é necessário que o ligante apresente também alto tempo de vida (τ) no estado excitado, para que o processo de fluorescência atrasada (processo 7) seja favorecido, uma vez que após a absorção muitos processos de relaxação não-radiativa podem ocorrer mais rapidamente, inclusive a emissão do próprio ligante.

Desta forma, a escolha do ligante para a sensibilização da emissão do íon lantanóide é fundamental para a transferência de energia efetiva. O íon európio(III) possui uma série de ligantes sensibilizadores já estudados como *“antenas”* descritos na literatura, e alguns deles estão sumarizados na **Figura 37**. A energia do nível emissor $^5D_0$ do íon európio(III) é de 17227 cm^{-1} , logo, os níveis tripletos dos ligantes ilustrados são superiores, o que justifica o efeito antenna nestes exemplos [207]

(Tabela 34). Destaca-se a semelhança dos *ligantes-antena* β -dicetonas e β -cetoésteres exemplificados, que já atuam na literatura como sensibilizadores da emissão do íon európio(III) [208-210], com o ligante *FDC*, ambos ligantes quelantes com átomos de oxigênio doadores [211]. O estudo com estes conjuntos de ligantes funcionais em compostos com terras raras se iniciaram a partir da metade da década de 60, ganhando impulso nos anos 70 [212-215], no entanto, um ligante como *FDC*, que possui em sua composição um fluoróforo de alto rendimento quântico e uma estrutura amplamente conjugada, que confere maior rigidez favorecendo os processos emissivos, apresenta originalidade frente a compostos similares e permite a expansão do estudo com ligantes-antena para íons európio(III).

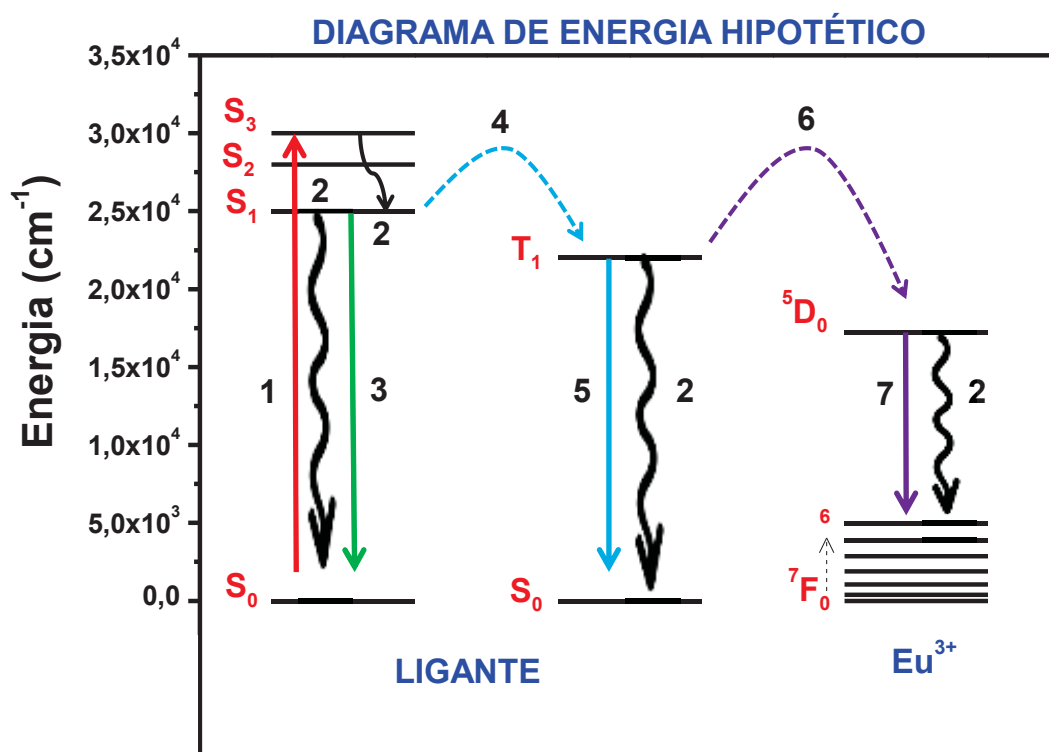
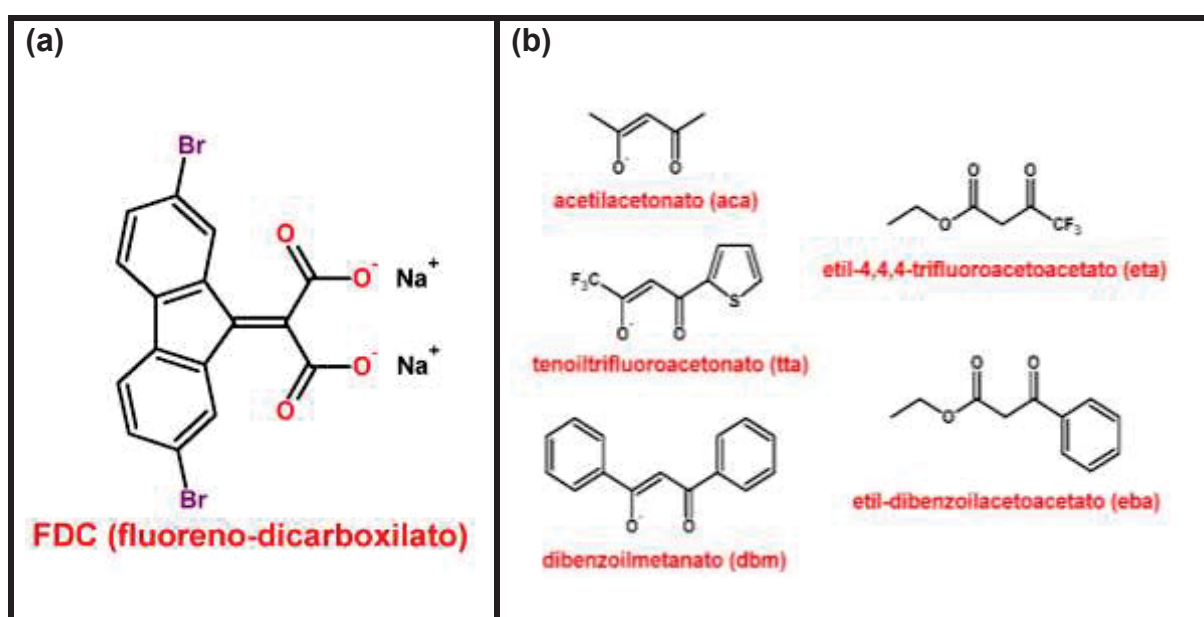


Figura 36. Diagrama de energia hipotético ilustrando os processos de: 1= absorção; 2= relaxações não-radiativas (conversão interna/externa e relaxação vibracional); 3= fluorescência; 4= cruzamento interssistema; 5= fosforescência; 6= transferência de energia; 7= fluorescência atrasada (retardada).

Tabela 34. Energia dos níveis tripleto dos ligantes-antena para o íon európio(III) [208-210].

LIGANTE-ANTENA	ENERGIA (cm ⁻¹)
ACAC	26000
TTA	20300
DBM	20660
ETA	21941
EBA	23712

**Figura 37.** (a) ligante FDC. (b) Exemplos de ligantes-antena para o íon európio(III) [201].

5.2.2. Tipos de quimiossensores com lantanóides

Os íons Ln^{3+} possuem carga elevada que favorece a formação de complexos, no entanto, por serem relativamente grandes (1,03-0,86 Å em NC=6) quando comparados a íons de elementos de transição (Cr^{3+} = 0,615 Å; Fe^{3+} = 0,55 Å; ambos NC=6) não formam compostos de coordenação com facilidade. Os complexos mais estáveis dos elementos da série lantanídica são aqueles formados com ligantes quelantes com átomos de oxigênio doadores, como EDTA, acetilacetato (acac), ácido oxálico e similares [140]. Complexos com número de coordenação inferior a 6 são raros, mas podem ocorrer com ligantes mais volumosos, com 10 e 12 ocorrem em íons lantanóides maiores com agentes quelantes menores como nitrato e sulfato.

Os números mais comuns de coordenação são 7, 8 e 9 [140].

Em geral, as moléculas de solvente, em especial água, são ótimos coordenantes com elementos da série, no entanto, são também ótimos supressores dos processos de emissão dos lantanóides, devido aos vários modos vibracionais O-H que favorecem a perda de energia por mecanismos de relaxação não-radiativa [199,216,217]. Assim, para garantir a efetividade do estudo emissivo do íon lantanóide é importante que o número de moléculas de água coordenado ao metal seja reduzido. Uma alternativa para contornar essa questão seria substituir essas moléculas por outros ligantes, incluindo ânions, e utilizar solventes anidros nas sínteses e medidas [199,203].

Os quimiossensores baseados nos íons lantanóides são usados como “*moduladores*” da emissão lantanídica, pois as linhas de emissão serão suprimidas ou intensificadas a partir de alguma modificação no quimiossensor [199,203,218-221]. Existem basicamente dois tipos principais de complexos de Ln(III) que atuam como quimiossensores, que estão esquematizados na **Figura 38**, e são baseados na(o):

1. *substituição das moléculas de água, ligadas diretamente ao íon lantanóide, por outros ligantes (ânions e/ou ligantes-antena), que podem ocorrer de 2 formas:*
 - A) *no complexo de Ln(III) que já contém um ligante-antena, a substituição das moléculas de água pode ser feita com o analito, como ânions por exemplo;*
 - B) *em um complexo de Ln(III) que não possua ligante-antena, a substituição das moléculas de água pode ser feita inserindo um ligante-antena.*
2. *ligante-antena atuar como receptor, capaz de se coordenar seletivamente a íons metálicos. Neste caso, o ligante-antena pode estar coordenado diretamente ao íon lantanóide ou estar inserido na estrutura do complexo, mas deve possuir átomos doadores disponíveis para se ligar ao outro íon metálico.*

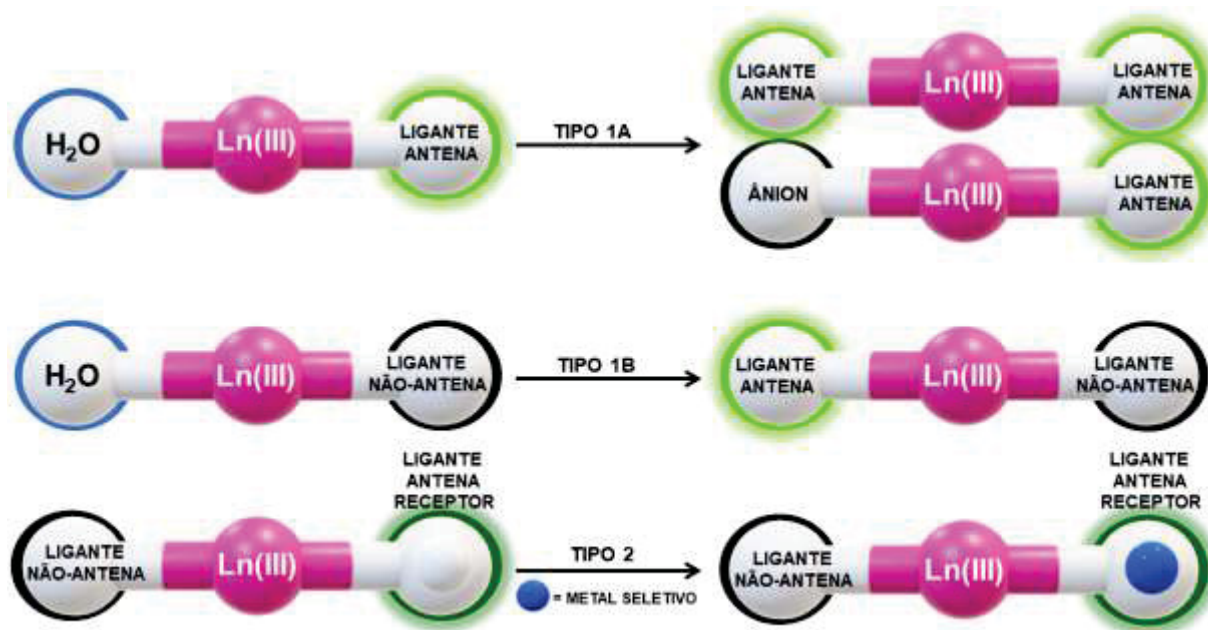


Figura 38. Esquema simplificado dos tipos de quimiossensores com complexos de Ln(III) .

A **Figura 39** traz dois exemplos no qual pode-se observar que complexos de európio(III) com ligantes derivados do *ciclen* podem ser usados como sensores para ânions quelantes como salicilato (**Figura 39(a)**), a partir da remoção das moléculas de água coordenadas ao metal (tipo 1B de quimiossensor) [218]; bem como, outros exemplos com derivados semelhantes, como mostra a **Figura 39(b)**, podem atuar na detecção seletiva de íons como cobre(II), a partir da formação de um composto tetranuclear com três unidades do complexo coordenados ao íon metálico pela porção fenantrolina (*phen*) [220]. Em outro trabalho, um sensor análogo ao mostrado na **Figura 39(b)** contendo a unidade $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{2+}$, $\text{bpy}=2,2'$ -bipiridina, foi estudado e apresentou modulação da banda de emissão da $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{2+}$ com outros íons lantanóides, como neodímio e itérbio [221]. Isso demonstra a grande versatilidade no estudo dos complexos de Ln(III) como quimiossensores, inclusive contendo composições semelhantes como ilustrado nos exemplos acima, bem como, mostra a complexidade para obtenção de compostos que apresentem capacidade de modulação, monitorada pelas linhas de emissão do lantanóide, além das condições supracitadas para o efeito antena.

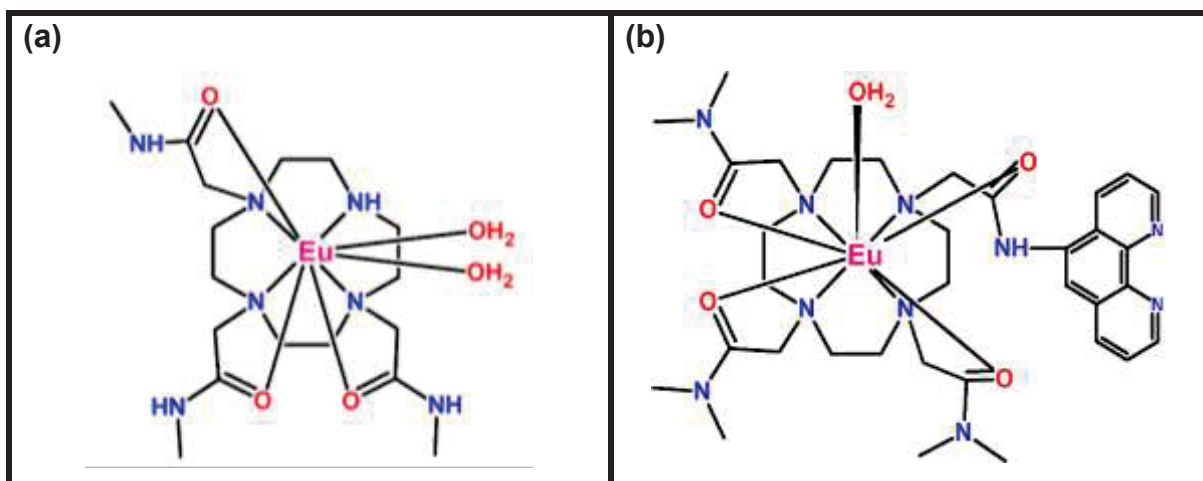


Figura 39. (a) complexo de európio(III) quimiossensor para ânions quelantes. (b) complexo de európio(III) quimiossensor para cátions.

Com base no que foi exposto, sabendo que a emissão do íon európio(III) é sensibilizada com efetividade através de ligantes β -dicetonatos e β -cetoésteres, muito similares ao ligante *FDC*, esse capítulo apresenta a investigação de um complexo de európio(III) contendo o ligante *MAC* (explorado no capítulo 1) e *FDC*, expandindo assim o estudo quanto à detecção baseada na luminescência de íons do bloco f, aqui representado pelo íon európio(III). Desta forma o estudo irá permitir a investigação de um sistema contendo dois tipos de fluoróforos: acridina e fluoreno, bem como, o complexo formado em solução no que tange a sua estequiometria, seu comportamento emissivo, incluindo estrutura fina e as intensidades relativas das transições nos espectros de emissão, e por fim, seu comportamento como quimiossensor do tipo 1A para ânions pela modulação da emissão do íon európio(III).

6. Objetivos gerais

6.1. SISTEMA 1 – DEFM

Investigar o comportamento fluorescente de um ligante derivado do fluoreno como quimiossensor para cátions.

6.1. Objetivos Específicos

1. Sintetizar ligante *DEFM* contendo o grupo luminescente *fluoreno* como mostrado na **Figura 40**.
2. Caracterizar o ligante *DEFM* por análise elementar, técnicas espectroscópicas (fluorescência, ultravioleta-visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear) e espectrometria de massas.
3. Sempre que possível, determinar as estruturas dos produtos por difratometria de raios X de monocristal (*DRX* de monocristal).
4. Utilizar cálculos teóricos (*TD-DFT*) a fim de confrontá-los com os resultados experimentais quanto ao seu comportamento de absorção de energia.
5. Estudar a capacidade do ligante *DEFM* na detecção seletiva de cátions.
6. Determinar a estequiometria do complexo formado em solução para o sistema *DEFM:METAL*.
7. Investigar o modo de coordenação no sistema *DEFM:METAL*.
8. Determinar a constante de formação (K_f) para o complexo *DEFM:METAL* formado em solução.

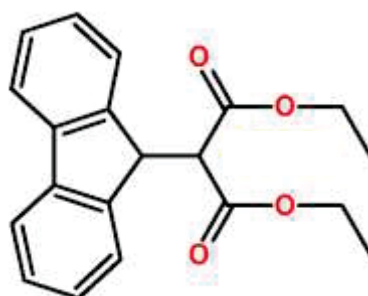


Figura 40. Ligante dietil 2-(9-fluorenil) malonato (*DEFM*).

6.2. SISTEMA 2 – *MAC:FDC:Eu³⁺*

Investigar o comportamento fluorescente de um sistema contendo dois fluoróforos diferentes (acridina – através do ligante *MAC*; e fluoreno – através do ligante *FDC*) na formação de um complexo contendo íon európio(III). Estudar o sistema *MAC:FDC:Eu³⁺* como quimiossensor para ânions.

6.1. Objetivos Específicos

9. Sintetizar ligante *FDC* contendo o grupo luminescente *fluoreno* como mostrado na **Figura 41**.
10. Caracterizar o precursor *FDE* e o ligante *FDC* por análise elementar, técnicas espectroscópicas (fluorescência, ultravioleta-visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear) e espectrometria de massas.
11. Sempre que possível, determinar as estruturas dos produtos por difratometria de raios X de monocristal (*DRX* de monocristal).
12. Utilizar cálculos teóricos (*TD-DFT*) a fim de confrontá-los com os resultados experimentais, no que diz respeito a estimativa do nível tripleto de energia dos ligantes *FDC* e *MAC*.
13. Determinar a estequiometria do complexo formado em solução para o sistema *MAC:FDC:Eu³⁺* que melhor sensibiliza o íon lantanóide.
14. Investigar o modo de coordenação destes ligantes polifuncionais, no sistema *MAC:FDC:Eu³⁺*.
15. Estudar a capacidade do complexo na detecção seletiva de ânions.



Figura 41. Ligante fluoreno-dicarboxilato (*FDC*).

7. Parte Experimental

7.1. Reagentes e Solventes

2,7-dibromo-9-fluorenona (Aldrich)	Hidrossulfito de sódio (Vetec)
Acetato de Sódio (Carlo Erba)	Hidróxido de sódio (Biotec)
Álcool etílico (Química Moderna)	Iodeto de sódio (Synth)
Azida sódica (Synth)	Nitrato de európio hexahidratado (Aldrich)
Benzoato de sódio (Merck)	Nitrato de sódio (Vetec)
Bicarbonato de sódio (Synth)	Oxalato de sódio (Vetec)
Brometo de sódio (EEL)	Perclorato de sódio (Vetec)
Carbonato de sódio anidro (Synth)	Piridina (Synth)
Cianato de sódio (Acros Organic)	Salicilato de sódio (Merck)
Cloreto de titânio(IV) (1M-CHCl ₃) (Aldrich)	Sulfato de magnésio anidro (Merck)
Clorofórmio (Synth)	Sulfato de sódio anidro (Êxodo Científica)
Dietil éter (Ecibra)	Tetrahidrofurano (Synth)
Dietil malonato (Aldrich)	Tiocianato de sódio (Riedel)
Hidrogenofosfato de sódio (Vetec)	

7.2. Condições de atmosfera inerte, tratamento de solventes e calibração dos balões volumétricos/pipetas

Alguns dos solventes foram previamente tratados baseados nos métodos descritos por Armarego e Perrin [106] sobre purificação de compostos químicos. A síntese de fluoreno-diéster (*FDE*) foi realizada em atmosfera de argônio (grau industrial, White Martins) e vácuo de 10^{-4} Torr. A calibração dos balões volumétricos (5 e 10 mL) e pipetas automáticas (100 e 1000 μ L), utilizadas para o preparo das soluções do trabalho, foram realizadas da seguinte forma: o volume total foi preenchido com água destilada, e pesado em balança analítica, medidas em triplicatas. A média das medidas de calibração apresentaram desvio menor que 5% do volume máximo, e foram repetidas a cada dois meses durante o período do trabalho. Após o uso, as vidrarias calibradas eram lavadas e secas ao ar.

7.3. Análise Instrumental

Análise Elementar e Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região Ultravioleta-Visível (UV-VIS)

As análises elementares, visando a determinação em porcentagem de C, H e N, foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), em um equipamento Perkin-Elmer, modelo CHN 2400. Para a obtenção dos espectros eletrônicos UV-VIS em solução foi utilizado um espectrofotômetro HP 8452A – Diode Array do Laboratório de Bioinorgânica (UFPR) e uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (^1H -RMN e ^{13}C -RMN)

As análises de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram realizadas no Laboratório de RMN do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica, em um espectrômetro Bruker 400 MHz Avance HD, ou ainda no Laboratório de RMN do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, em um espectrômetro Bruker 200 MHz Avance HD, ambos com Tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

Espectroscopia de Fluorescência e lavagem de cubeta e frascos

Para as análises de excitação/emissão fluorescente e a determinação de rendimento quântico foi utilizado um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF5301-PC, do Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (LAPPS) – UFPR e uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A abertura de fenda (o “slit” de entrada e de saída) foi variado de 1,5 à 5 nm dependendo do teste, a potência do detector foi fixada em 800 volts (alta) e velocidade de varredura em 600 nm min⁻¹ (média). Após as medidas, a cubeta de quartzo usada nos testes e os frascos de vidro usados no armazenamento das soluções preparadas, eram mantidos em água-régia por um dia, a fim de evitar adsorção do produto nos recipientes e posterior contaminação nos demais testes.

Difratometria de Raios X de monocristal

Os dados de difração, para análise de cela unitária, foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com detector de área

Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de *Mo-K α* ($\gamma = 0,7107 \text{ \AA}$) e *Cu-K α* ($\gamma = 1,5418 \text{ \AA}$), e dispositivo *Kryoflex II*, para realização de coletas à baixa temperatura. Os dados foram processados utilizando o programa *APEX3* 1. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do *CCDC* (*Cambridge Crystallographic Data Centre*). A resolução das estruturas cristalinas foi executada pela técnica e doutoranda Francielle Sousa Santana.

Cálculos Teóricos

Para estimar a geometria no estado fundamental e a energia dos orbitais de fronteira dos ligantes e complexos estudados realizou-se cálculos teóricos *TD-DFT* (abreviatura do inglês “*Time Dependent Density Functional Theory*”), utilizando o funcional *B3LYP* com a função de base 6-311g(d,p) para todos os átomos. A partir das estruturas otimizadas calculou-se as energias livres dos compostos. Os espectros de absorção foram obtidos usando cálculos *TD-DFT*. Os dados foram obtidos utilizando o programa *GAUSSIAN 2009* [107]; e os cálculos foram executados pelo Dr. Cristiano Zanlorenzi em parceria com o Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (*LAPPS*) – *UFPR*.

Espectrometria de massas (*ESI-MS*)

Os espectros de massas foram registrados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (*USP*), em um equipamento MicroTof Bruker Daltonics de fonte *ESI* (Ionização por Eletrospray, do inglês “*EletroSpray Ionization*”) com analisador *TOF* (traduzido como tempo de voo, do inglês “*time of flight*”) de alta resolução (10000 FWHM), no modo positivo e negativo, com injeção de amostra por infusão direta no equipamento.

Teste de seletividade individual do ligante *DEFM* com cátions

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante em etanol e 50 μL de uma solução equimolar do cátion (sal cloreto) em etanol, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol. As concentrações finais do ligante e do cátion foram de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicata para cada íon.

Teste de competição de íons do ligante *DEFM* com cátions

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 µL de uma solução a 10 mmol L⁻¹ do ligante em etanol e 50 µL de solução equimolar de 20 cátions diferentes (sais cloretos) em etanol, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol. As concentrações finais do ligante e de cada cátion foram de 100 µmol L⁻¹, e as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em quintuplicatas: para a amostra do ligante livre e amostras contendo ligante com adição de 22 cátions na ausência e presença de íons ferro(III).

Determinação da estequiometria do complexo de *DEFM* formado em solução

O teste foi baseado no formalismo de Job, também conhecido como método das variações contínuas, no qual preparou-se soluções equimolares do ligante e do metal de concentração 100 µmol L⁻¹ em etanol em seguida, realizou-se a mistura de diferentes volumes de cada solução, mantendo-se constante o volume final em 10 mL para todas. As amostras foram medidas em triplicatas e analisadas por espectroscopia de fluorescência.

Estudo da reversibilidade do complexo $[FeCl_2(DEFM)_2]^+$

No teste de reversibilidade, conhecido como “teste de ciclagens”, escolheu-se um ligante que possui uma constante de formação superior ao do sensor estudado com o mesmo metal, neste caso os testes foram realizados com o ligante EDTA. As ciclagens consistem na adição alternada do metal e EDTA, mantendo-se a concentração do sensor constante (100 µmol L⁻¹). Todas as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas.

Figuras de mérito: *DEFM* e ferro(III)

Condições nominais

Para a obtenção das “figuras de mérito” deste trabalho, como seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez, as condições de todas as medidas foram padronizadas, para atenuar erros aleatórios de análise. Tais condições padrões são chamadas “nominais” e estão sumarizadas na **Tabela 35**, estas foram respeitadas em todos os testes relacionados à parametrização do método utilizado com o sensor.

Tabela 35. Parâmetros e suas condições nominais de análise para o sistema *DEFM* e ferro(III)

Parâmetros	Condição Nominal
Slit de entrada e saída	3 a 5 nm
Velocidade de varredura	Muito rápida (500 nm min ⁻¹)
λ_{ex} e λ_{em}	296 e 316 nm
Temperatura da medida	Temperatura ambiente (20-25°C)
Temperatura de armazenamento	Geladeira (10-15°C)
Atmosfera de argônio	Não
Tempo entre o preparo de amostra e a medida	2 h
Meio	Etanol
Concentração dos metais (teste de seletividade individual)	1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
Concentração de íons ferro(III) (teste de repetibilidade e precisão intermediária)	Nível 1 = LOQ= 51,85 nmol L ⁻¹
Concentração de íons ferro(III) (teste de robustez)	1 µmol L ⁻¹
Calibração de balões volumétricos e pipetas automáticas	Mensal
Lavagem da cubeta antes e depois das medidas	Água-régia/1 dia
Lavagem da cubeta entre as medidas	3 vezes
	2x Etanol e 1x Acetona

Testes estatísticos

Ferramentas estatísticas foram utilizadas a fim de identificar resultados anômalos, tendenciosos e não-homogêneos, para garantir que o sensor corresponda a um sistema estatisticamente robusto, preciso e exato, conforme os parâmetros adotados e recomendados por órgãos regulamentadores como ANVISA [108-109] e INMETRO [110]. Para a seletividade e linearidade realizou-se uma análise da curva de calibração com cálculo *RSD*, determinação do limite de detecção (*LOD*) e quantificação (*LOQ*), testes de *Grubbs*, *Fisher*, *Cochran* e *Durbin-Watson*. Os dados de repetibilidade e precisão intermediária foram analisados com a estimativa do *RSD* de *Horwitz* e o cálculo de *Horrat*, além do teste de *Dixon*. Os testes estatísticos para análise da robustez consistiram no *Teste de Youden*, com a produção do gráfico de Pareto.

Curva de calibração

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante em etanol e soluções a 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 mmol L^{-1} do cátion (sal cloreto) em etanol, respectivamente, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol. A concentração final do ligante foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as medidas, e do cátion foi de 0,1 a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. As soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicata para cada concentração do metal.

Testes de repetibilidade, precisão intermediária e robustez

Estes testes foram realizados em concentrações pré-estabelecidas de ferro(III), segundo a curva de calibração obtida. Para repetibilidade e precisão intermediária analisou-se o nível de concentração referente ao limite de quantificação ($\text{LOQ}=51,85 \text{ nmol L}^{-1}$) obtido para o quimiossensor, e para o teste de robustez analisou-se o nível de concentração 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da faixa linear. A concentração do ligante foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as medidas. As soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicata para cada íon, e para os testes de precisão intermediária foram preparadas e medidas por um segundo analista.

Recuperação em amostras reais

A figura de mérito que analisa a exatidão do método utilizado com o sensor DEFM para a detecção de íons ferro(III) foi investigada com experimentos de recuperação empregando etanol combustível. As amostras foram preparadas da seguinte forma: em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante em etanol, 50, 250 e 500 μL de uma solução de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ferro(III) em etanol (três níveis de concentração), e o volume final foi completado com a matriz. As concentrações finais de ferro(III) adicionado foram de 100, 500 e 1000 nmol L^{-1} , e do ligante 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As amostras foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas.

Estequiometria do sistema *MAC:FDC:Eu³⁺*

Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante *MAC* em clorofórmio, 50 μL de solução

equimolar do ligante *FDC* em etanol e 50 μL de solução equimolar do íon európio(III) (sal nitrato) em etanol, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol, tornando-a de proporção *CHCl₃:EtOH* (1:99 v/v). A concentração final dos ligantes (*MAC* e *FDC*) e do íon foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas. O teste também foi realizado aumentando as concentrações alternadamente de cada ligante e do íon lantanóide, analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas.

Teste de seletividade individual do sistema *MAC:FDC:Eu³⁺* com ânions

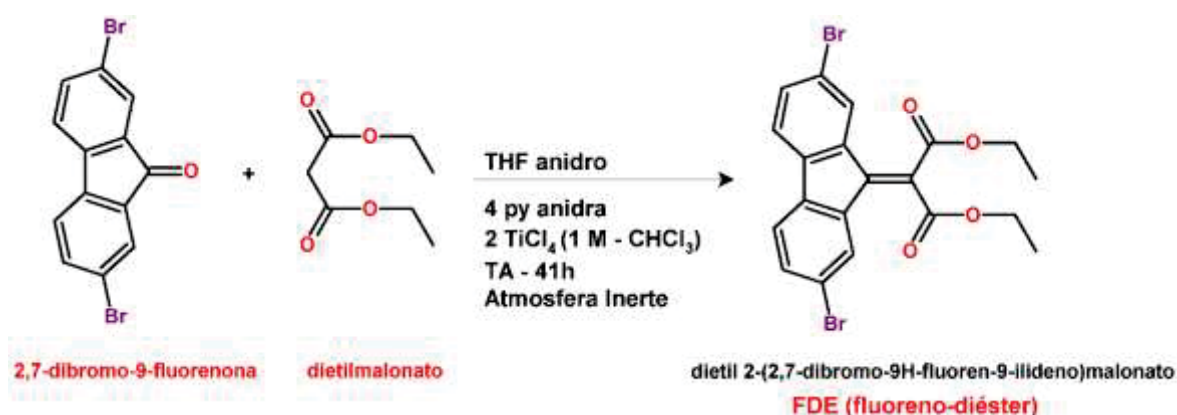
Em um balão volumétrico de 5 mL, previamente calibrado, adicionou-se 50 μL de uma solução a 10 mmol L^{-1} do ligante *MAC* em clorofórmio, 100 μL de solução equimolar do ligante *FDC* em etanol, 50 μL de solução equimolar do íon európio(III) (sal nitrato) em etanol e 50 μL de solução equimolar do ânion (contra-íon sódio) em etanol, em seguida a mistura foi levada até o volume final de 5 mL com etanol, tornando-a de proporção *CHCl₃:EtOH* (1:99 v/v). As concentrações finais do ligante *MAC*, do íon európio(III) e dos demais íons foram de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e do ligante *FDC* de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; as soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em triplicatas para cada íon.

7.4. Sínteses

7.4.1. Síntese de dietil-2-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno)malonato (*FDE*) - (*C₂₀H₁₆Br₂O₄*)

Essa síntese é conhecida como “condensação de Knoevenagel” e foi realizada baseada, com algumas adaptações, no trabalho de W. Lehnert [222] com cetonas e malonato, como mostra o **Esquema 11**. Sob atmosfera de argônio, adicionou-se 15 mL de *THF* anidro e refrigerado a 0°C (com o auxílio de um banho de gelo) em 5,92 mL (5,92 mmol) de uma solução 1 mol L^{-1} de *TiCl₄* em clorofórmio. Em seguida, adicionou-se ao sistema 0,45 mL (2,96 mmol) de dietilmalonato e 1g (2,96 mmol) de 2,7-dibromo-9-fluorenona ambos a 0 °C. O sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo e atmosfera inerte por alguns minutos, e então gotejou-se no meio reacional a mistura de 1 mL (0,012 mol) de piridina anidra diluída em 5 mL de *THF* anidro durante aproximadamente 40 minutos, obtendo-se uma suspensão amarela com sobrenadante laranjado intenso. Após a adição de piridina, removeu-se o banho

de gelo, mantendo-se a atmosfera inerte e a agitação sem aquecimento por aproximadamente 41 horas. Após o tempo transcorrido a suspensão foi transferida em 100 mL de água destilada, formando-se duas fases límpidas, a fase aquosa de coloração amarela e a orgânica praticamente incolor. Com a fase aquosa realizou-se extração com éter dietílico, em três porções de 50 mL, utilizando um funil de separação. Ao final da extração a fase aquosa apresentou-se incolor e a fase orgânica amarela intensa. Com a fase orgânica realizou-se três lavagens na seguinte ordem: 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio 50 mL de solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e 50 mL de salmoura novamente. Posteriormente às lavagens, a solução orgânica foi deixada sob agitação com MgSO_4 anidro, sem aquecimento, por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, o solvente foi removido por rotoevaporador para obtenção de um sólido laranja que foi seco sob vácuo. **Rendimento:** 1,35 g (95%), calculado pela fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_4$; 480,15 g mol^{-1} . **Análise elementar:** C% 50,18 (50,03); H% 3,03 (3,36); N% 0,09 (0,00) (valores calculados entre parênteses).

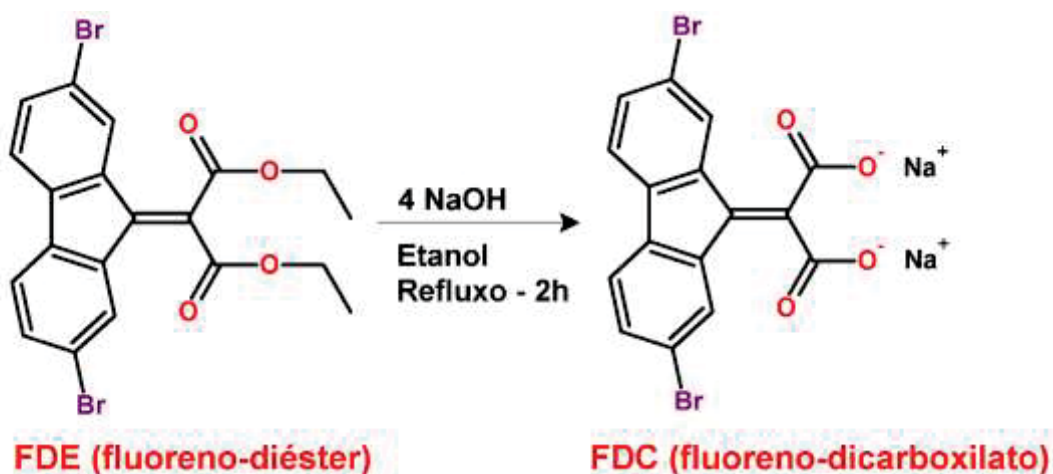


Esquema 11. Síntese de *FDE*.

7.4.2. Síntese de 2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno de sódio ($\text{Na}_2(\text{FDC}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{Na}_2\text{O}_6$)

Para a obtenção do ligante *FDC* foi realizado uma reação de hidrólise básica, ilustrado no **Esquema 12**, em 20 mL de etanol com 1 g (2,08 mmol) de seu precursor *FDE* e 0,33 g (8,32 mmol) de NaOH , por aproximadamente 2h sob sistema de refluxo. Após o tempo transcorrido, a suspensão branca obtida foi filtrada, o sólido foi lavado com etanol gelado e seco sob vácuo. **Rendimento:** 0,90 g (92%), calculado pela fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{Na}_2\text{O}_6$; 504,03 g mol^{-1} . **Análise elementar:** C% 37,97

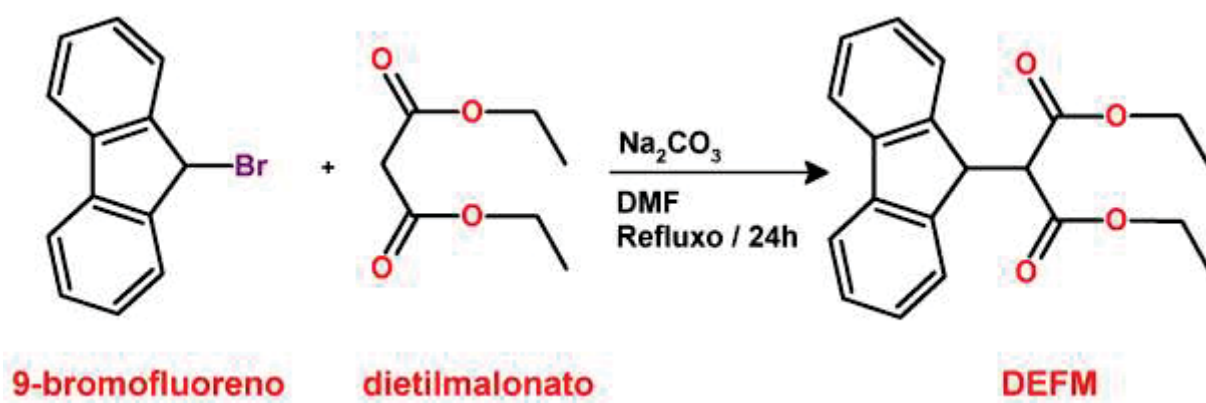
(38,13); H% 1,94 (2,00); N% 0,16 (0,00) (valores calculados entre parênteses).



Esquema 12. Síntese de *FDC*.

7.4.3. Síntese de dietil 2-(9-fluorenil) malonato (*DEFM*) - ($C_{20}H_{20}O_4$)

Esta síntese foi realizada de acordo com o método descrito por Qin-Hui Luo e colaboradores [192], como mostra o **Esquema 13**. Em uma solução de 6,4 g de dietil malonato (0,04 mol) em 10 mL de *DMF* anidra foi adicionado 4,24 g de carbonato de sódio anidro (0,04 mol), e deixou-se agitando por 10 minutos. Em seguida adicionou-se uma solução de 9,8 g de 9-bromofluoreno (0,04 mol) em 40 mL de *DMF*. A mistura resultante foi deixada sob refluxo com banho de silicone a aproximadamente 160°C, por 24 horas, e após este período, em temperatura ambiente, transferida em 500 mL de água gelada. A suspensão formada foi extraída com três porções de 50 mL de dietil éter. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido no rotoevaporador para a obtenção de um sólido laranja. Em seguida, foi recristalizado em etanol, filtrado, lavado em etanol gelado e seco sob vácuo. **Rendimento:** 8,04 g (62 %), calculado pela fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_4$, 324,37 g mol⁻¹. **Análise elementar:** C% 74,10 (74,06); H% 6,27 (6,21); N% 0,10 (0,00) (valores calculados entre parênteses).



Esquema 13. Síntese de *DEFM*.

8. Resultados e Discussão

8.1. SISTEMA 1 - DEFM ($C_{20}H_{20}O_4$)

A síntese para obtenção de *DEFM* foi baseada no método descrito por Qin-Hui Luo e colaboradores [192]. Nosso grupo de pesquisa trabalhou com *DEFM* como um precursor para a rota de síntese de ligantes acíclicos em 2017 [143] que foram investigados como quimiossensores para cátions. Devido a fatores interessantes na sua composição, como ser um derivado de fluoreno, uma molécula relativamente pequena, portanto mais rígida quando comparado às moléculas maiores com mais modos vibracionais (que podem perder energia por relaxação não-radiativa), bem como, possuir a capacidade de atuar como um ligante quelante, decidiu-se investigar seu comportamento emissivo e como possível quimiossensor para íons inorgânicos.

8.1.1. Análise elementar (*CHN*), espectroscopia de massas (*ESI-MS*), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN) e difratometria de raios-X de monocristal (*DRX*)

A análise elementar (*CHN*) para o ligante *DEFM* forneceu os seguintes resultados *C*% 74,10 (74,06); *H*% 6,27 (6,21); *N*% 0,10 (0,00), sendo os valores entre parênteses os valores calculados com base na fórmula $C_{20}H_{20}O_4$, estando de acordo com os valores experimentais. O espectro de massas obtido por *ESI-MS* no modo positivo, **Figura 42**, mostra o pico molecular, $[DEFM]^+$, de razão massa/carga 325,15 condizente com a distribuição isotópica esperada e calculada pelo programa ChemDraw. As **Figura 43 e 44** mostram os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do ligante *DEFM*. Os deslocamentos químicos juntamente com a integração dos sinais são coerentes com as atribuições realizadas e com a composição química apresentada na **Tabela 36**. Os sinais que foram obtidos na região entre 7,24 ppm (singleto), 76 à 77 ppm (triplete) correspondem ao solvente clorofórmio usado nas análises [123]. O perfil espectral obtido, para ambos os espectros, foi comparado com os valores simulados [122], e estão entre parênteses nas tabelas ao lado dos valores obtidos, mostrando coerência nas atribuições.

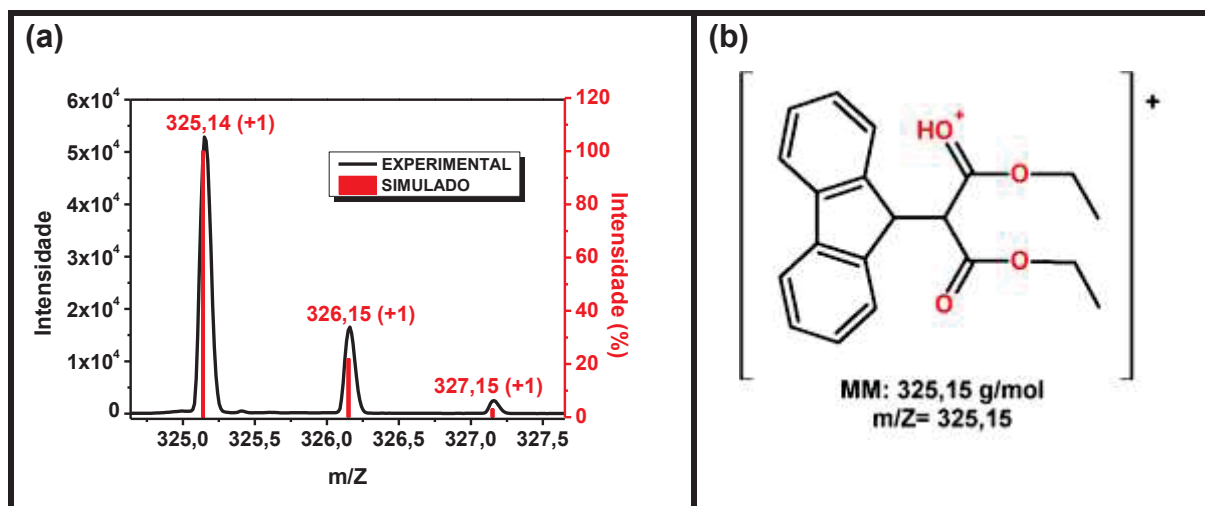


Figura 42. (a) Espectro de massas (ESI-MS) no modo positivo, experimental e simulado, e (b) atribuição do pico molecular para o ligante *DEFM*.

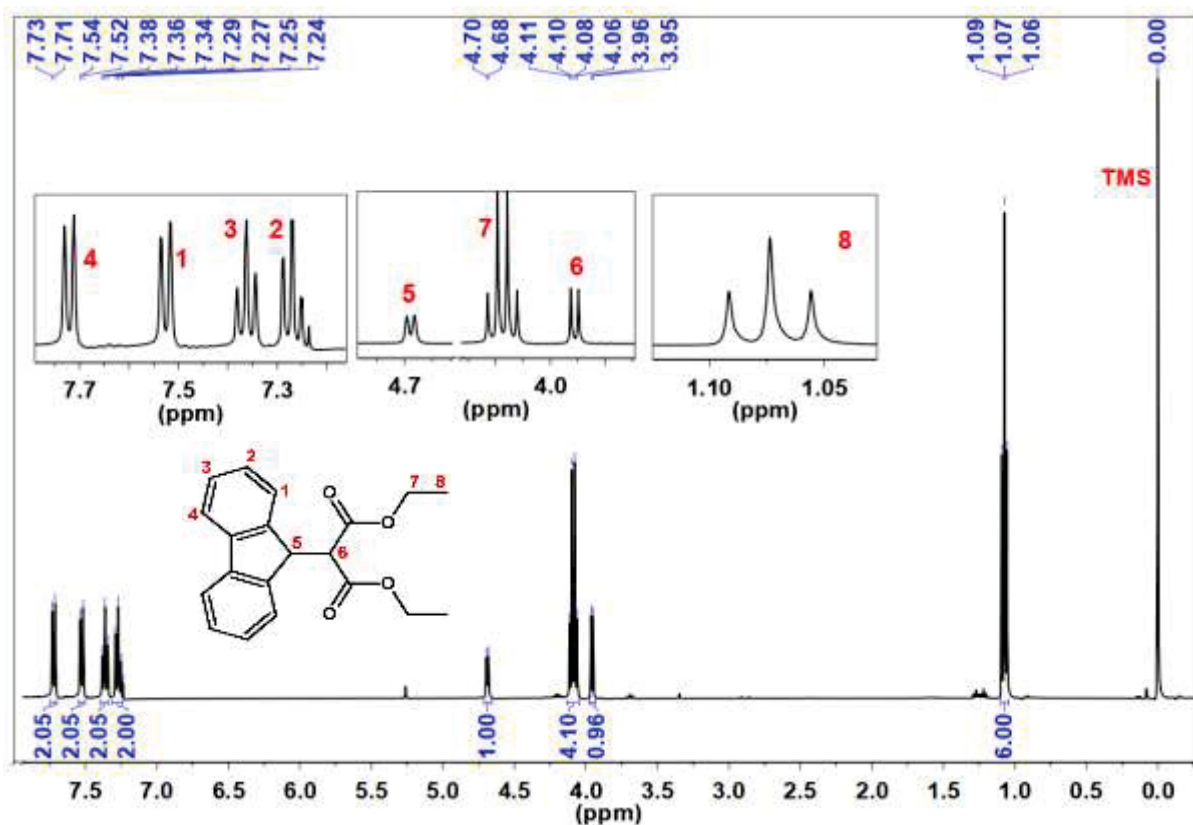


Figura 43. Espectro de ^1H -RMN de *DEFM*.

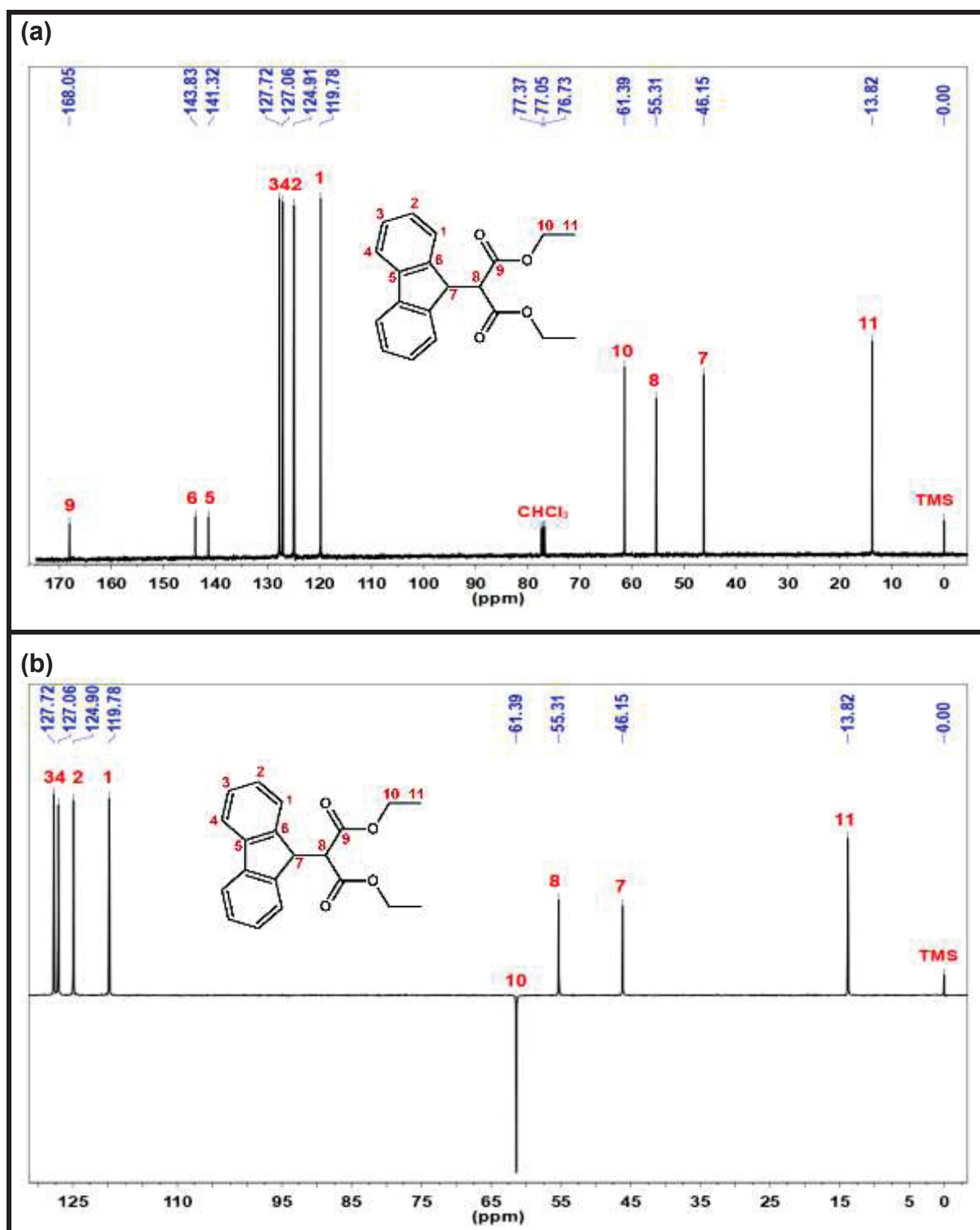


Figura 44. Espectro de ^{13}C -RMN de DEFM em: a) sem DEPT135; b) com DEPT135.

Tabela 36. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de *DEFM*. (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN com e sem DEPT135 de *DEFM*.

(a)		^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
		8	1,06 – 1,09	Tripleto (t)	6,00 (6H)
		6	3,95 – 3,96	Dubleto (d)	0,96 (1H)
		7	4,06 – 4,11	Quarteto (q)	4,10 (4H)
		5	4,68 – 4,70	Dubleto (d)	1,00 (1H)
		2	7,25 – 7,29	Tripleto (t)	2,00 (2H)
		3	7,34 – 7,38	Tripleto (t)	2,05 (2H)
		1	7,52 – 7,54	Dubleto (d)	2,05 (2H)
		4	7,71 – 7,73	Dubleto (d)	2,05 (2H)
(b)		^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm) (DEPT 135)	
		11	13,82 (14,1)	13,82	
		7	46,15 (39,0)	46,15	
		8	55,31 (56,1)	55,31	
		10	61,39 (61,3)	61,39 (NEGATIVO)	
		1	119,78 (120,5)	119,78	
		2	124,91 (125,2)	124,90	
		4	127,06 (126,2)	127,06	
		3	127,72 (126,7)	127,72	
		5	141,32 (142,6)	(NÃO APARECE)	
		6	143,83 (143,6)	(NÃO APARECE)	
		9	168,05 (169,9)	(NÃO APARECE)	

Foram obtidos monocristais de *DEFM* por evaporação lenta da solução-mãe do composto em *EtOH*, no qual a representação *ORTEP* da estrutura cristalina está ilustrada na **Figura 45(a)**. Um segundo monocristal de *DEFM* foi isolado (**Figura 45(b)**), em uma tentativa de metalação, novamente por evaporação lenta da solução-mãe da reação em *MeOH*, no qual constatou-se tratar de um polimorfo de empacotamento do composto [223]. O polimorfismo consiste na habilidade de uma substância existir no estado sólido com duas ou mais estruturas cristalinas distintas, sendo dividido em duas classes: conformacional e por empacotamento [223]. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura, utilizando a base de dados do *CCDC* (*Cambridge Crystallographic Data Centre*), no qual pôde-se constatar que ambas as formas cristalinas obtidas são inéditas. Um dos aspectos que torna distinto os polimorfos de um composto são as suas propriedades físico-químicas, que podem divergir um em relação ao outro, como por exemplo: ponto de fusão, dureza, solubilidade, densidade, entre outras. A **Tabela 37** traz alguns dados sobre a coleta e refinamento das difrações, no qual é possível observar que os

polimorfos I e II não diferem em muitos aspectos entre si, ambos cristalizam no sistema monoclinico, e com dimensões de cela unitária distintas. As distâncias e ângulos de ligação dos dois monocristais são trazidos no **ANEXO 7 (Tabelas 63-64)**.

Tabela 37. Principais dados cristalográficos dos monocristais de *DEFM*.

DADOS	POLIMORFO I	POLIMORFO II
Fórmula empírica	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	C ₂₀ H ₂₀ O ₄
Massa Molar	324,36 g mol ⁻¹	324,36 g mol ⁻¹
Temperatura	200(2) K	302(2) K
Comprimento de onda	1,54178 Å	1,54178 Å
Sistema cristalino	Monoclinico	Monoclinico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c
Cor do cristal/forma	Laranja/paralelepípedo	Laranja/paralelepípedo
Volume	1707,86(7) Å ³	1704,78(10) Å ³
Z	4	4
Densidade	1,261 mg/m ³	1,264 mg/m ³
Coeficiente de absorção	0,709 mm ⁻¹	0,710 mm ⁻¹
Dimensão do cristal	0,304x0,139x0,088 mm	0,583x0,107x0,052 mm
Coeficiente de extinção	N/A	0,0025(5)
Dimensões de cela unitária	a= 8,9825(2) Å	a= 12,903(4) Å
	b= 16,4142(4) Å	b= 7,8726(3) Å
	c= 11,6522(3) Å	c= 17,4109(6) Å
	α= 90°	α= 90°
	β= 96,300(10) °	β= 105,396(2)°
	γ= 90°	γ= 90°

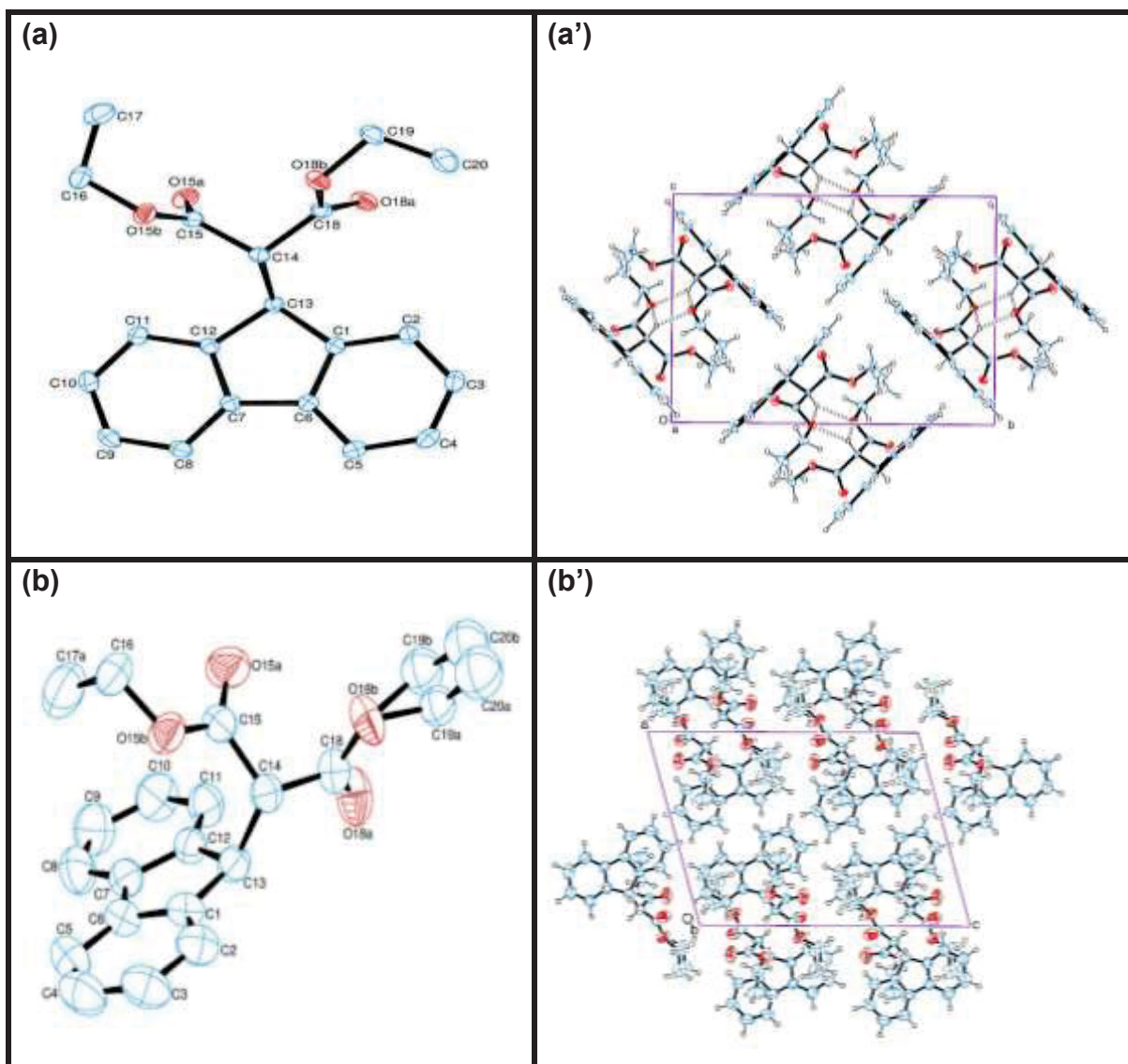


Figura 45. Representação *ORTEP* dos monocristais de *DEFM* em (a) polimorfo 1 e (b) polimorfo 2, com suas respectivas celas unitárias. Elipsóides termais com 50% de probabilidade.

8.1.2. Espectroscopia de fluorescência e espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (*UV-VIS*) para o ligante *DEFM*: aplicação como quimiossensor e cálculos mecânico-quânticos *TD-DFT*

A **Figura 47(a)** ilustra o espectro de absorção *UV-VIS* do ligante *DEFM*, juntamente com os espectros de excitação e emissão fluorescente. O espectro de absorção apresenta uma banda intensa em 268 nm e outra de menor intensidade em 302 nm. Os valores de absorvidade molar obtidos foram de $1,21 \times 10^5$ e $8,65 \times 10^3$ L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente. As bandas foram atribuídas às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$,

observadas em sistemas aromáticos [125], e coincidente com o perfil do fluoróforo (*fluoreno*). A fim de investigar a concentração que apresenta maior intensidade fluorescente, realizou-se um estudo da emissão do ligante *DEFM* em diversas concentrações, de 1×10^{-3} a 1×10^{-7} mol L⁻¹, em *EtOH*; com isso foi possível observar que a concentração que fornece o maior rendimento quântico é igual a 1×10^{-4} mol L⁻¹. A **Figura 47(a)** mostra que o perfil fluorimétrico para *DEFM* quando excitado em 296 nm, promove emissão em 316 nm.

A **Figura 47(b)** ilustra as intensidades fluorescentes médias do ligante na investigação para a detecção seletiva com cátions, chamado de “*teste de seletividade individual*”, nas mesmas condições de concentração e solvente, realizadas em triplicatas. A partir disso, foi possível observar que a interação do ligante *DEFM* com íons ferro(III) promove uma supressão expressiva de aproximadamente 99% da intensidade fluorescente. Ou seja, *DEFM* atua como sensor fluorescente para o íon férrico, sendo um quimiossensor do tipo *CHEQ* (do inglês “*chelation enhancement quenching*”), pois diminui a intensidade fluorescente na presença do analito.

A **Figura 47(c)**, através do teste de competição de íons, ilustra que o ligante *DEFM* atua como um bom quimiossensor na detecção seletiva e específica de íons ferro(III) sem íons interferentes. O teste de competição de íons, que pode ser chamado de teste de seletividade coletiva, simula um ambiente complexo com 21 cátions diferentes, que podem interagir com o ligante afetando sua especificidade. Porém observa-se que o ligante responde de maneira diferente quando interage com íons ferro(III), promovendo supressão próxima a 90% na sua presença e cerca de 55% na sua ausência, permitindo sua distinção em um ambiente saturado de íons, conferindo ao quimiossensor relativa especificidade, com a possível formação de um complexo estável em solução. O ferro(III) forma preferencialmente complexos com ligantes que se coordenam a átomos oxigênio, como fosfatos e oxalatos [140]. Logo, um complexo de ferro(III) com *DEFM*, que possui átomos oxigênio doadores em sua composição, torna a atribuição provável.

A **Figura 47(d)** mostra que o máximo obtido no gráfico de Job corresponde a fração molar igual a 0,3 para íons ferro(III), o que permite atribuir a formação de um complexo de razão 1:2 (metal:ligante), atribuído como $[FeCl_2(DEFM)_2]^+$, no qual os ligantes *DEFM* estão coordenados de forma bidentada ao centro metálico, que está ligado ainda a dois cloros.

A **Figura 47(e)** traz o “*gráfico de Benesi-Hildebrand*” (discutido na **seção**

4.3.3), que apresenta uma reta de coeficiente de determinação igual a 0,9928, no qual a razão entre sua inclinação e o intercepto permite obter a constante de formação (K_f) do complexo $[FeCl_2(DEFM)_2]^+$, sendo igual a $1,5 \times 10^6 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$ ($\log K = 6,18$). A estabilidade observada não mostrou-se tão elevada considerando o caráter quelato do ligante DEFM, mas pode sugerir a especificidade em relação aos demais íons testados.

O formalismo de “Stern-Volmer” [1,7], dado pela **Equação 13**, permite estimar a constante de supressão (K_{SV}) através da linearização do gráfico, mostrado na **Figura 47(f)**, que relaciona a razão F_0/F em função da concentração do agente supressor, no caso íons ferro(III). Com base na inclinação da reta obtida ($R^2 = 0,9942$), a constante de supressão (K_{SV}) encontrada foi igual a $1,0 \times 10^6$. De acordo com o formalismo descrito, a supressão da intensidade fluorescente de um dado sistema pode ocorrer de duas formas principais: **i)** supressão estática: através da formação de um complexo; **ii)** supressão dinâmica: através de mecanismos colisionais, com perda de energia por processos não-radiativos. Os valores similares das duas constantes supracitadas obtidas, K_f e K_{SV} , permite sugerir que a formação do complexo $[FeCl_2(DEFM)_2]^+$ contribua para a supressão estática do sistema.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q]^x = 1 + K_{SV} [Q]^x \quad \text{Equação 13}$$

Sendo: F e F_0 = intensidade fluorescente na presença e ausência do agente supressor, respectivamente; $[Q]$ = concentração do agente supressor (“quencher”); x = estequiometria para o agente supressor; K_{SV} = constante de supressão Stern-Volmer; τ_0 = tempo de vida no estado excitado na ausência do agente supressor; k_q = constante cinética bimolecular de supressão.

Cálculos mecânico-quânticos foram realizados utilizando a *TD-DFT* (*time dependent density functional theory*) a fim de entender qual seria o estado de spin mais provável do metal no complexo formado (sexteto ou dubleto conforme ilustra a **Figura 46**), bem como, para ter acesso aos orbitais moleculares e as transições eletrônicas observadas no ligante livre *DEFM* e em seu complexo.

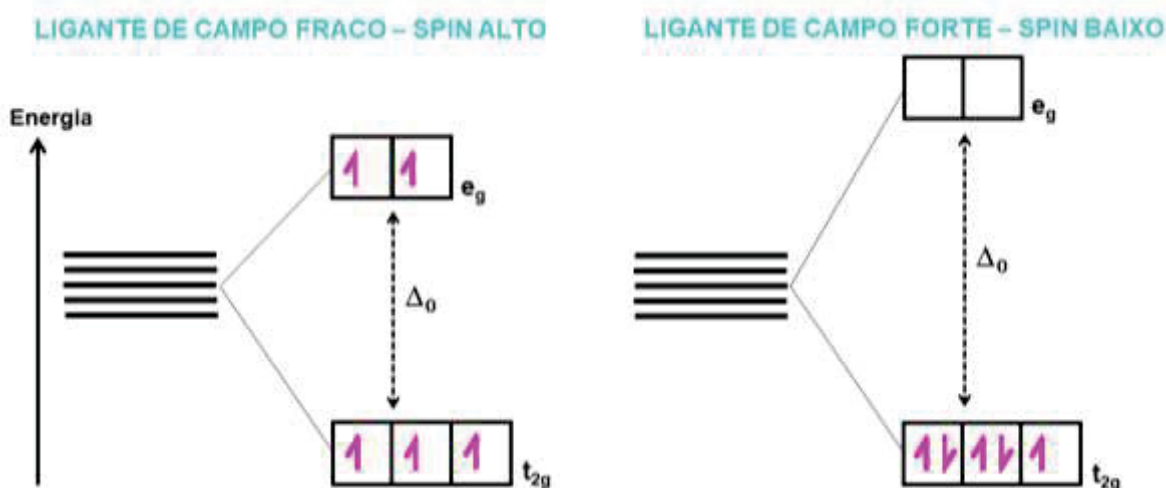


Figura 46. Arranjo eletrônico d^5 para o íon ferro(III) em campo fraco (multiplicidade sexteto) e campo forte (multiplicidade dubleto).

Os cálculos teóricos realizados permitiram estimar a energia eletrônica do complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$, nos diferentes estados de spin do íon metálico. Assim, constatou-se que o estado sexteto é cerca de $82,50 \text{ kJ mol}^{-1}$ mais estável que o estado dubleto no complexo formado. Desta forma, toda discussão sobre os fenômenos de supressão da emissão de $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$ foi realizada sob a perspectiva do estado sexteto do íon ferro(III), considerando assim, um complexo de campo fraco (spin alto). Os espectros simulados do ligante livre e seu complexo de ferro(III), no estado de spin sexteto, mostrados na **Figura 48(b-c)** respectivamente, mostraram grande similaridade com os perfis experimentais, **Figura 48(a)**, no qual pode ser observado uma banda intensa em 268 nm, coerente com os resultados teóricos trazidos na **Tabela 38**, e atribuído às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ no ligante, com densidade eletrônica centrada majoritariamente no fluoróforo fluoreno.

A partir do exposto, os cálculos possibilitaram a atribuição das principais transições com relação aos orbitais de fronteira, como mostra a **Tabela 38**, para o ligante livre e o complexo no estado fundamental sexteto. A **Figura 49** traz as estruturas otimizadas das espécies por CAM-B3LYP/6-311G(D,P) a **Figura 50** ilustra o diagrama de energia construído para o sensor livre *DEFM* e para o complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$ (de configuração octaédrica), juntamente com a composição dos orbitais envolvidos nas transições. A partir da otimização foi possível realizar uma investigação quanto a estabilidade do complexo, baseado em cálculos de energia livre, revelando um valor de $-1239 \text{ kJ mol}^{-1}$ para $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]$.

Uma inspeção nos orbitais de fronteira do ligante livre, **Figura 50(a)**, mostra que todas as transições estão centradas majoritariamente na porção do fluoróforo fluoreno, enquanto as principais transições no complexo $[FeCl_2(DEFM)_2]^+$ mostram diferentes participações dos orbitais moleculares. O orbital **HOMO-12**(-9,05 eV) e **LUMO+3**(-1,59 eV) do complexo, estão centrados majoritariamente na porção do malonato. Logo, após a excitação do complexo, um elétron do orbital **HOMO**(-6,93 eV) pode ser transferido ao orbital **HOMO-12**, como mostra a **Figura 50(b)**, através da transferência de elétron fotoinduzida (abreviado como *PET*, do inglês, “*photoinduced electron transfer*”). Assim, o elétron excitado no orbital **LUMO+3** se torna impedido de retornar ao estado fundamental tão imediatamente como demanda os processos emissivos, e como consequência tem-se uma drástica supressão da intensidade fluorescente com a formação do complexo $[FeCl_2(DEFM)_2]^+$. O processo *PET* ocorre comumente a curtas distâncias na molécula (menores que 15 Å) e acarreta a supressão da emissão do sistema. Desta forma, com base na geometria otimizada do complexo, pode-se calcular a distância entre a porção fluoreno e a porção malonato, que corresponde em média a aproximadamente 7 Å (média obtida pelo programa a partir da medição de vários pontos das duas porções, como mostra a seta ilustrativa na **Figura 49(a)**), o que corrobora o mecanismo de transferência de elétron atribuído a essas porções no complexo, com consequente diminuição da intensidade fluorescente observada. É importante lembrar que no ensaio de competição de íons, ao contrário da seletividade individual, o comportamento observado é consequência direta das estabilidades relativas dos diversos íons complexos que coexistem em equilíbrios simultâneos em solução. As estabilidades específicas de cada complexo são influenciadas pelas energias dos orbitais moleculares de fronteiras, que consequentemente, afetam a possibilidade de ocorrência do efeito *PET* de supressão.

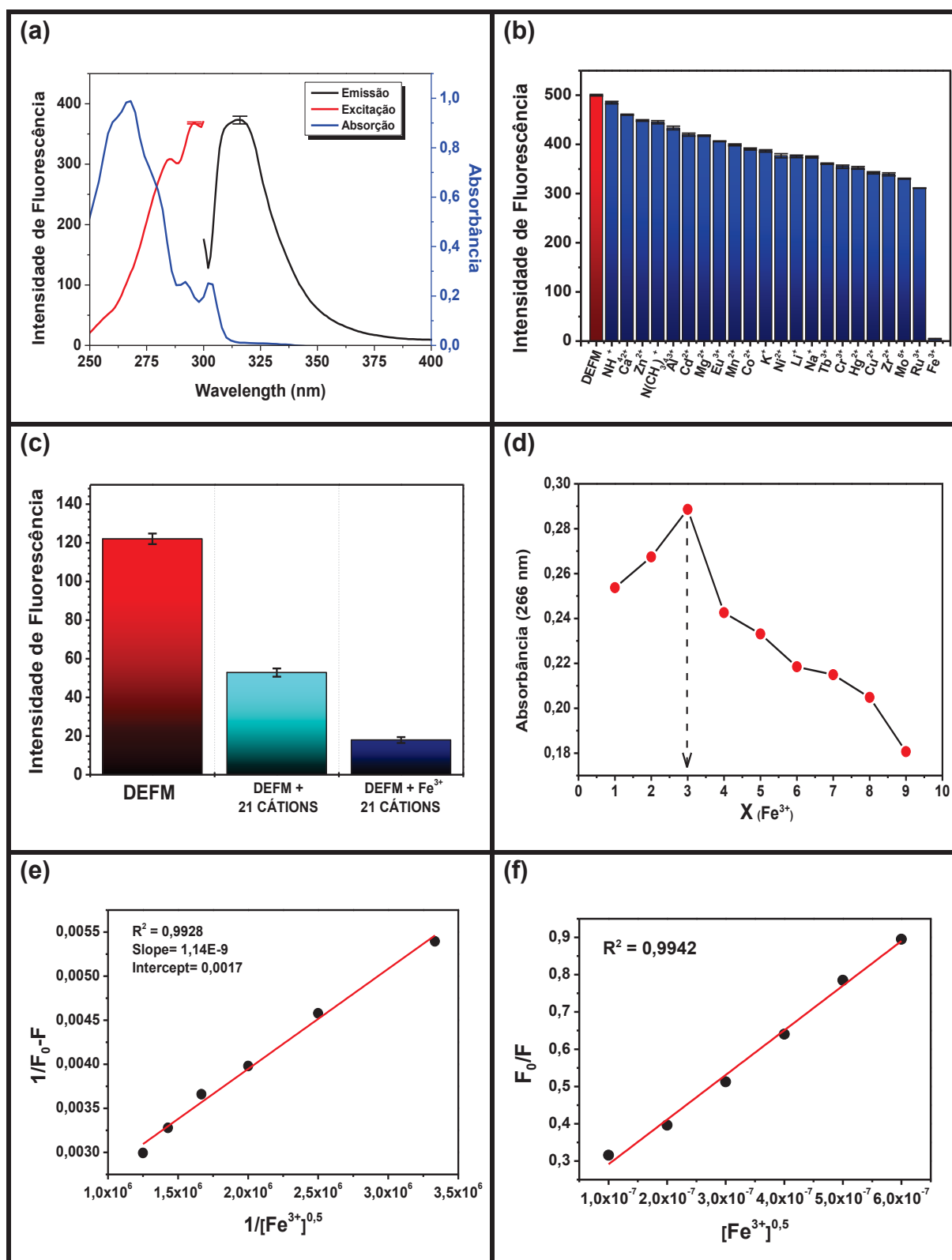


Figura 47. (a) Espectro de absorção UV-VIS, excitação e emissão fluorescente. $100 \mu\text{mol L}^{-1}$; slits 3 nm. (b) Teste de seletividade de DEFM e diferentes cátions. $[\text{DEFM}] = [\text{cátions}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$; slits 3 e 5 nm. (c) Competição de cátions de DEFM na presença e ausência de ferro(III). (d) Gráfico de Job. $[\text{DEFM}] = [\text{ferro(III)}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$. (e) Gráfico de Benesi-Hildebrand. (f) Gráfico de linearização de Stern-Volmer. $\lambda_{\text{ex}} = 296 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$, meio: EtOH.

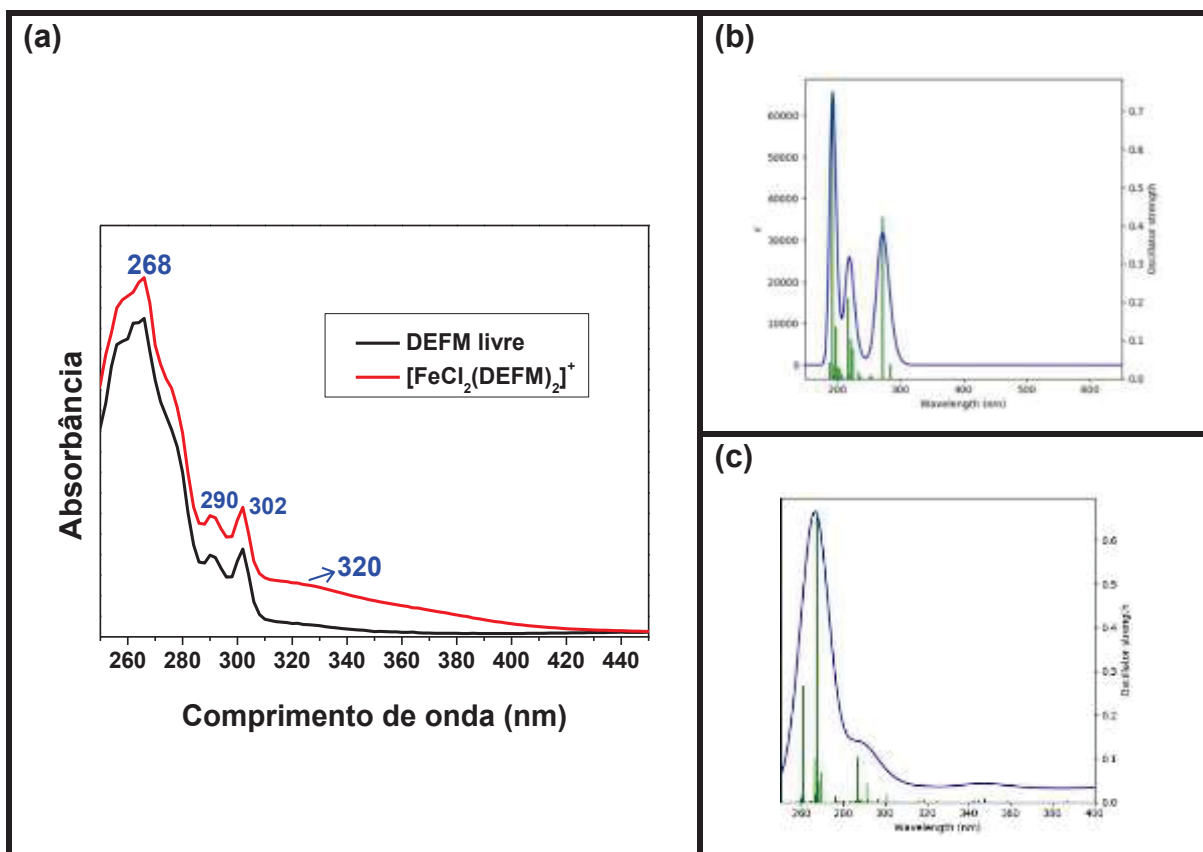


Figura 48. (a) Espectros de absorção experimentais para o ligante livre e seu complexo de ferro(III) em etanol. Perfil de absorção simulados para (b) ligante *DEFM* livre; (c) complexo no estado de spin sexteto.

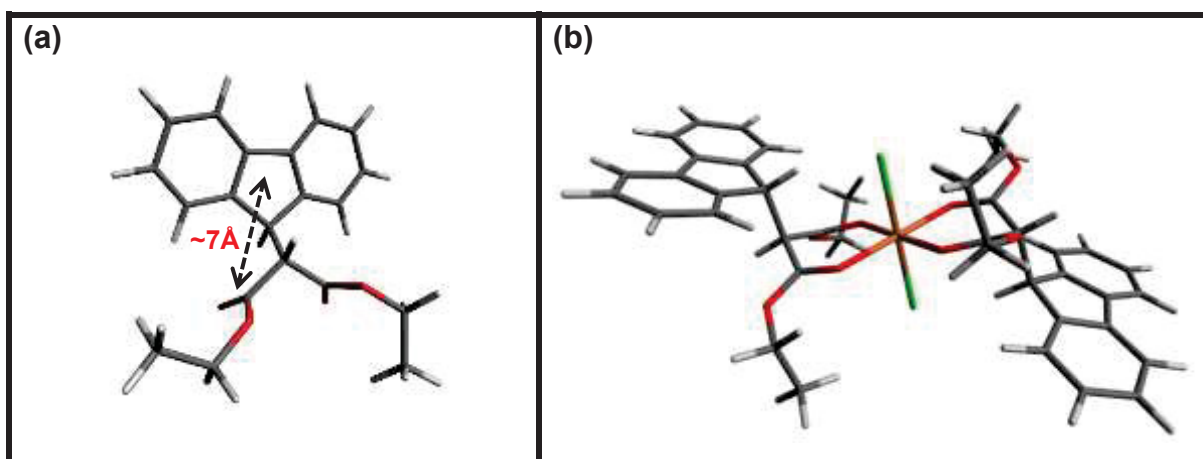


Figura 49. Estruturas otimizadas para (a) *DEFM* livre e (b) complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$.

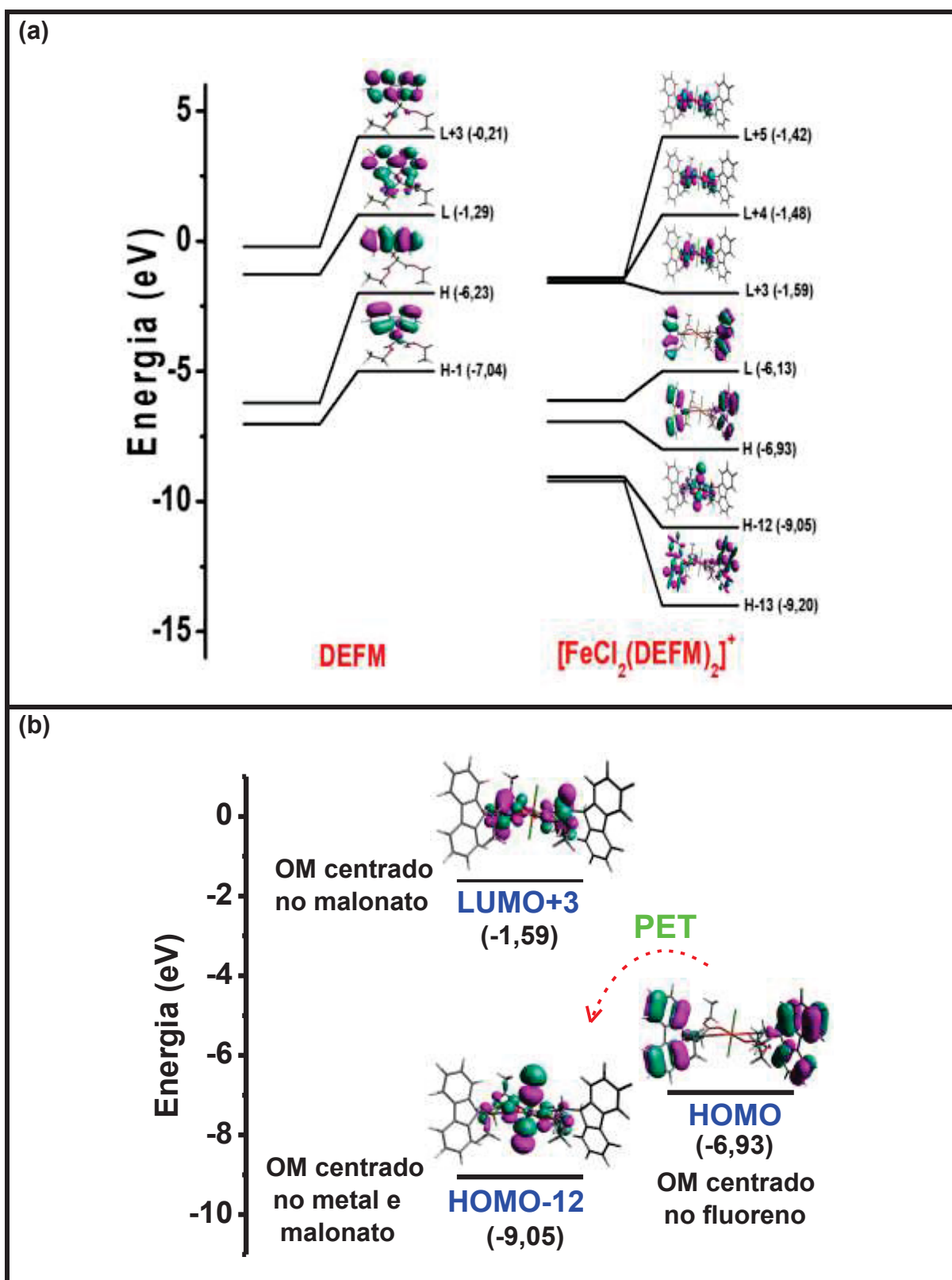


Figura 50. (a) Orbitais de fronteira do sensor *DEFM*, e seu complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$. (b) Ilustração do diagrama de energia dos orbitais de fronteira associados a emissão fluorescente do ligante *DEFM*, e seu complexo com ferro(III).

Tabela 38. Principais transições eletrônicas obtidas por *TD-DFT* para o ligante livre *DEFM* e seu complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$.

COMPOSTO	Comprimento de onda (nm) (experimental)	Força do oscilador (f)	Principais transições
DEFM	272 (302)	0,42	HOMO→LUMO
	217 (290)	0,21	HOMO→LUMO+3
	193 (266)	0,75	HOMO-1→LUMO+3
$[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$	347 (320)	0,09	HOMO-13→LUMO
	286 (290)	0,10	HOMO-12 →LUMO+3
	261 (302)	0,27	HOMO-13 →LUMO+4
	267 (266)	0,66	HOMO→LUMO+5

8.1.2.1. Obtenção de figuras de mérito do quimiossensor *DEFM* na detecção seletiva de íons ferro(III)

De maneira similar ao estudo realizado no capítulo 1 para o ligante *MAC* com íons cádmio(II), com a intenção de obter figuras de mérito e atestar a adequação do quimiossensor *DEFM* na detecção seletiva de íons ferro(III) [148], foram padronizadas as condições das medidas, para atenuar erros aleatórios de análise. As condições “*nominais*” são trazidas na **Tabela 35** (seção experimental), e foram respeitadas nos testes realizados. As figuras de mérito obtidas neste capítulo correspondem à seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez, e serão discutidas a seguir, bem como no **ANEXO 8**, trazendo os resultados obtidos para o sistema de detecção do sensor *DEFM* ao íon férrico. Ferramentas estatísticas foram utilizadas a fim de identificar resultados anômalos, tendenciosos e não-homogêneos, para garantir que o quimiossensor corresponda a um sistema estatisticamente robusto, preciso e exato, conforme os parâmetros adotados e recomendados por órgãos reguladores como *ANVISA* [108-109] e *INMETRO* [110].

8.1.2.1.1. Seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, reversibilidade e robustez

O teste de seletividade individual, trazido na **Figura 47(b)**, mostrou grande especificidade na detecção de íons ferro(III) através do sensor *DEFM*, com forte supressão da intensidade fluorescente em relação aos diversos cátions testados. Para essas medidas de seletividade feitas em triplicatas para cada íon, calculou-se o desvio

padrão relativo ou **RSD** (discutido no capítulo 1 **seção 4.3.5.1**), e apresentaram valores muito abaixo dos máximos aceitáveis e recomendados por órgãos reguladores como *ANVISA* [108,109] e *INMETRO* [110]. Os dados obtidos no teste de seletividade individual estão sumarizados no **ANEXO 8** para todos os íons. O teste de competição de íons tem como finalidade analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença da espécie de interesse, e foi realizado de modo análogo ao estudo discutido no capítulo 1 (**seção 4.3.5.5**) deste trabalho, logo, com todos os possíveis interferentes reunidos na mesma amostra, para atestar a especificidade do sensor [149-152]. A **Figura 47(c)** mostra que o sensor *DEFM* é altamente seletivo na detecção de íons ferro(III), pois o efeito *CHEQ* do sensor fluorescente na presença e na ausência desse metal permite sua distinção e detecção específica sem interferentes. Testes estatísticos, **Tabela 39**, não apresentaram nenhum “outlier” dos resultados (*teste de Dixon e teste de Grubbs*, sendo $Q_{\text{tabelado}} = 0,71$ e $G_{\text{tabelado}} = 1,715$), bem como nenhuma discrepância entre as variâncias das medidas (*teste de Fisher*, sendo $F_{\text{tabelado}} = 9,605$), **Tabela 40**, considerando um intervalo de 95% de confiança, grau de liberdade igual a 4 e número de replicatas igual a 5, com monitoramento da banda de emissão em 316 nm.

Tabela 39. Dados estatísticos do ensaio de “competição de íons” para o sistema de detecção do ligante *DEFM* e íons ferro(III).

Soluções		Média	Desvio padrão	RSD (%)	Variância (s ²)	Outlier?	
						DIXON	GRUBBS
1	DEFM	124,920	1,851	1,481	3,425	NÃO	NÃO
2	DEFM + 21 METAIS	50,781	1,429	2,813	2,041	NÃO	NÃO
3	DEFM + 21 METAIS + ferro(III)	17,316	0,828	4,782	0,686	NÃO	NÃO

Tabela 40. Combinações para o teste de Fisher (teste *F*) usados no ensaio de “competição de íons” do sistema de detecção do ligante *DEFM* e íons ferro(III).

COMBINAÇÕES TESTADAS DAS VARIÂNCIAS DAS SOLUÇÕES		TESTE F ($F_{\text{tab}} = 9,605$)	
		$F_{\text{CALCULADO}}$	RESULTADO
1:2	DEFM livre <u>versus</u> DEFM + 21 METAIS	1,678	Aprovado
1:3	DEFM livre <u>versus</u> DEFM + 21 METAIS + ferro(III)	4,994	Aprovado
2:3	DEFM + 19 METAIS <u>versus</u> DEFM + 21 METAIS + ferro(III)	2,976	Aprovado

A **Figura 51(a)** ilustra a faixa linear da curva de calibração do sensor *DEFM*, correspondente as concentrações 0,1-1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do íon ferro(III), com uma reta de coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,997, portanto, de acordo com as agências reguladoras (ANVISA [108], INMETRO [110]). A partir da faixa linear, com o valor de coeficiente angular (inclinação da reta), e o desvio padrão das medidas em decaplicata do sensor (branco analítico), podem-se obter os valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) (discutido na **seção 4.3.5.2**). Neste caso, os valores obtidos foram 15,56 e 51,85 nmol L^{-1} , respectivamente, sendo valores expressivamente baixos demonstrando, portanto, elevada detectabilidade do quimiossensor *DEFM*. Os testes estatísticos que foram realizados para a faixa linear estão agrupados e discutidos no **ANEXO 8** deste relatório, e correspondem ao: teste de Grubbs, teste de Fisher, e ainda uma avaliação dos resíduos de cada ponto do gráfico com os testes de Cochran e Durbin-Watson, com a obtenção do gráfico de dispersão residual. Os resultados dos testes estatísticos confirmam que a faixa linear obtida é estatisticamente aprovada com 95% de nível de confiança.

A **Figura 51(b)** mostra os testes de repetibilidade e precisão intermediária realizados pelo analista responsável pela curva de calibração (repetibilidade) e por um segundo analista, diferente do primeiro (precisão intermediária). O nível de concentração escolhido foi correspondente ao limite de quantificação (LOQ) encontrado a partir da faixa linear obtida. Logo, nesses experimentos a concentração do sensor foi mantida fixa (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e a concentração de íons ferro(III) medida foi de 51,85 nmol L^{-1} . As medidas respeitaram as condições nominais pré-estabelecidas, incluindo os parâmetros do equipamento utilizado, e preparadas de forma individual por cada um dos analistas em decaplicatas. O teste pode ser considerado repetível e reprodutível se para o nível de concentração analisado (LOQ) for obtido uma média

semelhante com a aprovação de testes estatísticos como Dixon (identificação de “outliers”) e Horrat [149-152]. A **Figura 51(b)** mostra os valores médios obtidos pelos dois analistas para o nível de concentração no limite de quantificação da faixa linear, e pode-se observar de imediato uma semelhança nos dados bem como um desvio padrão baixo para ambos os operadores.

Os testes estatísticos realizados nesses ensaios foram: *média*, *desvio padrão*, *desvio padrão relativo (RSD)*, *Horwitz (RSD teórico)*, *teste de Dixon (verificação de outliers)* e *HORRAT*, das decuplicatas em cada nível de concentração testado de cada analista (discutido na **seção 4.3.5.3**). A **Tabela 41** mostra que para o nível de concentração analisado pelos analistas, não houve “outlier” entre as replicatas. O desvio padrão de *Horwitz*, ou RSD teórico, simboliza o desvio padrão máximo esperado para o conjunto de dados analisados. Destaca-se que o valor encontrado de HORRAT ($RSD_{\text{experimental}}/RSD_{\text{HORWITZ}}$) deve ser menor ou igual a 1, mostrando que o desvio padrão relativo experimental obtido do método não ultrapassa o desvio padrão relativo máximo teórico [149-152]. A **Tabela 42** traz os resultados dos dois analistas, com seus valores de HORRAT consideravelmente abaixo da unidade, estando de acordo com um método estatisticamente repetível e reprodutível considerando um intervalo de 95% de confiança.

A fim de avaliar a robustez para o sistema do ligante *DEFM* com íons ferro(III), realizou-se um planejamento fatorial fracionário a partir de oito combinações diferentes de sete condições nominais alteradas, baseado no “*Teste de Youden*”, mantendo fixo as concentrações do ligante e do metal em 100 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, em todas as combinações, de forma similar a **seção 4.3.5.4** deste relatório. A **Tabela 44** mostra as sete condições e suas respectivas alterações para o teste da avaliação de robustez do método, e a **Tabela 45** traz as oito combinações realizadas, de modo a variar quatro vezes cada condição escolhida em quatro combinações distintas. Com a média obtida das duplicatas das combinações fatoriais, realizou-se um teste F (*teste de Fisher*). A **Tabela 43** traz os valores de Fisher obtidos para cada condição variada, mostrando que nenhuma das alterações realizadas nas condições nominais testadas apresentaram discrepâncias estatisticamente significativas, superiores ao $F_{\text{tabelado}}=15,44$, e a partir do teste das variâncias, o método desenvolvido mostrou-se robusto.

A **Figura 51(c)** ilustra o “*Gráfico de Pareto*”, para análise da robustez do sistema de detecção do sensor *DEFM* com íons ferro(III), traz em barras o valor do

desvio padrão de cada condição variada no *teste de Youden* [149-152]. Nota-se que todas as alterações das condições nominais no *teste de Youden* não apresentaram discrepâncias significativas nas medidas, e o método desenvolvido pode ser considerado robusto segundo o gráfico de Pareto, pois nenhum valor de desvio padrão de cada condição analisada ultrapassou a linha de significância calculada para o sistema de 0,4. Além disso, é possível ordenar as condições nominais a partir dos desvios obtidos das medidas, indicando as condições que foram mais afetadas com as alterações realizadas, assim, obteve-se o seguinte ordenamento: 5>1>7>6>2>3>4. Portanto, a forma de armazenamento das amostras após o preparo (condição 5) e a temperatura das soluções medidas (condição 1) apresentaram maior alteração com a variação na condição, bem como, a alteração na marca do solvente etanol mostrou a menor das variações nos resultados (condição 4).

Por fim, para o teste de reversibilidade, foi utilizado o ligante EDTA, uma vez que sua constante de formação do complexo com íons ferro(III) é cerca de 1×10^{25} [18], portanto, consideravelmente superior ao encontrado para $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$. A **Figura 51(d)** ilustra como o teste foi realizado, com 4 ciclos de EDTA ao sistema, mostrando que o ligante *DEFM* possui capacidade de reuso sem perda de rendimento quântico, logo, pode-se concluir que este atua como um quimiossensor eficientemente reversível.

Tabela 41. Teste de Dixon (teste Q) para analisar valores anômalos das medidas no teste de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

Analistas	Nível	Média ($\bar{x}$)	Valor mais alto	Outlier Dixon?	Valor mais baixo	Outlier Dixon?
1	LOQ	70,380	70,864	NÃO	69,498	NÃO
2	LOQ	70,668	71,828	NÃO	69,969	NÃO

Tabela 42. Dados estatísticos para análise de repetibilidade e precisão intermediária para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

Testes	Nível de concentração (LOQ)	
	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Média	70,380	70,668
Desvio Padrão	0,408	0,566
RSD (%)	0,579	0,801
RSD Horwitz (%)	18,799	
HORRAT	0,031	0,043

Tabela 43. Valores de $F_{\text{calculado}}$ para cada condição analisada e seus respectivos resultados de robustez para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

CONDIÇÕES		$F_{\text{calculado}}$	RESULTADO
1	Temperatura	6,051	ROBUSTO
2	Marca do sal	11,529	ROBUSTO
3	Tempo entre o preparo da amostra e a medida	13,881	ROBUSTO
4	Marca do etanol	5,996	ROBUSTO
5	Armazenamento das amostras antes das medidas	4,592	ROBUSTO
6	Borbulhamento de gás argônio	8,412	ROBUSTO
7	Lavagem da cubeta entre as medidas	6,435	ROBUSTO

Tabela 44. Parâmetros e suas condições nominais/variadas no teste de Youden para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III). Sendo: TA= temperatura ambiente.

PARÂMETROS		CONDIÇÃO NOMINAL	CONDIÇÃO VARIADA
1	<i>Temperatura</i>	TA	10°C
2	<i>Marca do sal</i>	SIGMA-ALDRICH	MERCK
3	<i>Tempo entre o preparo da amostra e a medida</i>	2h	1,5h
4	<i>Marca do etanol</i>	DINAMICA	BIOTEC
5	<i>Armazenamento das amostras antes das medidas</i>	TA	Geladeira (~15°C)
6	<i>Borbulhamento de gás argônio (~10 min antes das medidas)</i>	NÃO	SIM
7	<i>Lavagem da cubeta entre as medidas</i>	2x etanol + 1x acetona	1x acetona

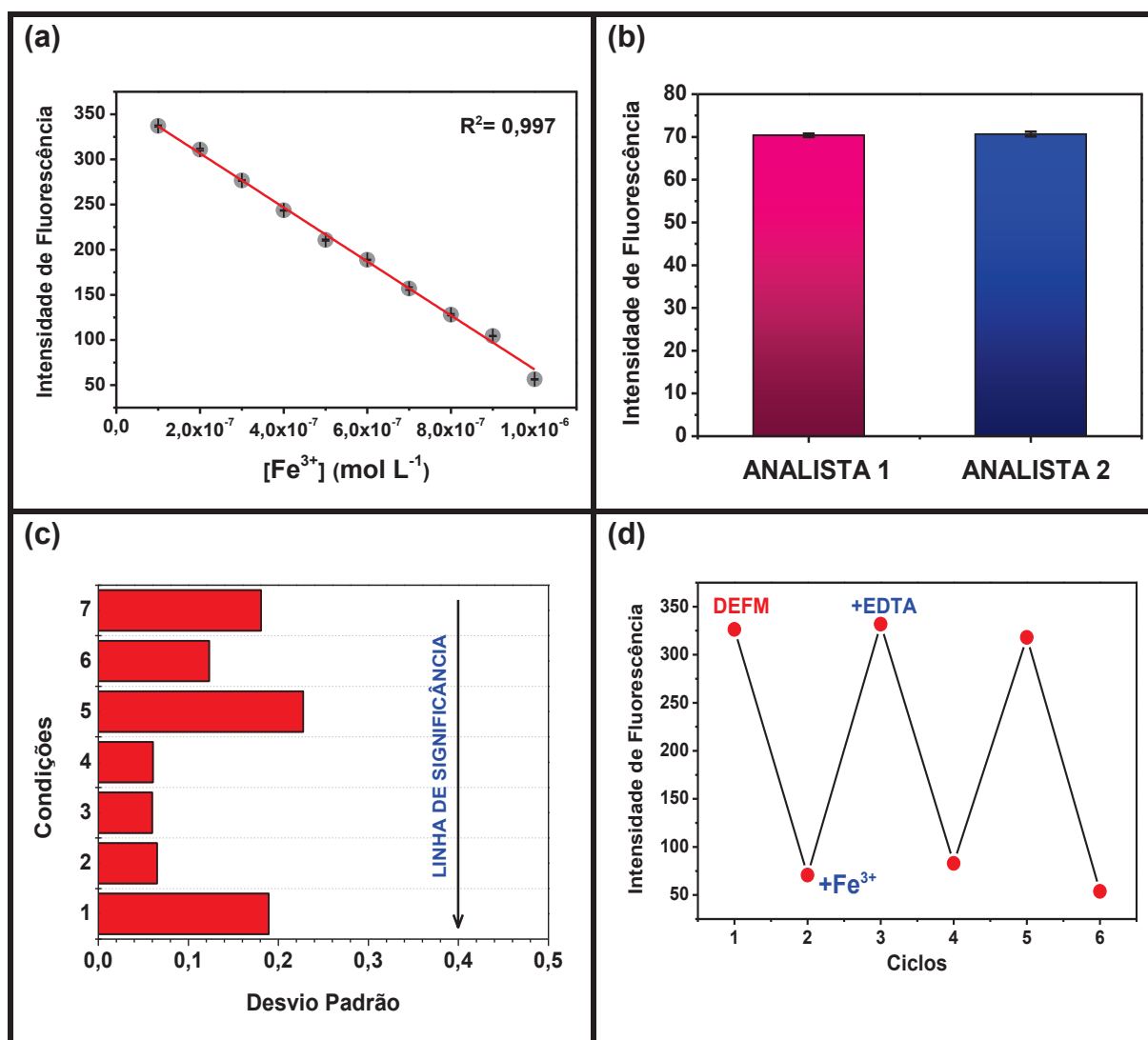


Figura 51. (a) Curva de calibração de DEFM em diferentes concentrações de ferro(III). λ_{em} = 316 nm, EtOH; c DEFM = 100 μ mol L⁻¹; slits 3 e 5 nm. **(b)** Repetibilidade e precisão intermediária. λ_{em} = 316 nm, EtOH; c DEFM = 100 μ mol L⁻¹; [ferro(III)] = LOQ; slits 1,5 nm. **(c)** Gráfico de Pareto. λ_{em} = 316 nm, EtOH; c DEFM = 100 μ mol L⁻¹; c ferro(III) = 1 μ mol L⁻¹; slits 3 e 5 nm. **(d)** Teste de reversibilidade com EDTA. λ_{em} = 316 nm, EtOH; c DEFM = c EDTA = 100 μ mol L⁻¹; c ferro(III) = 1 μ mol L⁻¹; slits 3 e 3 nm.

Tabela 45. Combinações fatoriais usadas no teste de Youden para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III). Para cada combinação, A-H, o quadro em amarelo em destaque representa a condição nominal (CN) usada e o quadro em branco representa a condição variada (CV).

PARÂMETROS		A	B	C	D	E	F	G	H
1	Temperatura	CN	CN	CN	CN	CV	CV	CV	CV
2	Marca do sal	CN	CN	CV	CV	CN	CN	CV	CV
3	Tempo entre o preparo da amostra e a medida	CN	CV	CN	CV	CN	CV	CN	CV
4	Marca do etanol	CN	CN	CV	CV	CV	CV	CN	CN
5	Armazenamento das amostras	CN	CV	CN	CV	CV	CN	CV	CN
6	Borbulhamento de gás argônio	CN	CV	CV	CN	CN	CV	CV	CN
7	Lavagem da cubeta entre as medidas	CN	CV	CV	CN	CV	CN	CN	CV

8.1.2.1.2. Ensaio de recuperação: aplicação do quimiossensor *DEFM* e comparação com sensores luminescentes similares na literatura

O ferro é o quarto elemento e o segundo metal mais abundante da crosta terrestre, correspondendo cerca de 62000 ppm ou 6,2% em peso, além de constituir a maior parte do núcleo da Terra [140]. Para as plantas e os animais, o ferro é um elemento de muita importância, pois, por exemplo, atua no transporte de oxigênio (hemoglobina) e armazenamento de oxigênio (mioglobina) dos mamíferos, entre outras funções [140]. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o ferro é encontrado em níveis de 0,50 a 50 mg L⁻¹ em águas naturais [161]. Um adulto saudável possui cerca de 40 a 160 mg L⁻¹ de ferro no sangue, logo, valores abaixo ou acima dessa concentração são um sinal de alerta. Em certos tipos de células e órgãos do corpo humano, o excesso ou a deficiência de ferro podem causar sérios problemas de saúde, como anemia, cirrose, diabetes, fadiga crônica e osteoporose [161].

Sob outra perspectiva interessante, o ferro pode ser considerado um contaminante inorgânico indesejado no etanol como combustível em automotores [224]. Do posto de vista da qualidade do combustível, os íons metálicos são considerados contaminantes inorgânicos em qualquer concentração, uma vez que as espécies metálicas podem acelerar a corrosão dos motores e/ou promover a produção de gomas e sedimentos. Por isso, agências reguladoras, como a Agência Nacional do

Petróleo (*ANP*) no Brasil, possuem especificações em resoluções de controle de qualidade do combustível etanol a respeito de íons como: ferro (5 mg kg^{-1}), cobre ($0,07 \text{ mg kg}^{-1}$), sódio (2 mg kg^{-1}), cloreto (1 mg kg^{-1}) e sulfato (4 mg kg^{-1}), tornando obrigatória a determinação dos níveis desses íons dentro dos limites máximos permitidos (mostrados entre parênteses) [225]. O ferro pode ser inserido nessa matriz através das etapas envolvidas na produção do etanol ou na fase de armazenamento [224, 226]. Apesar de serem encontrados em baixas concentrações, a presença de íons metálicos pode comprometer o bom desempenho dos motores, principalmente os movidos a mistura de etanol-gasolina, devido a formação de gomas (sólidos insolúveis) por processos de peroxidação dos hidrocarbonetos presentes na gasolina ou processos oxidativos dos componentes presentes nos motores, levando a possíveis emissões de gases responsáveis pelo efeito estufa, como monóxido de carbono [227]. Portanto, é particularmente importante determinar os níveis de ferro(III) em amostras de etanol combustível.

Sabendo disso, quando se trata de atestar a exatidão de um método analítico existem procedimentos variados, como o uso de *MRC* (material de referência certificado), ensaios de proficiência, comparação com métodos já validados, ou então, ensaios de recuperação, que são comuns quando não se tem *MRC* ou um método validado para fins comparativos [149-152]. Neste trabalho, utilizou-se amostras de etanol combustível (coletado de um posto de abastecimento localizado próximo a universidade) para o ensaio de recuperação, com adição do sensor *DEFM* e concentrações conhecidas de íons ferro(III), logo, concentração baixa, média e alta da faixa linear, e analisadas em triplicatas. O cálculo de recuperação foi realizado como discutido na **seção 4.3.5.5**. [149-152], e é dado em porcentagem, pois estima o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito, com base na fração mássica ($\mu\text{g kg}^{-1}$) do analito no teste.

Os resultados estão reunidos na **Tabela 46**, no qual pode-se observar valores satisfatórios de recuperação, na faixa de 45 a 547%, que é consideravelmente superior à faixa mínima aceitável (20 a 50%) segundo as normas do Mercosul [108-109], para a fração mássica ($\mu\text{g L}^{-1}$) de ferro(III) utilizada nos testes. Logo, é possível afirmar que o sensor *DEFM* pode ser utilizado em matrizes complexas, como etanol combustível, para recuperação de íons ferro(III), indicando um método analítico verossímil de detecção, sem interferentes.

A partir de todos os dados supracitados para a detecção de íons ferro(III) com o ligante *DEFM*, foi possível fazer um comparativo com alguns sensores para detecção do mesmo íon, também baseados na fluorimetria como transdução. Os dados mais importantes de cada exemplo são trazidos na **Tabela 48**, no qual se observa alguns resultados destacáveis para o sensor *DEFM*, tais como, alta especificidade, ou seja, nenhum interferente em potencial, valor de *LOD* na faixa de concentração nmol L^{-1} , complexo de estequiometria 1:2 (metal:ligante) com valor de constante de formação (K_f) que indica alta estabilidade em solução, bem como, figuras de mérito a fim de atestar a adequação do método de detecção proposto, que obedecem as normas vigentes da *ANVISA* e *INMETRO* [108-110], como sumariza a **Tabela 47**, sendo o grande diferencial deste trabalho em relação aos encontrados na literatura.

Tabela 46. Valores de recuperação (%) para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III) em etanol combustível.

MATRIZ	c Fe ³⁺ (nmol L ⁻¹)	RECUPERAÇÃO (%)
ETANOL COMBUSTÍVEL	100	45,99±0,2
	500	96,60±0,3
	1000	547,23±0,9

Tabela 47. Resultados gerais do sensor *DEFM*.

TESTES REALIZADOS	Resultado obtido
Seletividade individual (efeito CHEQ)	Íons ferro(III)
Competição de íons	Sem interferentes (altamente específico)
Estequiometria	1:2 (metal:ligante)
Constante de formação	$K_f = 1,5 \times 10^6 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$ (log $K_f=6,18$)
Reversibilidade	4 ciclos com <i>EDTA</i>
LOD e LOQ	15,56 e 51,85 nmol L^{-1} (respectivamente)
Repetibilidade, Precisão intermediária e Robustez	Estatisticamente aprovados
Teste de adição e recuperação (COMBUSTÍVEL ETANOL)	Estatisticamente aprovado em 3 níveis de concentração

Tabela 48. Dados analíticos de sensores fluorescentes seletivos para íons ferro(III). Sendo: FM= figuras de mérito.

Sensor	LOD (limite de detecção)	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Interferentes	Meio	logK	FM
DEFM [166]	15,56 nmol L ⁻¹	0,1-1,0	nenhum	etanol	6,0	Sim
[183]	2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$	200-1000	nenhum	H ₂ O/tris-HCl	-	Não
[228]	-	-	nenhum	H ₂ O /DMF	-	Não
[229]	-	-	Cu ²⁺	THF	-	Não
[230]	0,29 $\mu\text{mol L}^{-1}$	20-100	Al ³⁺ , Cr ³⁺	H ₂ O/MeOH	4,8	Não
[231]	275 nmol L ⁻¹	0,1-50	nenhum	H ₂ O	-	Não
[232]	0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	40-160	Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	DMF	-	Não

8.2. SISTEMA 2 – MAC:FDC:Eu³⁺

8.2.1. Síntese e caracterização de fluoreno diéster (FDE) e fluoreno dicarboxilato (FDC)

A síntese do precursor *FDE* foi realizada a partir de uma “condensação de Knoevenagel”, baseada no trabalho do químico alemão W. Lehnert [222] em 1973 com cetonas e malonatos, embora a técnica tenha sido elaborada em 1898 por Emil Knoevenagel [233]. Tendo como base a reação entre 9-fluorenona e dietilmalonato, o produto se difere do *FDE* apenas pelo bromo nas posições 2 e 7 do fluoreno, tornando-o assim inédito na literatura. O trabalho de Lehnert inspirou ainda outros autores que utilizaram as técnicas adaptadas de condensação de Knoevenagel em suas pesquisas, para estudar compostos quirais por exemplo, como Li e colaboradores [234], ou reações redox desses compostos, como Utley [235-236], Cao [237] e seus colaboradores. Com base nisso, aliando a experiência do grupo com derivados de fluoreno, juntamente com os resultados expostos neste trabalho com derivados de acridina, pretende-se expandir o estudo dos seus comportamentos emissivos com íons do bloco f, como o íon európio(III), que será abordado nesta seção. Os compostos *FDE* e *FDC* foram caracterizados por análise elementar (*CHN*), espectroscopia de massas (*ESI-MS*), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) e carbono (¹³C-RMN), espectroscopia de fluorescência e espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (*UV-VIS*).

8.2.1.1. Análise elementar (CHN), espectroscopia de massas (ESI-MS), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN) e difratometria de raios-X de monocristal (DRX)

A análise elementar (CHN) realizada forneceu os resultados mostrados na **Tabela 49**, respectivamente; sendo os valores entre parênteses os valores calculados com base em suas fórmulas moleculares atribuídas, estando de acordo com os valores experimentais. Além disso, os espectros de massas obtidos (ESI-MS), sumarizado na **Tabela 50**, mostra que as atribuições estão coerentes com os íons moleculares propostos e seus fragmentos. Um monocristal de *FDE* foi obtido por evaporação lenta da solução-mãe do composto em *THF*, no qual a representação *ORTEP* da estrutura cristalina está ilustrada na **Tabela 51**. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do *CCDC* (*Cambridge Crystallographic Data Centre*) no qual pôde-se constatar que trata-se de uma forma cristalina inédita. A **Tabela 51** traz alguns dados sobre a coleta e refinamento da difração, no qual se observa que o composto cristaliza no sistema triclinico. As distâncias e ângulos de ligação do monocristal são trazidos na **Tabela 65** do **ANEXO 7**. As **Figuras 52 e 53** mostram os espectros de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN referente à *FDE* e *FDC*, respectivamente. Os deslocamentos químicos juntamente com a integração dos sinais são coerentes com as atribuições realizadas e com a composição apresentada nas **Tabelas 52 e 53**. Os sinais que foram obtidos na região entre 7,26 ppm (singleto), 76 à 77 ppm (triplete) correspondem ao solvente clorofórmio usado nas análises para *FDE*, e os sinais em 1,59 e 4,03 ppm, ambos singletos, nos espectros de ^1H -RMN de *FDE* e *FDC* se referem ao solvente água [123]. O perfil espectral obtido, para ambos os espectros, foi comparado com os valores encontrados na literatura e em simuladores [122] (incluindo o programa ChemDraw), e estão entre parênteses nas tabelas ao lado dos valores obtidos, mostrando coerência nas atribuições.

Tabela 49. Análise elementar (CHN) de *FDC* e *FDE*. Entre parênteses estão os valores calculados.

COMPOSTOS	FÓRMULA	%C	%H	%N
FDE	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_4$	50,18 (50,03)	3,03 (3,36)	0,09 (0,00)
FDC	$\text{C}_{16}\text{H}_6\text{Br}_2\text{Na}_2\text{O}_4$	37,97(38,13)	1,94(2,00)	0,16(0,00)

Tabela 50. Espectro de massas (ESI-MS) dos compostos (a) *FDC* e (b) *FDE*, com as atribuições dos sinais obtidos referentes a relação massa/carga nos modos negativo e positivo, respectivamente, bem como, as comparações do perfil dos padrões isotópicos experimentais e calculados.

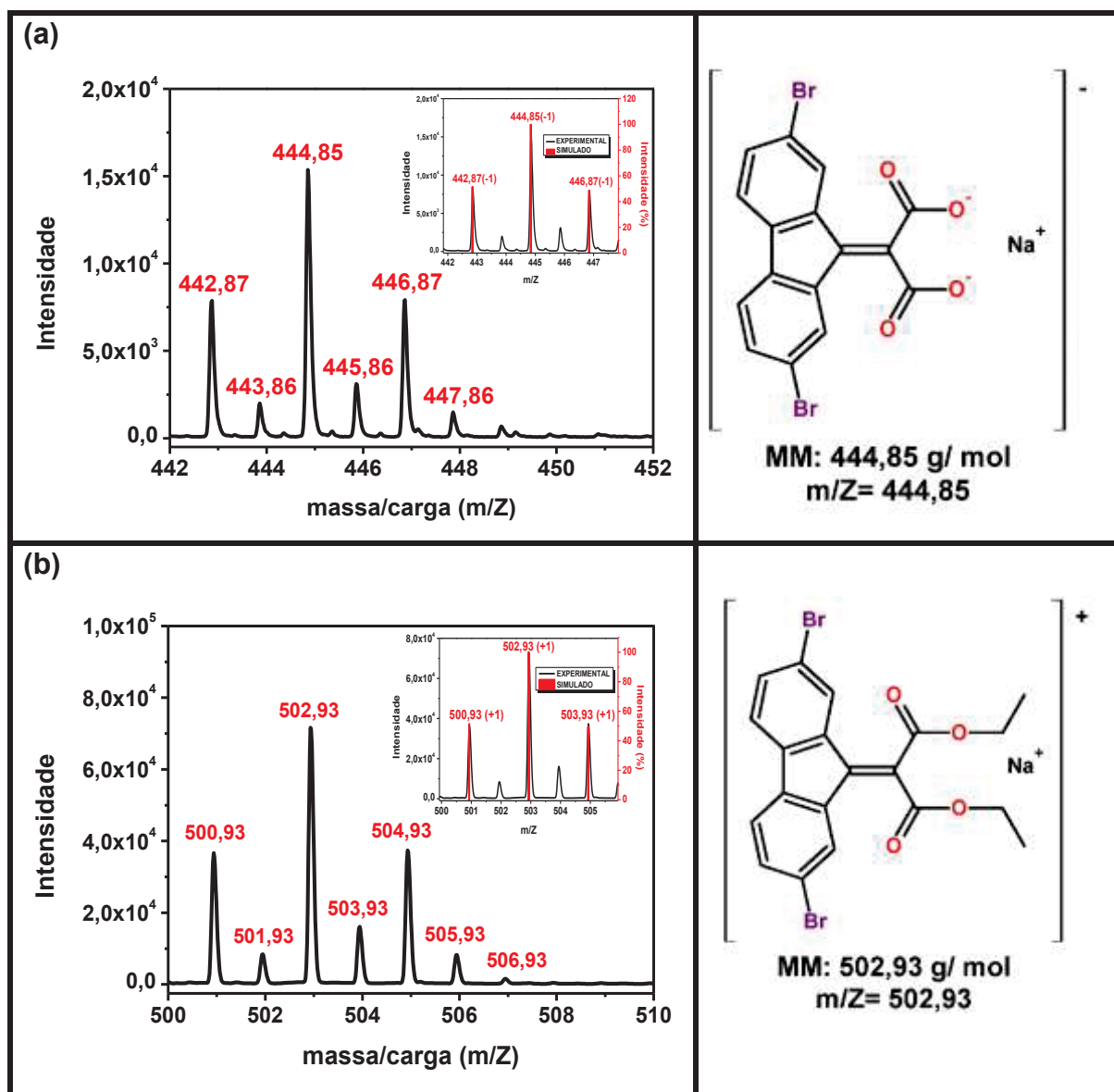


Tabela 51. Principais dados cristalográficos do monocristal de *FDE*. Representação *ORTEP* e elipsóides termais com 50% de probabilidade.

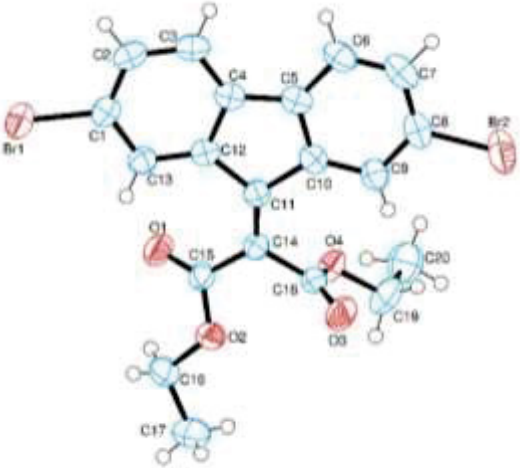
DADOS	
Fórmula empírica	$C_{20}H_{16}Br_2O_4$
Massa Molar	480,15 g mol ⁻¹
Temperatura	298(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Cor do cristal/forma	Laranja/paralelepípedo
Z; Volume	2; 939,32(8) Å ³
Densidade	1,698 mg/m ³
Coeficiente de absorção	4,337 mm ⁻¹
Dimensão do cristal	0,301x0,256x0,237 mm
Dimensões de cela unitária	a= 8,1354(4) Å
	b= 9,3484(4) Å
	c= 13,9354(7) Å
	α= 90,124(2)°
	β= 105,748(2) °
	γ= 112,002(2)°

Tabela 52. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de FDE. (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN de FDE.

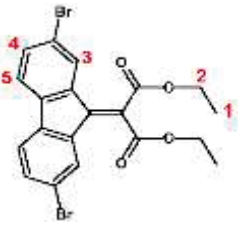
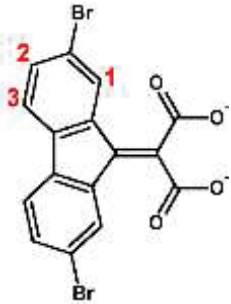
(a)	^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
	1	1,42 (1,39)	Tripleto (t)	6,00 (6H)
	2	4,41 – 4,52 (4,20)	Quarteto (q)	4,00 (4H)
	4	7,38 – 7,52 (7,44 – 7,63)	Multiplete (m)	3,90 (4H)
	5			
	3	7,93 (7,73)	Singleto (s)	1,00 (1H)
(b)	^{13}C	δ (ppm)		
	1	14,10 (14,20)		
	2	62,65 (62,40)		
	10	121,03 (120,90)		
	8	121,93 (121,90)		
	3	125,33 (124,00)		
	7	129,54 (125,50)		
	9	133,99 (131,30)		
	4	137,19 (135,90)		
	11	139,58 (139,20)		
	6	141,60 (140,60)		
	5	164,77 (165,00)		

Tabela 53. (a) Deslocamento químico, multiplicidade e integração dos sinais de ^1H -RMN de FDC. (b) Deslocamento químico de ^{13}C -RMN de FDC.

(a)	^1H	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
	2	7,42-7,52 (7,44 – 7,63)	Multiplete (m)	4,00 (4H)
	3			
	1	7,94 (7,73)	Singleto (s)	1,31 (1H)
(b)	^{13}C	δ (ppm)		
	8	120,72 (120,90)		
	6	121,10 (121,90)		
	1	123,43 (124,00)		
	5	126,09 (125,50)		
	7	131,12 (131,30)		
	2	137,29 (135,90)		
	9	138,09 (139,20)		
	4	140,67 (140,60)		
	3	172,83 (175,00)		

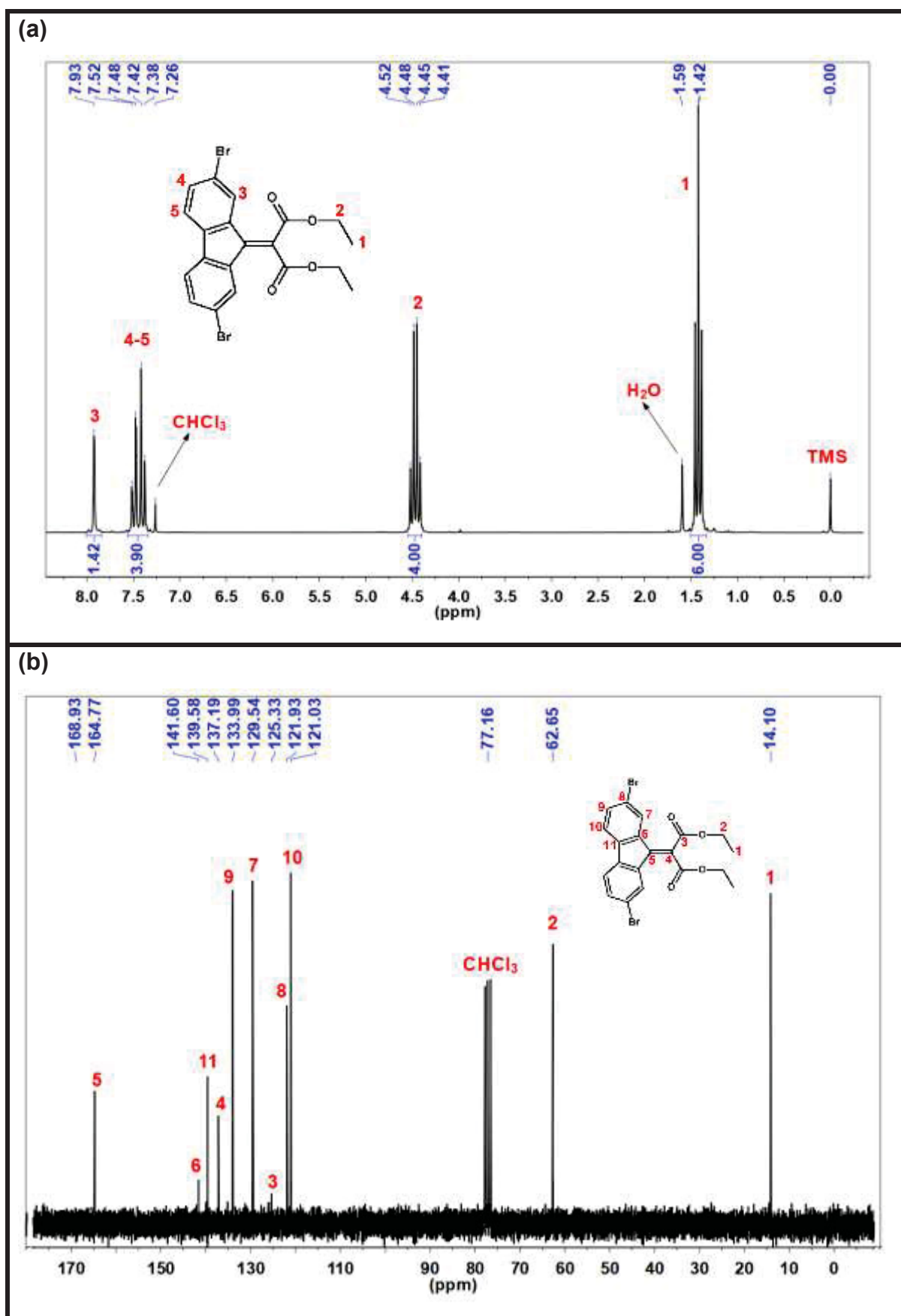


Figura 52. Espectros de (a) ^1H -RMN e (b) ^{13}C -RMN para FDE em CDCl_3 .

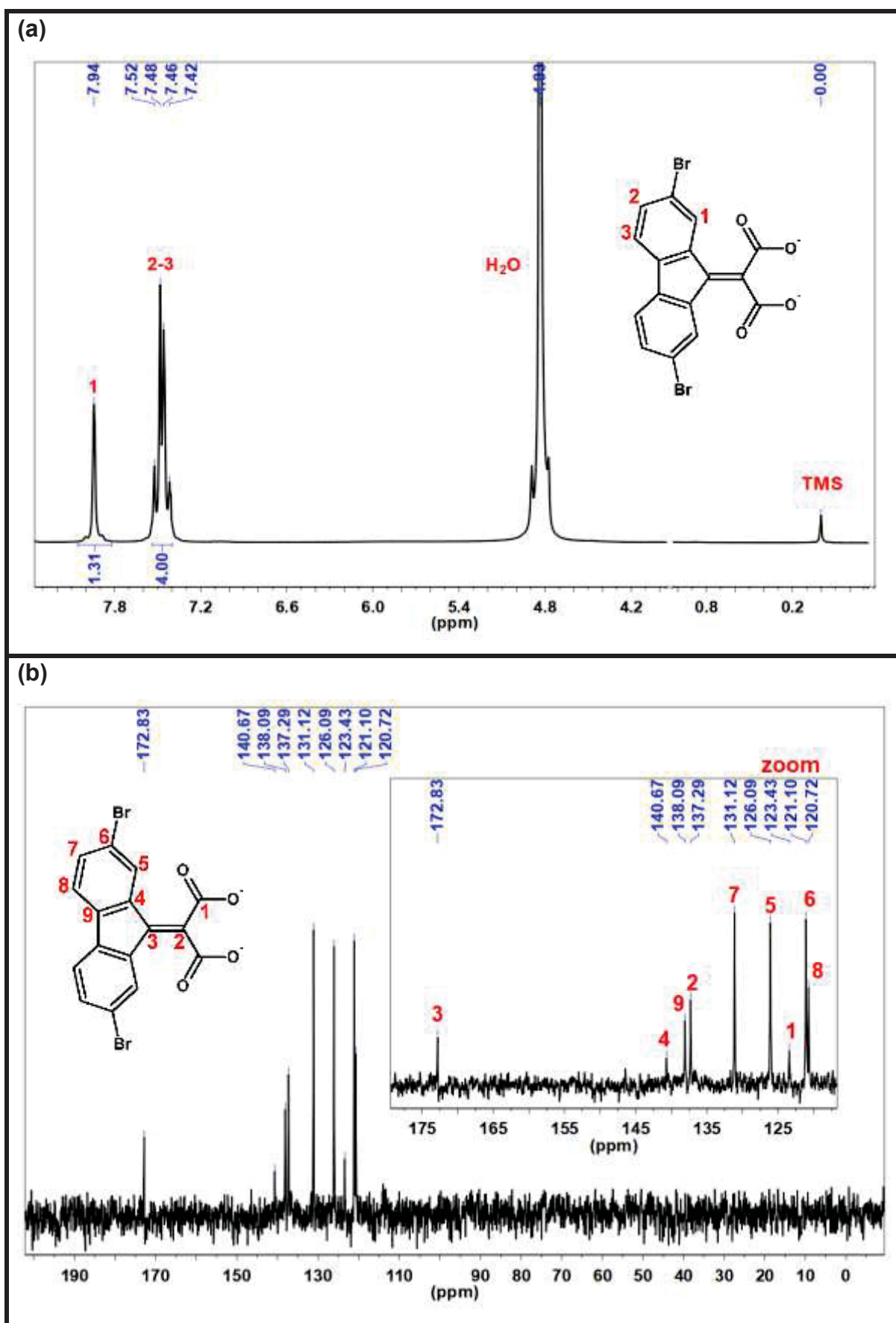


Figura 53. Espectros de (a) ^1H -RMN e (b) ^{13}C -RMN para FDC em D_2O .

8.2.1.2. Espectroscopia de fluorescência e espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS) para o ligante FDC

A **Figura 54(a)** ilustra o espectro de absorção UV-VIS do ligante FDC em *inset*, no qual é possível observar uma banda mais intensa em 268 nm com absortividade molar de $2,52 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, bem como, outras bandas de menor intensidade em 236, 258, 294 e 304 com valores de absortividade 2,19, 1,88, 1,41 e $1,37 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente. As bandas foram atribuídas às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, observadas em sistemas aromáticos [125], e coincidente com o perfil do fluoróforo (*fluoreno*).

Com base no perfil de absorção do ligante FDC, foram realizados testes fluorimétricos a fim de estudar seu comportamento emissivo, assim, realizou-se medidas em várias concentrações, como mostra a **Figura 54(b)** com variações entre 1×10^{-3} a $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, no qual foi possível observar que a concentração que fornece o maior rendimento quântico, das concentrações testadas, é igual a $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para FDC. A **Figura 54(a)** ilustra os espectros de excitação e emissão fluorescente para o ligante FDC, mostrando comprimento de onda de excitação em 268 nm e de emissão em 330 nm.

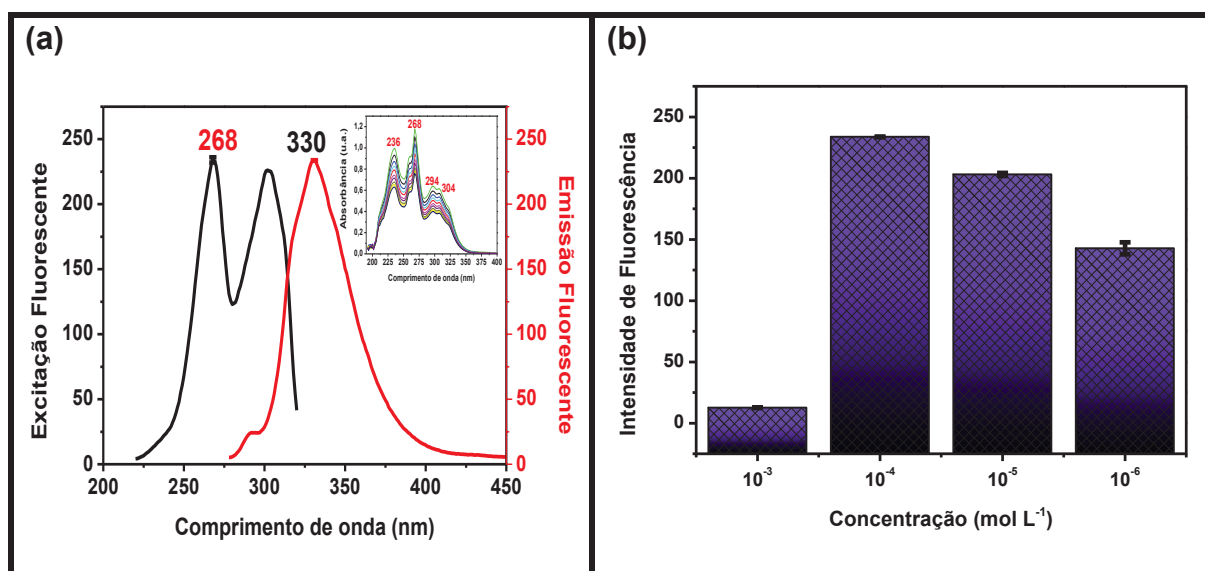


Figura 54. (a) Espectros de excitação, emissão fluorescente e UV-VIS (em inset com concentrações que variam de $4,24$ a $2,86 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) para o ligante FDC ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em EtOH. (b) Intensidades médias de fluorescência (triplicatas) para o ligante FDC em diferentes concentrações, 10^{-3} a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em EtOH (slits 3 e 5 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 268 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$).

8.2.2 Luminescência do sistema **MAC:FDC:Eu³⁺**

O comportamento emissivo do ligante *MAC*, explorado no capítulo 1 deste trabalho, mostrou que o ligante livre não foi capaz de sensibilizar a emissão do íon európio(III). Para contornar essa característica duas estratégias foram pensadas: *i) funcionalização do ligante MAC, a fim de obter, na sua estrutura, mais átomos doadores para coordenação com o metal. Porém, nessa abordagem, o baixo rendimento das duas rotas sintéticas para o ligante livre foi o fator limitante; ii) inserção de um ligante auxiliar, a fim de fornecer mais pontos para coordenação com o metal e que, adicionalmente, possa atuar como ligante-antena na sensibilização do íon lantanóide.* Nesse sentido, o estudo foi realizado com o ligante *FDC*, que se mostra similar a ligantes-antena já conhecidos na literatura e que possui em sua composição um fluoróforo com eficiência quântica elevada (fluoreno $\phi = 0,66$ em água [7]). Assim, pôde-se ainda analisar um sistema contendo dois fluoróforos diferentes: acridina e fluoreno. Além disso, a escolha do ligante *FDC* foi sustentada devido a rigidez conferida pela alta conjugação, incluindo a ligação entre o carbono 9 do fluoreno e a porção dicarboxilato, sendo um dos fatores que podem favorecer os processos radiativos.

Desta forma, a mistura **MAC:FDC:Eu³⁺** foi investigada quanto ao seu comportamento emissivo, no que diz respeito a sensibilização do íon európio(III) pelo efeito antena, sua estequiometria e modo de coordenação do complexo formado em solução, bem como, no seu papel como possível quimiossensor para ânions, mais precisamente do tipo 1A de sensores com lantanóides. Além disso, cálculos mecânico-quânticos foram realizados a fim de esclarecer os processos de transferência de energia para o nível emissor do íon európio(III).

8.2.2.1. Complexos **[Eu(MAC)(FDC)₂]⁻** e **[Eu(MAC)(FDC)(X)₂]ⁿ** (X= H₂O, EtOH ou NO₃⁻)

Um fator muito importante no estudo investigativo da mistura **MAC:FDC:Eu³⁺**, é o fato do ligante *FDC* apresentar comprimento de onda de emissão em 330 nm, portanto, região diferente do comprimento de onda de emissão do ligante *MAC*, que ocorre em 450 nm, pois suas emissões podem ser analisadas individualmente no espectro, sem sobreposições. O tratamento e armazenamento adequado dos solventes também foi de suma importância para os testes, pois, como dito, moléculas de água podem coordenar-se facilmente aos íons lantanóides levando à supressão

dos processos emissivos. Desta forma, os solventes foram tratados previamente e armazenados em frascos âmbar limpos e secos com peneira molecular 4Å ativada. É interessante salientar que nas mesmas condições, o espectro apenas do sal de európio(III) não apresenta linhas de emissão, muito provavelmente porque moléculas de solvente, possivelmente coordenadas ao íon lantanóide, não são capazes de sensibilizar a emissão do metal.

A fim de determinar a estequiometria dos ligantes que melhor sensibiliza o metal, inicialmente estudou-se diferentes razões de *MAC*, *FDC* e íons európio(III) em solução. Desta forma, como ilustra a **Figura 55(a)**, o ápice da sensibilização lantanídica ocorre com uma relação 1:2:1 (*MAC:FDC:Eu³⁺*), logo, em proporções diferentes não foi constatada transferência de energia para o nível emissor do európio(III), ou ainda, como na proporção 1:3:1 (*MAC:FDC:Eu³⁺*) a sensibilização não apresenta melhora significativa, indicando que a maior eficiência do efeito antena é suprida na proporção 1:2:1 (*MAC:FDC:Eu³⁺*). Cabe ressaltar que outras proporções entre os ligantes e o metal foram testadas, mas somente as ilustradas mostraram efetividade.

A **Figura 55(b)** ilustra o perfil de emissão da mistura *MAC* e *FDC* (1:2) sem íons európio(III), em um comparativo espectral da emissão do complexo proposto [Eu(*MAC*)(*FDC*)₂]⁻, enfatizando as emissões do lantanóide em 593 e 615 nm, referentes às transições ⁵D₀ → ⁷F₁ e ⁵D₀ → ⁷F₂, respectivamente, condizentes com suas regiões esperadas (ver **ANEXO 6**). A banda em 536 nm corresponde ao duplo harmônico, que se manifesta especificamente no comprimento de onda de excitação usado nas medidas vezes um fator de dois. Neste caso, a excitação em 268 nm é correspondente à excitação do ligante *FDC*. Todas as medidas foram realizadas neste comprimento de onda de excitação, pois a excitação do ligante *MAC* é menos energética (400 nm), o que diminuiria a faixa do espectro de emissão estudada, excluindo a emissão do ligante *FDC*, que ocorre em 330 nm, e como já mencionado, o objetivo é o monitoramento das 2 bandas de emissão dos ligantes com íon európio(III). A **Figura 55(c)** ilustra os espectros de emissão dos ligantes *MAC* e *FDC* livres, e para o complexo proposto [Eu(*MAC*)(*FDC*)₂]⁻, mostrando que a sensibilização do íon európio(III) não altera os comprimentos de onda de emissão dos ligantes, que continuam sendo 330 nm para *FDC* e 450 nm para *MAC* após a coordenação com o metal.

Os íons lantanóides possuem alta afinidade para ligações com átomos

oxigênio, nitrogênio e enxofre, em ordem decrescente $O > N > S$; bem como, complexos de európio(III) com ligantes do tipo β -dicetonas e β -cetoésteres, similares ao ligante FDC, geralmente apresentam modo de coordenação igual a 8 e baixa simetria ao redor do íon lantanóide [211,215]. Com base nas razões testadas de ligantes e metal, o **Esquema 14** mostra duas atribuições dos modos de coordenação possíveis nas proporções 1:1:1 e 1:2:1 (MAC:FDC:Eu³⁺), sendo que apenas a última consegue sensibilizar efetivamente o íon lantanóide. Desta forma, para ambos os casos, considerou-se um ambiente octacoordenado (NC=8), denominados [Eu(MAC)(FDC)(X)₂]ⁿ e [Eu(MAC)(FDC)₂]⁻, respectivamente.

A “teoria de Judd-Ofelt” [201,238,239], expressa pela **Equação 14**, conhecida como “razão R de assimetria e covalência”, é medida a partir das intensidades relativas das emissões referentes às transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$. Logo, segundo a teoria, se a “razão R” for igual ou superior à unidade (≥ 1) o íon lantanóide está inserido em um ambiente químico mais assimétrico, bem como, as ligações Ln³⁺-Oxigênio apresentam maior caráter covalente, mesmo sendo essencialmente iônica.

De todas as 7 transições principais do íon európio(III) (**Tabela 62 – ANEXO 6**), a $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ é conhecida como “transição hipersensível”, e normalmente a emissão que recebe maior destaque nas discussões dos trabalhos com Eu(III), devido à sua intensidade ser altamente influenciada pela simetria local do metal e pela natureza dos ligantes. Ou seja, qualquer alteração no modo de coordenação do íon lantanóide, poderá ser monitorada pela intensidade da transição hipersensível. Geralmente, em espectros nos quais essa transição é predominante, apresentam emissão de coloração vermelha a rosa pálido, como ilustra a **Figura 55(c’)** [201]. De acordo com a “teoria de Judd-Ofelt”, quanto mais intensa essa emissão, mais forte é a distorção do ambiente de coordenação [201,238,239]. No entanto, a intensidade da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ não é dependente do ambiente químico do íon Eu(III), e pode ser usada como referência para calibrar a distorção do ambiente químico do metal.

$$R = \frac{{}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2}{{}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1} \geq 1 \quad \text{Equação 14}$$

Sendo: $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ = transição hipersensível em 615 nm; $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ = transição em 593 nm.

No complexo proposto $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})_2]^-$ a relação das intensidades médias das emissões medidas em triplicatas, nos comprimentos de onda de 615 e 593 nm foi de $230/113 = 2,032$ (**Figura 55(b)**), logo, muito superior à unidade. Com base na teoria de Judd-Ofelt, esse resultado que pode ser um indicativo de que o complexo foi formado em solução, como proposto no **Esquema 14** [240-247]. O maior caráter covalente das ligações $\text{Eu}^{3+}\text{-O}$, conhecido como “efeito nefelauxético”, pode ser atribuído à alta polarizabilidade do ligante bidentado *FDC*, observado também em outros trabalhos com ligantes β -dicetonas e β -cetoésteres. Normalmente, esse efeito resulta em altas intensidades de emissão da “transição hipersensível” $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ [201] e baixas intensidades da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, que pode ser suportada devido a essa transição não ter sido observada no espectro obtido (normalmente ocorreria entre 570-585 nm). Ou ainda sua intensidade é suficientemente baixa a ponto de não ser melhor identificada, devido à proximidade com o duplo harmônico em 536 nm [248].

Assim, considerando o complexo $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})_2]^-$, a proposta é de que duas unidades do ligante *FDC* coordenam-se de forma bidentada ao metal, através de seus átomos de oxigênio, e uma unidade do ligante *MAC* de maneira tetradentada, por meio dos átomos de nitrogênio da molécula, completando assim a esfera de coordenação do íon európio(III) de forma octacoordenada. De modo análogo, para o complexo proposto $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})(\text{X})_2]^n$, o ligante *FDC* coordena-se de forma bidentada ao metal, o ligante *MAC* de maneira tetradentada, e as duas posições (**X**) remanescentes podem estar sendo preenchidas por moléculas de água, etanol ou ainda o contra-íon nitrato, resultando em diferentes valores de carga **n** no complexo.

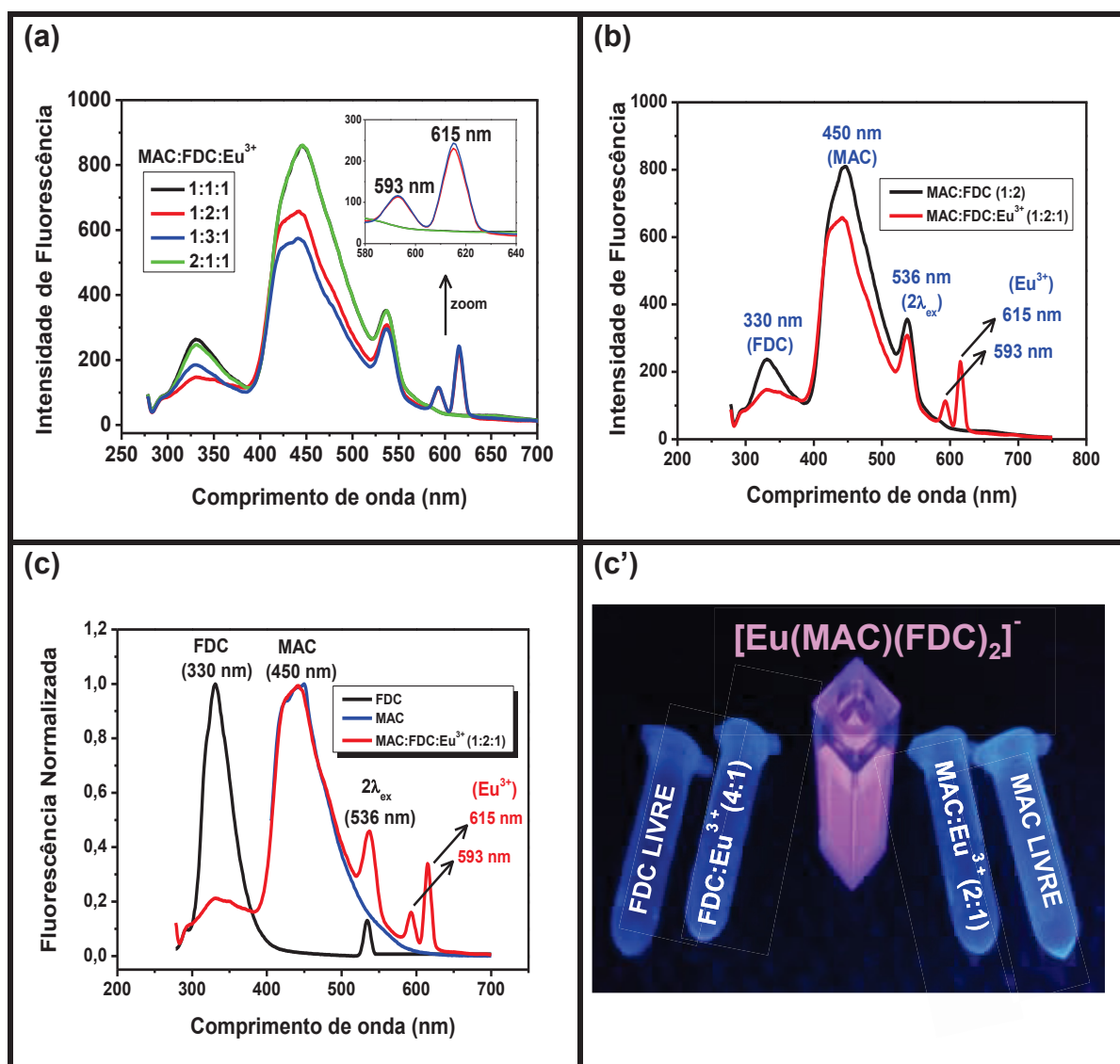
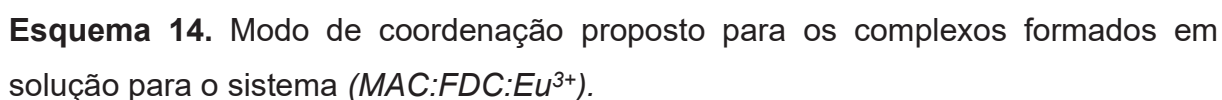


Figura 55. (a) Espectros de emissão em diferentes proporções $MAC:FDC:Eu^{3+}$. (b) Espectros de emissão da mistura $MAC:FDC$ (1:2) e para o complexo $[Eu(MAC)(FDC)_2]^-$ formado em solução. (c) Espectros normalizados de emissão dos ligantes livres MAC e FDC , e para o complexo $[Eu(MAC)(FDC)_2]^-$ formado em solução. (λ_{ex} = 268 nm, slits 3 e 5 nm, $CHCl_3:EtOH$ (1:99 v/v)). c ligantes = c Eu^{3+} = 100 μ mol L⁻¹. (c') fotografia das soluções dos ligantes livres MAC e FDC , das misturas $MAC:Eu^{3+}$ (2:1), $FDC:Eu^{3+}$ (4:1), e do complexo $[Eu(MAC)(FDC)_2]^-$ sob luz UV (λ = 365 nm).



O efeito antena normalmente é acompanhado pela diminuição da intensidade relativa de emissão do ligante-antena que sensibiliza o íon lantanóide. Como já discutido, para que o processo de transferência de energia ocorra, de um estado tripleto do ligante para o nível emissor do lantanóide, vários processos precisam ser desfavorecidos, o que inclui a emissão do próprio ligante e demais mecanismos não-radiativos [201]. Desta forma, quando há o efeito antena normalmente as emissões do ligante apresentam perda de rendimento quântico (ϕ).

Assim, observando a **Figura 55(b)** nota-se que a sensibilização da emissão do íon európio(III) ocorre concomitantemente a diminuição das intensidades relativas de emissão dos dois ligantes em 330 e 450 nm. A fim de entender a contribuição de cada ligante na transferência de energia ao nível emissor $^5D_0$, testes experimentais foram feitos das emissões dos ligantes livres com íon európio(III), mantendo o número de coordenação igual a 8. Logo, as medidas foram feitas com razões 4:1 (*FDC:Eu³⁺*) e 2:1 (*MAC:Eu³⁺*), como mostra a **Figura 56(a)**, uma vez que o ligante *FDC* se liga de forma bidentada ao íon lantanóide, e *MAC* de maneira tetradentada. Nessas

condições, observou-se que o comportamento emissivo do ligante *FDC* apresenta uma banda alargada que compreende quase toda a extensão de emissão do íon európio(III), em destaque no gráfico. Esse comportamento não é observado para o ligante *MAC*. A **Figura 55(c')** ilustra uma fotografia sob luz UV das soluções dos ligantes livres e nas misturas com íon európio(III) supracitadas, na qual observa-se uma leve coloração rosada na mistura 4:1 (*FDC:Eu³⁺*). Essa banda alargada é muito diferente da estrutura fina do perfil de emissão para íons lantanóides, como é observado nos espectros de emissão do complexo $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})_2]^-$, que apresenta emissão rosa pálida característica de íons európio(III). Esse comportamento emissivo indica que a transferência de energia para o nível emissor do íon európio(III) esteja possivelmente centrada no nível tripleto do ligante *FDC*, bem como, também é um indicativo que o ligante *MAC* possui um papel muito importante nesse sistema $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})_2]^-$, atuando como um “*ligante estabilizador*” para que o efeito antena ocorra de modo mais eficiente, resultando nas linhas de emissão com comprimentos de onda discretos observados na **Figura 55**.

Sabendo disso, com base na geometria otimizada dos ligantes obtida por cálculos teóricos (*TD-DFT*), foi possível estimar a energia do nível tripleto de *MAC* e *FDC*, trazidos na **Tabela 54**. A **Figura 56(b)** ilustra o diagrama de energia construído com base nas energias calculadas, no qual é possível observar que o nível tripleto do ligante *FDC* é superior ao nível emissor $^5\text{D}_0$ do íon európio(III) em aproximadamente 4000 cm^{-1} , que permite a eficiente transferência de energia. Ademais, a energia do nível tripleto do ligante *MAC* é inferior ao nível emissor do íon európio(III), o que torna o efeito antena a partir desse ligante pouco efetivo.

Cabe ressaltar que a presença do átomo de bromo, nas posições 2 e 7 do fluoróforo fluoreno, exerce ao sistema o “*efeito do átomo pesado*” (do tipo interno, uma vez que os átomos de bromo fazem parte da composição da molécula) [18]. Esse efeito aumenta a velocidade do processo de cruzamento intersistema ($\text{S} \rightarrow \text{T}$) [249], o que pode favorecer também a taxa de transferência de energia para o nível emissor do lantanóide. Em tempo, a energia do nível tripleto obtida para o ligante *FDC* apresenta-se muito similar às energias de ligantes como as β -dicetonas e as β -cetoésteres (entre 20000 a 26000 cm^{-1}), que são ligantes-antena conhecidos na literatura por sensibilizarem com efetividade a emissão do íon európio(III).

Tabela 54. Energia do nível tripleto estimado para os ligantes *MAC* e *FDC*.

NÍVEL	ENERGIA (cm ⁻¹)
NÍVEL EMISSOR Eu ³⁺ (⁵ D ₀) [201]	17227
TRIPLETO FDC	21118
TRIPLETO MAC	15627

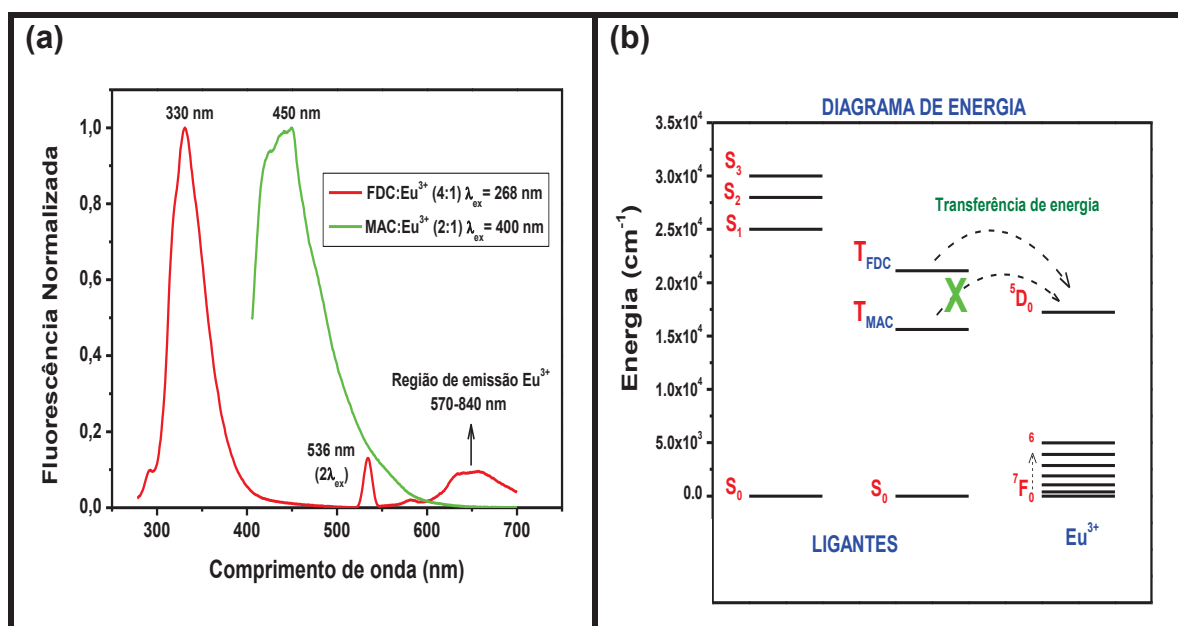


Figura 56. (a) Espectros de emissão dos ligantes livres *MAC* e *FDC* com íon európio(III) (c *MAC* = c *FDC* = c Eu³⁺ = 100 μ mol L⁻¹; *CHCl*₃:*EtOH* (1:99 v/v), slits 3 e 5 nm). (b) Diagrama de energia com os níveis tripletos estimados para os ligantes *MAC* e *FDC*.

8.2.2.3. Seletividade com ânions

Os complexos propostos [Eu(*MAC*)(*FDC*)(X)₂]ⁿ e [Eu(*MAC*)(*FDC*)₂]⁻ foram investigados quanto à seletividade na detecção de ânions, no qual o objetivo principal deste estudo foi analisar as linhas de emissão do íon európio(III), em especial a transição hipersensível, frente a interação com os ânions testados em solução, medidas em triplicatas. O complexo proposto [Eu(*MAC*)(*FDC*)(X)₂]ⁿ, possui duas ligações X que foram atribuídas à moléculas de solvente, provavelmente *EtOH* (ou ainda água), que possui modos vibracionais O-H de alta energia e podem atuar como supressoras da emissão do íon lantanóide, por isso, muito provavelmente, nesta configuração, a sensibilização não é observada, como ilustra a **Figura 55(a)**. Logo,

estas ligações com solvente podem ser substituídas por outros ligantes, como por exemplo os ânions que, conseqüentemente, pode acarretar alterações no comportamento emissivo do íon lantanóide, conforme discutido anteriormente, através da modulação da intensidade de emissão referente à transição hipersensível que ocorre na região de 615 nm.

De maneira análoga, o complexo proposto $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})_2]^-$, que sensibiliza o íon lantanóide, também pode apresentar modulações nas emissões motivadas pela interação com algum ânion. A **Figura 57(a-b)** mostra as médias das intensidades de emissão (gráfico de barras) para todos os testes, com os desvios obtidos das replicatas, no qual é possível observar que os dois sistemas de razões diferentes para **MAC:FDC:Eu³⁺** não apresentaram seletividade a nenhum ânion testado no monitoramento das emissões da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ do íon európio(III). Os sais utilizados foram todos com sódio como contra-íon, nas mesmas concentrações e condições de medida.

O complexo proposto $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})(\text{X})_2]^n$, no qual as moléculas de solvente foram atribuídas como possíveis coordenantes e prováveis responsáveis pela supressão das emissões do íon európio(III), podem não ter sido substituídas completamente pelos ânions estudados, e como consequência a sensibilização da emissão do íon európio(III) continua sem efetividade. Outra possibilidade é de ter havido a remoção das moléculas de solvente coordenadas ao metal, no entanto o complexo formado não é luminescente devido a uma supressão estática ou dinâmica.

No caso do complexo proposto $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})_2]^-$, a falta de seletividade com ânions pode ser atribuída ao fato do complexo já ter atingido sua maior estabilidade na proporção 1:2:1 (*MAC:FDC:Eu³⁺*), em um ambiente octacoordenado. A falta de qualquer modulação na emissão dominante do íon európio(III), que seria detectada pela transição hipersensível do complexo, sugere que não ocorre substituição dos ligantes do complexo $[\text{Eu}(\text{MAC})(\text{FDC})_2]^-$.

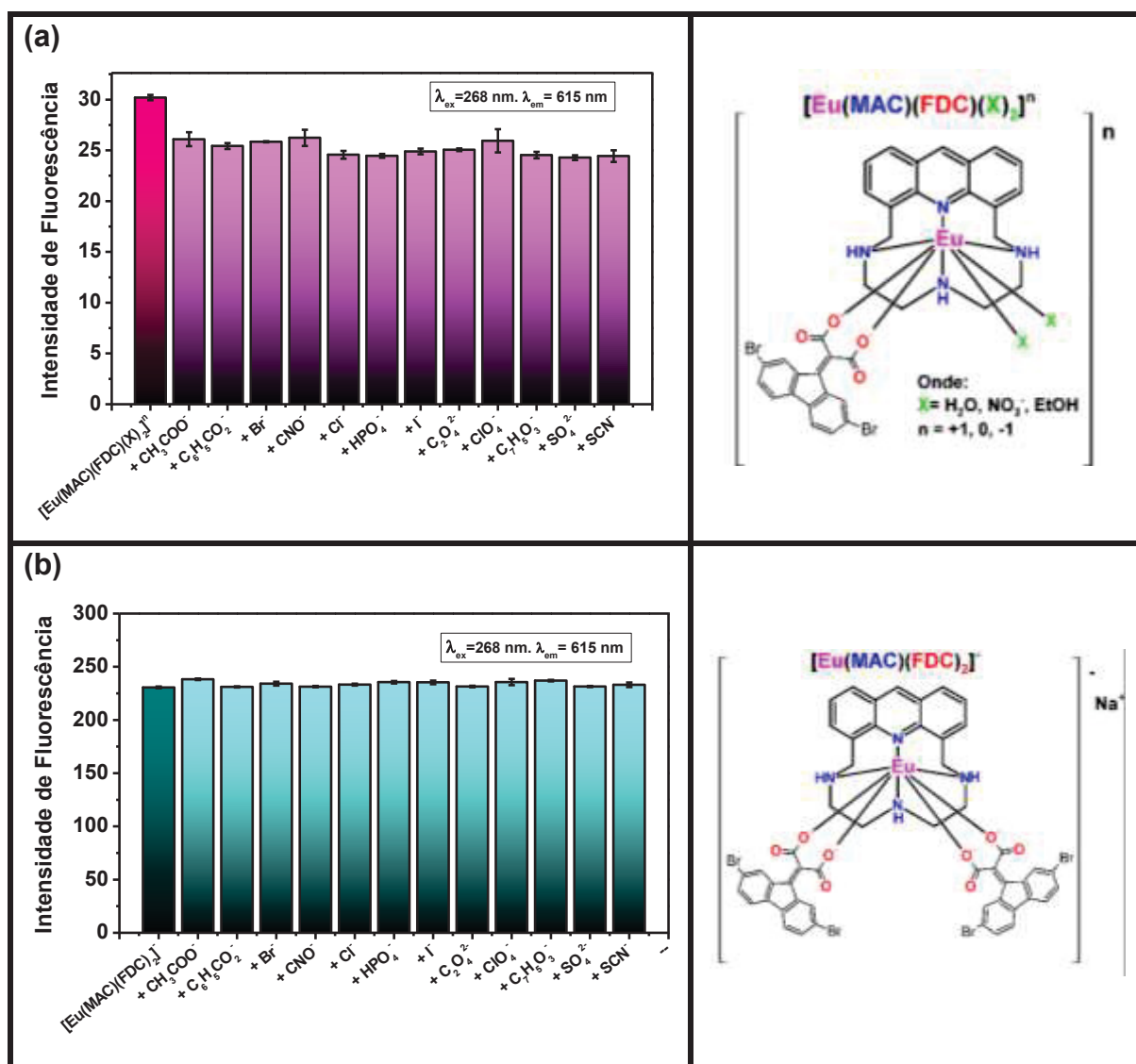


Figura 57. Teste de seletividade do complexo (a) $[Eu(MAC)(FDC)(X)_2]^n$ e (b) $[Eu(MAC)(FDC)_2]^-$ frente à diversos ânions, por ordem: acetato, benzoato, brometo, cianato, cloreto, hidrogenofosfato, iodeto, oxalato, perclorato, salicilato, sulfato e tiocianato. (condições: $\lambda_{ex} = 268 \text{ nm}$, slits 3 e 5 nm, $CHCl_3:EtOH$ (1:99 v/v), $c \text{ ânions} = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$)

9. Considerações Finais

Os ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC*, inéditos, e *DEFM*, foram sintetizados e caracterizados por análise elementar e técnicas como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, difratometria de raios X de monocristal (*DEFM*), espectroscopias de emissão e de absorção no ultravioleta visível, incluindo a investigação dos processos de absorção através de cálculos mecânico-quânticos. O teste de seletividade individual mostrou que o ligante *TAC* não se comporta como um quimiossensor para nenhum dos íons metálicos testados, em contrapartida, os ligantes *MAC* e *DAC* mostraram-se seletivos e específicos ao íon cádmio(II), com aumento de 8,46 e 7,95 vezes, respectivamente, na intensidade de fluorescência (*efeito CHEF*) em relação aos sensores livres, e o ligante *DEFM* mostrou-se seletivo ao íon ferro(III), com supressão de aproximadamente 99% da intensidade fluorescente (*efeito CHEQ*). Além disso, os sensores não apresentaram interferência significativa na presença de uma grande diversidade de íons para a determinação de cádmio(II) e ferro(III), conferindo um diferencial interessante quando comparado a sistemas similares.

Através de testes baseados em formalismos matemáticos, como Job e Benesi-Hildebrand, foi possível obter a estequiometria e constante de formação, respectivamente, do complexo formado em solução para o sistema de detecção de íons cádmio(II) com o ligante *MAC*, e de íons ferro(III) com o ligante *DEFM*. Assim, o complexo $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ formado em *in-situ*, apresentou proporção 1:1 (metal:ligante) e alta estabilidade, com $K_f = 1,05 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ ($\log K_f = 9,02$), e o complexo $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$ apresentou proporção 1:2 (metal:ligante) e $K_f = 1,5 \times 10^6 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$ ($\log K_f = 6,18$), o que pode justificar a especificidade dos sensores.

A reversibilidade do sensor *MAC* e do sensor *DEFM* foi confirmada em quatro ciclos de troca com o ligante EDTA, em ambos os casos, atestando capacidade de reuso sem perda de eficiência quântica dos mesmos. Cálculos mecânico-quânticos para os ligantes *MAC*, *DEFM* e seus complexos $[\text{Cd}(\text{MAC})]^{2+}$ e $[\text{FeCl}_2(\text{DEFM})_2]^+$ foram realizados, bem como, para o complexo $[\text{Hg}(\text{MAC})]^{2+}$ para fins comparativos. A construção dos diagramas de energia, com a composição dos orbitais de fronteira envolvidos nas transições nos processos de absorção puderam atestar, através da obtenção da energia livre, que o complexo com íons cádmio(II) com o ligante *MAC* e o complexo de ferro(III) no estado de spin sexteto com o ligante *DEFM* se mostram muito mais estáveis em relação ao possível complexo de íons mercúrio(II) com o

ligante *MAC*, ou no estado dubleto do íon ferro(III) com o ligante *DEFM*.

A obtenção de figuras de mérito para o sistema $[Cd(MAC)]^{2+}$ e $[FeCl_2(DEFM)_2]^+$ foi realizada e verificou-se excelente linearidade, com R^2 acima de 0,990 em ambos os casos; com análise da faixa linear pelos testes de *Grubbs*, *Fisher*, *Cochran* e *Durbin-Watson*, conferindo faixas estatisticamente aprovadas segundo os parâmetros adotados e recomendados pela *ANVISA* e *INMETRO*. Ainda segundo as agências regulamentadoras, pode-se concluir através de testes de *Dixon*, *Fisher*, *Grubbs*, *Horrat*, *Youden*, que o ligante *MAC* e o ligante *DEFM* são sensores sem interferentes em potencial (competição de íons), repetitíveis e reprodutíveis (ou seja, com elevada precisão), robustos (que também confere precisão ao método) e capazes de serem aplicados em matrizes complexas, como bebidas alcoólicas e extrato de fumaça de cigarro, com recuperação na faixa de 70-114% de íons cádmio(II), e em etanol combustível, com recuperação na faixa de 46-547% de íons ferro(III), portanto, com exatidão dos métodos analíticos estatisticamente aprovados dentro do nível de significância de 95% adotado.

Com a intenção de expandir o estudo com o ligante *MAC*, na atuação como quimiossensor de íons inorgânicos, foi efetuada a investigação de *MAC* com o ligante *FDC* e um metal do bloco f, no caso európio(III), em uma mistura *MAC:FDC:Eu³⁺*. Essa estratégia, de inserir um segundo ligante com *MAC*, foi usada para fornecer mais pontos de coordenação com o íon lantanóide e evitar ligações com moléculas de solvente, em especial de água ou etanol, uma vez que atuam como supressoras de emissão. O ligante *FDC*, inédito, foi sintetizado e caracterizado por análise elementar e técnicas como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, difratometria de raios X de monocristal, fluorimetria, espectroscopia de absorção no ultravioleta visível, incluindo a investigação dos processos de absorção através de cálculos mecânico-quânticos.

O sistema *MAC:FDC:Eu³⁺* foi estudado em diferentes proporções, mostrando que a formação de um possível complexo, proposto como $[Eu(MAC)(FDC)_2]^-$, a partir da razão 1:2:1 (*MAC:FDC:Eu³⁺*), foi capaz de sensibilizar a emissão do íon európio(III), através do efeito antena, com efetividade. Cálculos mecânico-quânticos atribuem ao ligante *FDC* a transferência de energia, pela estimativa do nível tripleto do ligante, sendo este superior em aproximadamente 4000 cm⁻¹ à energia do estado emissor do íon európio(III). Testes experimentais mostram que o ligante *MAC* atua como um ligante-estabilizador do efeito antena no complexo $[Eu(MAC)(FDC)_2]^-$, permitindo que

a transferência de energia ocorra de maneira mais eficiente e efetiva.

Sequencialmente, os complexos estudados $[Eu(MAC)(FDC)(X)_2]^n$ e $[Eu(MAC)(FDC)_2]$ foram testados frente a diversos ânions em solução, e não mostraram comportamento seletivo a nenhum dos íons, logo, sugerindo que não ocorre a substituição de moléculas do ligante ou de solvente por ânions, que possam modular a intensidade fluorescente de emissão do íon lantanóide, ou seja, os sistemas estudados não atuam como quimiossensores para complexos com íons Ln(III).

10. Referências

1. VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.
2. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de análise instrumental**. 8ª. ed. São Paulo: Thomson Brooks, 2007.
3. BROUWER, A. M. Standards for photoluminescence quantum. **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, p. 2213-2228, 2011.
4. CROSBY, G. A.; DEMAS, J. N. The measurement of photoluminescence quantum yields. A review. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 75, p. 971-1024, 1971.
5. MELHUISE, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 65, p. 229-235, 1961.
6. FERY-FORGUES, S.; LAVABRE, D. Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products. **Journal of Chemical Education**, v. 76, p. 1260-1264, 1999.
7. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2ª. ed. Cambridge: Cambridge University Press., 1999.
8. ATKINS, P. et al. **Shriver & Atkins: Inorganic chemistry**. 4ª. ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.
9. HARRIS, D. C.; BERTOLUCCI, M. D. **Symmetry and Spectroscopy- An introduction to vibrational and electronic spectroscopy**. New York: Dover Publications, 1989.
10. HUHEEY, J. E. et al. **Inorganic chemistry**. 4ª. ed. New York: Pearson, 1993.
11. SCHULMAN, S. G. **Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: physicochemical principles and practice**. Oxford: Pergamon Press, 1977.
12. SUBRAMANIAN, N.; OLIVEIRA, S. F. Algumas considerações sobre a regra de Hund e a estrutura eletrônica de átomos. **Química Nova**, v. 20, p. 313-318, 1997.
13. RENDELL, D. **Fluorescence and phosphorescence spectroscopy**. Londres: ACO, 1987.
14. WARDLE, B. **Principles and Applications of Photochemistry**. 3ª. ed.

Manchester: Wiley, 2009.

15. BERGONZI, R. et al. Molecular switches of fluorescence operating through metal centred redox couples. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 170, p. 31-46, 1998.
16. FABBRIZZI, L.; POGGI, A. Sensors and Switches from Supramolecular Chemistry. **Chemistry Society Reviews**, v. 24, p. 197-202, 1995.
17. LAVIS, L. D.; RAINES, R. T. Bright ideas for chemical biology. **ACV Chemical Biology**, v. 3, p. 142-155, 2008.
18. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6^a. ed. São Paulo: Thomson-Brooks/Cole, 2007.
19. NICKEL, B. Pioneers in photochemistry. From the Perrin diagram to the Jablonski diagram. **EPA - Newsletter**, v. 58, p. 9-38, 1996.
20. LAJUNEN, L. H. J.; PERAMAKI, P. **Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission**. 2^a. ed. London: The Royal Society of Chemistry, 2004.
21. LEHN, J.-M. **Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives**. Weinheim: VCH, 1995. 262 p.
22. PEDERSON, C. J.; LEHN, J.-M.; CRAM, D. J. Crowns and crypts: A fascinating group of multidentate macrocyclic ligands. **Indian Academy of Sciences**, v. 6, p. 71-79, 2001.
23. KOIDE, K.; SONG, F.; GARNER, A. L. A Highly Sensitive Fluorescent Sensor for Palladium Based on the Allylic Oxidative Insertion Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 12354–12355, 2007.
24. SEITZ, W. R.; ZHUJUN, Z. A fluorescent sensor for aluminum(III), magnesium(II), zinc(II) and cadmium(II) based on electrostatically immobilized quinolin-8-ol sulfonate. **Analytica Chimica Acta**, v. 171, p. 251-258, 1985.
25. COSTA, M. D. P.; SILVA, A. P.; PATHIRANA, S. T. Two dimensional fluorescent sensors: the different dependences of the fluorescence band position and the fluorescence quantum yield of 1,5-diphenyl-3-vinyl-4-pyrazoline upon solvent dipolarity and hydrogen bond acidity. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, p. 1416-1419, 1987.
26. GHASSEMLOOY, Z.; GRATTAN, K. T. V.; LYNCH, D. Probe design aspects of

- ruby decay-time fluorescent sensors. **Review of Scientific Instruments**, v. 60, p. 87-89, 1989.
27. ZHAO, M. et al. A rhodamine-based chromogenic and fluorescent chemosensor for copper ion in aqueous media. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 135, p. 625–631, 2009.
28. MEI, L. et al. A new fluorescent probe of rhodamine B derivative for the detection of copper ion. **Talanta**, v. 72, p. 1717–1722, 2007.
29. MU, H. et al. A novel colorimetric and fluorescent chemosensor: synthesis and selective detection for Cu(II) and Hg(II). **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 5525–5529, 2007.
30. AKSUNER, N. et al. Highly sensitive sensing of zinc(II) by development and characterization of a PVC-based fluorescent chemical sensor. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, p. 1133–1138, 2011.
31. ZHOU, Y. et al. A new Schiff base based on vanillin and naphthalimide as a fluorescent probe for Ag⁺ in aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 88, p. 56-59, 2012.
32. LI, F. et al. FRET-based sensor for imaging chromium(III) in living cells. **Chemical Communications**, v. 29, p. 3387-3389, 2008.
33. HUANG, K. et al. Multisignal Chemosensor for Cr(III) and Its Application in Bioimaging. **Organic Letters**, v. 10, p. 2557–2560, 2008.
34. BAI, R. et al. 2,6-Substituted pyridine derivative-containing conjugated polymers: synthesis, photoluminescence and ion-sensing properties. **Polymer Chemistry**, v. 2, p. 1699-1705, 2011.
35. JU, C.-C. et al. A fluorescent probe for both pH and Zn(II) based on 2-(1-phenyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)phenol. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, p. 1876–1880, 2011.
36. PARK, M. S. et al. A new acridine derivative as a fluorescent chemosensor for zinc ions in an 100% aqueous solution: a comparison of binding property with anthracene derivative. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 8129–8132, 2006.
37. ZHANG, G. et al. A fluorescence chemosensor based on imidazo [1,2-a]quinoline for Al(III) and Zn(II) in respective solutions. **RSC Advances**, v. 5, p. 100873-

- 100878, 2015.
38. TANG, L. et al. Single sensor for two metal ions: Colorimetric recognition of Cu(II) and fluorescent recognition of Hg(II). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, p. 1168–1172, 2011.
39. FABBRIZZI, L. et al. Fluorescent molecular sensing of amino acids bearing an aromatic residue. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 11, p. 2108-2113, 2001.
40. DI CASA, M. et al. A novel fluorescence redox switch based on the formal NIII/Nil couple. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 11, p. 1671-1675, 2001.
41. MENG, Q. et al. A reversible fluorescence chemosensor for sequentially quantitative monitoring copper and sulfide in living cells. **Talanta**, v. 143, p. 294-301, 2015.
42. SINGH, A. K. et al. A schiff base ligand of coumarin derivative as an ICT-based fluorescence chemosensor for Al (III). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 1109-1117, 2017.
43. SHEN, Y.-M. et al. A new turn-off fluorescence chemosensor for hydrogen peroxide based on carbazole derivative in aqueous solution. **Advanced Materials Research**, v. 1006, p. 821-825., 2014.
44. KURSUNLU, A. N.; SAHIN, E.; GULER, E. Cu (II) Chemosensor Based on a Fluorogenic Bodipy-Salophen Combination: Sensitivity and Selectivity Studies. **Journal of Fluorescence**, v. 26, p. 1997-2004, 2016.
45. CARLOS, F. S. et al. A novel fluorene-derivative Schiff-base fluorescent sensor for copper(II) in organic media. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 348, p. 41-46, 2017.
46. CARLOS, F. S. et al. Fluorenyl-Schiff-base ligands and their dicopper(II) complexes. Synthesis, structural and spectroscopic characterization and DNA binding assays. **Polyhedron**, v. 144, p. 18-29, 2018.
47. GRAEBE, C.; CARO, H. Acridin. **Chemische Berichte**, v. 3, p. 746-747, 1870.
48. ACHESON, R. M. **Acridines: The Chemistry of Heterocyclic Compounds**. 2^a. ed. New York, London, Sydney, Toronto: Interscience Publishers, v. 9, 1973. 878 p.

-
49. ALBERT, A. The Chemical and Biological Properties of Acridines. **Science Progress**, v. 37, p. 418-434, 1949.
 50. ALBERT, A. Relations between molecular structure and biological activity: stages in the evolution of current concepts. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 11, p. 13-36, 1971.
 51. ALBERT, A. The Chemical And Biological Properties Of Acridines. **Science Reviews**, v. 37, p. 418-434, 1949.
 52. ALBERT, A.; GOLDACRE, R.; RUBBO, S. D. Further Correlation of Physical and Biological Properties in an Acridine Series. **Nature**, v. 3736, p. 709, 1941.
 53. GRAEBE, C.; CARO, H. Ueber Acridin. **Chemische Berichte**, v. 13, p. 99-103, 1880.
 54. KOLLER, G.; STRANG, E. Über eine Synthese der Acridinsäure (Chinolin- 2, 3-dicarbonsäure). **Monatshefte für Chemie**, v. 50, p. 48-50, 1928.
 55. GRAEBE, C.; CARO, H. Ueber Acridin. **Justus Liebig's Annalen der Chemie**, v. 158, p. 265-281, 1871.
 56. RIEDEL, C. Zur Kenntniss der Carbonsauren des Chinoline und des Pyridins. **Chemische Berichte**, v. 16, p. 1609-1616, 1883.
 57. BERNTHSER, A.; BENDER, F. Ueber die Bildung von Nitrilbasen aus organischen Säuren und Aminen; Synthese der Acridine. **Chemische Berichte**, v. 16, p. 1802-1819, 1883.
 58. BERNTHSEN, A. Zur Kenntniss der Amidine und der Thiamide einbasischer organischer Säuren. **Justus Liebig's Annalen der Chemie**, v. 192, p. 1-60, 1878.
 59. GRAEBE, C.; LAGODZINSKI, K. Ueber Phenylantranilsäure und Acridon. **Chemische Berichte**, v. 25, p. 1733-1736, 1892.
 60. LI, S. et al. Stacking interactions and dna intercalation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 11166-11171, 2009.
 61. GRAEBE, C. Ueber Acridin. **Chemische Berichte**, v. 16, p. 2828-2832, 1883.
 62. LEHMSTEDT, K.; WIRTH, E. Über einige ms-Acridin-Derivate. **Chemische Berichte**, v. 61, p. 2044-2049, 1928.
 63. CORDIER, V. Überchlorsäure als mikrochemisches Reagens. **Monatshefte für**
-

- Chemie**, v. 43, p. 525-536, 1923.
64. HESS, W.; BERNTHSEN, A. Ueber Amidound Oxyderivate dee Phenyleoridine. **Chemische Berichte**, v. 18, p. 689-699, 1870.
65. SCHÖPFF, M. Ueber Acridonderivate. **Chemische Berichte**, v. 25, p. 1980-1984, 1892.
66. GRAEBE, C.; LAGODZINSKI, K. Ueber Acridon. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 276, p. 35-53, 1893.
67. VON RICHTER, V. **Organic chemistry or chemistry of the carbon compounds**. 3^a. ed. Londres: P. BLAKISTON'S SON & CO., 1900.
68. RICHTER, M. M. **Lexikon der Kohlenstoff-Verbindungen**. 1^a. ed. Hamburg: Verlag Von Leopold Voss, 1900.
69. BORSCHE, W. Über tricyclische Chinoline. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 377, p. 70-123, 1910.
70. STELZNER, R. **Literatur- Register der Organischen Chemie**. 1^a. ed. Berlin: Heidelberg GmbH, 1921.
71. PATTERSON, A. M. Proposed international rules for numbering organic ring systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 47, p. 543-561, 1925.
72. ACS, A. C. S. **Chemical Abstracts**. Ohio: Columbus, 1937.
73. LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 85^a. ed. New York: CRC Press LLC, 2005.
74. BOWEN, E. J.; HOLDER, N. J.; WOODGER, G. B. Hydrogen Bonding of Excited States. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 66, p. 2491-2492, 1962.
75. EATON, D. F. Reference materials for fluorescence measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 60, p. 1107-1114, 1988.
76. ALBERT, A.; WILLIS, J. B. Improved Syntheses of Acridines. Part V. The dechlorination of 5-Chloroacridines and a New Synthesis of Acridine. **Journal of the Society of Chemical**, v. 65, p. 26-28, 1946.
77. WOLFF, T. The solvent dependent fluorescence quantum yield of acridine as a probe for water in micelles and for the preferred location of acridine in micellar solutions. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 85, p. 145-148, 1981.

-
78. HERBSTEIN, F. H.; SCHMIDT, G. M. J. The Crystal and Molecular Structures of Heterocyclic Compounds. I. The Analysis of the Crystal Structure of alfa-Phenazine. **Acta Crystallographica**, v. 8, p. 399-405, 1955.
79. SCHUR, E. et al. Kitaigorodsky Revisited: Polymorphism and Mixed Crystals of Acridine/Phenazine. **Chemistry – A European Journal**, v. 20, p. 1-9, 2014.
80. GOSSELIN, R. E. et al. **Toxicologia Clínica de Produtos Comerciais**. 4^a edição. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1976.
81. ESCRITÓRIO INTERNACIONAL DO TRABALHO. **Enciclopédia de Saúde e Segurança Do Trabalho**. Nova Iorque: McGraw-Hill Book Co, v. Volumes I e II, 1971.
82. BOWEN, E. J.; SAHU, J. The Fluorescence of Acridine and Acridone Solutions. **Journal of the Chemical Society**, p. 3716-3718, 1958.
83. RUBIO-PONS, Ò.; SERRANO-ANDRÉS, L.; MERCHÁN, M. J. A Theoretical Insight into the Photophysics of Acridine. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, p. 9664-9673, 2001.
84. DIVERDI, L. A.; TOPP, M. R. Subnanosecond Time-Resolved Fluorescence of Acridine in Solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, p. 3447-3451, 1984.
85. DUPORTAIL, G.; MAUSS, Y.; CHAMBRON, J. Quantum Yields and Fluorescence Lifetimes of Acridine Derivatives Interacting with DNA. **BioPolymers**, v. 16, p. 1397-1413, 1977.
86. YANG, C.; LEE, T. S. Synthesis of polymeric fluorescent chemosensor for the recognition of Fe(III) ion. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 349, p. 283-286, 2000.
87. LEE, H. N. et al. Simple but Effective Way to Sense Pyrophosphate and Inorganic Phosphate by Fluorescence Changes. **Organic Letters**, v. 9, p. 243-246, 2007.
88. KIM, S. K. et al. A new imidazolium acridine derivative as fluorescent chemosensor for pyrophosphate and dihydrogen phosphate. **Tetrahedron Letters**, v. 64, p. 6402-6405, 2008.
89. THIAGARAJAN, V. et al. A Novel Colorimetric and Fluorescent Chemosensor for Anions Involving PET and ICT Pathways. **Organic Letters**, v. 7, p. 657-660, 2005.
-

-
90. JADHAV, J. R.; AHMAD, M. W.; KIM, H.-S. A New Acridine-Imidazolium-Based Cholestane Receptor for Anion Sensing. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, p. 2933-2937, 2011.
91. LI, L.-B.; JI, S.-J.; LIU, Y. A New Fluorescent Chemosensor for Cu(II) Based on 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-Decahydroacridine-1,8-dione Fluorophore. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 26, p. 979-982, 2008.
92. DAI, Q. et al. A One-step Synthesized Acridine-based Fluorescent Chemosensor for Selective Detection of Copper (II) Ions and Living Cell Imaging. **New Journal of Chemistry**, v. 1, p. 1-9, 2017.
93. VELU, R.; RAMAKRISHNAN, V. T.; RAMAMURTHY, P. Selective fluoride ion recognition by a thiourea based receptor linked acridinedione functionalized gold nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 217, p. 313-320, 2011.
94. WANG, Y. et al. A new acridine derivative as a highly selective 'off-on' fluorescence chemosensor for Cd²⁺ in aqueous media. **Sensor and Actuators B**, v. 156, p. 126-131, 2011.
95. SATHEESHKUMAR, R. et al. Synthesis of novel 1,10-phenanthroline derivatives and it used as probes for sensitive detection of Zn²⁺ and Cd²⁺ metal ions – Spectroscopic and theoretical approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 221, p. 117-128, 2019.
96. CHEMATE, S. et al. Acridine derivative as a "turn on" probe for selective detection of picric acid via PET deterrence. **RSC Advances**, v. 6, p. 84319–84325, 2016.
97. WANG., Y. et al. A new acridine derivative as a highly selective fluoroionophore for Cu²⁺ in 100% aqueous solution. **Journal of Luminescence**, v. 139, p. 16-21, 2013.
98. ZHOU, Y. et al. A simple-structured acridine derivative as a fluorescent enhancement chemosensor for the detection of Pd²⁺ in aqueous media. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 33-38, 2015.
99. ZHANG, D. et al. Acridine-based macrocyclic fluorescent sensors: self-assembly behavior characterized by crystal structures and tunable bathochromic-shift in emission induced by H₂PO₄⁻ via adjusting the ring size and rigidity. **Organic &**
-

- Biomolecular Chemistry**, v. 11, p. 3375-3380, 2013.
- 100 NUNES, M. C. et al. Turn-on fluorescence study of a highly selective acridine-based chemosensor for Zn^{2+} in aqueous solutions. **Inorganica Chimica Acta**, v. 499, p. 119191-119200, 2020.
- 101 NUNES, M. C. et al. A Facile Preparation of a New Water-Soluble Acridine Derivative and Application as a Turn-off Fluorescence Chemosensor for Selective Detection of Hg^{2+} . **Journal of Fluorescence**, v. 30, p. 235-247, 2020.
- 102 LEE, H. N. et al. New acridine derivatives bearing immobilized azacrown or azathiacrown ligand as fluorescent chemosensors for Hg^{2+} and Cd^{2+} . **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 1261-1265, 2008.
- 103 PUCCIONI, S. et al. Tuning the Emission Properties of Fluorescent Ligands by Changing pH: The Unusual Case of an Acridine-Containing Polyamine Macrocyclic. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 117, p. 3798-3808, 2013.
- 104 ARAGONIA, M. C. et al. Zn^{2+}/Cd^{2+} optical discrimination by fluorescent acridine-based bis-macrocyclic receptors. **Supramolecular Chemistry**, v. 1, p. 1-11, 2017.
- 105 CARLOS, F. S. et al. A highly selective acridine-based fluorescent probe for detection of $Al(III)$ in alcoholic beverage samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** **231 (2020) 118119**, v. 231, p. 118-124, 2020.
- 106 ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. **Purification of Laboratory Chemicals**. 4^a. ed. Oxford: Pergamon, 1997.
- 107 FRISCH, M. J. et al. **GAUSSIAN**, 2009.
- 108 ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Guia para tratamento estatístico da validação analítica**. [S.I.]. 2018.
- 109 ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos Documento de caráter orientativo**. Ministério da Saúde. Governo Federal. 2003.
- 110 INMETRO. **DOQ-CGCRE-008- orientação sobre validação de métodos. Documento de caráter orientativo**. Brasil. Versão nº 8. Atualizada em abril de 2020.

- 111 ZHANG, D. et al. A proof-of-concept fluorescent strategy for highly selective detection of Cr(VI) based on inner filter effect using a hydrophilic ionic chemosensor. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1669-1675, 2013.
- 112 HESS, F. K.; STEWART, P. B. Preparation of a New Immunosuppressant, 4,5-Bis(aminomethyl)acridine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 320-321, 1975.
- 113 LARONZE-COCHARD, M. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 4,5-bis(dialkylaminoalkyl)-substituted acridines as potent telomeric G-quadruplex ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3880-3888, 2009.
- 114 CAROLE, D. G. et al. Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5560-5568, 2005.
- 115 HIROYUKI, K.; TAMOTSU, Y. Syntheses of Some Medium Sized Cyclic Triamines and Their Cobalt(III) Complexes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 45, p. 481-484, 1972.
- 116 WILSON, J. M. et al. Synthesis, characterisation and anti-protozoal activity of carbamate-derived polyazamacrocycles. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 3651-3656, 2007.
- 117 CHERT, D. et al. The synthesis of binucleating polyaza macrocyclic and macrobicyclic ligands and the dioxygen affinities of their cobalt complexes. **Tetrahedron**, v. 51, p. 77-88, 1995.
- 118 BENCINI, A. et al. An Efficient Synthesis of Polyaza[n]paracyclophanes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 58, p. 4749-4753, 1993.
- 119 DELGADO, R.; COSTA, J. Metal Complexes of Macrocyclic Ligands Containing Pyridine. **Inorganic Chemistry**, v. 32, p. 5257-5265, 1993.
- 120 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- 121 NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 5ª. ed. New York: Wiley, 1997.
- 122 YAMAJI, T. et al. Spectral Database for Organic Compounds. Disponível em: <http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi>. Acesso em: 13 jun. 2018.

- 123 GOTTILIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **The Journal of the Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.
- 124 KOKKO, J. P.; GOLDSTEIN, J. H. The nuclear magnetic resonance spectra of acridine and some of its derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 19, p. 1119-1125, 1963.
- 125 PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4^a. ed. Washington: Cengage Learning, 2012.
- 126 RYAN, E. T.; XIANG, T. . J. K. P. . M. A. Absorption and Fluorescence Studies of Acridine in Subcritical and Supercritical Water. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 101, p. 1827-1835, 1997.
- 127 FÖRSTER, T. Fluoreszenzspektrum und Wasserstoffionen-konzentration. **Die Naturwissenschaften**, v. 36, p. 186-187, 1949.
- 128 SMITH, K. K. et al. Picosecond Proton Ejection: An Ultrafast pH Jump. **Chemical Physics Letters**, v. 64, p. 522-527, 1979.
- 129 FÖRSTER, T. Elektrolytische Dissoziation Angeregter Moleküle. **Z. Elektrochem**, v. 54, p. 42-46, 1950.
- 130 VENTURINI, J. J. **Estudo da fluorescência de ácidos hidróxi-naftóicos**. Universidade Federal de Santa Catarina. Monografia. Florianópolis. Santa Catarina. 2008.
- 131 GUERTA, A. C. **Propriedades fotoquímicas e fotofísicas de novos materiais derivados quinolinas e di naftalimidas**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP. 2007.
- 132 CARROL, F. A. **Perspectives on Structure and Mechanism in Organic Chemistry**. 2^a. ed. New Jersey: JOHN WILEY & SONS, 2010.
- 133 TAPPER, S. et al. 4,5-Bis(phthalimidomethyl)acridine. **Acta Crystallographica Section E**, v. 63, p. 719-720, 2007.
- 134 HIGASHI, T.; SAKAMOTO, M.; MOCHIZUKI, M. Synthesis of Acridine Analogues as Intercalating Crosslinkers and Evaluation of Their Potential Anticancer Properties. **Heterocycles**, v. 75, p. 1943-1952, 2008.
- 135 HESS, F.; CULLEN, E.; GROZINGER, K. A Facile Route for the Preparation of

- 4-aminomethylacridine and its Derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 28, p. 2591-2594, 1971.
- 136 LEVER, A. P. Fundamentals: Physical methods, theoretical analysis and cases studies. In: MCCLEVERTY, J. A.; MEYER, T. J. **Comprehensive Coordination Chemistry II**. [S.l.]: Elsevier, v. 2, 2003. p. 774.
- 137 CARLOS, F. S. et al. A novel macrocycle acridine-based fluorescent chemosensor for selective detection of Cd²⁺ in Brazilian sugarcane spirit and tobacco cigarette smoke extract. **Inorganica Chimica Acta**, v. 508, p. 119634, 2020.
- 138 VISSCHER, A. et al. Highly selective and sensitive fluorescence detection of Zn²⁺ and Cd²⁺ ions by using an acridine sensor. **Dalton Transactions**, v. 45, p. 5689-5699, 2016.
- 139 GOSWAMI, S.; AICH, K.; SEN, D. Acridine-based Switching on Fluorescence Sensor for Cd²⁺ Functioning in Absolute Aqueous Media. **Chemical Letters**, v. 41, p. 863-865, 2012.
- 140 LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão concisa**. 11^a edição. ed. Oxford: Blucher, 2015.
- 141 PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 22, p. 3533-3539, 1963.
- 142 LTDA., C. ChemAxon, 1998. Disponível em: <<https://chemaxon.com/products/marvin/download>>. Acesso em: 07 julho 2021.
- 143 CARLOS, F. S. **Química de coordenação de ligantes polidentados luminescentes. aplicação na identificação de íons metálicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 2017.
- 144 BENESI, H. A.; HILDEBRAND, J. A. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 2703-2704, 1949.
- 145 WANG, R.; YU, Z. Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method. **Acta Physico-Chimica Sinica**, v. 23, p. 1353-1359., 2007.
- 146 SOLOVYEVA, E. V. et al. X-ray, IR and Raman study of Ag(I), Cu(II) and Cd(II) complexes with 4,5-bis(N,N-di(2-hydroxyethyl)iminomethyl)acridine. **Polyhedron**, v. 106, p. 1-9, 2016.

- 147 ASILAN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern Physical Organic Chemistry**.
. Salzalito: University Science Books, 2006.
- 148 ROJAS-HERNA, A.; ROMERO-ROMO, M. Introduction to Validation of Analytical
. Methods: Potentiometric Determination of CO₂. **Journal of Chemical Education**, v. 94, p. 1303-1310, 2017.
- 149 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5ª edição. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2005.
- 150 HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. **Data analysis for chemistry - An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists**. Nova York: Oxford University, 2006.
- 151 ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J.; FARRANT, T. J. D. **Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide**. Cambridge: The Royal Society of Press, 2006.
- 152 RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.
. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- 153 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC MONOGRAPHS: EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS**. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Geneva: Lyon, v. 58, 1993.
- 154 KUBIER, A.; WILKIN, R. T.; PICHLER, T. Cadmium in soils and groundwater: A
. review. **Applied Geochemistry**, v. 108, 2018.
- 155 NAILA, A. et al. A review on global metal accumulators-mechanism,
. enhancement, commercial application, and research trend. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 26449-26471, 2019.
- 156 ALI, H.; KHAN, E. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-
. essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs-Concepts and implications for wildlife and human health. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 25, p. 1353-1376, 2019.
- 157 BRANCA, J. J. V.; MORUCCI, G.; PACINI, A. Cadmium-induced neurotoxicity:
. still much ado. **Neural Regeneration Research**, v. 13, p. 1879-1882, 2018.
- 158 NAWROT, T. S. et al. Cadmium exposure in the population: from health risks to
. strategies of prevention. **BioMetals**, v. 23, p. 769-782, 2010.

- 159 WANG, M. et al. A review on Cadmium Exposure in the Population and Intervention Strategies Against Cadmium Toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 106, p. 65-74, 2021.
- 160 PREFECTURE, T. The Itai-itai Disease museum, 2012. Disponível em: <<https://www.pref.toyama.jp/1291/kurashi/kenkou/iryou/1291/english/index.html>>. Acesso em: 07 julho 2021.
- 161 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Drinking-water Quality incorporating the 1st and 2nd addenda**. 3ª edição. ed. Geneva: WHO, 2008.
- 162 TSAKILAS, C. D. et al. Cadmium uptake by tobacco as affected by liming, N form, and year of cultivation. **Environmental Pollution**, v. 134, p. 239-246, 2005.
- 163 PIADE, J. J. et al. Differences in cadmium transfer from tobacco to cigarette smoke, compared to arsenic or lead. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 12-26, 2015.
- 164 KALCHER, K.; KERN, W.; PIESTCH, R. Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. **Science of the Total Environment**, v. 128, p. 21-35, 1993.
- 165 DUTTA, M.; DAS, D. Recent developments in fluorescent sensors for trace-level determination of toxic-metal ions. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 32, p. 113-132, 2012.
- 166 CARLOS, F. S. et al. Turn-off fluorene-based chemosensor switch to Fe³⁺: spectroscopic study, merit parameters, theoretical calculations, and its application in Brazilian ethanol fuel. **Inorganica Chimica Acta**, v. 256, p. 120511, 2021.
- 167 SHAHAMIRIFARD, S. A.; GHAEDI, M. Design and construction of a new optical solid-state mercury(II) sensor based on PVC membrane sensitized with colloidal carbon dots. **The Journal of Chemistry**, v. 41, p. 11533-11545, 2017.
- 168 AYDINA, D. et al. A simple and sensitive fluorescent sensor platform for Al³⁺ sensing in aqueous media and monitoring through combined PET and ESIPT mechanisms: Practical applications in drinking water and bio-imaging. **New Journal of Chemistry**, v. 1, p. 1-3, 2020.
- 169 TANG, Y. et al. A coumarin derivative as a “turn-on” fluorescence probe toward Cd²⁺ in live cells. **Spectrochimica Acta A**, v. 218, p. 359-365, 2019.
- 170 WAN, X. et al. Acid Environment-improved fluorescence sensing performance: A

- quinoline Schiff base-containing sensor for Cd²⁺ with high sensitivity and selectivity. **Talanta**, v. 199, p. 8-13, 2019.
- 171 WANG, P.; CHEN, K.; GE, Y. Peptide-based ratiometric fluorescent probe for highly selective detection of Cd (II) and its application in bioimaging. **Journal of Luminescence**, v. 208, p. 495-501, 2019.
- 172 LU, Z. N. et al. A selective fluorescent chemosensor for Cd²⁺ based on 8-hydroxyquinoline-benzothiazole conjugate and imaging application. **Spectrochimica Acta A**, v. 213, p. 57-63, 2019.
- 173 QIU, S. et al. A bifunctional sensor based on diarylethene for the colorimetric recognition of Cu²⁺ and fluorescence detection of Cd²⁺. **RSC Advances**, v. 9, p. 29141-29148, 2019.
- 174 MAITY, A. et al. A water-soluble BODIPY based 'OFF/ON' fluorescent probe for the detection of Cd²⁺ ions with high selectivity and sensitivity. **Dalton Transation**, v. 48, p. 2108-2117, 2019.
- 175 BERTHELOT, M. **Annales de chimie**, v. 142, p. 252, 1867.
- 176 VERKADE, P. E. **A History of the Nomenclature of Organic Chemistry**. [S.l.]: Springer Netherlands, 1985.
- 177 WITT, O. N. OBITUARY NOTICES: Rudolph Fitt. **Journal Chemical Society**, v. 99, p. 1646-1668, 1911.
- 178 AKCELRUD, L. C. Electroluminescent polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 875-962, 2003.
- 179 BELFIELD, K. et al. Fluorene-Based Metal-Ion Sensing Probe with High Sensitivity to Zn²⁺ and Efficient Two-Photon Absorption. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 9313-9321, 2010.
- 180 CAO, J.; LI, Y.; FENG, J. 9-Benzylidene-9H-fluorene Derivatives Linked to Monoaza-15-crown-5: Synthesis and Metal Ion Sensing. **Chinese Journal of Chemical Physics**, v. 30, p. 1571-1574, 2012.
- 181 CAO, X. et al. Surfaces wettability and morphology modulation in a fluorene derivative self-assembly system. **Applied Surface Science**, v. 368, p. 97-103, 2016.

- 182 HENS, A.; RAJAK, K. K. Selective fluorometric detection of F-1 and Zn(II) ions by a N, O coordinating sensor and naked eye detection of Cu(II) ions in mixed-aqueous solution. **RSC Advances**, v. 5, p. 44764–44777, 2015.
- 183 LI, L. et al. Lanthanide metal–organic frameworks assembled from a fluorene-based ligand: selective sensing of Pb²⁺ and Fe³⁺ ions. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 4, p. 1900-1905, 2016.
- 184 LI, Q. et al. A highly sensitive and selective fluorescent probe without quencher for detection of Pb²⁺ ions based on aggregation-caused quenching phenomenon. **RSC Advances**, v. 8, p. 38929–38934, 2018.
- 185 PABLOS, J. L. et al. Solid polymer and metallogel networks based on a fluorene derivative as fluorescent and colourimetric chemosensors for Hg(II). **Reactive & Functional Polymers**, v. 79, p. 14–23, 2014.
- 186 KURHUZENKAU, S. A. et al. Ultrafast spectroscopy, superluminescence and theoretical modeling for a two-photon absorbing fluorene derivative. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, p. 1239-1246, 2016.
- 187 BAUMGÄRTNER, K.; ROMINGER, F.; MASTALERZ, M. An Oxidative Macrobicyclic Ring Opening of a Triptycene to a Highly Functionalized Fluorene Derivative. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, p. 8881-8886, 2015.
- 188 RODRIGUES, P. C. et al. Synthesis of a PPV-fluorene derivative: Applications in luminescent devices. **Journal Applied Polymers Science**, p. 42579-42586, 2015.
- 189 SHANMUGASUNDARAM, K. et al. Synthesis and photophysical characterization of an ionic fluorene derivative for blue light-emitting electrochemical cells. **Organic Electronics**, v. 24, p. 297–302, 2015.
- 190 BEUKELEER, S. et al. Transition metal complexes with neutral and deprotonated malomide. **Transition Metal Chemistry**, v. 19, p. 468-476, 1994.
- 191 RODRIGUES-MARTIN, Y. et al. Combining Coordination Chemistry and Hydrogen Bonds: Synthesis, Crystal Structures and Thermal Behavior of the Complexes Aqua(2,2'-Bipyridine- N , N ')-(Malonamide- O , O ')-M(II) Dinitrate (M = Cu, Ni). **Journal of Coordination Chemistry**, v. 56, p. 181-191, 2003.
- 192 LUO, Q.-H. et al. A new dioxotetraamine ligand appended with fluorenyl and its copper(II) complex. Synthesis, crystal structure and solution behavior.

- Inorganica Chimica Acta**, v. 295, p. 48-55, 1999.
- 193 LUO, Q.-H. et al. New Fluorenyl-Substituted Dioxotetraamine Ligands and Their Copper(II) Complexes 2 Crystal Structure and Fluorescent Sensing Properties in Aqueous Solution. **European Journal of the Inorganic Chemistry**, v. 3, p. 664-670, 2002.
- 194 LUO, Q.-H. et al. A study on the reaction of copper complex of dioxotetraamine with superoxide ion by spectrophotometry and pulse radiolysis. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, p. 66-74, 2004.
- 195 LUO, Q.-H. et al. A dioxotetraamine fluorenyl ligand and its nickel(II) complex — crystal structure and fluorescent sensing properties in aqueous solution. **Polyhedron**, v. 20, p. 2807–2812, 2001.
- 196 BADIEI, A.; YADAVI, M.; KARIMI, M. A novel diethyl 2-(9-Fluorenyl) malonate functionized SBA-15 for selective optical sensing of iron. **Journal of Nanostructure**, v. 9, p. 146-153, 2019.
- 197 QIN-HUI LUO, Y.-N. W. Synthesis and Solution Behavior Studies of a Bifunctional Fluorenyl Dioxotetraamine and Its Copper(II) Complex. **Journal of Inorganic and General Chemistry**, v. 643, p. 1240–1244, 2017.
- 198 COTTON, S. **Chemistry Lanthanide and Actinide**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2006.
- 199 GUNNLAUGSSON, T. et al. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Lanthanides. **Topics in Current Chemistry**, v. 281, p. 1-43, 2007.
- 200 WYBONE, B. G. **Spectroscopic properties of rare-earth**. New York : Wiley , 1965.
- 201 BINNEMANS, K. Interpretation of europium(III) spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 295, p. 1-45, 2015.
- 202 VAN-VLECK, J. H. The puzzle of rare-earth spectra in solids. **The journal physical chemistry**, v. 41, p. 67-80, 1937.
- 203 GUNNLAUGSSON, T.; LEONARD, J. P. Responsive lanthanide luminescent cyclen complexes: from switching/sensing to supramolecular architectures. **Chemical Communications**, p. 3114-3131, 2005.
- 204 WEISSMAN, S. I. Intramolecular energy transfer the fluorescence of complexes

- . of europium. **Journal of Chemical Physics**, v. 10, p. 214, 1942.
- 205 SEVCHENKO, A. N.; TROFIMOV, A. K. Issledovanie fotolyuminesentsii
. bezoilatsetonarov evropiya i samariya. **Journal of experimental and theoretical physics**, v. 21, p. 220, 1951.
- 206 CROSBY, G.; KASHA, A. M. Intramolecular energy transfer in ytterbium organic
. chelates. **Spectrochimica Acta**, v. 10, p. 377-382, 1958.
- 207 SATO, S.; WADA, M. Relations between Intramolecular Energy Transfer
. Efficiencies and Triplet State Energies in Rare Earth β -diketone Chelates.
Bulletin of the Chemical Society of Japan, v. 43, p. 1955-1962, 1970.
- 208 SUSUMU, S.; MASANOBU, W. Relations between Intramolecular Energy
. Transfer Efficiencies and Triplet State Energies in Rare Earth β -diketone
Chelates. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 43, p. 1955-1962,
1970.
- 209 KLEINERMAN, M. Energy Migration in Lanthanide Chelates. **The Journal of**
. **Chemical Physics**, v. 51, p. 2409, 1969.
- 210 ZHENG, Y. et al. Red electroluminescent device with europium 1,1,1-
. trifluoroacetylacetonate complex as emissive center. **Materials Letters**, v. 53, p.
52-56, 2002.
- 211 SOUZA, A. P. T. **Uma investigação teórica e experimental das propriedades**
. **luminescentes de novos complexos de lantanídeos com b-cetoésteres**.
Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE.
2005.
- 212 DUTT, N. K.; SUR, S.; RAHUT, S. Spectral studies of rare earth chelates with b-
. diketone and b- ketoesters. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v.
33, p. 1717-1724, 1971.
- 213 DUTT, N. K.; RAHUT, S. Rare earth complexes of ethylacetoacetate. **Journal of**
. **Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 32, p. 2905-2909, 1970.
- 214 BHAUMIK, M. L. et al. Laser emission from a europium benzoylacetonate alcohol
. solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, p. 1490-1493, 1964.
- 215 BJORKLUND, S. et al. Internal stark splitting in tetraethylammonium tetrakis
. (dibenzoylmethido) europate(iii). **The Journal of Physical Chemistry**, v. 72, p.
970-978, 1968.

- 216 HORROCKS, W. D.; SUNDICK, D. R. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, p. 384-390, 1981.
- 217 SUPKOWSKI, R. M.; HORROCKS, W. D. On the determination of the number of water molecules, q , coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 340, p. 44-48, 2002.
- 218 GUNNLAGSSON, T.; STOMEIO, F. Recent advances in the formation of luminescent lanthanide architectures and self-assemblies from structurally defined ligands. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 1999-2009, 2007.
- 219 GUNNLAGSSON, T. et al. Mixed d-f³ Coordination Complexes Possessing Improved Near-Infrared (NIR) Lanthanide Luminescent Properties in Aqueous Solution. **Inorganic Chemistry**, v. 49, p. 8449-8456, 2010.
- 220 GUNNLAUGSSON, T. et al. The Formation of Luminescent Supramolecular Ternary Complexes in Water: Delayed Luminescence Sensing of Aromatic Carboxylates Using Coordinated Unsaturated Cationic Heptadentate Lanthanide Ion Complexes. **Supramolecular Chemistry**, v. 15, p. 505-519, 2003.
- 221 SÉNÉCHAL-DAVID, K. et al. Sensitized Near-Infrared Lanthanide Luminescence from Nd(III)- and Yb(III)-Based Cyclen-Ruthenium Coordination Conjugates. **Inorganic Chemistry**, v. 45, p. 10040-10042, 2006.
- 222 LEHNERT, W. Umsetzungen von ketonen und α -halogenketonen mit malonester. **Tetrahedron**, v. 29, p. 635-638, 1973.
- 223 HÖRNER, M. et al. Polymorphism in a 18-Membered Macrocyclic: An Energetic and Topological Approach to Understand the Supramolecular Structure. **CrystEngComm**, v. 18, p. 3866-3876, 2016.
- 224 TAKEUCHI, R. M. et al. Copper determination in ethanol fuel by differential pulse anodic stripping voltammetry at a solid paraffin-based carbon paste electrode modified with 2-aminothiazole organofunctionalized silica. **Talanta**, v. 71, p. 771-777, 2007.
- 225 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP). **Especificações do etanol anidro combustível (EAC) e do etanol hidratado combustível (EHC)**. Brasil. 2015.
- 226 SANTOS, A. L. et al. Electrochemical Determination of Inorganic Contaminants in Automotive Fuels. **Electroanalysis**, v. 24, p. 1681-1691, 2012.

- 227 PEREIRA, R. C. C.; PASA, V. M. D. Effect of Alcohol and Copper Content on the Stability of Automotive Gasoline. **Energy and Fuels**, v. 19, p. 426-432, 2005.
- 228 YI, C. et al. Fluorescent sensor of fluorene derivatives having phosphonic acid as a fluorogenic ionophore: synthesis and static quenched properties for Fe(III). **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 5119–5123, 2014.
- 229 LI, P. et al. A simple, selective, fluorescent iron(III) sensing material based on peripheral carbazole. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 332–336, 2014.
- 230 ALAM, R. et al. A rhodamine based fluorescent trivalent sensor (Fe³⁺, Al³⁺, Cr³⁺) with potential applications for live cell imaging and combinational logic circuits and memory devices. **New Journal of Chemistry**, v. 41, p. 8359--8369, 2017.
- 231 MU, Z. et al. A ratiometric fluorescence and light scattering sensing platformbased on Cu-doped carbon dots for tryptophan and Fe(III). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 248–256, 2019.
- 232 SAFARIFARD, V.; FARAHANI, Y. D. Highly selective detection of Fe³⁺, Cd²⁺ and CH₂Cl₂ based on a fluorescent Zn-MOF with azine-decorated pores. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 275, p. 131–140, 2019.
- 233 KNOEVENAGEL, E. Condensation von Malonsäure mit aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.**, v. 31, p. 2596–2619., 1898.
- 234 LI, J. et al. Synthesis of New C2- Symmetric Fluoren-9-ylidene Malonate Derived Bis(oxazoline) Ligands and Their Application in Friedel-Crafts Reactions. **Molecules**, v. 15, p. 8582-8592, 2010.
- 235 UTLEY, J. H. P. et al. Kinetic basicities of some electrogenerated organic dianions and the competition between protonation and reproportionation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 250, p. 373-384, 1988.
- 236 UTLEY, J. H. P.; LING-CHUG, S. K. The cathodic hydrogenation of azafluoren-9-ylidine probases. **Electrochimica Acta A**, v. 42, p. 2109-2115, 1997.
- 237 CAO, Y. et al. Determination of Thermodynamic Affinities of Various Polar Olefins as Hydride, Hydrogen Atom, and Electron Acceptors in Acetonitrile. **The Journal**

- of **Organic Chemistry**, v. 78, p. 7154–7168, 2013.
- 238 JUDD, B. R. Optical Absorption Intensities of Rare-Earth Ions. **Physical Review**, v. 127, p. 750-761, 1964.
- 239 OFELT, G. S. Intensities of Crystal Spectra of Rare-Earth Ions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 37, p. 511-520, 1962.
- 240 CHEN, B. J.; PUNB, E. Y. B.; LINA, H. Photoluminescence and spectral parameters of Eu³⁺ in sodium–aluminum–tellurite ceramics. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 479, p. 352-356, 2009.
- 241 WONG, P. S. et al. Structural and luminescence studies of europium ions in lithium aluminium borophosphate glasses. **Journal of rare earths**, v. 32, p. 585-592, 2014.
- 242 GASPAROTTOA, G. et al. Structural and spectroscopic properties of Eu³⁺ doped Y₄Al₂O₉ compounds through a soft chemical process. **Journal of Luminescence**, v. 204, p. 513-519, 2018.
- 243 SEBAI, S. et al. Synthesis and photoluminescence of Eu³⁺ activated alkali mixed (Li, Na)Y(PO₃)₄ under VUV-UV excitation. **Optical Materials**, v. 92, p. 217-222, 2019.
- 244 SZPIKOWSKA-SROKA, B. et al. Influence of silicate sol-gel host matrices and catalyst agents on luminescence properties of Eu³⁺/Gd³⁺ under different excitation wavelengths. **RSC Advances**, v. 2, p. 1-10, 2013.
- 245 DILLIP, G. R. et al. A potential red emitting K₄Ca(PO₄)₂: Eu³⁺ phosphor for white light emitting diodes. **Journal of Luminescence**, v. 132, p. 3072–3076, 2012.
- 246 ROSA, I. L. V. et al. SiO₂–GeO₂ Soot Preform as a Core for Eu₂O₃ Nanocoating: Synthesis and Photophysical Study. **Journal of Fluorescence**, v. 18, p. 541-545, 2008.
- 247 GÖFLLER-WALRAND, C.; BINNEMANS, K. **Rationalization of crystal-field parametrization**. Leuven: Elsevier, 1996.
- 248 MALTA, O. L.; BATISTA, H. J.; CARLOS, L. D. Overlap polarizability of a chemical bond: a scale of covalency and application to lanthanide compounds. **Chemical Physics**, v. 282, p. 21, 2002.
- 249 SEYBOLD, P. G. External Heavy-Atom Effect on Room-Temperature

-
- . Luminescence of Adsorbed Dyes. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 81, p. 2035-2040, 1977.
- 250 SILVA, A. P.; SANDANAYAKE, K. R. A. S. Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors for alkali cations: optimization of sensor action by variation of structure and solvent. **Tetrahedron Letters**, v. 32, p. 421-424, 1991.
- 251 CROSSWHITE, H. M.; CROSSWHITE, H. Parametric model for f-shell configurations. I. The effective-operator Hamiltonian. **Journal of the Optical Society of America B**, v. 1, p. 246-254, 1984.
- 252 REID, M. F. **Electronic Structure and Transition Intensities in Rare-Earth Materials**. (<http://www2.phys.canterbury.ac.nz/~mfr24/electronicstructure/00electronic.pdf>). [S.I.]. 2013.

ANEXO 1 – PUBLICAÇÕES COM AUTORIA PRINCIPAL E COLABORAÇÕES

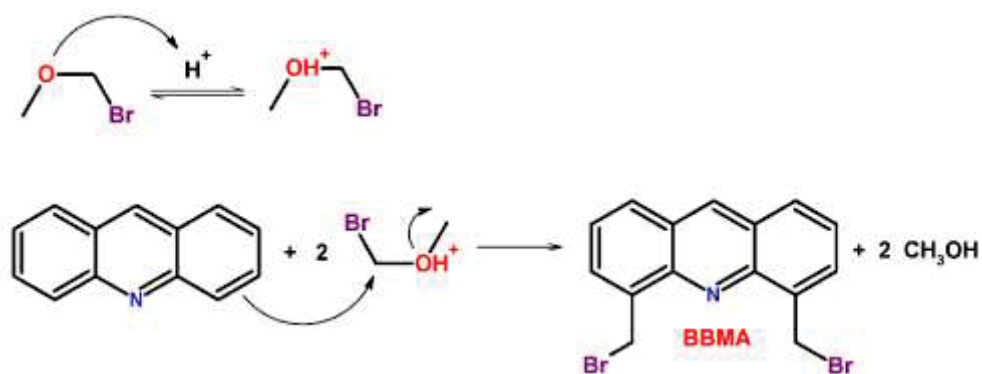
ANO	STATUS	TÍTULO
2020	Ref. [100]	Turn-on fluorescence study of a highly selective acridine-based chemosensor for Zn^{2+} in aqueous solutions.
2020	Ref. [101]	A Facile Preparation of a New Water-Soluble Acridine Derivative and Application as a Turn-off Fluorescence Chemosensor for Selective Detection of Hg^{2+}
2020	Ref. [105]	A highly selective acridine-based fluorescent probe for quantitative detection of Al^{3+} in beverages and in living cells.
2020	Ref. [137]	A novel macrocycle acridine-based fluorescent chemosensor for selective detection of Cd^{2+} in Brazilian sugarcane spirit and tobacco cigarette smoke extract
2021	Ref. [166]	Turn-off fluorene-based chemosensor switch to iron(III): spectroscopic study, merit parameters, theoretical calculations, and its application in Brazilian ethanol fuel

ANEXO 2 – MECANISMOS DE REAÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS PRECURSORES E LIGANTES

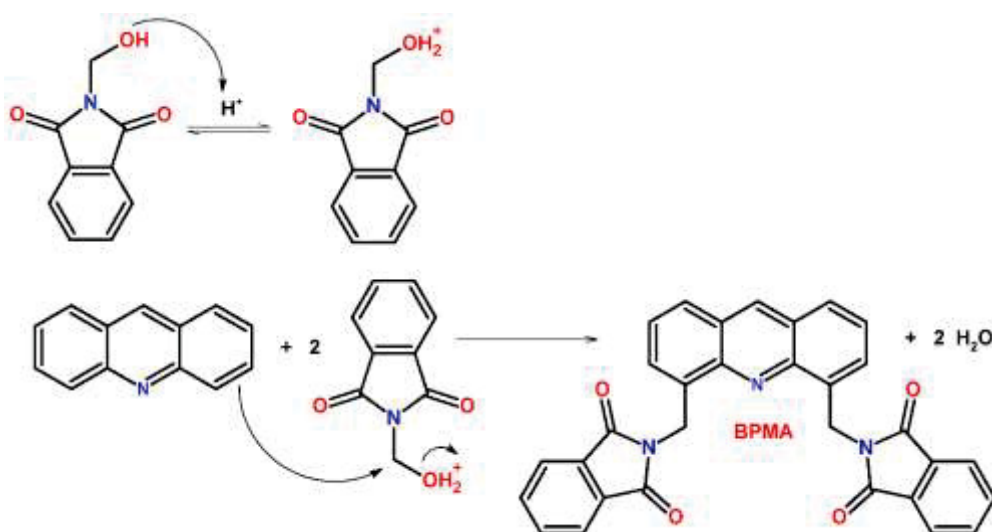
CAPÍTULO 1

A síntese para obtenção de 4,5-bisbromometilacridina (*BBMA*) foi realizada conforme o método descrito por Zhang e colaboradores [111], e para obtenção de 4,5-bisftalimidametilacridina (*BPMA*) a síntese foi baseada no trabalho de Hess e Stewart [112]. Os **Esquema 15 e 16** ilustram os mecanismos de reação de substituição nucleofílica propostos para *BBMA* e *BPMA*, respectivamente, no qual os reagentes bromometilmetileter (*BMME*) e N-hidroximetilftalimida (*HMP*) são protonados, pelo meio de reação ácido. A acridina, que possui maior densidade eletrônica nas posições 4 e 5, como discutido na introdução do capítulo 1 deste trabalho, doa elétrons para o carbono deficiente para formar os compostos *BBMA* e *BPMA*, respectivamente. A síntese para obtenção de 4,5-bisaminometilacridina diidrocloreto (*BAMA*) foi realizada com base no método utilizado por Laronze-Cochard e colaboradores [113]. O **Esquema 17** ilustra o mecanismo de reação proposto, no qual ocorre a quebra das ligações amídicas pela hidrazina, para a formação do composto *BAMA* e ftalidrazida.

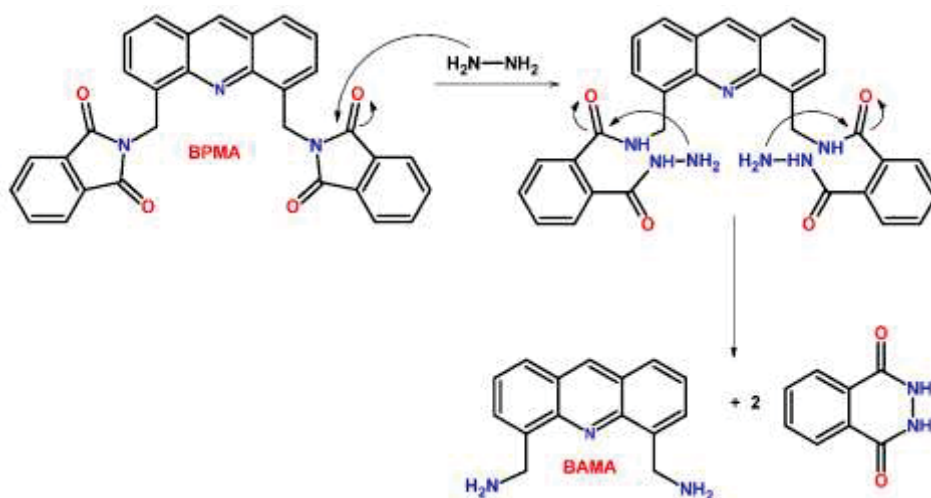
Os ligantes *MAC*, *DAC* e *TAC* foram preparados com base nos métodos descritos por Puccioni [103], Park [36], Carole [114] e colaboradores. O **Esquema 18** mostra o mecanismo de reação de substituição nucleofílica proposto para o ligante *MAC*, sendo mecanismos semelhantes para os demais ligantes. O carbono metilênico ligado ao bromo no composto *BBMA* está mais deficiente de elétron devido à ligação com o haleto, que é mais eletronegativo e onde se concentra a densidade eletrônica. Desta forma, os átomos de nitrogênio terminais do reagente dietilenotriamina (*deta*) doam o par de elétrons para esse carbono, removendo o bromo que é um bom grupo abandonador e formando *KBr* (devido a presença de K_2CO_3 no meio reacional), sequencialmente, o íon carbonato, que atua como base, desprotona as aminas, formando assim o ligante *MAC* e ácido carbônico.



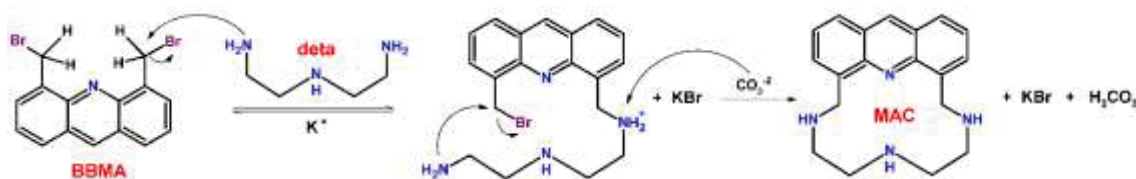
Esquema 15. Mecanismo de reação para obtenção de *BBMA*.



Esquema 16. Mecanismo de reação para obtenção de *BPMA*.



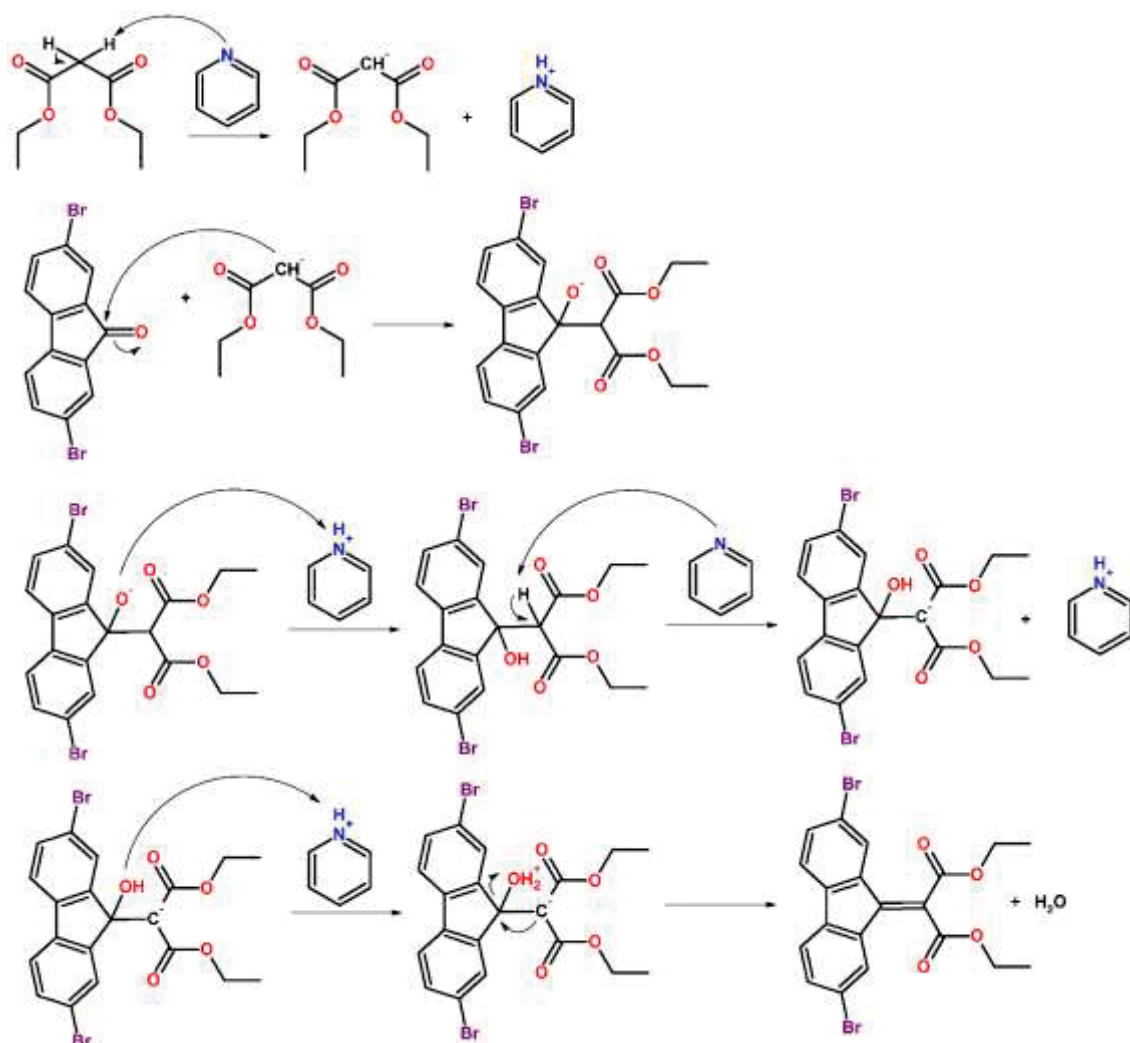
Esquema 17. Mecanismo de reação para obtenção de *BAMA*.



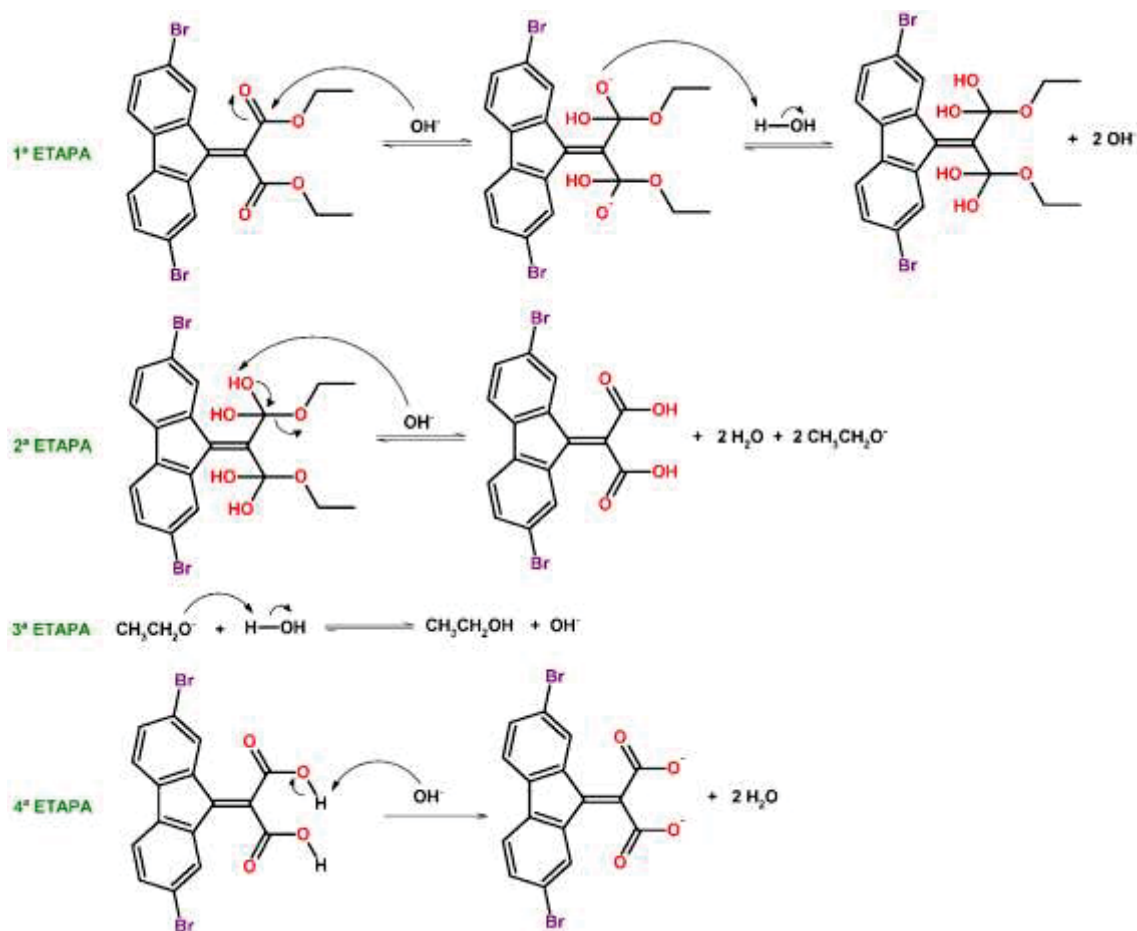
Esquema 18. Mecanismo de reação para obtenção de MAC.

CAPÍTULO 2

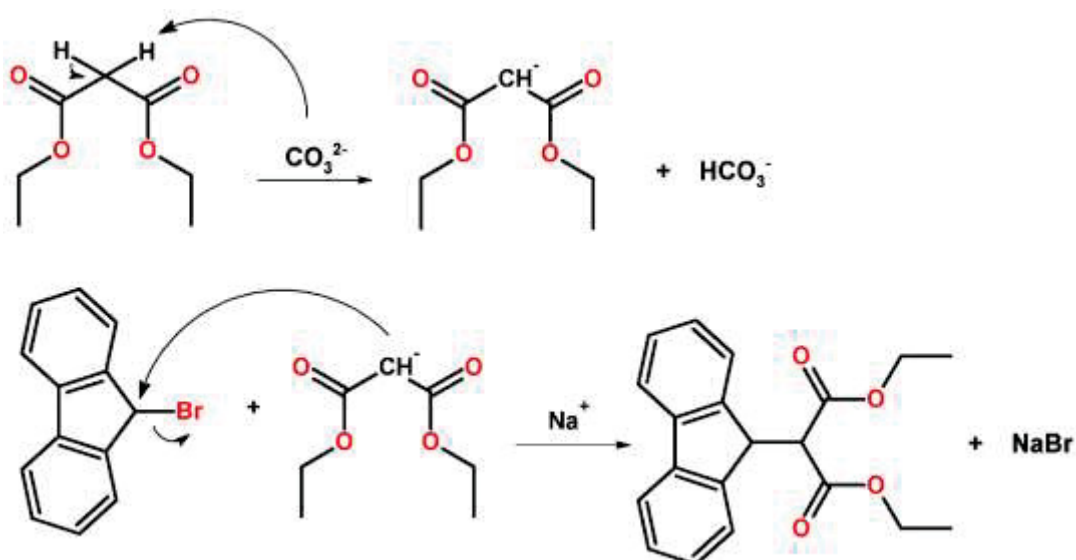
A síntese de dietil-2-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno)malonato, nomeado como fluoreno diéster (abreviado como *FDE*) é conhecida como “*condensação de Knoevenagel*” e foi realizada baseada no trabalho de W. Lehnert [222] com cetonas e malonatos. O diferencial desse tipo de reação frente às reações cetônicas clássicas é a elevada acidez dos compostos metilênicos ativos (moléculas portadoras de hidrogênios ácidos). O **Esquema 19** mostra que a piridina, que é uma base moderada e atua como catalisador, desprotona o carbono α do dietilmalonato ($pK_a < 11$), gerando um carbânion e o íon piridínio. O carbânion por sua vez, ataca a carbonila da 2,7-dibromo-9-fluorenona gerando um intermediário tetraédrico. O íon piridínio transfere um próton ao intermediário aniônico, e a piridina mais uma vez desprotona o carbono α malônico, liberando íon piridínio e o novo intermediário interage com piridínio para liberar água (condensação) e se rearranjar para formar o composto *FDE* (aduto de Knoevenagel). Nesta reação o cloreto de titânio(IV) pode atuar como ácido de Lewis. A síntese de 2,7-dibromo-9H-fluoren-9-ilideno, nomeado como fluoreno dicarboxilato (abreviado como *FDC*) corresponde a uma hidrólise de éster em solução básica. Como mostra o **Esquema 20**, inicialmente tem-se a adição nucleofílica do íon hidróxido ao grupo carbonila e posterior transferência de um próton para a forma aniônica do intermediário tetraédrico. Na 2ª etapa tem-se a dissociação do intermediário, com a formação do respectivo ácido carboxílico e íon alcóxido. As etapas seguintes correspondem à transferência de próton para a formação do etanol e o composto *FDC* (íon carboxilato). A síntese de dietil 2-(9-fluorenil) malonato, abreviado como *DEFM*, foi realizada de acordo com o método descrito por Qin-Hui Luo e colaboradores [192]. O **Esquema 21** mostra que o precursor dietil malonato é desprotonado pelo íon carbonato em solução, e o carbânion formado ataca o carbono 9 do fluoreno, ligado ao haleto, formando o ligante *DEFM* e o sal *NaBr*.



Esquema 19. Mecanismo de reação para obtenção de *FDE*.

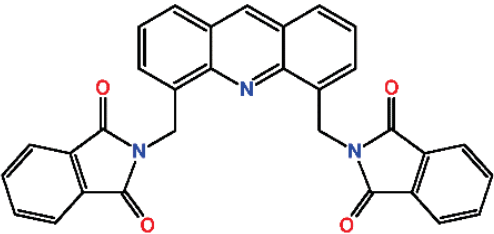


Esquema 20. Mecanismo de reação para obtenção de *FDC*.



Esquema 21. Mecanismo de reação para obtenção de *DEFM*.

ANEXO 3 – PRINCIPAIS RESULTADOS DO SENSOR BPMA

DADOS	BPMA
COMPOSIÇÃO	
REFERÊNCIAS	[105]
DERIVADO DE	ACRIDINA
SELETIVIDADE	Al(III)
EFEITO	CHEF
MEIO	ETANOL
INTERFERENTES	NENHUM
LOD	1,130 $\mu\text{mol L}^{-1}$
LOQ	3,768 $\mu\text{mol L}^{-1}$
ESTEQUIOMETRIA (METAL:LIGANTE)	1:1
CONSTANTE DE FORMAÇÃO (K_f)	$6,30 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$
CONSTRUÇÃO DE DIAGRAMA DE ORBITAIS MOLECULARES POR DFT	SIM
REPETITÍVEL	SIM
REPRODUTÍVEL	SIM
REVERSÍVEL	SIM
ROBUSTO	SIM
APLICÁVEL EM	CACHAÇA/SAQUÊ

ANEXO 4 – ESTUDO DO SENSOR MAC COM ÂNIONS

Uma vez que todas as medidas de detecção, com os ligantes investigados no capítulo 1, foram feitas em meio orgânico, *CHCl₃:EtOH (1:99 v/v)*, resolveu-se estudar o comportamento fluorescente em água ultrapura. É importante destacar que os sensores não são solúveis em água, mas a solubilidade aumenta com a mudança do pH do meio. O objetivo foi acidificar o ambiente para melhorar a solubilidade dos compostos, de modo a possibilitar o estudo da detecção com diferentes ânions, uma vez que o ligante estaria protonado (carga positiva) em meio ácido. Para isso escolheu-se o sensor *MAC*, que apresentou maior eficiência fluorescente dos sistemas estudados. Para o cálculo do pK_a do ligante *MAC*, baseando-se na **Equação 15** [94,250] descrita abaixo, com as intensidades fluorescentes em diferentes valores de pH, foi possível encontrar um valor de pK_a= 1,9 ± 0,2, que é coerente com a faixa de pH no qual o ligante está majoritariamente protonado.

$$\text{pH} - \text{pK}_a = \log \left(\frac{F_{\text{MÁX}} - F}{F - F_{\text{MÍN}}} \right) \quad \text{Equação 15}$$

Sendo: pH= potencial hidrogeniônico; pK_a= constante de dissociação ácida; F_{MÁX} e F_{MÍN}= intensidade fluorescente máxima e mínima durante a variação dos valores de pH, respectivamente; F= intensidade fluorescente em um dado valor de pH.

A **Figura 58(a)** ilustra a emissão fluorescente do *MAC* em uma faixa estreita de pH, de 1,0 a 3,5, não sendo possível testar com valores mais altos pois a solubilidade do ligante tornou-se comprometida (mesmo sob aquecimento). Também é interessante notar que em meio orgânico o sensor apresenta banda de emissão fluorescente em 416 nm, e em meio aquoso ácido a banda de emissão apresenta um deslocamento batocrômico de aproximadamente 70 nm (para valores de pH mais baixos), o que é coincidente com o comportamento ácido-base da *acridina* (**seção 4.1.3**), que caracteriza o deslocamento batocrômico (para comprimentos de onda maiores) com a protonação do ligante, bem como, o deslocamento hipsocrômico (para comprimentos de onda menores) com a desprotonação. O gráfico mostra que entre o pH 1,0 a 2,5 há um aumento considerável na intensidade fluorescente, e um leve deslocamento batocrômico; entre pH 2,5 e 3,0 não há grande mudança de intensidade fluorescente e ocorre um leve deslocamento hipsocrômico. A mudança mais acentuada ocorre entre o pH 3,0 e 3,5, que apresenta um decréscimo significativo na

intensidade fluorescente com um forte deslocamento hipsocrômico (~25 nm). Com base no que foi discutido para o comportamento ácido-base da *acridina*, é possível inferir que o sensor quando entre pH 1,0 a 2,5 está em sua forma majoritariamente protonada, pois o deslocamento batocrômico da banda de emissão, que caracteriza a protonação do ligante, é mantida até esse pH. Acima do pH 2,5 se observa um deslocamento hipsocrômico, no qual o sensor já não se encontra majoritariamente protonado. Os testes para a detecção do ligante *MAC* frente a diversos ânions foram realizados em pH 1,5 (a partir de *HCl*) para garantir a protonação do ligante, com água ultrapura e medido em triplicatas. A **Figura 58(b)** mostra as médias das intensidades de emissão (gráfico de barras) para todos os testes, com os desvios obtidos das replicatas, sendo possível observar que o ligante não apresentou detectabilidade a nenhum ânion testado. Os sais utilizados foram todos com sódio como contra-íon, nas mesmas concentrações.

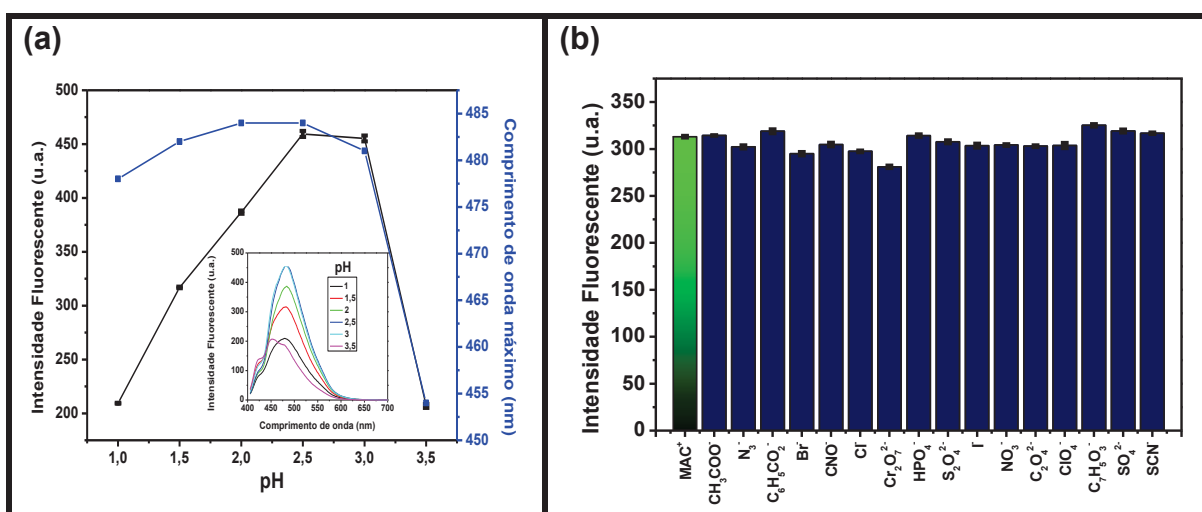


Figura 58. (a) Espectro de emissão fluorescente do ligante *MAC* em diferentes valores de pH com seus comprimentos de onda máximo em cada condição. **(b)** Investigação da seletividade do ligante *MAC* em meio aquoso e pH = 1,5, frente a diversos ânions. λ_{em} : 483 nm; λ_{ex} : 400 nm. Slits 1,5 nm para ambas as fendas. Ligante e ânions = c 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Medidas em triplicatas.

ANEXO 5 – FIGURAS DE MÉRITO PARA MAC E ÍONS CÁDMIO(II)

Tabela 55. Valores das intensidades fluorescentes médias das triplicatas (IFM), desvio padrão amostral (s) e desvio padrão relativo (RSD%) para o teste de seletividade individual do ligante MAC com íons metálicos.

MAC + METAL ⁿ⁺	IFM	s	RSD (%)
MAC LIVRE	141,778	0,801	0,565
MAC + Pd ²⁺	52,533	0,182	0,346
MAC + Cu ²⁺	80,241	0,154	0,192
MAC + Ni ²⁺	94,632	0,980	1,036
MAC + Co ²⁺	97,750	0,929	0,950
MAC + Hg ²⁺	122,364	0,987	0,807
MAC + Ru ³⁺	129,154	1,994	1,544
MAC + Fe ³⁺	129,709	0,346	0,267
MAC + K ⁺	129,752	0,669	0,516
MAC + Li ⁺	133,533	0,539	0,404
MAC + Zn ²⁺	135,144	1,659	1,227
MAC + Ca ²⁺	139,726	0,788	0,564
MAC + Eu ³⁺	140,647	1,217	0,865
MAC + Mn ²⁺	148,235	0,440	0,296
MAC + Tb ³⁺	163,915	1,541	0,940
MAC + NH ₄ ⁺	165,926	0,239	0,144
MAC + Cr ²⁺	179,303	0,645	0,359
MAC + Sn ²⁺	188,398	0,573	0,304
MAC + Na ⁺	201,031	0,595	0,296
MAC + Mg ²⁺	204,536	0,929	0,454
MAC + Cd ²⁺	1200,035	0,037	0,003

TESTES ESTATÍSTICOS PARA A FAIXA LINEAR

1. Teste de Grubbs (teste G): análise das triplicatas de cada ponto

Para a análise da faixa linear foram testados todos os conjuntos em triplicata (N=3) com nível e confiança de 95% e uma distribuição normal de variabilidade, com $G_{\text{tabelado}} = 1,155$. Os dados obtidos dos testes encontram-se na **Tabela 56**, na qual é possível observar que entre todos os pontos presentes na faixa linear não houve nenhum resultado discrepante entre as medidas, em nenhum nível de concentração. Desta forma é possível concluir que não existem valores anômalos no conjunto de medidas de intensidade de emissão para a faixa linear.

Tabela 56. Teste de Grubbs aplicado a faixa linear para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).

c (Cd ²⁺) (nmol L ⁻¹)	Replicata	Outlier – GRUBBS
100	130,266	NÃO
	128,761	NÃO
	131,073	NÃO
300	167,479	NÃO
	167,420	NÃO
	168,485	NÃO
500	204,597	NÃO
	201,190	NÃO
	199,757	NÃO
800	240,264	NÃO
	236,511	NÃO
	238,015	NÃO
1000	269,357	NÃO
	270,993	NÃO
	269,873	NÃO

2. Teste de Fisher (teste *F*): análise das variâncias de cada conjunto de medidas

Com as medidas da faixa linear feitas em triplicatas, tem-se, portanto, 3 conjuntos de dados a serem analisados, com 5 pontos cada. Assim, no teste *F* compara-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ com um valor de referência, F_{tabelado} . Logo, o teste será considerado estatisticamente aprovado se o valor obtido for inferior ou igual ao valor tabelado, de acordo com o grau de liberdade de cada conjunto analisado e o nível de significância adotado [149-152]. Para este caso, o grau de liberdade é igual a 4 ($n-1$) para os 3 conjuntos com 95% de nível de significância, produzindo um valor de $F_{\text{tabelado}} = 7,15$. A **Tabela 57** traz as intensidades de emissão para cada concentração da faixa linear, em sua replicata, bem como, os valores de média, desvio padrão e variâncias de cada conjunto de dados. Também é possível observar as relações das variâncias dos 3 conjuntos analisados, resultando em valores estatisticamente aprovados, ou seja, inferiores ao valor referencial de F_{tabelado} , segundo o nível de confiança de 95%, para o número de replicatas e portanto, grau de liberdade 4 analisados da faixa linear.

Tabela 57. Dados de média e desvio padrão (s) das intensidades de emissão em triplicata da faixa linear, e resultado do teste de Fisher para análise das variâncias de cada conjunto de replicatas ($F_{\text{tabelado}}=7,15$) do quimiossensor MAC e íons cádmio(II).

c (Cd ²⁺) (nmol L ⁻¹)	REPLICATAS			Média	Desvio Padrão (s)
	n=1	n=2	n=3		
100	130,266	128,761	131,073	130,033	1,173
300	167,479	167,420	168,485	167,795	0,599
500	204,597	201,190	199,757	201,848	2,486
800	240,264	236,511	238,015	238,263	1,889
1000	269,357	270,993	269,873	270,074	0,836
Variância (s ²)	3086,135	3126,543	3015,296		
Combinação	TEST F				Resultado
conjunto 1- 2	3126,543 / 3086,135			1,013	Aprovado
conjunto 1-3	3086,135 / 3015,296			1,023	Aprovado
conjunto 2-3	3126,543 / 3015,296			1,037	Aprovado

3. Avaliação dos resíduos dos pontos da faixa linear

Considerando a regressão linear realizada para obtenção da faixa linear, a estatística define como “*resíduos dos pontos de uma curva analítica*” a diferença entre os valores obtidos experimentalmente ($Y_{\text{experimental}}$) e os valores ideais ($Y_{\text{teórico}}$) calculados pelo modelo de regressão usado para cada concentração nas replicatas, como mostra a **Equação 16**, ou ainda em porcentagem pela **Equação 17**.

$$\text{Resíduo} = Y_{\text{EXPERIMENTAL}} - Y_{\text{TEÓRICO}} \quad \text{Equação 16}$$

$$\text{Resíduo \%} = \left(\frac{\text{resíduo}}{Y_{\text{EXPERIMENTAL}}} \right) * 100 \quad \text{Equação 17}$$

Desta forma, a análise residual da faixa linear se faz necessária a fim de atestar que o modelo de equação de 1º grau é de fato adequado para o método analítico proposto, com valores residuais estatisticamente aceitáveis para o conjunto de dados e parâmetros adotados. Esta análise foi feita através dos gráficos de dispersão residual, bem como, pelos testes de Cochram e teste de Durbin-Watson [149-152].

3.1. Gráfico de dispersão residual

A forma mais trivial de análise residual dos pontos de uma curva analítica é através da construção dos gráficos de dispersão. Para isso é necessário calcular os valores ideais dos pontos da faixa linear, ou seja, o valor teórico da intensidade de emissão pelo modelo de regressão usado para cada concentração nas replicatas, a partir das médias experimentais, trazido na **Tabela 58**. Em seguida, como mostra a **Tabela 59**, calculou-se o resíduo de cada replicata em cada concentração da faixa linear, considerando o valor de $Y_{\text{teórico}}$ da **Tabela 58**. Sequencialmente realizou-se o teste de Grubbs para os resíduos, com $N=3$ para 95% de confiança e $G_{\text{tabelado}} = 1,155$, não apresentando nenhum valor estatisticamente discrepante entre os resíduos.

O gráfico de dispersão, **Figura 59**, é construído a partir dos dados de resíduos (ou ainda resíduos%), e é possível observar que os pontos residuais estão dispostos homogeneamente e de forma não-tendenciosa no gráfico, indicando que a faixa linear está de acordo com o modelo de regressão linear adotado e este é adequado ao método analítico proposto [149-152].

Tabela 58. Médias teóricas obtidas pelo modelo de regressão da faixa linear para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).

DADOS DA CURVA		COEFICIENTE DA CURVA ($Y = BX + A$)		DADOS DOS PONTOS DA CURVA PARA CÁLCULO DE RESÍDUOS	
X c (Cd ²⁺) (nmol L ⁻¹)	Y MÉDIA EXPERIMENTAL	VALOR DE B	VALOR DE A	X c (Cd ²⁺) (nmol L ⁻¹)	Y TEÓRICO
100	130.033	1.52x10 ⁸	1.20x10 ²	100	134.922
300	167.795	inclinação	intercepto	300	165.231
500	201.848			500	195.541
800	238.263			800	241.005
1000	270.074			1000	271.315

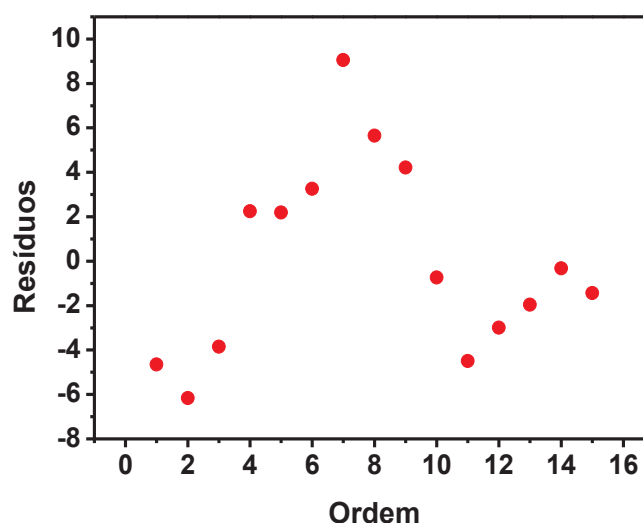


Figura 59. Gráfico de dispersão residual dos pontos da faixa linear do quimiossensor MAC e íons cádmio(II).

Tabela 59. Valores residuais das replicatas de cada concentração da faixa linear, e teste de Grubbs dos resíduos para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).

Concentração (nmol L ⁻¹)	Replicatas	Resíduos	Resíduos em %	Outlier "resíduos" - Grubbs
100	130,266	-4,6558	-3,57	NÃO
100	128,761	-6,1608	-4,78	NÃO
100	131,073	-3,8488	-2,94	NÃO
300	167,479	2,2477	1,34	NÃO
300	167,420	2,1887	1,31	NÃO
300	168,485	3,2537	1,93	NÃO
500	204,597	9,0562	4,43	NÃO
500	201,190	5,6492	2,81	NÃO
500	199,757	4,2162	2,11	NÃO
800	240,264	-0,7411	-0,31	NÃO
800	236,511	-4,4941	-1,90	NÃO
800	238,015	-2,9901	-1,26	NÃO
1000	269,357	-1,9577	-0,73	NÃO
1000	270,993	-0,3217	-0,12	NÃO
1000	269,873	-1,4417	-0,53	NÃO

3.2. Homocedasticidade e independência residuais: teste de Cochram e teste de Durbin-Watson

Além da construção do gráfico de dispersão para avaliar os resíduos dos pontos da faixa linear, outros testes estatísticos podem ser realizados, como o teste de Cochram (que avalia a homogeneidade dos resíduos) e o teste de Durbin-Watson (que avalia a auto-correlação entre os resíduos). O teste de Cochram (teste C),

Equação 18, é usado para verificar se a maior variância entre os pontos de uma curva está estatisticamente coerente e aceitável dentro da linha de tendência do método, indicando a homogeneidade na distribuição das variâncias daquele conjunto de resíduos. Uma “distribuição heterocedástica” significa uma dispersão heterogênea das variâncias, o que não é adequado, enquanto a “homocedasticidade” indica a distribuição homogênea das variâncias residuais da regressão linear, logo, o método e a equação usados no método são adequados. O valor de $C_{\text{calculado}}$ deve ser inferior ou igual a um valor de referência, C_{tabelado} , para ser considerado um teste residual homocedástico, conforme o nível de confiança adotado e o número do grau de liberdade do conjunto de dados analisados [149-152].

Os valores obtidos no *teste de Cochram* para a faixa linear estudada encontram-se na **Tabela 60**, no qual pode-se concluir que a distribuição das variâncias dos resíduos é homocedástica e que o modelo de regressão usado no método analítico foi o mais adequado, considerando 95% de nível de significância e grau de liberdade igual a 2, para as triplicatas de cada ponto da faixa linear.

$$C_{\text{CALCULADO}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{\sum_{i=0}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}} \quad \text{Equação 18}$$

Sendo: s^2 = variância de um conjunto de dados

Tabela 60. Teste de Cochram para avaliação residual dos pontos da faixa linear para o quimiossensor MAC e íons cádmio(II).

c (Cd ²⁺) (nmol L ⁻¹)	s ² (resíduos)	s ² _{máximo}	Soma	C _{CALCULADO}	C _{TABELADO}	TESTE DE COCHRAM
100	1,377	6,181	12,183	0,507	0,999	Homocedástico
300	0,358					
500	6,181					
800	3,568					
1000	0,699					

No *teste de Durbin-Watson* verifica-se a existência de alguma correlação entre os resíduos, ou seja, se eles estão dispersos de forma independente e aleatória. Logo, se os resíduos estiverem correlacionados, a regressão de mínimos quadrados pode

subestimar o desvio padrão dos coeficientes da equação, assim, levando a erros na leitura dos resultados. O valor de $D_{\text{calculado}}$ (**Equação 19**) deve ser comparado com valores de referência, D_{tabelado} , no caso são dois valores tabelados, D_{superior} e D_{inferior} (também conhecidos como D_U e D_L , respectivamente), conforme o nível de confiança adotado e o número do grau de liberdade do conjunto de dados analisados. Logo, para ser considerado um teste residual independente e aleatório, o valor de $D_{\text{calculado}}$ deve ser inferior ao D_{superior} e superior ao D_{inferior} , caso contrário o teste é considerado inconclusivo [149-152]. Os valores obtidos no *teste de Durbin-Watson* para a faixa linear estudada encontram-se na **Tabela 61**, no qual pode-se concluir que os resíduos são distribuídos de forma independente e aleatória, e que o modelo de regressão usado no método analítico foi o mais adequado, considerando 95% de nível de significância e grau de liberdade igual a 2, para as triplicatas de cada ponto da faixa linear.

$$D_{\text{CALCULADO}} = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=2}^n e_i^2} \quad \text{Equação 19}$$

Sendo: e_i = resíduo gerado da replicata analisada, e_{i-1} = resíduo gerado da replicata anterior a analisada.

Tabela 61. Teste de Durbin-Watson para avaliação residual dos pontos da faixa linear do quimiossensor *MAC* e íons cádmio(II)..

Concentração (nmol L ⁻¹)	Resíduos (ei)	(ei - ei-1) ²	Soma (ei - ei-1) ²	SomaQuad (ei)	D _{calculado}	Teste de Durbin-Watson
100	-4,656		139,163	262,278	0,531	Independente
100	-6,161	2,265			D _{superior}	
100	-3,849	5,345				
300	2,248	37,167			1,540	
300	2,189	0,003				
300	3,254	1,134			D _{inferior}	
500	9,056	33,669				
500	5,649	11,608			0,950	
500	4,216	2,053				
800	-0,741	24,575				
800	-4,494	14,085				
800	-2,990	2,262				
1000	-1,958	1,066				
1000	-0,322	2,676				
1000	-1,442	1,254				

ANEXO 6 – EURÓPIO: DOS LANTANÓIDES À CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE ENERGIA

O elemento európio faz parte da série lantanídica da Tabela Periódica, que está localizado no sexto período da família 3B, e consiste ao todo em 15 elementos, do lantânio (La= Z 57) ao lutécio (Lu= Z 71). Os lantanóides (conhecidos também como “lantanídeos”), juntamente com os elementos escândio (quarto período da família 3B; Sc= Z 21) e ítrio (quinto período da família 3B; Y= Z 39) formam o conjunto conhecido como “*terras raras*”. Apesar da nomenclatura, estes elementos não são exatamente “*raros*” na crosta terrestre, sendo que a maioria deles são mais abundantes que elementos como cobre, prata e iodo [140]. As “*terras raras*” são chamadas assim devido ao fato dos elementos que a compõem terem sido isolados por muito tempo como seus respectivos óxidos e pelas dificuldades enfrentadas, em meados do século XVIII, para separação dos minerais incomuns na época. O estudo com os lantanóides ganhou maior impulso no século XX, com técnicas mais robustas para extração desses elementos suficientemente puros, dando suporte às investigações de suas propriedades químicas, físicas, magnéticas, etc.

A química dos lantanóides é predominantemente iônica e determinada principalmente pelo tamanho de seus cátions trivalentes por ser o estado mais abundante e estável [140]. Os elementos da série lantanídica se assemelham muito mais entre si do que os elementos de transição de um mesmo período, isso ocorre porque os lantanóides apresentam, praticamente, apenas um estado de oxidação estável (3+). Alguns elementos da série podem apresentar outros estados, como o próprio európio, que é encontrado também na forma (2+) em alguns complexos e em solução, sendo facilmente oxidado [200]. Assim, é possível comparar os efeitos de pequenas variações de tamanho e de carga nuclear sobre o comportamento químico dentro da série, mesmo que sutis. Como dito, as propriedades desses elementos entre si são muito semelhantes, no entanto uma das diferenças mais marcantes é a chamada “*contração lantanídica*”, que é a diminuição do raio iônico com o aumento do número atômico. Essa contração é originada devido ao preenchimento progressivo do orbital 4f ao longo da série, que promove um aumento da carga nuclear efetiva, e os raios iônicos vão de 1,032 a 0,861 Å [140,200]. O raio dos últimos quatro elementos da série é menor que o elemento de transição ítrio (Y), tornando as propriedades do íon Y^{3+} muito semelhantes à íons como disprósio (Dy^{3+}) e hólmio (Ho^{3+}), e sua distinção muito difícil, o que explica a atribuição de ítrio (Y) como “*terra rara*”. Além

disso, a contração lantanídica é sentida pelos elementos que a sucedem na terceira série de transição, logo, as propriedades desses elementos também são muito similares ao dos correspondentes elementos da segunda série [140].

A configuração eletrônica dos lantanóides corresponde basicamente a forma $[\text{Xe}]6s^24f^x$, em que x varia de 0 para a espécie La^{3+} até 14 para Lu^{3+} dentro da série, portanto, segundo a IUPAC é correto expressar seus íons trivalentes como $[\text{Xe}]4f^x$ [201]. No caso do íon európio(III), a configuração eletrônica é expressa como $[\text{Xe}]4f^6$ ($x=6$). Cabe ressaltar que os elétrons da camada 4f estão mais próximos ao núcleo, portanto, são mais blindados (protegidos) pelas camadas mais externas, $5s^2$ e $5p^6$, estas totalmente preenchidas por elétrons em seus orbitais, explicando porque estas espécies são pouco afetadas pelo ambiente químico em que se encontram, uma vez que os elétrons 4f não estão disponíveis para formação de ligações com maior caráter covalente, como também são pouco afetados pelo campo cristalino exercido pelos ligantes em suas esferas de coordenação [200-201].

Para entender como é construído um diagrama de energia para uma espécie lantanídica é importante lembrar que o orbital 4f, que será preenchido pelos elétrons a depender de sua configuração eletrônica, pode assumir diversas possibilidades de ocupação, e cada arranjo resulta em energias distintas, dando origem ao que chamamos de “microestados”. O íon európio(III), por exemplo, possui 3003 microestados, logo, existem 3003 formas diferentes de arranjar os seus 6 elétrons nos 7 orbitais 4f [201]. Esse número pode ser obtido a partir da **Equação 20**, que estima o número de microestados para X elétrons distribuídos em Y orbitais [201]. Os microestados de mesma energia são agrupados em um mesmo “*termo espectroscópico*”, assim, para o íon európio(III) existem 119 termos [201]. A degenerescência (número de microestados) de cada termo é dada pela **Equação 21**.

A forma geral de representação de um termo espectroscópico é mostrada abaixo, juntamente com as equações, e dependem das somas dos momentos angulares de orbital (L) e spin (S) totais. Os termos são denotados por letras maiúsculas do alfabeto: S ($L = 0$), P ($L = 1$), D ($L = 2$), F ($L = 3$), G ($L = 4$), H ($L = 5$), I ($L = 6$), K ($L = 7$), L ($L = 8$), M ($L = 9$), e assim por diante. Note que a letra J não é usada como um termo [201]. A expressão $(2S+1)$ é a multiplicidade de spin do termo, e a nomenclatura usada é: *singlete*, *dubleto*, *triplete*, *quarteto*, *quinteto*, *sexteto*, e assim por diante.

Para a configuração $4f^6$ do íon európio(III), por exemplo, o termo com a maior

multiplicidade de spin é o septeto [201]. Esta multiplicidade é obtida com os 6 elétrons desemparelhados nos 7 orbitais 4f, no qual S é a soma dos valores de momento angular de spin (ms): $S = [\frac{1}{2} + \frac{1}{2} + \frac{1}{2} + \frac{1}{2} + \frac{1}{2} + \frac{1}{2}] = 3$, logo, sua multiplicidade de spin é: $(2S + 1) = 7$. Neste caso, o valor de L do septeto é 3 (ou um termo F), que é obtido a partir da soma dos valores de momento angular orbital (ml), logo: $L = [(+3) + (+2) + (+1) + 0 + (-1) + (-2)] = 3$. É interessante notar que para configurações (4f) com número de elétrons pares (como 6 para európio(III)), todos os termos do íon apresentam multiplicidade ímpar [201].

Em 295 termos espectroscópicos da configuração $[\text{Xe}]4f^6$ ocorre a divisão (“split”) em níveis de energia diferentes (representado pela letra J no termo geral) devido às interações spin-órbita. J é o momento angular total e indica a orientação relativa do spin e o momento angular. O “acoplamento spin-órbita”, como é chamado, resulta da interação entre o momento magnético spin do elétron e o campo magnético criado pelo movimento do elétron ao redor do núcleo. Os valores possíveis para J variam de $(L + S)$ a $(L - S)$. Assim, considerando como exemplo o termo ^7F (do íon európio(III)), no qual $L = 3$ e $S = 3$, os valores de J variam de 0 a 6. A presença de um ambiente químico induz a uma quebra da degenerescência de cada nível J, conhecido como “efeito Stark”, dado pela **Equação 22**, e estima o número de *sub-níveis* que cada nível possui após a quebra. A **Figura 60** mostra um espectro de emissão para um complexo de európio(III), no qual é possível observar as transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0-4}$, bem como os sub-níveis das transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0-2}$ através das divisões das linhas de emissão.

$$\left(\frac{14}{n}\right) = \frac{14!}{n!(14-n)!}$$

Equação 20

$$(2S+1)(2L+1)$$

Equação 21

$$(2J+1)$$

Equação 22

$$(2S+1)L_J$$

Termo espectroscópico geral

Sendo: n= número de orbitais (f=7); S= momento angular de spin total; L= momento angular orbital total; $(2S+1)$ = multiplicidade de spin; J= resultante do acoplamento spin-órbita (varia de $(S-L)$ a $(S+L)$).

O estado fundamental é definido como o termo de menor energia e identificado pela Regra de Hund (condição principal) e outras condições secundárias,

sendo: Condição principal: estado fundamental de menor energia é aquele no qual a multiplicidade de spin ($2S+1$) é a maior possível. Condições secundárias: **i)** caso tenha mais de um termo com mesma multiplicidade, o estado fundamental será aquele com maior L ; **ii)** quando o orbital tem menos da metade de elétrons preenchidos, o estado fundamental é aquele com o menor valor de J ; **iii)** quando o orbital tem mais da metade de elétrons preenchidos, o estado fundamental é aquele com o maior valor de J . Desta forma, o termo fundamental para o európio(III), de configuração $[\text{Xe}]4f^6$, é o ${}^7F_0$, e os valores de J variam de zero (menor energia) a seis (maior energia) (${}^7F_{0-6}$). A ordem dos termos no estado excitado não é definido pela mesma regra, e sim a partir de cálculos extremamente complexos que consideram os hamiltonianos do íon livre e do campo cristalino, estes cálculos não serão abordados neste trabalho, no entanto, o ordenamento é amplamente difundido na literatura [201], os programas mais conhecidos são descritos por Crosswhite [251] e Reid [252]. A **Figura 61** ilustra o diagrama de energia para o íon európio(III), com seu termo fundamental (e seus níveis de 0-6), bem como seus estados excitados, sendo o 1º estado excitado o termo ${}^5D_0$. A **Tabela 62** ilustra as energias de cada estado no diagrama, as regiões das linhas de emissão com suas respectivas transições do espectro de luminescência.

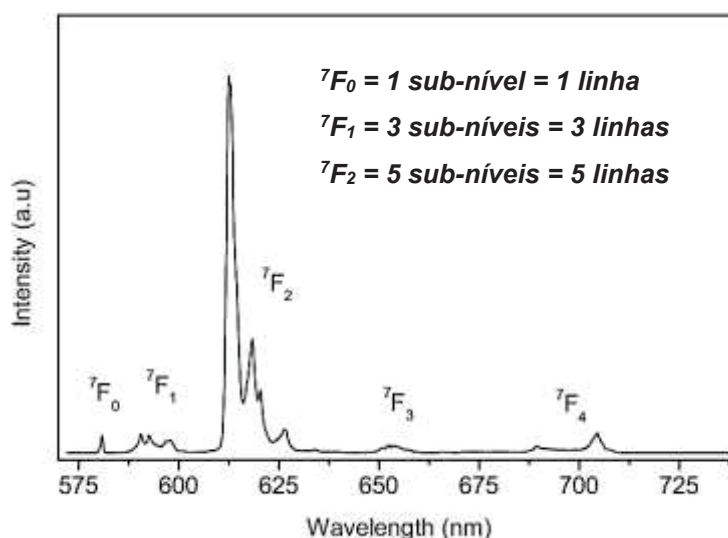


Figura 60. Espectro de emissão de $[\text{Eu}(\text{tta})_3(\text{phen})]$ a 77K, que mostra os sub-níveis das transições ${}^7F_0$ a ${}^7F_2$ (Retirado de [201]).

Tabela 62. (a) Transições do estado excitado $^5D_0$ para os níveis de 0-6 do termo fundamental ^7F e suas regiões de emissão no espectro [201]. **(b)** Energia de cada termo espectroscópico no diagrama de energia para o íon európio(III) [201].

(a)			(b)	
TRANSIÇÕES		$\lambda(\text{nm})$	TERMO	ENERGIA (cm^{-1})
1	$^5D_0 \rightarrow ^7F_6$	810-840	$^7F_0$	0
2	$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	740-770	$^7F_1$	379
3	$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	680-710	$^7F_2$	1043
4	$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	640-660	$^7F_3$	1896
5	$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	610-630	$^7F_4$	2869
6	$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	585-600	$^7F_5$	3912
7	$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	570-585	$^7F_6$	4992
			$^5D_0$	17227
			$^5D_1$	18973
			$^5D_2$	21445
			$^5D_3$	24335

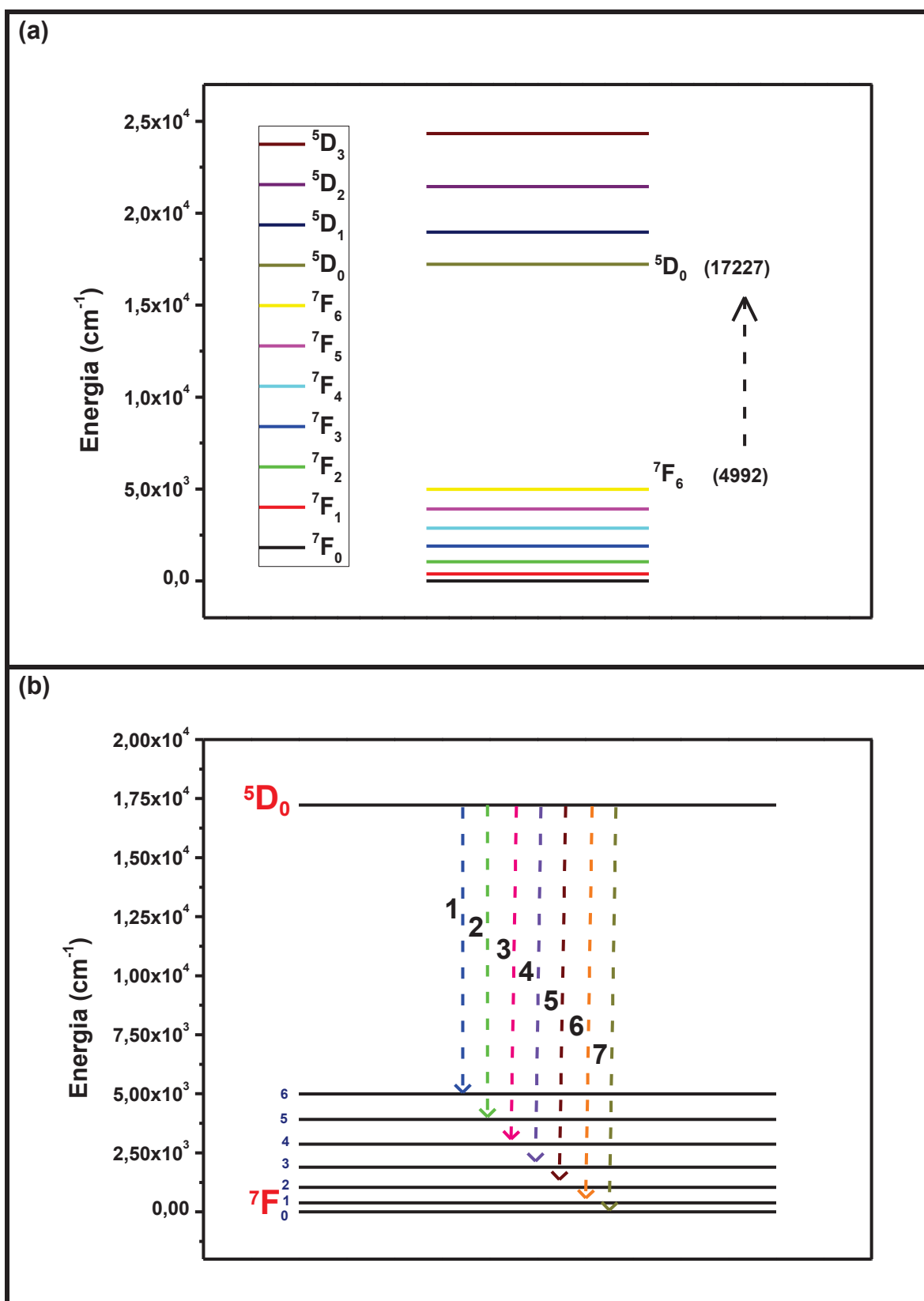


Figura 61. Diagrama de energia do íon európio(III), **(a)** do termo fundamental ${}^7F_{0-6}$ ao excitado ${}^5D_3$. **(b)** Transições a partir do estado excitado ${}^5D_0$ para os 7 níveis do termo fundamental.

ANEXO 7 – DISTÂNCIAS E ÂNGULOS DE LIGAÇÃO DOS MONOCRISTAIS OBTIDOS DE DEFM E FDE

Tabela 63. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o polimorfo I de DEFM.

DISTÂNCIAS DE LIGAÇÃO			
C(1)-C(2)	1.3910(15)	C(13)-C(14)	1.5426(14)
C(1)-C(6)	1.4010(15)	C(13)-H(13)	0.978(14)
C(1)-C(13)	1.5256(14)	C(14)-C(15)	1.5240(15)
C(2)-C(3)	1.3924(17)	C(14)-C(18)	1.5256(15)
C(2)-H(2)	0.965(15)	C(14)-H(14)	0.947(13)
C(3)-C(4)	1.3869(19)	C(15)-O(15A)	1.2047(14)
C(3)-H(3)	0.962(16)	C(15)-O(15B)	1.3301(14)
C(4)-C(5)	1.3879(17)	O(15B)-C(16)	1.4678(15)
C(4)-H(4)	0.970(16)	C(16)-C(17)	1.494(2)
C(5)-C(6)	1.3937(15)	C(16)-H(16A)	0.976(17)
C(5)-H(5)	0.965(14)	C(16)-H(16B)	0.992(18)
C(6)-C(7)	1.4653(15)	C(17)-H(17A)	1.02(2)
C(7)-C(8)	1.3910(16)	C(17)-H(17B)	1.00(3)
C(7)-C(12)	1.4021(15)	C(17)-H(17C)	1.01(2)
C(8)-C(9)	1.3880(18)	C(18)-O(18A)	1.2025(14)
C(8)-H(8)	0.962(15)	C(18)-O(18B)	1.3320(14)
C(9)-C(10)	1.3879(19)	O(18B)-C(19)	1.4643(14)
C(9)-H(9)	0.971(17)	C(19)-C(20)	1.494(2)
C(10)-C(11)	1.3954(17)	C(19)-H(19A)	1.009(17)
C(10)-H(10)	0.961(17)	C(19)-H(19B)	1.002(18)
C(11)-C(12)	1.3905(15)	C(20)-H(20A)	0.99(2)
C(11)-H(11)	0.971(15)	C(20)-H(20B)	1.02(2)
C(12)-C(13)	1.5267(14)	C(20)-H(20C)	1.01(3)
ÂNGULOS DE LIGAÇÃO			
C(19)-C(20)-H(20A)	108.7(12)	C(11)-C(12)-C(13)	130.22(10)
C(19)-C(20)-H(20B)	107.9(12)	C(7)-C(12)-C(13)	110.18(9)
H(20A)-C(20)-H(20B)	111.6(16)	C(1)-C(13)-C(12)	101.98(8)
C(19)-C(20)-H(20C)	109.8(14)	C(1)-C(13)-C(14)	113.36(8)
H(20A)-C(20)-H(20C)	109.7(18)	C(12)-C(13)-C(14)	112.55(9)
H(20B)-C(20)-H(20C)	109.2(18)	C(1)-C(13)-H(13)	109.5(8)
C(2)-C(1)-C(6)	119.68(10)	C(12)-C(13)-H(13)	111.0(8)
C(2)-C(1)-C(13)	130.19(10)	C(14)-C(13)-H(13)	108.3(8)
C(6)-C(1)-C(13)	110.08(9)	C(15)-C(14)-C(18)	104.29(8)
C(1)-C(2)-C(3)	118.94(11)	C(15)-C(14)-C(13)	111.10(8)
C(1)-C(2)-H(2)	120.6(9)	C(18)-C(14)-C(13)	112.65(9)
C(3)-C(2)-H(2)	120.4(9)	C(15)-C(14)-H(14)	109.0(8)
C(4)-C(3)-C(2)	121.00(11)	C(18)-C(14)-H(14)	108.6(8)

C(4)-C(3)-H(3)	119.2(9)	C(13)-C(14)-H(14)	110.9(8)
C(2)-C(3)-H(3)	119.8(10)	O(15A)-C(15)-O(15B)	125.07(11)
C(3)-C(4)-C(5)	120.75(11)	O(15A)-C(15)-C(14)	123.11(10)
C(3)-C(4)-H(4)	120.3(9)	O(15B)-C(15)-C(14)	111.83(9)
C(5)-C(4)-H(4)	119.0(9)	C(15)-O(15B)-C(16)	116.40(10)
C(4)-C(5)-C(6)	118.32(11)	O(15B)-C(16)-C(17)	110.50(12)
C(4)-C(5)-H(5)	121.1(8)	O(15B)-C(16)-H(16A)	109.8(10)
C(6)-C(5)-H(5)	120.6(8)	C(17)-C(16)-H(16A)	112.0(10)
C(5)-C(6)-C(1)	121.30(10)	O(15B)-C(16)-H(16B)	104.1(10)
C(5)-C(6)-C(7)	129.58(10)	C(17)-C(16)-H(16B)	111.0(10)
C(1)-C(6)-C(7)	109.02(9)	H(16A)-C(16)-H(16B)	109.2(14)
C(8)-C(7)-C(12)	121.24(10)	C(16)-C(17)-H(17A)	110.4(11)
C(8)-C(7)-C(6)	130.03(10)	C(16)-C(17)-H(17B)	107.8(13)
C(12)-C(7)-C(6)	108.71(9)	H(17A)-C(17)-H(17B)	109.4(17)
C(9)-C(8)-C(7)	118.64(11)	C(16)-C(17)-H(17C)	109.9(11)
C(9)-C(8)-H(8)	122.6(9)	H(17A)-C(17)-H(17C)	110.4(16)
C(7)-C(8)-H(8)	118.7(9)	H(17B)-C(17)-H(17C)	109.0(17)
C(10)-C(9)-C(8)	120.54(11)	O(18A)-C(18)-O(18B)	125.30(10)
C(10)-C(9)-H(9)	121.4(10)	O(18A)-C(18)-C(14)	124.88(10)
C(8)-C(9)-H(9)	118.0(10)	O(18B)-C(18)-C(14)	109.71(9)
C(9)-C(10)-C(11)	120.93(11)	C(18)-O(18B)-C(19)	117.24(10)
C(9)-C(10)-H(10)	119.7(10)	O(18B)-C(19)-C(20)	111.02(12)
C(11)-C(10)-H(10)	119.3(10)	O(18B)-C(19)-H(19A)	108.0(9)
C(12)-C(11)-C(10)	119.03(11)	C(20)-C(19)-H(19A)	110.9(9)
C(12)-C(11)-H(11)	121.9(9)	O(18B)-C(19)-H(19B)	103.1(10)
C(10)-C(11)-H(11)	119.1(9)	C(20)-C(19)-H(19B)	112.4(10)
C(11)-C(12)-C(7)	119.59(10)	H(19A)-C(19)-H(19B)	111.0(14)
C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	0.68(16)	C(2)-C(1)-C(13)-C(12)	176.50(11)
C(13)-C(1)-C(2)-C(3)	-176.46(11)	C(6)-C(1)-C(13)-C(12)	-0.86(11)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	0.38(18)	C(2)-C(1)-C(13)-C(14)	-62.26(15)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-1.07(19)	C(6)-C(1)-C(13)-C(14)	120.38(10)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	0.66(18)	C(11)-C(12)-C(13)-C(1)	-177.12(11)
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	0.42(16)	C(7)-C(12)-C(13)-C(1)	1.68(11)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	176.48(11)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	61.08(15)
C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	-1.09(16)	C(7)-C(12)-C(13)-C(14)	-120.12(10)
C(13)-C(1)-C(6)-C(5)	176.59(10)	C(1)-C(13)-C(14)-C(15)	-173.64(9)
C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	-177.89(10)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-58.54(11)
C(13)-C(1)-C(6)-C(7)	-0.21(12)	C(1)-C(13)-C(14)-C(18)	69.76(11)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	3.2(2)	C(12)-C(13)-C(14)-C(18)	-175.14(8)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	179.63(11)	C(18)-C(14)-C(15)-O(15A)	69.60(13)
C(5)-C(6)-C(7)-C(12)	-175.13(11)	C(13)-C(14)-C(15)-O(15A)	-52.01(14)
C(1)-C(6)-C(7)-C(12)	1.32(12)	C(18)-C(14)-C(15)-O(15B)	-109.92(10)
C(12)-C(7)-C(8)-C(9)	0.34(18)	C(13)-C(14)-C(15)-O(15B)	128.47(10)

C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-177.79(11)	O(15A)-C(15)-O(15B)-C(16)	-2.95(17)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	1.0(2)	C(14)-C(15)-O(15B)-C(16)	176.56(10)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-1.2(2)	C(15)-O(15B)-C(16)-C(17)	-78.99(15)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	0.1(2)	C(15)-C(14)-C(18)-O(18A)	-96.55(13)
C(10)-C(11)-C(12)-C(7)	1.21(17)	C(13)-C(14)-C(18)-O(18A)	24.03(15)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	179.91(11)	C(15)-C(14)-C(18)-O(18B)	79.74(10)
C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	-1.44(17)	C(13)-C(14)-C(18)-O(18B)	-159.68(9)
C(6)-C(7)-C(12)-C(11)	177.05(10)	O(18A)-C(18)-O(18B)-C(19)	-2.67(17)
C(8)-C(7)-C(12)-C(13)	179.62(10)	C(14)-C(18)-O(18B)-C(19)	-178.94(10)
C(6)-C(7)-C(12)-C(13)	-1.90(12)	C(18)-O(18B)-C(19)-C(20)	-77.76(16)

Tabela 64. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o polimorfo II de DEFM.

DISTÂNCIAS DE LIGAÇÃO			
C(1)-C(2)	1.382(4)	C(11)-H(11)	0.93(2)
C(1)-C(6)	1.392(4)	C(12)-C(13)	1.517(3)
C(1)-C(13)	1.513(3)	C(13)-C(14)	1.548(3)
C(2)-C(3)	1.383(4)	C(13)-H(13)	0.97(2)
C(2)-H(2)	1.03(3)	C(14)-C(18)	1.514(4)
C(3)-C(4)	1.373(5)	C(14)-C(15)	1.514(3)
C(3)-H(3)	1.01(4)	C(14)-H(14)	0.92(2)
C(4)-C(5)	1.383(5)	C(15)-O(15A)	1.196(3)
C(4)-H(4)	1.00(4)	C(15)-O(15B)	1.326(3)
C(5)-C(6)	1.395(4)	C(16)-C(17A)	1.457(5)
C(5)-H(5)	0.96(3)	C(16)-O(15B)	1.458(3)
C(6)-C(7)	1.466(4)	C(16)-H(16A)	1.03(3)
C(7)-C(8)	1.388(4)	C(16)-H(16B)	1.05(4)
C(7)-C(12)	1.393(3)	C(18)-O(18A)	1.200(3)
C(8)-C(9)	1.384(5)	C(18)-O(18B)	1.331(3)
C(8)-H(8)	0.93(3)	C(19A)-C(20A)	1.352(10)
C(9)-C(10)	1.369(5)	C(19A)-O(18B)	1.486(6)
C(9)-H(9)	1.00(3)	C(19B)-C(20B)	1.372(10)
C(10)-C(11)	1.390(4)	C(19B)-O(18B)	1.479(7)
C(10)-H(10)	0.99(3)		
ÂNGULOS DE LIGAÇÃO			
C(2)-C(1)-C(6)	120.5(2)	C(11)-C(12)-C(7)	120.4(2)
C(2)-C(1)-C(13)	129.2(3)	C(11)-C(12)-C(13)	130.1(2)
C(6)-C(1)-C(13)	110.2(2)	C(7)-C(12)-C(13)	109.6(2)
C(1)-C(2)-C(3)	119.0(3)	C(1)-C(13)-C(12)	102.6(2)
C(1)-C(2)-H(2)	120.0(16)	C(1)-C(13)-C(14)	114.9(2)
C(3)-C(2)-H(2)	121.0(16)	C(12)-C(13)-C(14)	115.5(2)
C(4)-C(3)-C(2)	120.8(3)	C(1)-C(13)-H(13)	111.4(13)
C(4)-C(3)-H(3)	118.3(19)	C(12)-C(13)-H(13)	107.4(13)

C(2)-C(3)-H(3)	121(2)	C(14)-C(13)-H(13)	105.0(13)
C(3)-C(4)-C(5)	120.9(3)	C(18)-C(14)-C(15)	108.9(2)
C(3)-C(4)-H(4)	121.5(19)	C(18)-C(14)-C(13)	112.2(2)
C(5)-C(4)-H(4)	117.7(19)	C(15)-C(14)-C(13)	111.8(2)
C(4)-C(5)-C(6)	118.8(3)	C(18)-C(14)-H(14)	108.3(15)
C(4)-C(5)-H(5)	122.6(17)	C(15)-C(14)-H(14)	109.1(15)
C(6)-C(5)-H(5)	118.6(17)	C(13)-C(14)-H(14)	106.5(15)
C(1)-C(6)-C(5)	120.0(3)	O(15A)-C(15)-O(15B)	123.5(2)
C(1)-C(6)-C(7)	108.5(2)	O(15A)-C(15)-C(14)	125.0(2)
C(5)-C(6)-C(7)	131.5(3)	O(15B)-C(15)-C(14)	111.5(2)
C(8)-C(7)-C(12)	120.2(3)	C(17A)-C(16)-O(15B)	111.0(3)
C(8)-C(7)-C(6)	130.6(3)	C(17A)-C(16)-H(16A)	111.4(17)
C(12)-C(7)-C(6)	109.2(2)	O(15B)-C(16)-H(16A)	108.4(18)
C(9)-C(8)-C(7)	118.8(3)	C(17A)-C(16)-H(16B)	111(2)
C(9)-C(8)-H(8)	122.7(18)	O(15B)-C(16)-H(16B)	105(2)
C(7)-C(8)-H(8)	118.5(18)	H(16A)-C(16)-H(16B)	110(3)
C(10)-C(9)-C(8)	121.0(3)	O(18A)-C(18)-O(18B)	124.9(2)
C(10)-C(9)-H(9)	122.0(18)	O(18A)-C(18)-C(14)	124.3(2)
C(8)-C(9)-H(9)	117.1(18)	O(18B)-C(18)-C(14)	110.8(2)
C(9)-C(10)-C(11)	120.5(3)	C(20A)-C(19A)-O(18B)	112.9(6)
C(9)-C(10)-H(10)	120.7(16)	C(20B)-C(19B)-O(18B)	112.9(6)
C(11)-C(10)-H(10)	118.8(16)	C(15)-O(15B)-C(16)	117.0(2)
C(12)-C(11)-C(10)	119.2(3)	C(18)-O(18B)-C(19B)	121.5(3)
C(12)-C(11)-H(11)	119.3(14)	C(18)-O(18B)-C(19A)	112.0(3)
C(10)-C(11)-H(11)	121.5(14)		

Tabela 65. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do monocristal de FDE.

DISTÂNCIAS DE LIGAÇÃO			
Br(1)-C(1)	1.894(2)	C(12)-C(13)	1.387(3)
Br(2)-C(8)	1.899(2)	C(13)-H(13)	0.89(3)
C(1)-C(2)	1.383(3)	C(14)-C(15)	1.494(3)
C(1)-C(13)	1.387(3)	C(14)-C(18)	1.506(3)
C(2)-C(3)	1.383(4)	C(15)-O(1)	1.198(3)
C(2)-H(2)	0.90(3)	C(15)-O(2)	1.326(3)
C(3)-C(4)	1.382(3)	C(16)-O(2)	1.458(3)
C(3)-H(3)	0.92(3)	C(16)-C(17)	1.491(4)
C(4)-C(12)	1.409(3)	C(16)-H(16A)	1.02(3)
C(4)-C(5)	1.458(3)	C(16)-H(16B)	0.87(3)
C(5)-C(6)	1.385(3)	C(17)-H(17)	0.96(4)
C(5)-C(10)	1.402(3)	C(17)-H(17B)	0.93(4)
C(6)-C(7)	1.379(4)	C(17)-H(17C)	0.89(5)
C(6)-H(6)	0.94(3)	C(18)-O(3)	1.191(3)

C(7)-C(8)	1.375(4)	C(18)-O(4)	1.327(3)
C(7)-H(7)	0.96(3)	C(19)-O(4)	1.462(3)
C(8)-C(9)	1.387(3)	C(19)-C(20)	1.472(5)
C(9)-C(10)	1.387(3)	C(19)-H(19A)	0.97(4)
C(9)-H(9)	0.85(3)	C(19)-H(19B)	0.92(4)
C(10)-C(11)	1.497(3)	C(20)-H(20A)	0.96(4)
C(11)-C(14)	1.344(3)	C(20)-H(20B)	0.98(4)
C(11)-C(12)	1.495(3)	C(20)-H(20C)	1.06(5)
ÂNGULOS DE LIGAÇÃO			
C(2)-C(1)-C(13)	122.2(2)	C(12)-C(13)-H(13)	119.9(17)
C(2)-C(1)-Br(1)	117.93(17)	C(11)-C(14)-C(15)	126.43(18)
C(13)-C(1)-Br(1)	119.83(17)	C(11)-C(14)-C(18)	121.66(18)
C(3)-C(2)-C(1)	119.6(2)	C(15)-C(14)-C(18)	111.61(17)
C(3)-C(2)-H(2)	120.5(18)	O(1)-C(15)-O(2)	124.32(19)
C(1)-C(2)-H(2)	119.8(18)	O(1)-C(15)-C(14)	125.81(19)
C(4)-C(3)-C(2)	119.1(2)	O(2)-C(15)-C(14)	109.67(17)
C(4)-C(3)-H(3)	120.2(16)	O(2)-C(16)-C(17)	106.7(2)
C(2)-C(3)-H(3)	120.7(16)	O(2)-C(16)-H(16A)	109.7(16)
C(3)-C(4)-C(12)	121.1(2)	C(17)-C(16)-H(16A)	113.7(16)
C(3)-C(4)-C(5)	129.6(2)	O(2)-C(16)-H(16B)	104.8(18)
C(12)-C(4)-C(5)	109.26(18)	C(17)-C(16)-H(16B)	111.5(19)
C(6)-C(5)-C(10)	121.1(2)	H(16A)-C(16)-H(16B)	110(2)
C(6)-C(5)-C(4)	130.0(2)	C(16)-C(17)-H(17)	111(2)
C(10)-C(5)-C(4)	108.87(18)	C(16)-C(17)-H(17B)	110(2)
C(7)-C(6)-C(5)	119.3(2)	H(17)-C(17)-H(17B)	108(3)
C(7)-C(6)-H(6)	123.2(17)	C(16)-C(17)-H(17C)	107(3)
C(5)-C(6)-H(6)	117.5(18)	H(17)-C(17)-H(17C)	105(4)
C(8)-C(7)-C(6)	119.4(2)	H(17B)-C(17)-H(17C)	117(4)
C(8)-C(7)-H(7)	120.7(19)	O(3)-C(18)-O(4)	125.3(2)
C(6)-C(7)-H(7)	119.9(19)	O(3)-C(18)-C(14)	125.3(2)
C(7)-C(8)-C(9)	122.5(2)	O(4)-C(18)-C(14)	109.46(17)
C(7)-C(8)-Br(2)	119.10(18)	O(4)-C(19)-C(20)	108.3(3)
C(9)-C(8)-Br(2)	118.38(19)	O(4)-C(19)-H(19A)	104(2)
C(8)-C(9)-C(10)	118.3(2)	C(20)-C(19)-H(19A)	106(2)
C(8)-C(9)-H(9)	118.2(18)	O(4)-C(19)-H(19B)	104(2)
C(10)-C(9)-H(9)	123.4(19)	C(20)-C(19)-H(19B)	118(2)
C(9)-C(10)-C(5)	119.3(2)	H(19A)-C(19)-H(19B)	116(3)
C(9)-C(10)-C(11)	132.3(2)	C(19)-C(20)-H(20A)	107(2)
C(5)-C(10)-C(11)	108.36(18)	C(19)-C(20)-H(20B)	110(2)
C(14)-C(11)-C(12)	129.61(19)	H(20A)-C(20)-H(20B)	105(3)
C(14)-C(11)-C(10)	124.80(19)	C(19)-C(20)-H(20C)	108(2)
C(12)-C(11)-C(10)	105.17(17)	H(20A)-C(20)-H(20C)	112(3)
C(13)-C(12)-C(4)	119.43(19)	H(20B)-C(20)-H(20C)	115(3)

C(13)-C(12)-C(11)	132.67(19)	C(15)-O(2)-C(16)	117.12(18)
C(4)-C(12)-C(11)	107.89(18)	C(18)-O(4)-C(19)	117.5(2)
C(1)-C(13)-C(12)	118.4(2)	C(15)-O(2)-C(16)	117.12(18)
C(1)-C(13)-H(13)	121.7(17)	C(18)-O(4)-C(19)	117.5(2)

ANEXO 8 – FIGURAS DE MÉRITO PARA DEFM E ÍONS FERRO(III)

Tabela 66. Valores das intensidades fluorescentes médias das triplicatas (IFM), desvio padrão amostral (s) e desvio padrão relativo (RSD%) para o teste de seletividade individual do ligante *DEFM* com íons metálicos.

DEFM + METAL ⁿ⁺	IFM	s	RSD (%)
DEFM livre	500,275	1,578	0,315
DEFM + NH ₄ ⁺	485,015	2,655	0,547
DEFM + Ca ²⁺	460,502	1,167	0,253
DEFM + Zn ²⁺	448,740	1,627	0,362
DEFM+(CH ₃) ₄ N ⁺	445,155	3,079	0,692
DEFM + Al ³⁺	433,320	3,688	0,851
DEFM + Cd ²⁺	419,925	3,089	0,736
DEFM + Mg ²⁺	417,871	1,283	0,307
DEFM + Eu ³⁺	406,438	0,842	0,207
DEFM + Mn ²⁺	399,091	1,878	0,471
DEFM + Co ²⁺	390,651	2,161	0,553
DEFM + K ⁺	386,879	2,427	0,627
DEFM + Ni ²⁺	377,050	4,245	1,126
DEFM + Li ⁺	375,528	2,566	0,683
DEFM + Na ⁺	374,334	1,838	0,491
DEFM + Tb ³⁺	360,776	1,256	0,348
DEFM + Cr ³⁺	354,627	3,388	0,955
DEFM + Hg ²⁺	352,327	2,727	0,774
DEFM + Cu ²⁺	342,343	2,291	0,669
DEFM + Zr ²⁺	339,298	3,079	0,907
DEFM + Mo ⁵⁺	330,394	1,034	0,313
DEFM + Ru ³⁺	311,172	0,584	0,188
DEFM + Fe ³⁺	4,943	0,099	2,011

TESTES ESTATÍSTICOS PARA A FAIXA LINEAR

1. Teste de Grubbs (teste G): análise das triplicatas de cada ponto

Para o teste de Grubbs, com $G_{\text{tabelado}} = 1,155$, todos os pontos da faixa linear foram analisados, em suas triplicatas (N=3), com 95% de confiança e uma distribuição normal de variabilidade. O resultado encontra-se na **Tabela 67**, no qual é possível observar que entre todos os pontos presentes na faixa linear não houve nenhum resultado discrepante entre as medidas, em nenhum nível de concentração. Desta forma é possível concluir que não existem valores anômalos no conjunto de medidas

de intensidade de emissão para a faixa linear.

Tabela 67. Teste de Grubbs aplicado a faixa linear para o quimiossensor DEFM e íons ferro(III).

$c(\text{Fe}^{3+})$ (nmol L ⁻¹)	Replicata	Outlier – GRUBBS
100	337,79	NÃO
	336,127	NÃO
	337,183	NÃO
200	310,242	NÃO
	312,253	NÃO
	310,084	NÃO
300	277,122	NÃO
	276,899	NÃO
	275,954	NÃO
400	243,812	NÃO
	244,177	NÃO
	243,063	NÃO
500	211,188	NÃO
	209,725	NÃO
	211,297	NÃO
600	189,124	NÃO
	188,177	NÃO
	188,941	NÃO
700	158,22	NÃO
	155,234	NÃO
	157,458	NÃO
800	127,52	NÃO
	127,18	NÃO
	129,412	NÃO
900	104,423	NÃO
	104,475	NÃO
	104,217	NÃO
1000	60,786	NÃO
	60,779	NÃO
	60,561	NÃO

2. Teste de Fisher (*teste F*): análise das variâncias de cada conjunto de medidas

Com as medidas da faixa linear feitas em triplicatas, tem-se, portanto, 3 conjuntos de dados a serem analisados, com 10 pontos cada. Assim, no *teste F* compara-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ com um valor de referência, F_{tabelado} . Logo, o teste será

considerado estatisticamente aprovado se o valor obtido for inferior ou igual ao valor tabelado, de acordo com o grau de liberdade de cada conjunto analisado e o nível de significância adotado [149-152]. Para este caso, o grau de liberdade é igual a 9 ($n-1$) para os 3 conjuntos com 95% de nível de significância, produzindo um valor de $F_{\text{tabelado}} = 4,026$. A **Tabela 68** traz as intensidades de emissão para cada concentração da faixa linear, em sua replicata, bem como, os valores de média, desvio padrão e variâncias de cada conjunto de dados. Também é possível observar as relações das variâncias dos 3 conjuntos analisados, resultando em valores estatisticamente aprovados, ou seja, inferiores ao valor referencial de F_{tabelado} , segundo o nível de confiança de 95%, para o número de replicatas e portanto, grau de liberdade 9 analisados da faixa linear.

Tabela 68. Dados de média e desvio padrão (s) das intensidades de emissão em triplicata da faixa linear, e resultado do teste de Fisher para análise das variâncias de cada conjunto de replicatas ($F_{\text{tabelado}}=4,026$) do quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

c (Fe ³⁺) (nmol L ⁻¹)	REPLICATAS			Média	Desvio Padrão (s)
	n=1	n=2	n=3		
100	337,790	336,127	337,183	337,033	0,842
200	310,242	312,253	310,084	310,860	1,209
300	277,122	276,899	275,954	276,658	0,620
400	243,812	244,177	243,063	243,684	0,568
500	211,188	209,725	211,297	210,737	0,878
600	189,124	188,177	188,941	188,747	0,502
700	158,220	155,234	157,458	156,971	1,552
800	127,520	127,180	129,412	128,037	1,203
900	104,423	104,475	104,217	104,372	0,136
1000	60,786	60,779	60,561	60,709	0,128
Variância (s ²)	8302,627	8335,822	8243,123		
Combinação	TEST F				Resultado
conjunto 1- 2	8335,822 / 8302,627			1,004	Aprovado
conjunto 1-3	8302,627 / 8243,123			1,007	Aprovado
conjunto 2-3	8335,822 / 8243,123			1,011	Aprovado

3. Avaliação dos resíduos dos pontos da faixa linear

Considerando a regressão linear realizada para obtenção da faixa linear, a estatística define como “*resíduos dos pontos de uma curva analítica*” a diferença entre

os valores obtidos experimentalmente ($Y_{\text{experimental}}$) e os valores ideais ($Y_{\text{teórico}}$) calculados pelo modelo de regressão usado para cada concentração nas replicatas, como mostrado no **ANEXO 5**. Desta forma, a análise residual da faixa linear se faz necessária a fim de atestar que o modelo de equação de 1º grau é de fato adequado para o método analítico proposto, com valores residuais estatisticamente aceitáveis para o conjunto de dados e parâmetros adotados. Esta análise foi feita através dos gráficos de dispersão residual, bem como, pelos testes de Cochram e teste de Durbin-Watson [149-152].

3.1. Gráfico de dispersão residual

A forma mais trivial de análise residual dos pontos de uma curva analítica é através da construção dos gráficos de dispersão. Para isso é necessário calcular os valores ideais dos pontos da faixa linear, ou seja, o valor teórico da intensidade de emissão pelo modelo de regressão usado para cada concentração nas replicatas, a partir das médias experimentais, trazido na **Tabela 69**. Em seguida, como mostra a **Tabela 70**, calculou-se o resíduo de cada replicata de cada concentração da faixa linear, considerando o valor de $Y_{\text{teórico}}$ da **Tabela 69**. Sequencialmente, realizou-se o *teste de Grubbs* para os resíduos, com $N=3$ para 95% de confiança e $G_{\text{tabelado}} = 1,155$, não apresentando nenhum valor estatisticamente discrepante entre os resíduos. O gráfico de dispersão, **Figura 59**, é construído a partir dos dados de resíduos (ou ainda resíduos%), e é possível observar que os pontos residuais estão dispostos homogeneamente e de forma não-tendenciosa no gráfico, indicando que a faixa linear está de acordo com o modelo de regressão linear adotado e este é adequado ao método analítico proposto [149-152].

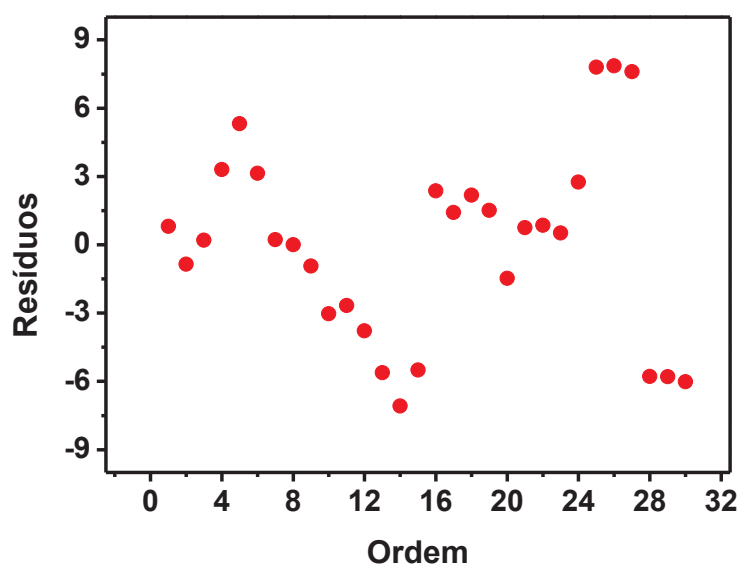


Figura 62. Gráfico de dispersão residual dos pontos da faixa linear do quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

Tabela 69. Médias teóricas obtidas pelo modelo de regressão da faixa linear para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

DADOS DA CURVA		COEFICIENTE DA CURVA ($Y = BX + A$)		DADOS DOS PONTOS DA CURVA PARA CÁLCULO DE RESÍDUOS	
X $c(\text{Fe}^{3+})$ (nmol L ⁻¹)	Y MÉDIA EXPERIMENTAL	VALOR DE B	VALOR DE A	X $c(\text{Fe}^{3+})$ (nmol L ⁻¹)	Y TEÓRICO
100	337,033	-3×10^8	$3,67 \times 10^2$	100	336,99
200	310,860	inclinação	intercepto	200	306,94
300	276,658			300	276,9
400	243,684			400	246,85
500	210,737			500	216,8
600	188,747			600	186,76
700	156,971			700	156,71
800	128,037			800	126,67
900	104,372			900	96,62
1000	60,709			1000	66,574

Tabela 70. Valores residuais das replicatas de cada concentração da faixa linear, e teste de Grubbs dos resíduos para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

Concentração (nmol L ⁻¹)	Replicatas	Resíduos	Resíduos em %	Outlier “resíduos” - Grubbs
100	337,790	0,803	0,238	NÃO
	336,127	-0,860	-0,256	NÃO
	337,183	0,196	0,058	NÃO
200	310,242	3,301	1,064	NÃO
	312,253	5,312	1,701	NÃO
	310,084	3,143	1,014	NÃO
300	277,122	0,227	0,082	NÃO
	276,899	0,004	0,001	NÃO
	275,954	-0,941	-0,341	NÃO
400	243,812	-3,038	-1,246	NÃO
	244,177	-2,673	-1,095	NÃO
	243,063	-3,787	-1,558	NÃO
500	211,188	-5,616	-2,659	NÃO
	209,725	-7,079	-3,375	NÃO
	211,297	-5,507	-2,606	NÃO
600	189,124	2,366	1,251	NÃO
	188,177	1,419	0,754	NÃO
	188,941	2,183	1,156	NÃO
700	158,220	1,508	0,953	NÃO
	155,234	-1,478	-0,952	NÃO
	157,458	0,746	0,474	NÃO
800	127,520	0,854	0,670	NÃO
	127,180	0,514	0,404	NÃO
	129,412	2,746	2,122	NÃO
900	104,423	7,803	7,472	NÃO
	104,475	7,855	7,518	NÃO
	104,217	7,597	7,290	NÃO
1000	60,786	-5,788	-9,522	NÃO
	60,779	-5,795	-9,535	NÃO
	60,561	-6,013	-9,929	NÃO

3.2. Homocedasticidade e independência residuais: teste de Cochram e teste de Durbin-Watson

Além da construção do gráfico de dispersão para avaliar os resíduos dos pontos da faixa linear, outros testes estatísticos podem ser realizados, como o teste de Cochram (que avalia a homogeneidade dos resíduos) e o teste de Durbin-Watson (que avalia a auto-correlação entre os resíduos), conforme discutido no **ANEXO 5** deste trabalho [149-152]. Os valores obtidos no *teste de Cochram* para a faixa linear estudada encontram-se na **Tabela 71**, no qual pode-se concluir que a distribuição das variâncias dos resíduos é homocedástica e que o modelo de regressão usado no método analítico foi o mais adequado, considerando 95% de nível de significância e grau de liberdade igual a 9, para as triplicatas de cada ponto da faixa linear.

Tabela 71. Teste de Cochram para avaliação residual dos pontos da faixa linear para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

c (Fe ³⁺) (nmol L ⁻¹)	s ² (resíduos)	s ² _{máximo}	Soma	C _{CALCULADO}	C _{TABELADO}	TESTE DE COCHRAM
100	0,708	2,407	7,789	0,309	0,816	Homocedástico
200	1,462					
300	0,385					
400	0,323					
500	0,771					
600	0,252					
700	2,407					
800	1,446					
900	0,019					
1000	0,016					

No *teste de Durbin-Watson* verifica-se a existência de alguma correlação entre os resíduos, ou seja, se eles estão dispersos de forma independente e aleatória, como descrito no **ANEXO 5** [149-152]. Os valores obtidos no *teste de Durbin-Watson* para a faixa linear estudada encontram-se na **Tabela 72**, no qual pode-se concluir que os resíduos são distribuídos de forma independente e aleatória, e que o modelo de regressão usado no método analítico foi o mais adequado, considerando 95% de nível de significância e grau de liberdade total igual a 29, para as triplicatas de cada ponto

da faixa linear.

Tabela 72. Teste de Durbin-Watson para avaliação residual dos pontos da faixa linear para o quimiossensor *DEFM* e íons ferro(III).

Concentração (nmol L ⁻¹)	Resíduos (ei)	(ei - ei-1) ²	Soma (ei - ei-1) ²	SomaQuad (ei)	D _{calculado}	Teste de Durbin-Watson
100	0,176		446,199	691,976	0,645	Independente
	-1,487	2,766			D _{superior}	
	-0,431	1,115				
200	2,909	11,154			1,57	
	4,920	4,044				
	2,751	4,705			1,28	
300	0,070	7,189				
	-0,153	0,050				
	-1,098	0,893				
400	-2,959	3,464				
	-2,594	0,133				
	-3,708	1,241				
500	-5,303	2,541				
	-6,766	2,140				
	-5,194	2,471				
600	2,914	65,736				
	1,967	0,897				
	2,731	0,584				
700	2,291	0,194				
	-0,695	8,916				
	1,529	4,946				
800	1,872	0,118				
	1,532	0,116				
	3,764	4,982				
900	9,056	28,003				
	9,108	0,003				
	8,850	0,067				
1000	-8,090	286,970				
	-8,962	0,760				
	-9,000	0,001				