

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Departamento de Ciência dos Materiais

**Desenvolvimento e optimização de um sensor de fibra óptica
para determinação da concentração de oxigénio**

Por

José Valério do Nascimento Palmeira

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em
Instrumentação, Manutenção Industrial e Qualidade

Orientador Científico: Professor Doutor Abel González Oliva

LISBOA

2009

AGRADECIMENTOS

A todos os que tornaram possível a realização desta tese.

Ao Professor Abel González Oliva pela disponibilidade e apoio prestado na orientação deste trabalho. Também aos Professores Marat Mendes e Carlos Dias pela coordenação e co-orientação do Mestrado.

Aos colegas de curso pela camaradagem estabelecida, especialmente aos colegas e amigos Filipe Anunciação e Rui Terras, pelas noitadas de estudo e trabalho.

Aos vários colegas do Laboratório de Diagnóstico Biomolecular no ITQB, pelas palavras de incentivo e motivação. Um agradecimento especial ao Luís Lopes pelo apoio em algumas tarefas.

Aos Engenheiros António Cunha e João Clemente, pela disponibilização da Unidade Piloto do IBET para a realização dos ensaios finais.

Aos colegas do ISEL, em particular ao Paulo e Teodoro, companheiros próximos de tarefas comuns, mas especialmente à minha “chefe” Helena Avelino por todo o apoio e incentivo.

Aos amigos Torres, pela amizade.

À minha esposa e filhas, pelo tempo de marido e pai ausente a que este trabalho obrigou.

Por último, aos meus queridos pais.

A todos os meus agradecimentos!

SUMÁRIO

A medição de oxigénio gasoso e dissolvido é de extrema importância nas mais diversas áreas como o ambiente, indústria, medicina, agricultura, etc. Historicamente, a medição de oxigénio tem sido efectuada por técnicas tais como a cromatografia gasosa, a espectrometria de massa, a ressonância paramagnética e a electroquímica. O desenvolvimento de sensores ópticos para medição de oxigénio tem recebido muita atenção nos últimos anos por parte dos investigadores, devido às suas evidentes vantagens tais como a miniaturização, elevada sensibilidade e imunidade a interferências electromagnéticas.

Esta tese de Mestrado resultou do trabalho desenvolvido num projecto intitulado “*Optical Fiber Sensors for Distributed Monitoring of Dissolved Oxygen and Temperature*” financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Embora esta tese não tenha um âmbito tão abrangente como o do projecto, está focada na optimização de um dos parâmetros mais importantes na construção de um sistema sensorial óptico para medição de oxigénio dissolvido, nomeadamente a sensibilidade do filme sensor.

O trabalho aqui apresentado inclui a construção de um sistema instrumental baseado em fluorescência e a produção e estudo de membranas sensoras com diferentes características. As membranas foram produzidas através da imobilização de um complexo de ruténio (fluoróforo) numa matriz de suporte de sol-gel.

Embora o foco do trabalho seja a medição da concentração de oxigénio em meio aquoso, são apresentados de forma adicional, os resultados obtidos com ensaios de medição da concentração de oxigénio em meio gasoso.

Esta tese está estruturada em duas partes. Na primeira parte são abordados os fundamentos teóricos necessários à compreensão do trabalho desenvolvido. É focada a importância da medição de oxigénio em várias aplicações e os métodos convencionais utilizados. Dado que o sensor desenvolvido é baseado na supressão da fluorescência por parte do oxigénio, são considerados os princípios de fluorescência necessários à compreensão dos fenómenos envolvidos. As membranas sensoras foram produzidas a partir de sol-gel, pelo que foi necessário dominar alguns aspectos relacionados com a sua síntese. Por esta razão, é também incluída uma descrição do processo de sol-gel. Por fim, são focados alguns aspectos relacionados com a construção de sensores ópticos para a medição de oxigénio.

Na segunda parte desta tese é apresentado todo o trabalho experimental desenvolvido. Este inclui um estudo de caracterização de três fluoróforos (duas metaloporfirinas e um complexo de ruténio), a descrição da produção de filmes sensores de sol-gel depositados em substratos de vidro e a descrição do sistema instrumental utilizado para a caracterização dos filmes. Por fim, é apresentada a caracterização efectuada aos filmes produzidos e que permitiram a identificação das composições de sol-gel com sensibilidade mais elevada.

Finalmente, são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalho futuro.

SUMMARY

Oxygen concentration measurements are extremely important in many areas such as the environment, industry, energy, medicine, and agriculture. Historically, techniques for measuring oxygen have included gas chromatography, mass spectrometry, paramagnetic resonance and electrochemical techniques. The development of optical sensors for oxygen measurement have received a great amount of scientific and technological interest during the past years, because of their many advantages over other sensor types, such as the possibility of miniaturization, high sensitivity and immunity to electromagnetic interferences.

This master thesis resulted from the work developed in a project entitled "*Optical Fiber Sensors for Distributed Monitoring of Dissolved Oxygen and Temperature*" financed by *Fundação para a Ciência e Tecnologia*.

Although, the scope of this thesis isn't as extensive as the project, it is focused on the optimization of one of the most important parameters in the construction of an optical sensor which measures dissolved oxygen, namely the film sensitivity.

The work presented here includes the construction of an instrumental setup based on fluorescence and the production and study of sensor films with different characteristics. The films were produced through the physical immobilization of a ruthenium complex in a sol-gel matrix.

Although the focus of this work is the measurement of dissolved oxygen, it also presents the results obtained with test measurements of oxygen concentration in gaseous medium.

This thesis is structured in two sections. The first part analyses the theoretical basis needed to understand the developed work. It focuses on the importance of the measurement of oxygen in several applications and the conventional used methods. In view of the fact that the working principle of the sensor is based on the fluorescence quenching of the fluorophore by oxygen, the fundamentals of fluorescence are considered in order to fully understand the implied phenomena. A comprehensive understanding of some aspects related with sol-gel synthesis was necessary for sensor films fabrication, therefore a description of the sol-gel process is also included. Lastly, some aspects of the optical sensors for oxygen measurement are considered.

All experimental work developed is presented in the second section of this thesis. This include the characterization of three fluorophores (two metalloporphyrines and one ruthenium complex), the description of the of sol-gel films production and the instrumental setup developed for the films

characterization. Lastly, the characterization of the produced films which allowed the identification of the film compositions with highest sensitivity is also described.

Finally, the conclusions and future work suggestions are presented.

SÍMBOLOS E NOTAÇÕES

α	fracção de fótons incidentes no átomo ou molécula que são absorvidos
χ_V	susceptibilidade magnética volumétrica
Φ	eficiência quântica
Φ_0	eficiência quântica na ausência do supressor
ϕ_ω	desvio da fase entre os sinais de excitação e fluorescência
η	viscosidade do meio
λ_a	comprimento de onda da radiação de absorção
λ_f	comprimento de onda da radiação de fluorescência
ν	frequência
ρ	massa volúmica
τ_0	tempo de vida natural da fluorescência (sem ocorrência da supressão)
τ_R	tempo de residência
ω	frequência angular
C_A	concentração da espécie A
D	soma dos coeficientes de difusão do fluoróforo e do supressor
E	energia absorvida por um átomo ou molécula
E_E	energia do nível electrónico de uma orbital
E_R	energia do nível rotacional de uma orbital
E_T	energia total de um estado electrónico
E_V	energia do nível vibracional de uma orbital
F	constante de Faraday
f	frequência de modulação
f_i	fracção do microambiente i que contribui para a intensidade total
f_S	eficiência de supressão
H	força do campo magnético
h	constante de Planck
I_E	intensidade de radiação incidente
I_{E0}	intensidade de radiação incidente no instante $t=0s$
I_0	Intensidade de fluorescência (sem ocorrência da supressão)
I_{0i}	intensidade de fluorescência imediatamente após a excitação por um pulso de luz
K	constante de Boltzman
k_a	constante de velocidade do processo de absorção de fótons
k_H	constante de equilíbrio entre oxigénio gasoso e dissolvido (constante de Henry)
k_{IC}	constante de velocidade do processo de conversão interna
k_{ISC}	constante de velocidade do processo de cruzamento intersistemas

k_M	constante de velocidade de decaimento total
K_{NF}	constante de equilíbrio da formação do complexo não fluorescente
k_{nr}^S	constante de velocidade dos processos não radiativos
k_o	constante de difusão bimolecular
k_r^S	constante de velocidade do processo de fluorescência
k_S	constante de velocidade do mecanismo de supressão
K_{SV}	constante de Stern-Volmer
M_{dp}	momento de dipolo magnético
M	molécula no estado fundamental
M^*	molécula no estado excitado
M_E	factor de modulação da excitação
M_F	factor de modulação da fluorescência
M_M	massa molar
m_W	factor de desmodulação
N	número de Avogadro
N_0	número de fótons incidentes sobre um volume de amostra
P_1	pressão parcial de oxigénio de referência no sensor de zircónia
P_o	pressão parcial de oxigénio na amostra a medir no sensor de zircónia
p_{O_2}	pressão parcial do oxigénio atmosférico
Q	caudal volumétrico
R	constante universal dos gases perfeitos
R_c	raio de colisão (soma dos raios do fluoróforo e do supressor)
R_m	raio molecular
S	supressor
$S(\%)$	eficiência de supressão
T	temperatura absoluta
t	tempo
V	volume
V_C	tensão eléctrica entre os eléctrodos do sensor de zircónia

APD	fotodíodos de avalanche
BT11	filme de sol-gel com mistura BTEOS+TEOS na estequiometria 1:1
BT31	filme de sol-gel com mistura BTEOS+TEOS na estequiometria 3:1
BTEOS	isobutiltrietoxisilano
c.d.o	comprimento de onda
ET11	filme de sol-gel com mistura ETEOS+TEOS na estequiometria 1:1
ET31	filme de sol-gel com mistura ETEOS+TEOS na estequiometria 3:1
ETEOS	etiltrietoxisilano

LED	<i>light emitting diode</i>
LOD	limite de detecção
LP	passa alto
MLC	complexo metal-ligando
MLCT	transferência de carga entre o metal e o ligando
MS	complexo fluoróforo-supressor
MT11	filme de sol-gel com mistura MTEOS+TEOS na estequiometria 1:1
MT31	filme de sol-gel com mistura MTEOS+TEOS na estequiometria 3:1
MTEOS	metiltrietoxissilano
OD	oxigénio dissolvido
<i>Ormosil</i>	precursor organicamente modificado
OTEOS	octiltrietoxissilano
PDMS	polidimetil siloxano
PdOEPk	<i>palladium octaethylporphyrin ketone</i>
PEG	polietilenoglicol
PMMA	polimetil metacrilato
PMT	tubos fotomultiplicadores
ppbm	partes por bilião (escala curta: 1 parte em 10^9 partes; base mássica)
ppmm	partes por milhão (1 parte em 10^6 partes; base mássica)
PS	poliestireno
PT11	filme de sol-gel com mistura PTEOS+TEOS na estequiometria 1:1
PT31	filme de sol-gel com mistura PTEOS+TEOS na estequiometria 3:1
PTEOS	feniltrietoxissilano
PtOEPk	<i>platinum octaethylporphyrin ketone</i>
PVC	policloreto de vinilo
SNR	razão sinal/ruído
SP	passa baixo
SV	Stern-Volmer
TEOS	tetraetoxissilano
TMOS	tetrametoxissilano

ÍNDICE DE MATÉRIAS

I – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1. A MEDIÇÃO DE OXIGÉNIO	23
1.1. Introdução	23
1.2. Oxigénio dissolvido	25
1.3. Sensores de medição de oxigénio	27
1.3.1. Sensores electroquímicos	27
1.3.2. Sensores paramagnéticos	30
1.3.3. Sensores de zircónia	30
2. FLUORESCÊNCIA.....	33
2.1. Introdução	33
2.2. Transições electrónicas	35
2.3. Tempo de vida	39
2.4. Eficiência quântica da fluorescência	40
2.5. Desvio de <i>Stokes</i>	41
2.6. Técnicas de medição da fluorescência	42
2.6.1. Medição da intensidade em estado estacionário.....	42
2.6.2. Determinação do tempo de vida	43
2.7. Supressão da fluorescência	45
2.7.1. Supressão dinâmica da fluorescência.....	47
2.7.2. Supressão estática da fluorescência.....	49
2.7.3. Combinação da supressão estática e dinâmica	51
2.7.4. Supressão em sistemas heterógeneos	52
2.8. Fluoróforos	52
2.8.1. Complexos metal-ligando	55
2.9. Fotodegradação.....	57
3. O PROCESSO SOL-GEL.....	59
3.1. Introdução	59
3.2. Histórico	60
3.3. Aplicações.....	62
3.3.1. Materiais ópticos	63
3.3.2. Catalisadores	64

3.3.3.	Filmes	64
3.3.4.	Membranas	65
3.3.5.	Sensores químicos e biosensores	66
3.3.6.	Outras aplicações	66
3.4.	Processo Reaccional	67
3.5.	Gelificação	69
3.6.	Envelhecimento após a gelificação	70
3.7.	Secagem	71
3.8.	Parâmetros de controlo	73
3.8.1.	Natureza do precursor	74
3.8.2.	Razão molar água:precursor	75
3.8.3.	Tipo de solvente	76
3.8.4.	Catalisador	77
3.8.5.	Envelhecimento da Solução	78
3.9.	Formação de filmes	79
3.9.1.	Formação de filmes por imersão (<i>dip-coating</i>)	79
4.	SENSORES ÓPTICOS PARA A MEDIÇÃO DE OXIGÉNIO	81
4.1.	Introdução	81
4.2.	Componentes dos sensores ópticos químicos	81
4.2.1.	Fonte óptica	82
4.2.2.	Fotodetectores	83
4.2.3.	Fibras ópticas	83
4.3.	Classificação de sensores ópticos químicos	84
4.4.	Medição de oxigénio por luminescência	89
4.4.1.	Introdução	89
4.4.2.	Técnicas de medição de O ₂	90
4.4.3.	Parâmetros de sensibilidade	92
4.4.4.	Desvio à linearidade da equação de Stern-Volmer	93
4.4.5.	Tempo de resposta do sensor	94
4.5.	Escolha do fluoróforo	95
4.6.	Matriz de suporte do fluoróforo	98
4.7.	Temperatura	100
4.8.	Vantagens dos Sensores ópticos de oxigénio	101

II – PARTE EXPERIMENTAL

5. INTRODUÇÃO	103
6. CARACTERIZAÇÃO DOS FLUORÓFOROS	107
6.1. Complexos de ruténio	107
6.2. Metaloporfirinas.....	111
7. PRODUÇÃO DE FILMES DE SOL-GEL	115
7.1. Materiais	116
7.2. Protocolo de preparação da solução.....	116
7.3. Preparação do substrato de suporte.....	117
7.4. Produção de filmes por <i>dip-coating</i>	117
7.5. Produção de filmes com diferentes tempos de envelhecimento.....	118
8. MONTAGEM EXPERIMENTAL.....	121
8.1. Descrição geral	121
8.1.1. Descrição da montagem para determinação de intensidades	122
8.1.2. Descrição da montagem para determinação dos tempos de vida	123
8.2. Caracterização do LED	1233
8.3. Filtros ópticos	126
8.4. Construção da câmara de suporte de amostras.....	129
8.5. Atraso de fase da componente electrónica	137
9. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE SOL-GEL	139
9.1. Caracterização da hidrofobicidade dos filmes	139
9.1.1. Meios e métodos	139
9.1.2. Resultados experimentais	141
9.1.3. Conclusões	142
9.2. Avaliação da fotodegradação	143
9.2.1. Meios e métodos	143
9.2.2. Resultados e discussão	144
9.2.3. Conclusões	148
9.3. Ensaio de precisão e limite de detecção.....	148
9.3.1. Meios e métodos	149
9.3.2. Resultados e discussão	149
9.3.3. Conclusões.....	154
9.4. Avaliação da sensibilidade dos filmes	155

9.4.1.	Meios e métodos	156
9.4.2.	Resultados experimentais e discussão.....	156
9.4.3.	Conclusões	160
9.5.	Avaliação dos parâmetros de <i>Stern-Volmer</i>	161
9.5.1.	Meios e métodos	162
9.5.2.	Resultados experimentais.....	164
9.5.3.	Conclusões	176
9.6.	Tempos de resposta em meio gasoso	176
10.	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	179
10.1.	Conclusões.....	179
10.2.	Trabalho Futuro.....	181
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183
	ANEXOS	189
A –	Solubilidade do oxigénio (em mg.L ⁻¹) em meio aquoso a várias temperaturas e pressões.	189
B–	Tempos de vida medidos e valores da supressão obtidos para as famílias de filmes produzidos (T=24 °C).....	191

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Solubilidade do oxigénio em função da temperatura, à pressão atmosférica de 1 atm (Anexo A).	26
Figura 1.2 – Esquema da construção de um sensor amperométrico.	28
Figura 1.3 – Esquema da construção de um sensor de zircónia.	30
Figura 1.4 – Esquema da construção de um sensor paramagnético (adaptado de [13]).	32
Figura 2.1 – Processos de desactivação de uma molécula excitada (adaptado de [15]).	34
Figura 2.2 – Níveis de energia numa molécula de formaldeído e possíveis transições electrónicas (adaptado de [15]).	36
Figura 2.3 – Distinção entre o estado singleto e tripleto para o caso da molécula de formaldeído (adaptado de [15]).	36
Figura 2.4 – Diagrama Perrin-Jablonski com exemplos dos vários mecanismos de absorção e desexcitação. S_0 , S_1 e S_2 – estados electrónicos singleto; T_1 , T_2 – estados electrónicos tripleto; IC – conversão interna; ISC – cruzamento intersistemas (adaptado de [15]).	37
Figura 2.5 – Representação das taxas de ocorrência dos vários processos de desexcitação (adaptado de [15]).	39
Figura 2.6 – Representação do desvio de Stokes [15].	41
Figura 2.7 – Decaimento da fluorescência após um pulso de excitação (escala logarítmica) do triptófano [18].	44
Figura 2.8 – Fase do sinal de excitação e de fluorescência.	44
Figura 2.9 – Esquema simplificado do mecanismo da supressão intermolecular (adaptado de [15]).	46
Figura 2.10 – Comparação entre a supressão dinâmica e estática (adaptado de [21]).	51
Figura 2.11 – Orbitais dos complexos metal-ligando (adaptado de [21]).	55
Figura 2.12 – Diagrama de Jablonski para um MLC (adaptado de [21]).	56
Figura 2.13 – Estados de energia tripletos para vários MLC's (adaptado de [21]).	56
Figura 2.14 – Espectros de absorção de complexos de ruténio: (1) $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, (2) $[Ru(bpy)_2(dpp)]^{2+}$, (3) $[Ru(bpy)(dpp)_2]^{2+}$, (4) $[Ru(dpp)_3]^{2+}$ [27].	57
Figura 3.1 – a) Pintura na gruta de Lascaux, França. b) “The tower of Babel” pintada por Pieter Bruegel, ca. 1556.	60
Figura 3.2 – Viscosidade de filmes de sol-gel preparados com diferentes razões água/TEOS (adaptado de [57]).	69
Figura 3.3 – Sinérese de um gel [59].	70
Figura 3.4 – Formação de tensões nos poros durante o processo de secagem: a) antes e b) após a formação de forças capilares (adaptado de [60]).	72
Figura 3.5 – Caminho funiculares de difusão do líquido para o exterior dos poros (adaptado de [34]).	72
Figura 3.6 – Formação de fissura na superfície do material. R- região com contracção livre, C- região sob tensão (adaptado de [34]).	73
Figura 3.7 – Influência da razão água/TEOS no tempo de gelificação para diferentes quantidades de etanol (adaptado de [57]).	76
Figura 3.8 – Diagrama de fases ternário de solubilidade do sistema Água+Álcool+TEOS (adaptado de [34]).	77

Figura 3.9 – Tipos de matérias formados a partir do sol-gel (adaptado de [65]).	79
Figura 3.10 – Passos de formação de filmes por <i>dip-coating</i> (adaptado de [34]).	80
Figura 3.11 – Detalhe das linhas de fluxo de escoamento da solução sol-gel. S- ponto de estagnação (adaptado de [34]).	80
Figura 4.1 – Funcionamento genérico de um sensor óptico químico (adaptado de [70]).	82
Figura 4.2 – Constituição de uma fibra óptica.	84
Figura 4.3 – Classificação de sensores quanto ao tipo de suporte do elemento sensor (adaptado de [69]).	84
Figura 4.4 – Configurações de fibras ópticas utilizadas em sensores químicos: a) fibra óptica, b) fibra óptica com revestimento removido, c) fibra óptica com deposição lateral, d) transmissão de luz no terminal de um feixe de fibra óptica, e) transmissão de luz através de fibras ópticas, f) configuração em forma de U, g),h) e i) revestimento da ponta da fibra óptica com filme sensor [69].	85
Figura 4.5 – Terminal sensor de uma fibra óptica para espectrofotometria.	86
Figura 4.6 – Configuração óptica para a medição de oxigénio gasoso, através da fluorescência: A,B,C-lentes, D-filtro passa-baixo, E- filtro passa-alto, F- fibra óptica com revestimento do elemento sensor, P.D- detector de fase (adaptado de [71]).	86
Figura 4.7 – Fibra óptica com a configuração tipo “agulha”, com filme sensor depositado na ponta (fluorescência laranja) [72].	87
Figura 4.8 – Transmissão da radiação ao elemento sensor por evanescência das ondas guiadas através do substrato plano (SP) [69].	88
Figura 4.9 – Configuração óptica com a excitação através do substrato e a captação de fluorescência externa [74].	88
Figura 4.10 – Configuração óptica com a excitação e captação de fluorescência externo ao substrato [75].	88
Figura 4.11 – Processo de supressão de um fluoróforo na presença de oxigénio [77].	89
Figura 4.12 – Determinação da constante de tempo de t_{90} de um sensor por análise gráfica.	94
Figura 4.13 – Estrutura molecular do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$.	97
Figura 6.1 – Espectro de absorção do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ utilizado na produção de filmes.	107
Figura 6.2 – Espectros de excitação e emissão do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$.	108
Figura 6.3 – Variação da fluorescência do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ com a temperatura.	109
Figura 6.4 – Espectros do LED e emissão fluorescente em meio gasoso nitrogenado e arejado.	110
Figura 6.5 – Espectros do LED e emissão fluorescente em meio gasoso nitrogenado e arejado (modificação de escala da figura 6.4).	110
Figura 6.6 – a) Espectro de absorção das metaloporfirinas PdOEPK e PtOEPK em CHCl_3 ; espectros de excitação e emissão das metaloporfirinas b) PtOEPK e c) PdOEPK, em CHCl_3 , meio arejado e a T_{ambiente} .	112
Figura 6.7 – Resposta luminescente: a) PdOEPK, e (b) PtOEPK em atmosfera de azoto. A banda de valor mais elevado, centrado em 590 nm, corresponde a fonte de excitação (LED âmbar).	113
Figura 7.1 – a) Filme PTEOS+TEOS (1:1) de qualidade aceitável; b) Filme de BTEOS puro de qualidade não aceitável.	115
Figura 7.2 – Equipamento utilizado para o processo de <i>dip-coating</i> .	118
Figura 7.3 – Diferença entre dois filmes de sol-gel MTEOS:TEOS (3:1) marcados com $\text{Ru}(\text{dpp})_3\text{Cl}_2$, produzidos por <i>dip-coating</i> , com 125 h (a) e 240 h (b) de tempo de envelhecimento.	119

Figura 8.1 – Montagem experimental para medições em meio aquoso de a) intensidade, e b) tempos de vida.	121
Figura 8.2 – Espectro de radiação do LED azul utilizado.	124
Figura 8.3 – Dispersão angular do LED (tipo <i>lambertian</i>) utilizado como fonte de radiação [119].....	125
Figura 8.4 – Acoplamento da lente de concentração com o LED [120].....	125
Figura 8.5 – a) LED, b) Acoplamento da lente no LED montado em dissipador de calor, c) Bloco que suporta a fonte de radiação (à esquerda) e o fotodetector (à direita).....	126
Figura 8.6 – Espectro da luz ambiente do laboratório a) não filtrada b) filtrada abaixo dos 550 nm.....	127
Figura 8.7 – Espectros obtidos utilizando apenas a reflexão de LED e o sinal fluorescente com várias combinações de filtros.....	127
Figura 8.8 – Espectros obtidos utilizando apenas a reflexão do LED e o sinal fluorescente com várias combinações de filtros (escala modificada da fig. 8.7).....	128
Figura 8.9 – Transmitância do filtro FESO500 da <i>Thorlabs</i> [E03].	128
Figura 8.10 – Caixa de suporte de amostras.	129
Figura 8.11 – Variação da distância entre a lâmina e o <i>bundle</i> de fibras ópticas.....	131
Figura 8.12 – Variação da intensidade fluorescente com a distância entre a lâmina e o <i>bundle</i> de fibras ópticas.	131
Figura 8.13 – Intensidade da radiação azul captada pelo fotodetector devida à reflexão no substrato de vidro.....	132
Figura 8.14 – Posição da lâmina nos ensaios de estudo do ângulo de incidência.....	132
Figura 8.15 – Estudo da intensidade de fluorescência com o ângulo de incidência.	133
Figura 8.16 – Propriedades angulares da luminescência irradiada por um fluoróforo depositado num substrato de vidro em a) ar e, b) água. As linhas a cheio representam a distribuição espacial da luminescência, e a tracejado os ângulos supercríticos em que l_s =filme, a_s =ar e w =água [122].	133
Figura 8.17 – Saída da luminescência do substrato com um ângulo preferencial.	134
Figura 8.18 – Razão entre a intensidade de fluorescência e reflexão azul em função do ângulo de incidência.	135
Figura 8.19 – Variação da posição relativa entre a lâmina e o <i>bundle</i>	135
Figura 8.20 – Variação da intensidade com a posição relativa entre a lâmina e o <i>bundle</i>	136
Figura 8.21 – Variação da razão de fluorescência, com a posição relativa entre a lâmina e o <i>bundle</i>	136
Figura 8.22 – Atraso de fase correspondente aos elementos electrónicos e percurso óptico em função da frequência.....	137
Figura 9.1 – Equipamento utilizado na determinação dos ângulos de contacto dos filmes produzidos.	140
Figura 9.2 – Deposição de gota sobre o filme sol-gel para determinação do ângulo de contacto do filme ET31.	141
Figura 9.3 – Representação gráfica da variação do ângulo de contacto de cada filme em função do tempo de envelhecimento da solução de sol-gel.....	142
Figura 9.4 – a) Variação do sinal de intensidade em meio gasoso: b) nitrogenado, e c) arejado, com o tempo de exposição à radiação de excitação.....	145
Figura 9.5 – Variação da supressão com o tempo de exposição à radiação.	146
Figura 9.6 – Variação da fase em meio arejado e nitrogenado com o tempo de exposição: a) ciclos ar/N ₂ , b) meio arejado, c) meio nitrogenado.	147
Figura 9.7 – Medição da fase em ciclos ar/nitrogénio para o filme BT11D.....	150

Figura 9.8 – Curva de calibração para meio gasoso do filme BT11D (2 pontos).....	151
Figura 9.9 – Atraso de fase lido para o filme BT11D, durante um ciclo de mudança da concentração de oxigénio do meio aquoso	152
Figura 9.10 – Medição da fase em ciclos alternados de meio aquoso arejado e nitrogenado para o filme BT11 (95h).....	153
Figura 9.11 – Curva de calibração para meio aquoso do filme BT11D (2 pontos).....	154
Figura 9.12 – Relação linear entre a $\tan(\phi)$ e a frequência.	157
Figura 9.13 – Valores da supressão obtidos em meio aquoso arejado e nitrogenado para filmes com diferentes tempos de envelhecimento.....	158
Figura 9.14 – Valores da supressão obtidos em meio gasoso arejado e nitrogenado para filmes com diferentes tempos de envelhecimento.....	158
Figura 9.15 – Disposição do equipamento e instrumentação utilizados na determinação dos parâmetros de <i>Stern-Volmer</i> : A- vaso com água; B- caixa de suporte de amostras; C- bomba peristáltica; D- dispositivo para remoção de bolhas; E- agitador; F- LED; G- fotodetector; H- <i>Lock-in</i> ; I- Fonte de alimentação do LED; J- Gerador de funções; M-Controlador de caudais de gases de borbulhamento e temperatura; N- Visualização para registo de resultados.....	162
Figura 9.16 – Remoção de bolhas de ar no fluxo de água que entra na caixa de suporte de amostras.....	163
Figura 9.17 – Medições de fase efectuadas a diferentes concentrações para a lâmina BT11J.	165
Figura 9.18 – Fases medidas para a componente electrónica e meio aquoso nitrogenado, para o filme BT11J.	165
Figura 9.19 – Variação da fase com a frequência (filme BT11J).	166
Figura 9.20 – Diferença de fase entre os meios aquosos nitrogenados, arejado e oxigenado, para diferentes frequências de modulação (filme BT11J).	166
Figura 9.21 – Tangente da fase (ϕ) em função da frequência de modulação, para o filme BT11J.	167
Figura 9.22 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> para os filmes testados em meio aquoso.....	170
Figura 9.23 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> para os filmes testados em meio aquoso, na gama de 0 – 7.5 mg.L ⁻¹	170
Figura 9.24 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> para os filmes testados em meio aquoso, na gama de 7.5 – 35.7 mg.L ⁻¹	171
Figura 9.25 – Variação do tempo de vida com a concentração de oxigénio em meio gasoso, para o filme BT11.	172
Figura 9.26 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> para os filmes testados em meio gasoso.	172
Figura 9.27 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> para os filmes testados em meio gasoso, na gama de 0 – 21%.	173
Figura 9.28 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> para os filmes testados em meio gasoso, na gama de 21 - 100%.	173
Figura 9.29 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> obtidas em meio gasoso para o filme BT11J, através da determinação da razão de fases e da razão de tempos de vida, no intervalo de 0-21% de oxigénio.....	174
Figura 9.30 – Curvas de <i>Stern-Volmer</i> obtidas em meio gasoso para o filme BT11, através da determinação da razão de fases e da razão de tempos de vida, no intervalo de 21-100 % de oxigénio.....	175
Figura 9.31 – Avaliação do tempo de resposta do filme ET11, na passagem de 2.1% para 4.2% de O ₂	177

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Exemplos de aplicação onde ocorre a medição da concentração oxigênio [11].	24
Tabela 1.2 – Susceptibilidade magnética de alguns gases constituintes do ar atmosférico [15].	32
Tabela 2.1 – Os vários tipos de luminescência.	33
Tabela 2.2 – Tempos característicos para os processos de absorção e desexcitação [22].	38
Tabela 2.3 – Principais processos fotofísicos responsáveis pela supressão [22].	46
Tabela 3.1 – Constantes cinéticas de hidrólise para diferentes precursores [42].	74
Tabela 4.1 – Propriedades fotofísicas de fluoróforos utilizados na medição da concentração de oxigênio [12, 34].	96
Tabela 7.1 – Composição das soluções de sol-gel.	116
Tabela 7.2 – Tempos de envelhecimento dos filmes produzidos para cada solução (todos os valores em horas).	119
Tabela 9.1 – Desvios nas medições de $[O_2]$ utilizando a equação de <i>Stern-Volmer</i> (com base nas intensidades), após 60 min de exposição contínua à fonte de radiação.	146
Tabela 9.2 – Desvios nas medições de $[O_2]$ utilizando a equação de <i>Stern-Volmer</i> (com base nas fases), após 110 min de exposição contínua à fonte de radiação.	148
Tabela 9.3 – Desvio padrão da fase obtido numa sequência de ciclos ar/nitrogênio em meio gasoso.	151
Tabela 9.4 – Desvio padrão da fase obtido numa sequência de ciclos ar/nitrogênio em meio aquoso.	153
Tabela 9.5 – Aumento percentual da supressão entre os filmes com menor e maior tempo de envelhecimento.	159
Tabela 9.6 – Tempos de envelhecimento das amostras testadas.	161
Tabela 9.7 – Tempos de vida e diferenças de tempo de vida determinados para os filmes de sol-gel.	167
Tabela 9.8 – Frequências utilizadas nos ensaios e frequências ótimas teóricas, determinadas pelos tempos de vida.	168
Tabela 9.9 – Valores da constante de <i>Stern-Volmer</i> obtidos em meio aquoso.	171
Tabela 9.10 – Valores da constante de <i>Stern-Volmer</i> obtidos em meio gasoso.	174
Tabela 9.11 – Constantes de <i>Stern-Volmer</i> em meio gasoso, obtidas pela medição da fase a uma frequência ótima e diferenças percentuais relativamente aos obtidos pela medição dos tempos de vida.	175
Tabela 9.12 – Tempos de resposta obtidos para as variações de $\%O_2$ (ET11).	178

I - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1. A MEDIÇÃO DE OXIGÉNIO

1.1. INTRODUÇÃO

O oxigénio é uma das espécies químicas mais abundantes e importantes na natureza. A sua importância deriva do facto de ser extremamente reactivo, pois forma compostos com quase todos os elementos excepto os gases raros, ouro e platina.

Na sua forma molecular (O_2), é um gás incolor à temperatura ambiente e constitui cerca de 20.95% da atmosfera terrestre. Tem a particularidade de ser inodoro, comburente (mas não combustível), pouco solúvel na água e paramagnético. Participa num vasto número de reacções químicas e bioquímicas, quer como reagente, quer como produto da reacção [1].

O oxigénio é indispensável para a sustentabilidade da vida na terra pois participa de forma importante no ciclo de energia dos seres vivos, sendo essencial na respiração das células aeróbias.

Para além de ser fundamental em processos naturais, o oxigénio é também utilizado nas mais variadas aplicações ao nível industrial, medicinal, ambiental, alimentar, etc. A determinação exacta da concentração de oxigénio em meio gasoso ou aquoso é da mais elevada importância, de forma a identificar alterações no meio que resultam de fenómenos naturais ou da actividade humana.

Dado o elevado número de exemplos que poderiam ser recolhidos e que testificam a importância da medição de concentrações exactas de O_2 , são listadas na Tabela 1.1 algumas das aplicações mais comuns nas diversas áreas. Consideremos com mais detalhe alguns exemplos onde a medição da concentração de oxigénio é determinante.

A medição da concentração de oxigénio tem sido fundamental na estratégia de controlo da poluição em sistemas que envolvem a combustão, tais como os motores de combustão interna dos automóveis, caldeiras industriais, indústrias cimenteiras, centrais termoeléctricas, etc [2]. Nestes casos é importante o fornecimento de uma mistura com um valor preciso da razão combustível/ar, de forma a garantir uma boa eficiência na obtenção da energia dos combustíveis, evitar a formação e envio para a atmosfera de poluentes nocivos e ainda por questões de segurança.

Tabela 1.1 – Exemplos de aplicações onde ocorre a medição da concentração oxigénio [3].

Área	Aplicação
Medicina	
Análise de sangue	Medições não invasivas Sistemas de monitorização contínua
Ventiladores	Controlo dos ciclos de respiração
Salas de operação	Mistura gasosa O ₂ -N ₂
Ambiente	
Águas de superfície e subterrâneas	Monitorização da poluição Sistemas de tratamento de efluentes
Águas municipais	
Processos Industriais	
Químicos	<i>Cracking</i> do petróleo
Biológicos	Fermentação
Centrais nucleares	Monitorização da água de arrefecimento
Caldeiras	Controlo da corrosão
Alimentar	Carbonatação de bebidas, embalagem, controlo de processos
Fornecimento de gases	Produção de O ₂
Segurança	
Ocupacional	Minas, túneis, silos e poços
Edifícios	Qualidade do ar interior
Inertização	Controlo de explosões
Transportes	
Emissões de gases auto	Sensores de exaustão
Aeronáutica	Controlo da qualidade do ar interior
Segurança de navios	Controlo ambiental e de explosões
Transporte de bens perecíveis	Monitorização de contentores
Outros	
Aquários	Tanques de peixes, aquacultura

Na medicina, os níveis de oxigénio no ar exalado ou no sangue de um paciente, constituem parâmetros fisiológicos fundamentais que devem ser monitorizados continuamente em algumas situações [4].

Na área ambiental, mais especificamente no tratamento de águas residuais, são utilizados tanques de arejamento onde é mantida em suspensão uma comunidade de microrganismos aeróbios com o objectivo de metabolizar a matéria orgânica que aí chega. Os microrganismos metabolizam e

reproduzem-se sob condições ambientais óptimas, onde se inclui o nível de oxigénio dissolvido (OD) na água. Devido ao carácter oxidante do oxigénio e a carga orgânica teste tipo de águas, os níveis de oxigénio são normalmente baixos pelo que é necessário um fornecimento de oxigénio suplementar através do arejamento em difusores colocados no fundo do tanque, ou através de agitação mecânica. Se a concentração de OD for demasiado baixa, resultará na morte dos microrganismos e consequente tratamento inadequado das águas. Por outro lado, um nível elevado de OD resultante do arejamento excessivo significa que está a ser desperdiçada energia. Adicionalmente, podem proliferar outro tipo de organismos indesejados [5].

Na área alimentar temos o exemplo da carbonatação de cervejas. A carbonatação é obtida por um processo natural de fermentação em que o açúcar é transformado em álcool, ou então por injeção artificial de dióxido de carbono no líquido. A presença de oxigénio neste processo, para além de diminuir a eficiência da carbonatação, conduz a alterações das propriedades da cerveja, nomeadamente a cor, aparência e sabor, através de reacções indesejáveis [6].

Em processos biológicos onde ocorre uma fermentação, a monitorização de OD durante a realização de uma cultura de células fornece uma informação valiosa sobre o metabolismo e saúde das células [4]. Valores de OD diferentes do desejado, normalmente resultam na morte das células devido a anóxia (défice de oxigénio) ou toxicidade por excesso de oxigénio [7].

Nos exemplos apresentados, não foi feita a distinção entre a medição de oxigénio gasoso ou oxigénio dissolvido. No próximo subcapítulo será explicado a relação entre estes dois parâmetros.

1.2. OXIGÉNIO DISSOLVIDO

O oxigénio dissolvido (OD) corresponde ao oxigénio solubilizado em água, sendo normalmente expresso em mg/L ou ppm (partes por milhão em base mássica). A medição de OD adquire especial importância em meios naturais onde os níveis deste parâmetro são indicativos de um maior ou menor grau de poluição, em processos de controlo no tratamento de águas residuais, processos fermentativos, etc.

A concentração de OD em meio aquoso depende da solubilidade do oxigénio em água, e de outros factores tais como a temperatura, pressão e presença de iões.

A baixa solubilidade do oxigénio na água resulta do facto de este ser formado por uma molécula apolar e como tal, ter baixa interacção molecular com a molécula de H₂O que é polar. Em sistemas naturais, o oxigénio dissolvido em meio aquoso pode ter origem na fotossíntese e no ar atmosférico. A dissolução do oxigénio a partir do ar atmosférico é dada pela seguinte equação química:



O equilíbrio nesta equação é regulado pela constante de equilíbrio, k_H , fornecida pela lei de Henry que estipula que:

“A solubilidade de um gás dissolvido num líquido é proporcional à pressão parcial do gás em equilíbrio com o líquido”

A constante de equilíbrio k_H é dada por:

$$k_H = [O_2(aq)]/p_{O_2} \quad \text{Eq. 1.1}$$

em que p_{O_2} corresponde à pressão parcial do oxigénio atmosférico.

Num meio aquoso natural à pressão atmosférica (1 atm – ao nível do mar) e a 25°C, a constante de Henry para o O_2 tem o valor de $1.27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ [8] e a composição atmosférica do oxigénio é de 20.95% resultando em $p_{O_2} = 0.2095 \text{ atm}$. Nestas condições a concentração de oxigénio dissolvido é dada por:

$$[O_2(aq)] = p_{O_2} \times k_H = 0.2095 \times 1.27 \times 10^{-3} = 2.65 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

Dada a massa molar do oxigénio molecular ($M_{O_2} = 32 \text{ g/mol}$), a concentração anterior é convertida para 8.5 mg/L. O OD calculado apresentará um valor diferente caso a pressão atmosférica absoluta seja diferente, como se verifica em sistemas a diferente altitude do nível do mar.

Outro factor de elevada influência no valor de OD é a temperatura. A solubilidade dos gases em água sofre uma forte diminuição com o aumento da temperatura. Por exemplo, no caso do oxigénio à pressão atmosférica, verifica-se uma variação de 14.6 mg/L a 0°C para menos de metade a 40°C (6.4 mg/L). A Figura 1.1 ilustra esta dependência.

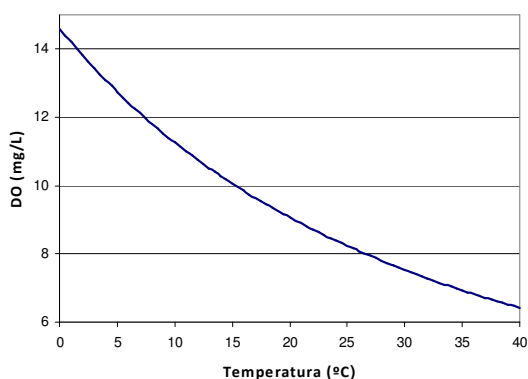


Figura 1.1 – Solubilidade do oxigénio em função da temperatura, à pressão atmosférica de 1 atm (Anexo A).

Ainda outro factor que altera a solubilidade do oxigénio na água é a presença de iões, como acontece por exemplo em águas salinas.

1.3. SENSORES DE MEDIÇÃO DE OXIGÉNIO

O primeiro método desenvolvido para a determinação de oxigénio dissolvido, foi reportado em 1888 por L.W.Winkler. Este é um método titrimétrico [9] baseado num conjunto de reacções e do qual se conseguem obter medições precisas, se forem realizadas com um bom controlo do pH. No entanto, este método é susceptível a erros grosseiros se estiverem presentes iões na amostra (ex. Fe^{2+} e SO_3^{3-}), sólidos suspensos ou alguns compostos orgânicos, razão pela qual o método tem sofrido modificações ao longo do tempo para minimizar estas interferências. Para além disso, este método é trabalhoso e moroso o que torna inviável a sua utilização em medições locais ou como método para monitorização em tempo real. Adicionalmente, este método apenas é adequado para medição de oxigénio em meios aquosos, não podendo ser utilizado para medição de oxigénio gasoso.

Em 1922, Heyrovsky's desenvolveu a primeira técnica electroquímica para medição de OD com base na redução do oxigénio num eléctrodo gotejante de mercúrio [10]. Nas décadas seguintes, muitos outros sensores de oxigénio foram desenvolvidos utilizando vários materiais e configurações na aplicação de técnicas electroquímicas, com destaque para o eléctrodo de Clark patenteado em 1956. Simultaneamente, devido ao desenvolvimento de novas técnicas de análise, foram desenvolvidos métodos de determinação de oxigénio gasoso baseados em cromatografia gasosa, espectrometria de massa e ressonância paramagnética [3].

A monitorização da concentração de oxigénio, fundamental no controlo de alguns processos, só é possível recorrendo a técnicas de medição em tempo real, na forma de sensores.

Os principais tipos de sensores baseados na transdução da concentração ou pressão parcial de oxigénio num sinal eléctrico e que actualmente são utilizados na medição de oxigénio gasoso e dissolvido são resumidamente descritos.

Recentemente, uma nova abordagem para medição de oxigénio envolve a transdução a partir da variação das propriedades de luminescência de um indicador (fluoróforo). Este tipo de metodologia é adequado para a aplicação de elementos ópticos, tais como as fibras ópticas. Os sensores ópticos para medição de oxigénio serão abordados de forma mais detalhada no capítulo 4, pois o sensor construído neste trabalho pertence a essa categoria. Previamente a esse capítulo, serão abordados os aspectos teóricos de fluorescência (cap. 2) e produção de filmes sol-gel (cap.3), que estão na base do sensor desenvolvido nesta tese.

1.3.1. SENSORES ELECTROQUÍMICOS

Estes sensores são constituídos por células electroquímicas que convertem energia química em energia eléctrica, ou vice-versa. As células são formadas por dois eléctrodos metálicos (ânodo e

cátodo) e uma fase iónica condutora (electrólito) no estado sólido ou no estado líquido.

1.3.1.1. Amperométricos

Os sensores amperométricos (ou polarográficos) mais conhecidos são os eléctrodos de Clark, constituídos por um cátodo de platina e um ânodo de prata mergulhados num electrólito (ex. KCl). O volume constituído pelos eléctrodos e electrólito está separado do meio em análise por uma membrana porosa (ex. teflon) permeável ao oxigénio, mas que impede que o electrólito saia (Figura 1.2). Quando o sensor é mergulhado na solução onde se pretende conhecer a concentração de oxigénio, este último difunde-se através da membrana para o electrólito, ficando em equilíbrio com este.

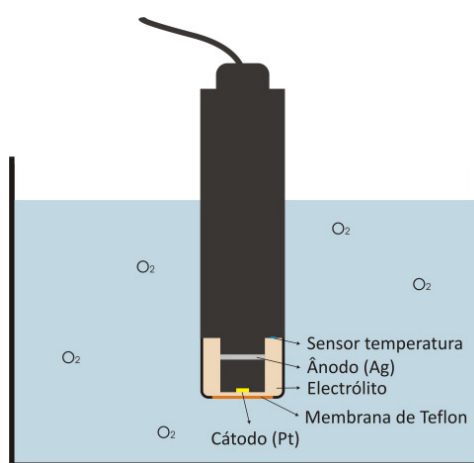
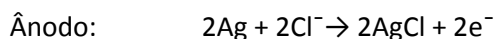
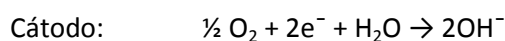


Figura 1.2 – Esquema da construção de um sensor amperométrico.

Após a polarização da célula com uma tensão entre os eléctrodos de 700 mV, o oxigénio existente no electrólito é reduzido a iões hidróxido gerando assim uma corrente eléctrica de intensidade proporcional à concentração de oxigénio no meio [2].

As reacções que ocorrem nos eléctrodos são as seguintes:



Estes sensores incluem um termistor que permite compensar a temperatura. A compensação é necessária uma vez que a solubilidade do oxigénio em meio aquoso diminui com a temperatura, mas também porque um aumento de temperatura aumenta a permeabilidade da membrana ao oxigénio, com um conseqüente aumento da taxa de difusão. Estes sensores podem ser utilizados para medições em meio gasoso e aquoso.

Para a medição de oxigénio dissolvido, tem sido utilizada nos últimos anos a célula polarográfica de Clark como técnica principal, no entanto existem algumas limitações na sua utilização. As grandes desvantagens dos eléctrodos de Clark são o consumo de oxigénio e a formação de AgCl que se deposita no eléctrodo de prata, reduzindo progressivamente a área de reacção. Outras limitações estão relacionadas com:

Estabilidade a longo prazo – o electrólito da célula de Clark é eventualmente consumido ao longo do tempo. A utilização contínua destes sensores resulta num desvio progressivo do sinal eléctrico para uma determinada concentração de oxigénio.

Dependência do fluxo – uma vez que os eléctrodos consomem oxigénio, as medições dependem da difusão de oxigénio através da membrana. No caso de amostras sem agitação a concentração de oxigénio junto da membrana será reduzida à medida que o consumo de oxigénio ocorre, resultando numa diminuição do fluxo de moléculas de oxigénio que chega ao eléctrodo. Estes sensores são dependentes de uma renovação constante da amostra junto à membrana de forma a minimizar os erros na leitura.

Tempo de resposta – os tempos de resposta equivalentes a uma variação de 90% do sinal medido, são na ordem dos 30 segundos. Quando o fenómeno em estudo é transiente, tal como a medição de taxas de respiração em células suspensas, a medição de OD com tempos de resposta curtos é necessária.

Sensibilidade – tipicamente a razão sinal-ruído é muito reduzida para medições de concentração baixas, sendo esta uma situação crítica em algumas aplicações.

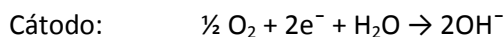
Interferência eléctrica – quando as medições resultam em sinais eléctricos de baixo valor, é bastante provável a interferência de sinais ruído externos resultantes de correntes *ground loop* ou a interferência de outros sensores electroquímicos (ex. sensor de pH).

Alguns dos problemas relacionados com os sensores de Clark têm solução. Por exemplo, a utilização de membranas de maior espessura diminui a dependência do fluxo da amostra, mas por outro lado aumenta o tempo de resposta e diminui a exactidão da leitura. A maior parte das soluções comerciais são um compromisso entre as várias características [11].

1.3.1.2. Potenciométricos

O princípio de funcionamento destes sensores baseia-se no funcionamento de uma célula galvânica, em que uma corrente eléctrica é formada a partir de uma reacção que ocorre entre dois eléctrodos mergulhados num electrólito. A diferença entre estes sensores e os amperométricos é que estes não necessitam de uma polarização dos seus eléctrodos para que as reacções electroquímicas ocorram.

Os materiais utilizados nos eléctrodos, assim como a sua forma, são diferentes. O ânodo (ex. Pb, Cd, etc.) deverá ter uma massa elevada e o cátodo (ex. Ag) uma área superficial de exposição ao oxigénio também elevada. As reacções que ocorrem nos eléctrodos são:



Os electrões necessários para que a reacção ocorra no cátodo viajam a partir do ânodo através de um circuito externo, cuja intensidade de corrente depende da concentração de oxigénio. O potencial no cátodo é determinado pela escolha do material no ânodo, que deverá ser suficientemente electronegativo. De forma geral, o sinal de saída do sensor é uma medida da tensão eléctrica de uma resistência colocada entre os dois eléctrodos. Tal como para os sensores amperométricos, estes também necessitam de uma compensação de temperatura e também podem ser utilizados para medições em meio gasoso e aquoso.

1.3.1.3. Sensores de zircónia

Estes sensores são dos mais utilizados para a medição de oxigénio gasoso, com destaque para a medição nos gases de exaustão dos automóveis. Este sensor é do tipo electroquímico, em que o electrólito está no estado sólido ao contrário dos referidos anteriormente. O electrólito utilizado é a zircónia que actua como isolante térmico quando está frio, mas adquire as características de um material semiconductor a temperaturas elevadas (tipicamente acima dos 600°C). Quando a temperatura do gás a analisar não atinge os 600°C, o sensor tem um dispositivo de aquecimento que permite manter a temperatura da zircónia acima do valor limite que a faz comportar como electrólito [12].

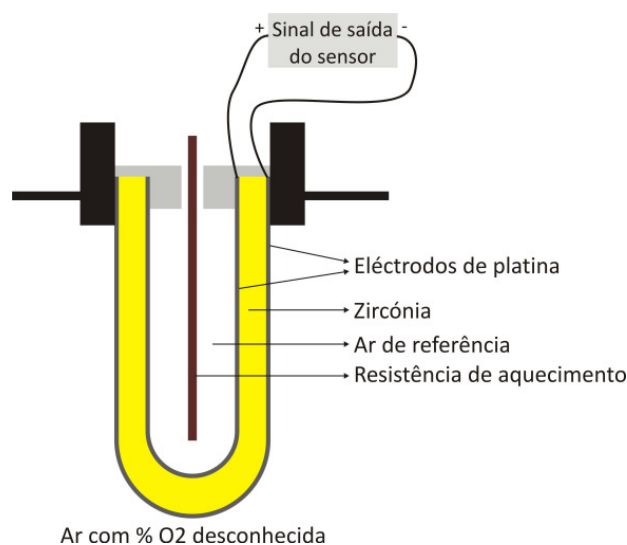


Figura 1.3 – Esquema da construção de um sensor de zircónia.

Conforme ilustra a Figura 1.3, a zircónia é revestida interna e externamente por eléctrodos de platina porosos. O eléctrodo interior está em contacto com ar que tem uma concentração de referência, enquanto o eléctrodo exterior está em contacto com o gás que se pretende conhecer a concentração de oxigénio. A diferença da concentração de oxigénio existente entre os dois lados do eléctrodo associada às propriedades do electrólito origina um fluxo de iões de oxigénio de um eléctrodo para o outro gerando uma pequena tensão eléctrica. A tensão eléctrica (V_c) gerada entre os eléctrodos é dada pela equação de Nernst:

$$V_c = (RT/4F) \ln(P_o/P_1) \quad \text{Eq. 1.2}$$

em que:

T- temperatura absoluta (K)

F – constante de Faraday ($F= 96493 \text{ Cmol}^{-1}$)

R – constante universal dos gases perfeitos ($R=8.314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

P_o e P_1 - pressões parciais do O_2 na amostra a medir (exterior) e de referência (interior)

1.3.2. SENSORES PARAMAGNÉTICOS

Apesar do uso intensivo dos sensores electroquímicos para a medição da concentração de oxigénio, os sensores paramagnéticos constituem uma boa alternativa quando se trata de medir oxigénio gasoso.

Os materiais podem ser caracterizados quanto à sua susceptibilidade magnética, que é definido como o grau de magnetização de um material em resposta à aplicação de um campo magnético.

A susceptibilidade magnética volumétrica (χ_v) relaciona-se com o momento de dipolo magnético (M_{dp} , amperes/metro) e a força do campo magnético (H, amperes/metro):

$$M_{dp} = \frac{\chi_v M_M}{\rho} H \quad \text{Eq. 1.3}$$

em que M_M é a massa molar (kg.mol^{-1}) e ρ a massa volúmica (kg.m^{-3}) do material.

Se o valor de χ_v for positivo o material é classificado de paramagnético e a intensidade do campo magnético é aumentada na presença do material. Se o valor for negativo, o material é classificado de diamagnético e o campo magnético é enfraquecido na presença do material. Quanto maior a susceptibilidade do material, maior a tendência que os dipolos das moléculas têm de se alinhar paralelamente a um campo magnético externo. O oxigénio é um dos poucos gases que apresenta elevada susceptibilidade magnética, como se observa na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Susceptibilidade magnética de alguns gases constituintes do ar atmosférico [8].

Gás	O ₂	N ₂	H ₂	CO ₂	Ne	Ar	CH ₄
χ (cm ³ mol ⁻¹ .10 ⁻⁶)	+3449	-12	-4	-21	-7	-19	17

Um exemplo de um sensor paramagnético pode ser encontrado na Figura 1.4.

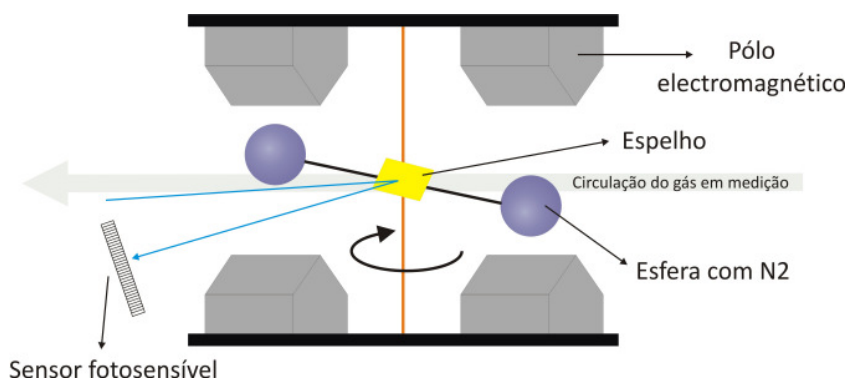


Figura 1.4 – Esquema da construção de um sensor paramagnético (adaptado de [13]).

O sensor é constituído por pólos magnéticos que criam um forte campo magnético numa zona onde estão colocadas esferas de quartzo com N₂. As esferas estão ligadas a um eixo (fio de sílica) com liberdade de rotação horizontal e onde existe um pequeno espelho montado. Quando o oxigénio entra na zona de medição do sensor e fica sujeita ao campo magnético, as moléculas ficam orientadas com os dipolos paralelos ao campo magnético fazendo com que este aumente. Daqui resulta um afastamento da esfera da sua posição central original, até que a força magnética iguale o módulo de rigidez do fio. Quanto maior a concentração de oxigénio, maior o campo magnético, logo maior será o afastamento das esferas. Um sistema de controlo coloca as esferas na sua posição original por meio de uma força aplicada por uma corrente eléctrica. A intensidade da corrente necessária para equilibrar novamente a posição das esferas, constitui uma medida da concentração de oxigénio da amostra em análise. A medição da posição das esferas é possível através da posição de um raio de luz que incide no espelho central e é reflectido sobre um sensor fotosensível. Este sensor apresenta a desvantagem de ser mecanicamente sensível [14]. Na presença de outros gases paramagnéticos (ex. NO, NO₂) as medições são afectadas de erro.

2. FLUORESCÊNCIA

2.1. INTRODUÇÃO

A luminescência é a emissão de luz ultravioleta, visível ou infravermelha, de uma espécie química a partir de um estado excitado resultante de um estímulo de luz, de uma reacção química ou de radiação ionizante.

A palavra luminescência deriva do latim (lumen = luz) e foi originalmente introduzida em 1888 pelo físico e historiador em ciência Eilhardt Wiedemann, para descrever todos os fenómenos de emissão de luz à excepção da incandescência que se deve à elevada temperatura de um corpo. A luminescência é designada de luz fria, enquanto a incandescência de luz quente.

A luminescência pode ser classificada em várias categorias em função da forma como ocorre a excitação da espécie química que exhibe esta propriedade (ver Tabela 2.1)

Tabela 2.1 – Os vários tipos de luminescência.

FENÓMENO	MODO DE EXCITAÇÃO
Fotoluminescência (Fluorescência, Fosforescência)	Absorção de luz (fotões)
Radioluminescência	Radiação de ionização (ex. raios X)
Catodoluminescência	Raios catódicos
Electroluminescência	Campos eléctricos
Termoluminescência	Aquecimento após pré-armazenamento de energia (ex. irradiação radioactiva)
Quimioluminescência	Processos químicos (ex. oxidação)
Triboluminescência	Forças de fricção e electrostáticas
Sonoluminescência	Ultra-sons

As espécies químicas luminescentes poderão ser de diferentes tipos:

- compostos orgânicos: hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, perileno, pireno, etc.), fluoresceína, rodamina, cumarina, oxazinas, polienos, aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina), etc.
- compostos inorgânicos: uranilo (UO_2^+), iões lantanídeos (ex. Eu^{3+} , Tb^{3+}), vidros dopados (ex. com Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), cristais (ex. ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, GaS, GaP, $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cr}^{3+}$ (rubi)), etc.

- compostos organometálicos: complexos de ruténio (ex. $\text{Ru}(\text{dpp})_3$), complexos com iões de lantanídeos, complexos com agentes quelatos (ex. 8-hidroxiquinolina), etc.

Conforme observado na Tabela 2.1, a fluorescência e a fosforescência são casos particulares da fotoluminescência, em que a emissão luminescente é dispoletada pela absorção de fotões de luz.

Quando uma molécula absorve a energia de um fotão, ela passa de um estado energético fundamental para um estado energético excitado, correspondente à ocupação de níveis energéticos mais elevados por um electrão de valência. O regresso da molécula ao seu estado fundamental pode ser acompanhada por emissão luminescente, mas também existem outras possibilidades de decaimento não radiativo (com diferentes probabilidades de ocorrência) tais como a conversão interna, cruzamento intersistemas e transferência de carga intermolecular (Figura 2.1). Alguns destes processos de desexcitação resultam da interacção com outras moléculas, como por exemplo, o processo de transferência de electrão, transferência de protões e transferência energia.

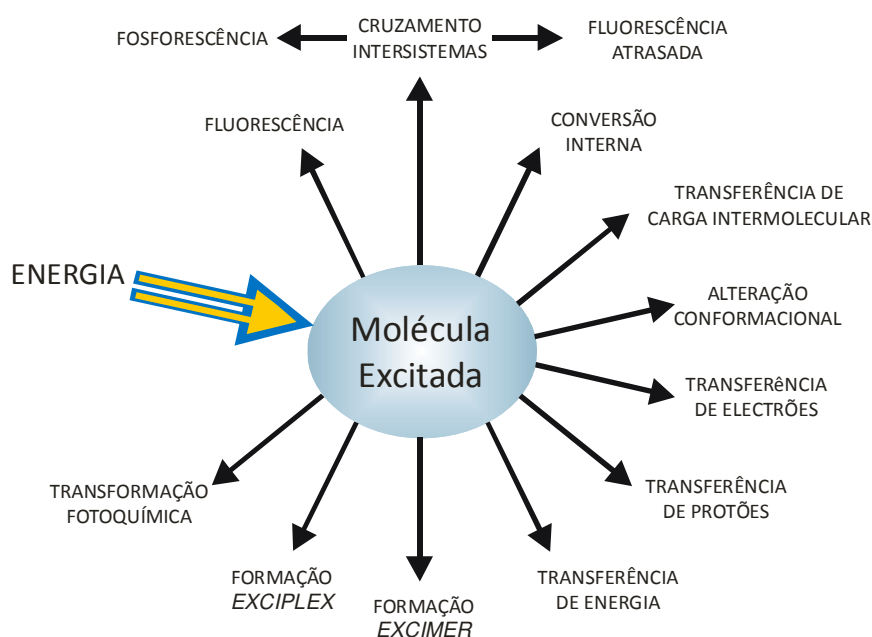


Figura 2.1 – Processos de desactivação de uma molécula excitada (adaptado de [15]).

Quando as características da fluorescência (espectro, tempo de vida, intensidade, etc.) são afectadas por processos de desexcitação devidos à interacção da molécula excitada com o micro-ambiente mais próximo, podem ser extraídas informações sobre esses micro-ambientes.

Para melhor compreensão do fenómeno de fluorescência que serve de suporte à metodologia utilizada na medição de oxigénio dissolvido, são apresentados alguns aspectos foto-físicos básicos.

2.2. TRANSIÇÕES ELECTRÓNICAS

A absorção de energia por parte de uma molécula provoca a excitação do electrão de valência, resultando numa transição electrónica entre dois níveis energéticos discretos bem definidos. Para que essa transição ocorra é necessária que a energia absorvida seja igual à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado.

A energia (E) absorvida pode ser quantificada pela seguinte expressão:

$$E = h\nu \quad \text{Eq. 2.1}$$

em que h corresponde à constante de Planck (6.67×10^{-27} erg.s) e ν à frequência (Hz) da radiação.

A energia total (E_T) do estado electrónico fundamental ou do estado electrónico excitado de uma molécula é dada pela soma das energias do nível electrónico (E_E), vibracional (E_V) e rotacional (E_R) naquele estado:

$$E_T = E_E + E_V + E_R \quad \text{Eq. 2.2}$$

Cada nível electrónico está associado a um conjunto de níveis vibracionais. As transições electrónicas poderão ocorrer entre níveis rotacionais (energia fornecida na gama dos micro-ondas), vibracionais (infravermelho) ou entre níveis electrónicos (UV-visível), sendo estas últimas as necessárias para que ocorra o fenómeno de fluorescência.

As orbitais moleculares resultam da combinação de orbitais atómicas e são classificadas como orbitais σ ou π . As orbitais moleculares σ podem ser formadas a partir de duas orbitais atómicas s, a partir de uma orbital atómica s e outra p, ou ainda a partir de duas orbitais atómicas p que tenham um eixo de simetria co-linear. As orbitais π são sempre formadas por duas orbitais atómicas p que se sobrepõem lateralmente.

As orbitais podem ser classificadas de ligantes (σ ou π) ou anti-ligantes (σ^* ou π^*). Ainda um outro tipo de orbitais designadas de não ligantes (também designadas de n) pode ser encontrado em algumas moléculas, em que os electrões dessa orbital se encontram deslocados para um dos átomos. Para ilustrar as várias possibilidades de excitação de um electrão numa molécula, vamos considerar a molécula de formaldeído (Figura 2.2).

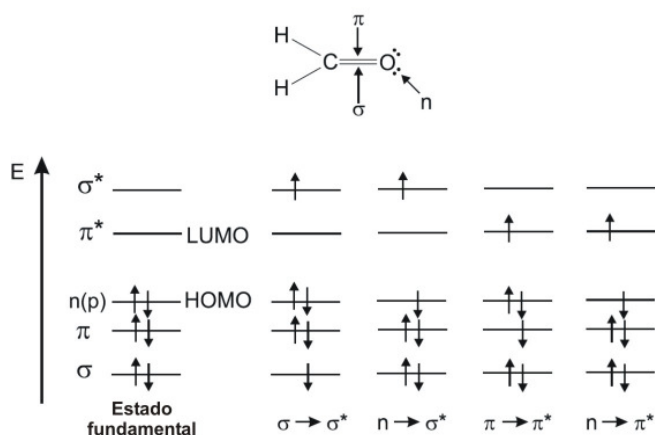


Figura 2.2 – Níveis de energia numa molécula de formaldeído e possíveis transições electrónicas (adaptado de [15]).

Das várias possibilidades de excitação de um electrão na molécula de formaldeído, a transição de um electrão da orbital $n(p)$ para a π^* , é a que necessita de uma menor quantidade de energia.

No estudo da fluorescência, a transição entre a orbital ocupada de mais alta energia (HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbitals*) para a orbital desocupada de mais baixa energia (LUMO- *Lowest Unoccupied Molecular Orbitals*) é a que assume maior relevância.

Nas transições representadas na Figura 2.2, verifica-se que o electrão que é excitado conserva o spin oposto ao electrão com que partilhava a orbital no estado fundamental, para que o número quântico total de *spin* seja nulo ($S = \sum s_i$, $s_i = +1/2$ ou $-1/2$). Quando isto ocorre, os estados são designados de singleto e a transição de singleto-singleto, pois a multiplicidade de ambos os estados é igual a 1 ($M = 2S + 1$).

No entanto, em alguns casos pode ocorrer uma mudança do sentido do spin do electrão excitado, para que este fique com um spin paralelo do que ficou no estado fundamental. Neste caso, dado que o número quântico de spin passou para 1 e a multiplicidade para 3, estes estados são designados de tripleto. De acordo com uma das regras de Hund [16], estes estados são energeticamente inferiores que os correspondentes estados singleto (Figura 2.3).

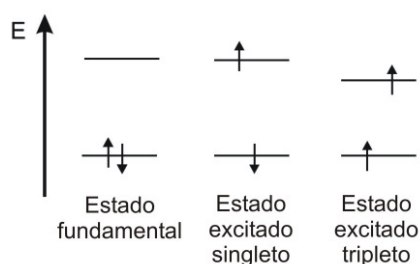


Figura 2.3 – Distinção entre o estado singleto e tripleto para o caso da molécula de formaldeído (adaptado de [15]).

O diagrama simplificado de Perrin–Jablonski (Figura 2.4) permite visualizar as transições electrónicas possíveis resultantes da absorção de um fóton e os processos de desexcitação com emissão fluorescente, fosforescente e outros não radiativos.

Os estados electrónicos singleto são designado por S_0 (estado electrónico fundamental), S_1 e S_2 e os estados electrónicos tripleto por T_1 e T_2 . Dentro de cada um destes estados electrónicos de energia existem um conjunto de níveis vibracionais representado por linhas horizontais mais finas.

Dependendo da energia do fóton absorvido, o electrão excitado pode transitar do nível electrónico S_0 para um dos níveis vibracionais de S_1 ou S_2 . Se a transição ocorrer para um dos níveis vibracionais de S_2 , o electrão sofre um processo de desexcitação até ao nível vibracional mais baixo de S_2 por um processo de relaxamento vibracional. Quando o processo de relaxamento vibracional ocorre entre dois estados electrónicos (ex: $S_2 \rightarrow S_1$) com a mesma multiplicidade sem qualquer emissão radiativa, o processo é designado de conversão interna. Quando em solução, o relaxamento vibracional ocorre por perda de energia resultante da colisão com moléculas de solvente vizinhas.

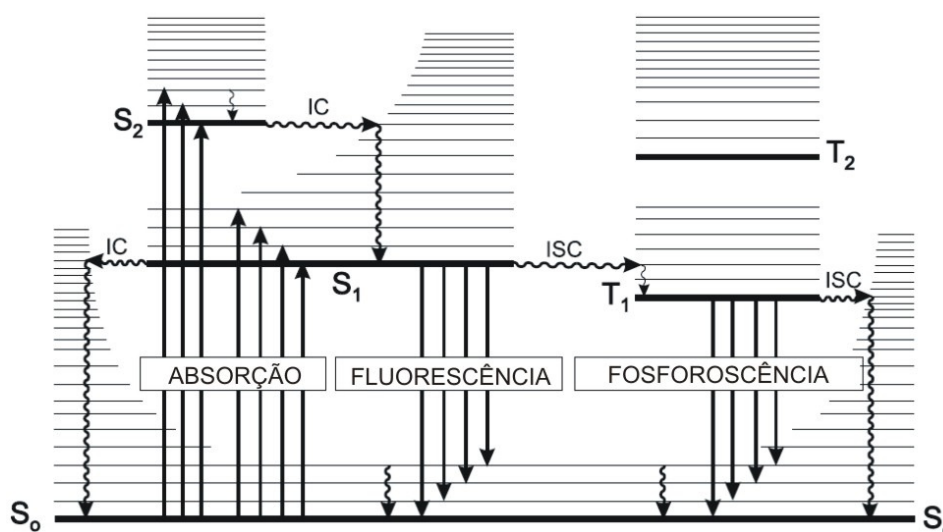


Figura 2.4 – Diagrama Perrin-Jablonski com exemplos dos vários mecanismos de absorção e desexcitação. S_0 , S_1 e S_2 – estados electrónicos singleto; T_1 , T_2 – estados electrónicos tripleto; IC – conversão interna; ISC – cruzamento intersistemas (adaptado de [15]).

Quando o electrão atinge o estado electrónico S_1 , a continuação de perda de energia por conversão interna é possível mas menos provável, pois a diferença de energia entre os níveis S_1 e S_0 é mais elevada que a diferença entre S_2 e S_1 . Neste ponto surgem outros processos que competem com a conversão interna, tais como a emissão de fótons e o cruzamento intersistemas.

No caso de o decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ ser acompanhado pela emissão de um fóton o processo é designado de fluorescência. A emissão de um fóton tem um tempo de duração da mesma ordem de grandeza

da absorção de um fóton (cerca de 10^{-15} s). No entanto, os electrões permanecem no estado excitado por um certo período de tempo antes de emitirem um fóton ou sofrerem outro processo de desexcitação (ver Tabela 2.2). A duração deste tempo depende da própria molécula e do meio envolvente. Após a excitação de um determinado número de moléculas, estas sofrerão um decaimento exponencial da sua intensidade fluorescente de acordo com o tempo médio de permanência no estado excitado.

Tabela 2.2 – Tempos característicos para os processos de absorção e desexcitação [15].

PROCESSO	TEMPO (s)	
Absorção	10^{-15} s	
Relaxamento vibracional	10^{-12} a 10^{-10} s	
Tempo de vida do estado excitado S ₁	10^{-10} a 10^{-7} s	→ Fluorescência
Cruzamento intersistemas	10^{-10} a 10^{-8} s	
Conversão interna	10^{-11} a 10^{-9} s	
Tempo de vida do estado excitado T ₁	10^{-6} a 1 s	→ Fosforescência

Para além da conversão interna e da fluorescência, uma outra possibilidade de regresso do electrão ao estado fundamental ocorre através do cruzamento intersistemas. Este processo de decaimento consiste num mecanismo de alteração do spin do electrão de valência, passando este de um estado electrónico singlete (S₁) para um tripleto (T₁). Como exemplificado na Figura 2.4, o electrão sofre uma transição isoenergética do estado S₁ para um nível vibracional mais elevado de T₁, ocorrendo de seguida um relaxamento até se atingir o estado vibracional mais baixo de T₁. O cruzamento intersistemas pode ser suficientemente rápido para competir com a fluorescência e a conversão interna. Este processo é favorecido em sistemas em que a transição electrónica S₀→S₁ é do tipo n→π* e onde existe a presença de átomos com um número atómico elevado

Desde o estado electrónico T₁, a desexcitação pode agora seguir vários caminhos. Por um lado, pode ocorrer o cruzamento intersistemas para um nível vibracional elevado de S₀, seguido de relaxamento vibracional. No entanto, se o tempo médio de vida do electrão no estado tripleto for suficiente elevado, pode observar-se fosforescência com um tempo de vida na ordem dos segundos. Pelo facto de o nível electrónico T₁ ter uma energia mais baixa, verifica-se que a emissão fosforescente tem comprimentos de onda mais elevados que a fluorescência.

Outro exemplo de desexcitação não representado na figura inclui um regresso de T₁ para S₁ quando os níveis de energia são muito próximos, seguido de fluorescência (fluorescência atrasada).

Ainda uma outra forma possível de decaimento do electrão para o estado fundamental ocorre devido à interacção de moléculas vizinhas à espécie química fluorescente (fluoróforo). Este é o caso

do oxigénio que ao aproximar-se e colidir com determinados fluoróforos, estabelece caminhos alternativos de desexcitação do electrão sem a emissão de fluorescência. Este mecanismo é designado de supressão e é a base de funcionamento da maior parte dos sensores baseados na fluorescência, inclusive o desenvolvido neste trabalho.

2.3. TEMPO DE VIDA

Consideremos que no instante zero é emitido um pulso de luz infinitamente curto no tempo com energia suficiente para que um determinado número de moléculas ($[M^*]_0$) passem para o estado excitado com o electrão de valência em S_1 . A taxa de ocorrência de cada um dos processos internos de decaimento está representada através das diversas constantes k na Figura 2.5.

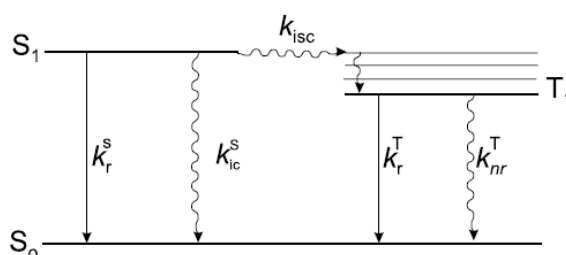


Figura 2.5 – Representação das taxas de ocorrência dos vários processos de desexcitação (adaptado de [15]).

Por uma questão de simplicidade, consideremos as transições que são efectuadas exclusivamente a partir de S_1 . Neste caso a constante de velocidade de decaimento total (k_M) resulta do somatório das constantes de cada um dos processos de decaimento individuais:

$$k_M = k_{isc} + k_{ic}^S + k_r^S = k_{nr}^S + k_r^S \quad \text{Eq. 2.3}$$

em que:

k_{isc}^S – constante de velocidade do processo cruzamento intersistemas.

k_{ic}^S - constante de velocidade do processo de conversão interna.

k_r^S - constante de velocidade do processo de fluorescência.

k_{nr}^S - constante de velocidade dos processos não radiativos

A taxa de decaimento da população de moléculas inicialmente excitada é dada por:

$$\frac{d[M^*]}{dt} = - (k_{nr}^S + k_r^S) [M^*] \quad \text{Eq. 2.4}$$

em que:

$[M^*]$ – concentração de moléculas excitadas

Se considerarmos que $[M^*] = [M^*]_0$ no instante inicial, após integração da equação anterior obtemos:

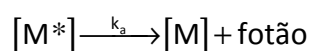
$$[M^*] = [M^*]_0 \exp(-t/\tau_0) \quad \text{Eq. 2.5}$$

em que o t é o tempo decorrido e o τ_0 é o tempo de vida do estado excitado. Este último parâmetro pode ser obtido através da equação:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_{nr}^s + k_r^s} \quad \text{Eq. 2.6}$$

O tempo de vida do estado excitado é definido como o tempo que demora para que 63% das moléculas inicialmente excitadas regressem ao seu estado fundamental por processos radiativos e não radiativos. A definição deste tempo é importante de forma a avaliar a janela de tempo em que é possível observar o processo fotodinâmico de fluorescência.

A intensidade fluorescente é definida como a quantidade de fótons emitidos por unidade de tempo e por unidade de volume, de acordo com a seguinte equação:



A intensidade fluorescente (I_0) que se observa em cada instante relaciona-se com o tempo de vida de acordo com a seguinte equação:

$$I_0(t) = k_r^s [M^*] = k_r^s [M^*]_0 \exp(-t/\tau_0) \quad \text{Eq. 2.7}$$

2.4. EFICIÊNCIA QUÂNTICA DA FLUORESCÊNCIA

A eficiência quântica da fluorescência (Φ_0) corresponde à razão entre o número de fótons emitido pelo fluoróforo pelo processo de fluorescência sobre o número total de fótons absorvidos. Pode ainda ser definido como a fração de elétrons que decaem a partir do estado excitado S_1 para o nível S_0 (durante todo o período de decaimento) com a emissão de fótons. O seu valor pode ser obtido a partir da seguinte equação:

$$\Phi_0 = \frac{k_r^s}{k_{nr}^s + k_r^s} = k_r^s \tau_0 \quad \text{Eq. 2.8}$$

De forma geral, a eficiência quântica diminui com a temperatura, tal como ocorre com o tempo de vida. Isto acontece porque os processos não radiativos relacionados com a agitação térmica (colisões com moléculas de solventes, vibrações intramoleculares e rotações) são mais eficientes a temperaturas elevadas. Esta dependência da temperatura é diferente para cada fluoróforo.

2.5. DESVIO DE STOKES

A análise ao diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 2.4) permite perceber que a energia de emissão é tipicamente inferior à energia de absorção. Quando um fóton incide sobre a molécula, pode ocorrer a transição de um electrão de qualquer um dos níveis vibracionais de S_0 para um dos níveis vibracionais de S_1 ou até mesmo S_2 . O comprimento de onda máximo, λ_a^{\max} , representado na Figura 2.6, traduz a transição com mais probabilidades de ocorrer. De forma análoga, o espectro de emissão é uma representação das transições electrónicas que ocorrem do nível vibracional mais baixo de S_1 para um qualquer nível vibracional de S_0 .

A menor diferença de energia entre os estados no processo de desexcitação resulta que, a radiação fluorescente apresenta comprimentos de onda mais elevados relativamente à radiação utilizada para a excitação das moléculas. Ou seja, entre o espectro de absorção e o de emissão existe um desvio, conforme ilustrado na Figura 2.6. O desvio de Stokes, é normalmente quantificado pela diferença do número de onda que existe entre o pico máximo no espectro de absorção e o pico máximo no espectro de emissão.

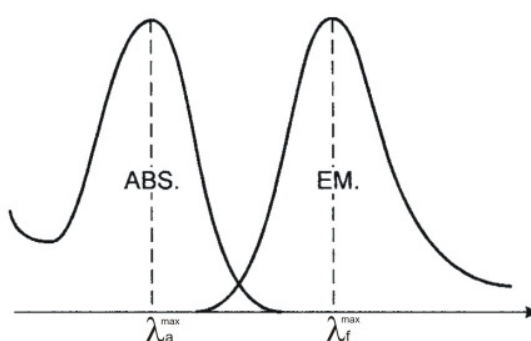


Figura 2.6 – Representação do desvio de Stokes [15].

É de notar que estes dois espectros podem apresentar uma zona de sobreposição, significando que algumas transições de excitação requerem menos energia que as libertadas em transições de regresso ao estado fundamental.

O espectro de absorção utilizado para a avaliação do desvio de Stokes é obtido através da medição da radiação absorvida por um material. Por sua vez, o espectro de emissão é obtido através da excitação da amostra a um comprimento de onda fixo e análise do espectro de fluorescência resultante. Vulgarmente, também são obtidos espectros de excitação para caracterizar materiais fluorescentes. Estes espectros são normalmente próximos dos de absorção, mas fornecem uma informação diferente. Para a leitura destes espectros, fixa-se o comprimento de onda de leitura da intensidade fluorescente e faz-se um varrimento do comprimento de onda da radiação de excitação.

2.6. TÉCNICAS DE MEDIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA

Na sequência dos fenómenos fotofísicos atrás descritos, pretende-se com este capítulo realizar uma descrição mais pormenorizada das técnicas de medição da fluorescência que possibilitaram a avaliação do sensor desenvolvido neste trabalho. Os dois tipos de medições da fluorescência abordados são a medição em estado estacionário e a medição de tempos de vida.

2.6.1. MEDIÇÃO DA INTENSIDADE EM ESTADO ESTACIONÁRIO

A medição da intensidade em estado estacionário pressupõe a existência de uma fonte de radiação com emissão constante sobre a amostra e uma medição contínua da intensidade de fluorescência. Uma vez que a absorção ocorre numa escala de tempo dos femtosegundos, o estado estacionário é atingido imediatamente após a incidência de radiação sobre a amostra.

No estado estacionário, o número de fótons incidentes sobre um determinado volume da amostra é constante (consideremos esta variável de N_0). Uma vez que nem todos os fótons são absorvidos, consideremos α como a fracção de fótons incidentes que são absorvidos, resultando daqui que αN_0 é o número de fótons absorvidos por um volume de amostra.

Neste caso, verifica-se também que a taxa de variação da concentração de moléculas excitadas $[M^*]$ é igual a zero:

$$\frac{d[M^*]}{dt} = k_a \alpha N_0 - (k_r^s + k_{nr}^s)[M^*] = 0 \quad \text{Eq. 2.9}$$

em que k_a representa a constante de velocidade de fótons absorvidos.

Se considerarmos que $k_a \alpha N_0$ pode ser substituído por αI_E , em que I_E representa a intensidade de radiação incidente (em número de fótons por volume e tempo), a concentração de moléculas no estado excitado é constante e é dada por:

$$[M^*] = \frac{\alpha I_E}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad \text{Eq. 2.10}$$

Das equações 2.8 e 2.10, a intensidade fluorescente (I_o) em estado estacionário é dada por:

$$I_o = k_r^s [M^*] = \alpha I_E \Phi_o \quad \text{Eq. 2.11}$$

Nos sistemas de medição da intensidade de fluorescência, esta é uma medida adimensional que está associada ao número de fótons de emissão que incidem sobre o fotodetector. No caso do fotodetector ser um espectrofotómetro, para além da intensidade, também é possível obter informação sobre o espectro de emissão. O espectro de emissão diz-nos que nem todos os fótons

emitidos têm a mesma energia, reflectindo as várias transições que ocorrem do nível vibracional mais baixo de S_1 para os vários níveis vibracionais de S_0 .

A relação entre a intensidade de fluorescência medida no estado estacionário e o tempo de vida de fluorescência é dada pela seguinte equação:

$$I_o = \int_0^{\infty} I_{oi} e^{-t/\tau_o} dt = I_{oi} \tau_o \quad \text{Eq. 2.12}$$

em que I_{oi} corresponde à intensidade de fluorescência imediatamente após a excitação do fluoróforo através de um pulso de luz.

O valor de I_o depende da concentração do fluoróforo e de um conjunto de características instrumentais. A equação 2.12 estabelece uma proporcionalidade entre a intensidade no estado estacionário e o tempo de vida.

2.6.2. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA

Existem basicamente dois métodos para a determinação de tempos de vida de um fluoróforo. O primeiro é a fluorometria de pulso que analisa os dados recolhidos no domínio do tempo, e o segundo é a fluorometria de fase que faz a análise no domínio das frequências [17].

2.6.2.1. Fluorometria de Pulso

Na sua forma mais simples, este método consiste na excitação da amostra por um pulso de luz de curta duração (de preferência inferior ao tempo de vida da fluorescência) e o registo do decaimento da intensidade fluorescente ao longo do tempo. Considerando que a intensidade de fluorescência é proporcional ao número de moléculas no estado excitado, a partir da equação 2.7 derivamos a seguinte equação:

$$I_o(t) = I_{oi} e^{(-t/\tau_o)} \quad \text{Eq. 2.13}$$

De acordo com a equação 2.13, após o pulso de excitação, a intensidade sofre uma diminuição exponencial em ordem ao tempo. Do registo obtido com este método, o tempo de vida pode ser determinado graficamente, correspondendo ao tempo em que ocorre uma diminuição da intensidade para $1/e$ (36.8%) do seu valor inicial, ou por determinação do declive da recta obtida a partir de $\log I_o(t)$ em função do tempo (Figura 2.7).

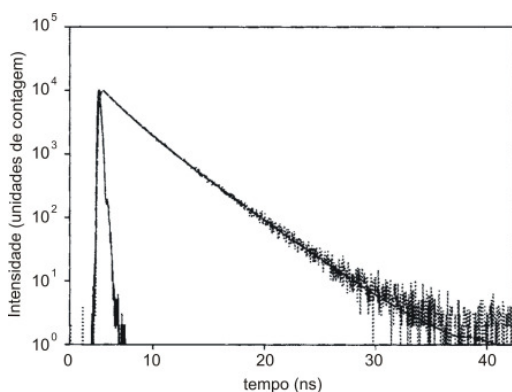


Figura 2.7 – Decaimento da fluorescência após um pulso de excitação (escala logarítmica) do triptófano [18].

2.6.2.2. Fluorometria de fase

Nas medições da fluorescência no domínio da frequência [19, 20], a amostra é excitada através de uma luz modulada sinusoidalmente com uma frequência angular (ω):

$$\omega = 2\pi f \tag{Eq. 2.14}$$

em que f é a frequência de modulação.

A radiação de excitação é dada pela função $I_E(t)$:

$$I_E(t) = I_{E0} [1 + M_E \text{sen}(\omega t)] \tag{Eq. 2.15}$$

em que:

I_{E0} – intensidade da excitação no instante $t=0$

M_E – factor de modulação da excitação

O factor de modulação corresponde à razão entre as componentes AC e DC do sinal (Figura 2.8):

$$M_E = AC_E / DC_E \tag{Eq. 2.16}$$

Da excitação das moléculas vai resultar um sinal de fluorescência modulado na mesma frequência, mas que devido ao tempo de vida finito do estado excitado está desfasado no tempo relativamente ao sinal de excitação.

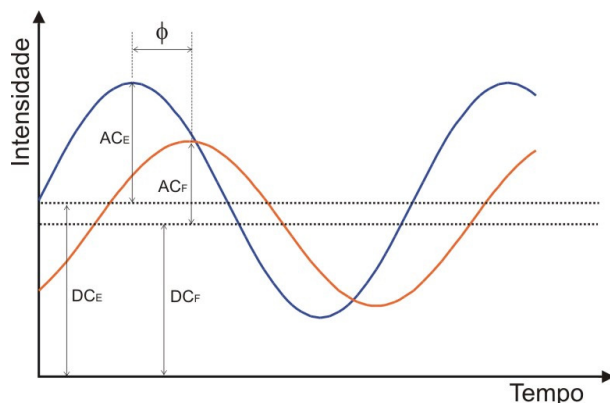


Figura 2.8 – Fase do sinal de excitação e de fluorescência.

A intensidade do sinal de fluorescência em cada instante de tempo pode ser descrita pela seguinte equação:

$$I(t) = I_0 [1 + M_F \sin(\omega t + \phi_\omega)] \quad \text{Eq. 2.17}$$

em que:

M_F – factor de modulação da fluorescência ($M_F = AC_F/DC_F$)

ϕ_ω – desvio da fase entre os sinais de excitação e fluorescência

As medidas do desvio da fase ϕ_ω e do factor de desmodulação ($m_W = M_F/M_E$) fornecem os dados para duas determinações independentes do tempo de vida da fluorescência.

A medição da fase permite determinar o tempo de vida a partir da seguinte relação:

$$\tan(\phi_\omega) = 2\pi f \tau_0 \quad \text{Eq. 2.18}$$

Por sua vez, as medições da modulação são também relacionadas com o tempo de vida através da seguinte equação:

$$m_W = (1 + \omega^2 \tau_0^2)^{-1/2} \quad \text{Eq. 2.19}$$

No caso de um decaimento exponencial simples (significando que só existe um tempo de vida) os tempos de vida determinados destas duas formas deverão ser idênticos para todas as frequências de modulação. No caso de amostras em que existe mais do que um fluoróforo, com tempos de vida distintos, verificar-se-á uma diferença nos tempos de vida determinados pelas equações 2.18 e 2.19.

2.7. SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA

A supressão (inibição) da fluorescência (o termo em inglês é *quenching*) refere-se a qualquer processo de diminuição da intensidade da emissão fluorescente de uma molécula. Nos subcapítulos anteriores foram descritos os processos de decaimento de um electrão no estado excitado que são intrínsecos à molécula. No entanto, e conforme também referido anteriormente, existem outros processos de decaimento que resultam da interferência de moléculas vizinhas (Tabela 2.3). Estes processos intermoleculares podem resultar na supressão da fluorescência.

Conforme já descrito, o tempo de vida corresponde a um período de tempo em que o electrão permanece no estado excitado (nível S_1) e durante o qual poderão ocorrer outros processos de decaimento competindo com os intrínsecos da molécula.

A maioria destes processos envolve a acção de uma molécula interferente (supressor), de acordo com o esquema simplificado da Figura 2.9, em que k_s representa a constante de velocidade do mecanismo de supressão.

Tabela 2.3 – Principais processos fotofísicos responsáveis pela supressão [15].

PROCESSO FOTOFÍSICO	MECANISMO
Colisão com um átomo mais pesado ou uma espécie paramagnética (ex: O ₂)	$M^* + S \rightarrow M + S + \text{calor}$
Transferência electrónica	${}^1D^* + A \rightarrow D^{\bullet+} + A^{\bullet-}$ ${}^1A^* + D \rightarrow A^{\bullet-} + D^{\bullet+}$
Formação de excímero	${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1(MM)^*$
Formação de excíplexo	${}^1D^* + A \rightarrow {}^1(DA)^*$ ${}^1A^* + D \rightarrow {}^1(DA)^*$
Transferência de protão	$AH^* + B \rightarrow A^{\bullet-} + BH^+$ $B^* + AH \rightarrow BH^{\bullet+} + A^-$
Transferência de energia	${}^1D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^1A^*$ ${}^3D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^3A^*$ ${}^3D^* + {}^3A \rightarrow {}^1D + {}^3A^*$ ${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1M + {}^1M^*$

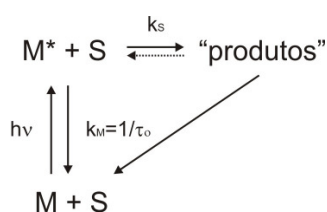


Figura 2.9 – Esquema simplificado do mecanismo da supressão intermolecular (adaptado de [15]) .

De forma geral, a supressão é um processo fotofísico em que não existem reacções químicas e que após a ocorrência de todos os processos de decaimento, a molécula mantém o seu estado fundamental inalterado [15].

Dos processos de interacção intermolecular apresentados na Tabela 2.3, apenas será considerado o que ocorre por colisão entre o fluoróforo e o supressor (o termo em inglês é *quencher*), pois é o que se verifica no sistema fluoróforo-supressor utilizado no desenvolvimento do sensor de oxigénio aqui apresentado.

Este processo é dependente do tempo, pois necessita que durante o tempo de vida do estado excitado da molécula ocorra uma colisão com o supressor, resultando no regresso ao estado fundamental sem emissão de um fotão e com a produção de energia na forma de calor. Este processo é classificado de supressão dinâmica e depende da difusão das moléculas no meio.

Para além da supressão dinâmica, ainda será considerado um outro mecanismo designado de supressão estática, que difere do primeiro pela formação de um par fluoróforo-supressor ainda no estado fundamental e que não depende dos choques entre as moléculas.

2.7.1. SUPRESSÃO DINÂMICA DA FLUORESCÊNCIA

Quando os processos de decaimento da molécula excitada passam a incorporar uma componente que resulta da interferência de moléculas vizinhas, a variação de $[M^*]$ em função do tempo após um pulso de excitação passa a ser descrita pela seguinte equação (corresponde à eq. 2.4 modificada):

$$\frac{d[M^*]}{dt} = -(k_M + k_s[S]) [M^*] = -\left(\frac{1}{\tau_0} + k_s[S]\right) [M^*] \quad \text{Eq. 2.20}$$

em que:

$[S]$ – concentração do supressor

Após integração desta equação diferencial, com as condições iniciais $[M^*]=[M^*]_0$ (para $t=0$), obtemos a seguinte equação (equivalente à eq. 2.5):

$$[M^*] = [M^*]_0 \exp\left[-\left(1/\tau_0 + k_s[S]\right)t\right] \quad \text{Eq. 2.21}$$

Uma vez que a intensidade fluorescente (a intensidade é agora designada de I , indicando que ocorre o processo de supressão) é proporcional à população de moléculas excitadas, obtemos a seguinte equação:

$$I(t) = k_r [M^*] = k_r [M^*]_0 \exp\left[-\left(1/\tau_0 + k_s[S]\right)t\right]$$

$$I(t) = I_{oi} \exp\left[-\left(1/\tau_0 + k_s[S]\right)t\right] \quad \text{Eq. 2.22}$$

A intensidade fluorescente apresenta um decaimento exponencial, em que o tempo de vida afectado pelo processo de supressão (τ) é dado por:

$$\tau = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + k_s[S]} \quad \text{Eq. 2.23}$$

de que resulta,

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_s \tau_0 [S] = 1 + K_{SV} [S] \quad \text{Eq. 2.24}$$

em que o parâmetro K_{SV} corresponde à constante de *Stern-Volmer*.

O tempo de vida representado por τ_0 é designado de tempo de vida natural do fluoróforo, correspondendo ao tempo de vida na ausência do supressor. A eficiência quântica na presença do supressor é dada por:

$$\Phi = \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s + k_s [S]} = \frac{k_r^s}{\frac{1}{\tau_o} + k_s [S]} \quad \text{Eq. 2.25}$$

enquanto que na ausência do supressor é dada por:

$$\Phi_o = k_r^s \tau_o \quad \text{Eq. 2.26}$$

Das equações 2.11, 2.25 e 2.26., é possível estabelecer a equação de *Stern-Volmer*, da seguinte forma:

$$\frac{\Phi_o}{\Phi} = \frac{I_o}{I} = 1 + k_s \tau_o [S] = 1 + K_{sv} [S] \quad \text{Eq. 2.27}$$

em que I_o e I correspondem às intensidades de fluorescência no estado estacionário, na ausência e presença do supressor, respectivamente.

De forma geral, quando se representa graficamente a razão I_o/I em função da concentração do supressor, obtém-se uma relação linear em que o declive representa a constante de *Stern-Volmer* e a ordenada na origem é 1. Se o tempo de vida do estado excitado na ausência do supressor for conhecido, é possível determinar a constante bimolecular de supressão, k_s .

A constante k_s pode reflectir a eficiência da supressão ou a acessibilidade do supressor ao fluoróforo, uma vez que ela pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$k_s = f_s k_o \quad \text{Eq. 2.28}$$

em que:

f_s – eficiência de supressão

k_o – constante de difusão bimolecular

A eficiência de supressão indica a fracção de encontros entre a molécula e o fluoróforo que resultam numa supressão da fluorescência efectiva. Alguns supressores, tais como o oxigénio, apresentam eficiências muito próximas da unidade, pelo que k_s é aproximadamente igual a k_o .

Por sua vez, a constante de difusão bimolecular pode ser calculada utilizando a equação proposta por Smoluchowski [21]:

$$k_o = 4\pi N R_c D \quad (\text{L.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) \quad \text{Eq. 2.29}$$

em que:

N – número de Avogadro

R_c – raio de colisão (soma dos raios do fluoróforo e do supressor)

D – soma dos coeficientes de difusão do fluoróforo e do supressor

Dado que N e R_c são constantes, a constante de difusão e conseqüentemente a supressão dependem da difusão das moléculas no meio. A difusão pode ser determinada pela equação de *Stokes-Einstein* que estipula:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_m} \quad \text{Eq. 2.30}$$

em que:

k – constante de *Boltzman*

T – temperatura

η – viscosidade do meio

R_m – raio molecular

Fica evidente que no caso de processos de supressão onde existe difusão do supressor no meio para aceder ao fluoróforo, um aumento da difusão do fluoróforo resulta no aumento da constante de Stern-Volmer.

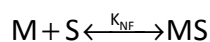
2.7.2. SUPRESSÃO ESTÁTICA DA FLUORESCÊNCIA

Para além da supressão que resulta do choque entre o fluoróforo e o supressor durante o estado excitado do primeiro, um outro tipo de supressão pode ocorrer. Nesta supressão, designada de estática, ocorre a formação de um complexo não fluorescente quando essas duas moléculas estão suficientemente próximas. Quando esse complexo absorve luz, o fluoróforo regressa imediatamente ao estado fundamental sem a emissão de fotão.

A supressão estática pode verificar-se nos casos em que a difusão das moléculas está limitada, devido a por exemplo, viscosidades elevadas do meio ou matrizes rígidas. Nestes casos existe um volume esférico à volta do fluoróforo (esfera de supressão) em que não existe qualquer fluorescência se o supressor se encontrar dentro desse volume. Se o supressor estiver fora da esfera de supressão, então não haverá qualquer alteração das características de fluorescência do fluoróforo.

Este tipo de supressão diminui a intensidade de fluorescência, pois diminui o número de fluoróforos com propriedades fluorescentes, mas não afecta o decaimento da fluorescência dos fluoróforos não afectados, após a excitação por um pulso de luz.

Vamos considerar a formação do equilíbrio entre as moléculas de fluoróforo (M) e do supressor (S) isoladas, e o complexo (MS) formado:



A constante de equilíbrio da formação do complexo não fluorescente (K_{NF}) é dada pela equação:

$$K_{NF} = [MS]/[M][S] \quad \text{Eq. 2.31}$$

De acordo com a lei da conservação de massa (em que $[M]_o$ é a concentração total do fluoróforo), temos:

$$[M]_o = [M] + [MS] \quad \text{Eq. 2.32}$$

logo, a fracção de fluoróforos não afectados por este tipo de supressão será dada por:

$$[M]/[M]_o = 1/(1+K_{NF}[S]) \quad \text{Eq. 2.33}$$

Dado que as intensidades fluorescentes são proporcionais à concentração de fluoróforos, a equação anterior fica:

$$I_o/I = 1+K_{NF}[S] \quad \text{Eq. 2.34}$$

Como se pode observar, a equação que traduz a diminuição da intensidade fluorescente devida à supressão estática é equivalente à utilizada para a supressão dinâmica, com a excepção que a constante da primeira é a constante de equilíbrio de formação do complexo. Por esta razão, se a análise da supressão de um fluoróforo for realizada exclusivamente por medições da intensidade fluorescente, não se poderá concluir se a supressão é estática ou dinâmica. Para uma conclusão definitiva é essencial a análise dos tempos de vida da fluorescência. No caso da supressão estática, a fluorescência que se observa resulta da acção de fluoróforos com o seu comportamento inalterado, pelo que o seu tempo de vida da fluorescência não sofre alteração ($\tau_o/\tau=1$). No caso da supressão dinâmica, a proporcionalidade que se verifica em τ_o/τ é igual a I_o/I .

Outra forma que permite distinguir estes dois tipos de supressão, resulta da sua análise em função de uma variação da temperatura. Conforme comentado anteriormente, a supressão dinâmica depende da difusão das moléculas supressoras no meio, que por sua vez aumenta com a temperatura. Daqui resulta que para iguais valores de concentração do supressor, um aumento de temperatura resultará numa diminuição mais acentuada da concentração de fluoróforos no estado excitado (Figura 2.10). Devida à proporcionalidade com a intensidade de fluorescência, ocorrerá igualmente uma diminuição da intensidade, ou um aumento da proporção I_o/I . No caso da supressão estática é esperado que um aumento de temperatura diminua a estabilidade dos complexos fluoróforo-supressor, com uma conseqüente diminuição da constante de formação do complexo (K_{NF}) [21].

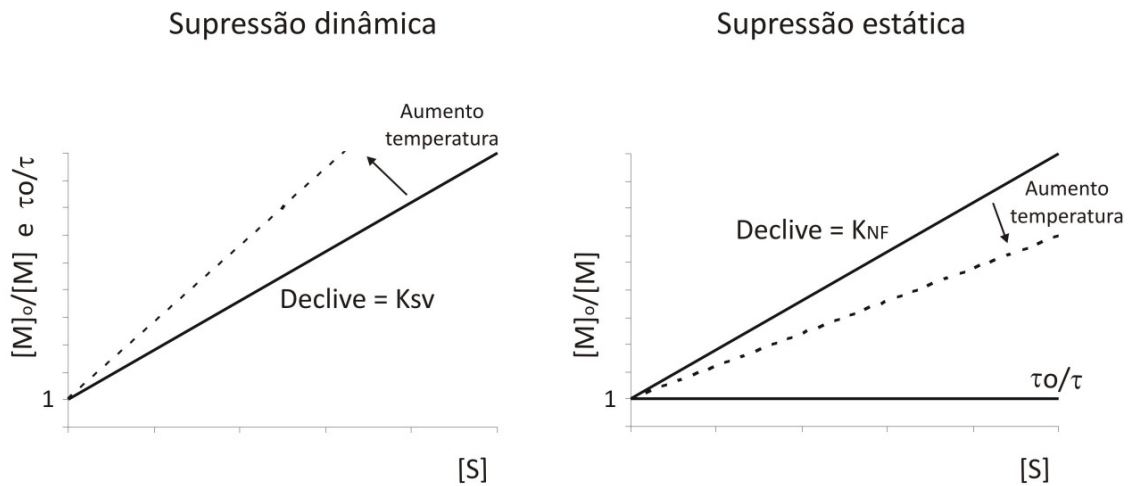


Figura 2.10 – Comparação entre a supressão dinâmica e estática (adaptado de [21]).

2.7.3. COMBINAÇÃO DA SUPRESSÃO ESTÁTICA E DINÂMICA

Em alguns casos pode verificar-se simultaneamente a ocorrência da supressão dinâmica e estática o que conduz a um desvio da linearidade de I_0/I em função da concentração do supressor $[S]$.

Neste caso, apenas a fracção das moléculas que não são afectadas por supressão estática é que poderá sofrer supressão dinâmica. Daqui resulta a seguinte equação:

$$\frac{I}{I_0} = \left[\frac{I}{I_0} \right]_{\text{din}} \times \frac{[M]}{[M]_0} \quad \text{Eq. 2.35}$$

Através da relação da equação anterior com as equações 2.27 e 2.33, obtemos a equação modificada de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV} [S])(1 + K_{NF} [S]) = 1 + (K_{SV} + K_{NF})[S] + K_{SV}K_{NF} [S]^2 \quad \text{Eq. 2.36}$$

Esta equação é de 2ª ordem relativamente a $[S]$. Os parâmetros K_{NF} e K_{SV} podem ser extraídos através de um ajuste dos resultados de intensidade obtidos em função de $[S]$ a uma equação de 2ª ordem.

Alternativamente, os resultados podem ser esboçados graficamente de forma a obter a seguinte relação linear:

$$\left(\frac{I_0}{I} - 1 \right) / [S] = (K_{SV} + K_{NF}) + K_{SV}K_{NF} [S] \quad \text{Eq. 2.37}$$

Após regressão linear, resolve-se um sistema com duas equações e duas incógnitas a partir dos valores extraídos do declive e da ordenada na origem, obtendo-se K_{NF} e K_{SV} .

Se for possível a realização de ensaios de tempo de vida é possível extrair o valor de K_{SV} através da análise gráfica de τ_0/τ em função de $[S]$, de acordo com a seguinte equação:

$$\tau_0/\tau=1+K_{SV}[S] \quad \text{Eq. 2.38}$$

2.7.4. SUPRESSÃO EM SISTEMAS HETERÓGENEOS

Quando um sistema é constituído por um fluoróforo em diferentes meios (ex. fluoróforos incorporados em matrizes heterogéneas de sol-gel, polímeros, etc.), a equação de *Stern-Volmer* sofre alterações. Por exemplo, no caso de supressão dinâmica, a equação de *Stern-Volmer* fica na seguinte forma:

$$\frac{I}{I_0} = \sum_{i=1}^n \frac{f_i}{1 + K_{SV,i} [S]} \quad \text{Eq. 2.39}$$

em que $K_{SV,i}$ é a constante de *Stern-Volmer* para cada um dos i microambientes existentes na matriz onde o fluoróforo está incorporado e f_i a respectiva fracção contributiva para a intensidade no estado estacionário.

2.8. FLUORÓFOROS

A designação de fluoróforo é dada a uma molécula ou parte da molécula que apresenta características fluorescentes. A designação de luminóforo muitas vezes encontrada na bibliografia é mais abrangente, pois inclui ainda espécies que apresentam características fosforescentes.

Alguns fluoróforos (também designados de indicadores fluorescentes) têm a característica de alterar as suas propriedades fluorescentes em função do meio que as envolve. Mais especificamente, significa que a sua fluorescência sofre alteração em função da presença de outras moléculas, já referidas anteriormente como supressores. Isto os torna adequados para serem utilizados como transdutores em sistemas físico-químicos, bioquímicos ou biológicos.

A classificação dos fluoróforos que é apresentada de seguida [21], é principalmente baseada nas suas aplicações, embora algumas classes sejam baseadas na similaridade das suas propriedades fluorescentes.

1) Fluoróforos naturais ou intrínsecos

Este tipo de fluoróforos pode ser encontrados em muitos organismos vivos. São incluídos os aminoácidos fluorescentes: triptófano, tirosina e fenilalanina encontradas nas proteínas, assim como co-factores de NADH (forma reduzida de dinucleotídeo nicotinamida adenina), FAD (dinucleótido de flavina-adenina) e riboflavina encontrados em células e tecidos. Embora os fluoróforos intrínsecos

possam ser utilizados no estudo da dinâmica celular e estrutura de proteínas, mais usualmente geram fluorescência de fundo indesejada que tem que ser separada do sinal desejado.

2) Fluoróforos extrínsecos – Fluoróforos ligados covalentemente a proteínas

Estes fluoróforos têm grupos de ligação específicos para marcação de proteínas, possibilitando a monitorização do seu comportamento. Os grupos de ligação podem ser obtidos por reacção de fluoróforos com derivados químicos específicos de forma a conseguir determinada ligação a uma proteína. Por exemplo, grupos sulfidril podem ser ligados por reacção química a iodoacetamida, ou a grupos amina e isotiocianatos.

3) Fluoróforos extrínsecos – Fluoróforos ligados não covalentemente a proteínas

Estes fluoróforos interagem não covalentemente com a proteína alvo, resultando numa alteração das propriedades de fluorescência. Por exemplo, o ácido 1-anilino-8-naftaleno-6-sulfónico (ANS) apresenta uma fluorescência de cor verde muito fraca, mas quando se liga a proteínas adquire uma fluorescência de forte intensidade com cor azul.

4) Fluoróforos extrínsecos – Fluoróforos para membranas

Este tipo de fluoróforos é adequado para a marcação de membranas. Por exemplo, indicadores hidrofóbicos tais como o DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) ligam-se preferencialmente a regiões das membranas não polares apresentando elevada fluorescência [22]. Ao invés, quando em solução, a sua fluorescência é muito fraca. Outros indicadores mais hidrofílicos tais como a fluoresceína e a rodamina podem ser utilizados para ligação a grupos acilo ou aos fosfolípidos das membranas [23].

5) Sondas de ADN

Existem muitos fluoróforos que se ligam espontaneamente ao ADN resultando num aumento da intensidade fluorescente. Por exemplo, o brometo de etídio apresenta uma fraca fluorescência em água com um tempo de vida de cerca de 1.7 ns, mas após ligação à estrutura do ADN a sua intensidade fluorescente aumenta cerca de 30 vezes e o tempo de vida aumenta para 20 ns. Outros tipos de sondas de ADN são especialmente construídos para se ligarem preferencialmente a determinadas sequências da cadeia.

6) Indicadores vermelhos ou infravermelhos próximo

Devido à sua excitação com comprimentos de onda elevados, estes indicadores fluorescentes apresentam a vantagem de minimizar os problemas associados à autofluorescência de fundo apresentada em células e tecidos. Isto é possível porque a autofluorescência ocorre com maior incidência por excitação com radiação ultravioleta (UV) ou azul, sendo progressivamente reduzida com o aumento do comprimento de onda. Esta classe de fluoróforos ainda apresenta a vantagem de

serem excitados por fontes da radiação relativamente baratos, tais como os díodos laser. Os fluoróforos de cianina Cy-3, Cy-5 e Cy-7, são exemplos de indicadores de elevado comprimento de onda que têm sido extensivamente utilizados na sequenciação de ADN.

7) Fluoróforos para análise química

Esta classe de fluoróforos é utilizada para a quantificação de substâncias químicas. Em muitas aplicações estes fluoróforos são utilizados para detectar iões tais como, Na^+ , Ca^+ , Cl^- e Mg^{2+} . A ligação dos iões ao fluoróforo altera as características destes como por exemplo uma variação na intensidade de fluorescência ou um desvio dos espectros de fluorescência. Outro exemplo deste tipo de fluoróforos, são os utilizados na medição de oxigénio gasoso ou dissolvido e que é aplicado neste trabalho.

8) Fluoróforos para análise ambiental

Aqui estão incluídos todos os fluoróforos que são sensíveis a alterações do meio onde estão inseridos, tais com pH, viscosidade, polaridade [24] e temperatura. Como exemplo, temos o indicador *Prodan* cujo comprimento de onda de emissão (logo o desvio de *Stokes*) é altamente sensível à polaridade do solvente.

9) Proteínas fluorescentes

Para além das proteínas referidas no ponto 1 desta lista de classes de fluoróforos, existem outras classes de proteínas que exibem fluorescência intrínseca a comprimentos de onda mais elevados. Estas incluem as ficobiliproteínas, as proteínas verdes fluorescentes (GFP – *green fluorescent proteins*) e as *phytofluors*.

10) Fluoróforos de tempo de vida elevado

A maior parte dos fluoróforos orgânicos têm tempos de vida entre 1 e 10 ns. Esta gama de tempos de vida limita os estudos dinâmicos que podem ser efectuados com estes fluoróforos. No entanto, existem alguns tipos de fluoróforos metálicos com tempos de vida mais longos. Alguns dos mais utilizados são os lantanídeos Eu^{3+} e Tb^{3+} que apresentam tempos de vida de 0.5 a 3 ms. Devido ao seu baixo coeficiente de extinção são normalmente ligados a compostos orgânicos (formando quelatos) que absorvem eficientemente a luz e transferem a energia para o ião metálico. Dentro desta classe, ainda temos os complexos ligando-metal de transição (MLC – *metal-ligand complex*). A maioria destes complexos utiliza o Ruténio [Ru(II)], Rénio [Re(I)] e o Ósmio [Os(II)] ligado a uma ou mais diaminas. Estes fluoróforos apresentam uma fluorescência molecular que resulta de um estado de transferência de carga do metal para o ligando. Como a transição é parcialmente proibida, os tempos de vida de decaimento são longos. Estes complexos apresentam uma estabilidade química muito

elevada, equivalente aos compostos covalentes, pelo que não existe dissociação significativa dos ligandos e do metal.

O fluoróforo utilizado neste trabalho foi um MLC, mais especificamente o Ru[tris(4,7-difenil -1,10-fenantrolina)]dicloro, pelo que especial atenção será dada a esta classe de fluoróforos na descrição dos processos de transição de que resulta a fluorescência.

2.8.1. COMPLEXOS METAL-LIGANDO

Conforme já referido, os fluoróforos MLC apresentam tempos de vida mais elevados que outras classes de fluoróforos, assim como elevada estabilidade química e fotoquímica, o que constitui uma vantagem na sua utilização em algumas aplicações. Os tempos de vida vão desde valores inferiores a 100 ns até cerca de 100 μ s [25, 26].

É conhecida uma variedade muito grande de MLC's, em que alguns apresentam uma forte luminescência enquanto outros apresentam emissões muito fracas ou até mesmo inexistentes.

Vamos analisar com um pouco de mais detalhe os estados electrónicos existentes nestes complexos. Nos MLC's, as orbitais π estão associadas aos ligandos orgânicos enquanto as orbitais d ao átomo de metal. Na generalidade dos casos, existem seis electrões nas orbitais d. A presença dos ligandos origina uma divisão dos níveis energéticos das orbitais d em três orbitais de energia baixa (t) e duas de energia mais elevada (e) (Figura 2.11). A diferença de energia Δ que separa estas orbitais mede a interacção metal-ligando e depende do metal e do ligando [21].

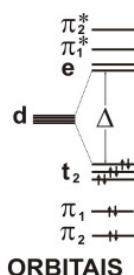


Figura 2.11 – Orbitais dos complexos metal-ligando (adaptado de [21]).

As três orbitais d de mais baixa energia estão completas com seis electrões. As transições entre as orbitais $t \rightarrow e$ são proibidas. Mesmo que ocorra a absorção de radiação com transição d-d, a constante de velocidade radiativa é muito baixa. Para além disso, os electrões na orbital “e” são anti-ligantes no que diz respeito à ligação metal-ligando, pelo que os estados excitados d-d são instáveis.

A combinação apropriada de um metal com um ligando resulta na possibilidade de uma nova transição que envolve uma transferência de carga entre o metal e o ligando sendo esta designada de

MLCT (*metal-to-ligand charge-transfer*). Esta transição é responsável pela intensa absorção na gama do azul dos MLC's de ruténio.

De acordo com o diagrama de Jablonski apresentado na Figura 2.12, após a absorção, o complexo passa para o estado tripleto MLCT através de um processo de cruzamento intersistemas.

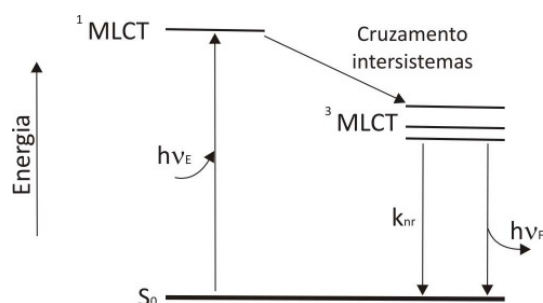


Figura 2.12 – Diagrama de Jablonski para um MLC (adaptado de [21]).

Uma vez neste estado, o decaimento para o estado fundamental pode ocorrer pelos usuais processos radiativos e não radiativos.

Para que o MLC seja luminescente é necessário que a energia Δ seja suficientemente elevada para que o estado d-d fique energeticamente acima do estado MLCT. Na Figura 2.13 estão exemplificados os posicionamentos do estado tripleto MLCT em relação ao estado tripleto d-d, para três MLC's com metais centrais diferentes. O MLC com o metal de ferro é não luminescente devido ao estado d-d ser de energia inferior ao MLCT. Segundo o mesmo critério, o MLC com o ruténio apresenta elevada luminescência dado que o decaimento ocorre preferencialmente a partir de MLCT e de forma radiativa. Neste caso, o aumento de temperatura conduz a uma diminuição do tempo de vida devido à maior probabilidade de transferência do electrão para o estado d-d com conseqüente decaimento não radiativo. No caso do MLC de Ósmio, apesar do grande afastamento energético entre estes dois estados, existe um outro factor que torna este complexo de luminescência fraca, que consiste na aproximação do MLCT ao estado fundamental (*energy gap law*).

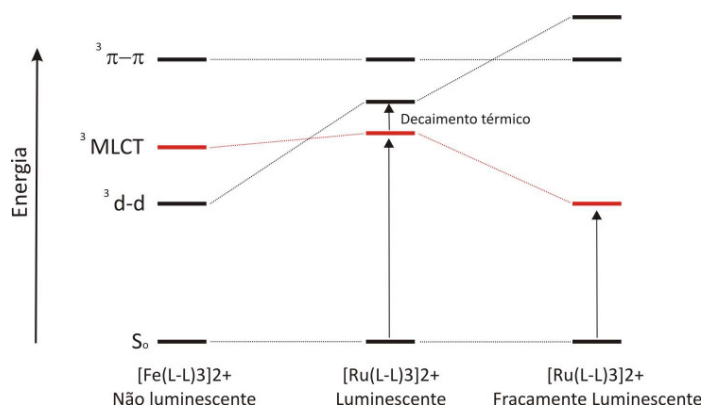


Figura 2.13 – Estados de energia tripletos para vários MLC's (adaptado de [21]).

Para uma grande maioria de aplicações, as propriedades espectrais dos MLC são muito favoráveis. A banda de absorção, que por exemplo nos complexos de rutênio é apresentada na gama próxima dos 450 nm (Figura 2.14), deve-se à transição MLCT. A emissão luminescente destes complexos também se deve na sua maioria à transição MLCT, cujo pico de banda está centrado nos cerca de 610 a 650 nm para os complexos de Ru(II). Uma análise aos espectros de absorção e emissão revela um desvio de *stokes* elevado, significando que existe facilidade na separação das respectivas bandas. Esta é uma característica muito desejável na maioria das aplicações que utilizam estes fluoróforos.

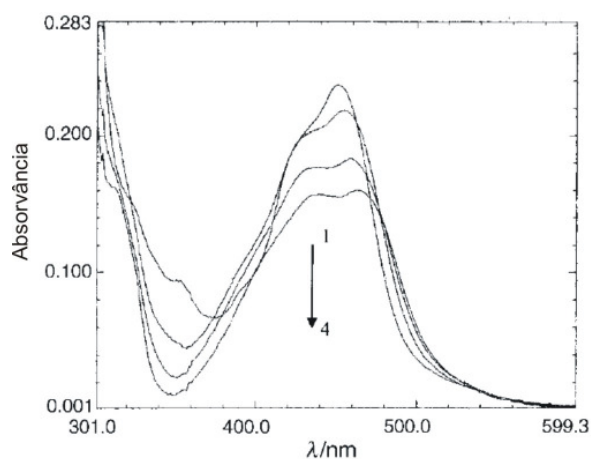


Figura 2.14 – Espectros de absorção de complexos de rutênio: (1) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, (2) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dpp})]^{2+}$, (3) $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dpp})_2]^{2+}$, (4) $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ [27].

2.9. FOTODEGRADAÇÃO

O fenómeno da fotodegradação (termo em inglês, *photobleaching*) ocorre quando um fluoróforo perde de forma irreversível as suas características fluorescentes devido a alterações químicas foto induzidas. Após a excitação, enquanto a molécula permanece no seu estado singleto ou tripleto (caso apresente fluorescência ou fosforescência, respectivamente), os fluoróforos podem interagir com outras moléculas produzindo modificações das ligações covalentes. Dado o estado tripleto ser caracterizado por tempos médios de vida mais elevados, os indicadores fosforescentes são mais susceptíveis de sofrer fotodegradação.

A fotodegradação de um fluoróforo é normalmente acompanhada por um aumento ou diminuição da intensidade fluorescente. A diminuição da intensidade fluorescente pode ser observada quando o fluoróforo se decompõe em produtos não fluorescentes. O aumento da intensidade ocorrerá se esses produtos tiverem intensidades de emissão fluorescente ainda mais elevadas que o fluoróforo original nas mesmas condições de excitação. A alteração da intensidade fluorescente pode ser observada através da comparação do espectro de emissão antes e depois da radiação. Se a espécie

fluorescente ou os produtos de decomposição apresentam cor, também é possível observar uma alteração visível na amostra.

O número de ciclos de excitação-emissão que um determinado fluoróforo requer antes de se degradar, depende da sua estrutura molecular e do meio onde está inserido. Alguns fluoróforos decompõem-se rapidamente, apenas com alguns fótons, enquanto outros necessitam de um número muito elevado de ciclos de exposição à radiação.

A melhor forma de evitar a fotodegradação do fluoróforo consiste em limitar o tempo de exposição à radiação de excitação. Quando o fluoróforo é aplicado em esquemas sensoriais, dever-se-á limitar o tempo de excitação do fluoróforo ao momento em que se pretende realizar a medição. O fluoróforo deve ser preferencialmente excitado com um comprimento de onda o mais elevado possível dentro do espectro de excitação, e com uma intensidade de radiação baixa. Quando se utilizam fluoróforos orgânicos a presença de oxigénio leva a uma oxidação destes compostos, que é especialmente intensa se a radiação for na gama dos ultravioletas (UV). A remoção de oxigénio nestes casos é fundamental [28].

3. O PROCESSO SOL-GEL

3.1. INTRODUÇÃO

Os métodos de preparação de materiais refractários inorgânicos, poderão seguir um conjunto variado de esquemas tecnológicos, em que a ocorrência de reacções a elevadas temperaturas é um factor comum a todas elas. Já desde a antiguidade que materiais cerâmicos ou vítreos têm sido obtidos desta forma, utilizando para tal matérias-primas disponíveis na natureza.

A tecnologia sol-gel tem sofrido uma evolução considerável nas últimas décadas e apresenta-se hoje como uma alternativa à produção destes materiais cerâmicos ou vítreos, com a particularidade de o processo de produção ocorrer a baixas temperaturas [29].

A produção de sol-gel inicia-se pela formação de uma suspensão coloidal (designada de sol) de precursores onde ocorrerá um conjunto de reacções de polimerização e policondensação que conduzirão à formação gradual de uma rede sólida tridimensional (designado de gel), tornando a solução cada vez mais viscosa até à sua solidificação final. Por fim, ocorre a remoção do solvente. Dependendo das operações de processamento aplicadas, poderão ser obtidos pós, fibras, filmes, monólitos, etc., a partir de uma solução com a mesma composição inicial.

Os materiais cerâmicos produzidos por este processo são caracterizados pela facilidade com que as suas propriedades são modificadas através de alterações no procedimento de síntese. A utilização dos materiais de sol-gel na construção de materiais sensores tem sofrido um incremento nos últimos anos, essencialmente devido a duas propriedades interessantes: a porosidade e o ser inerte quimicamente.

Na maioria das aplicações que utiliza o sol-gel com material sensor, este tem a função de providenciar uma matriz de suporte porosa, onde o reagente sensível à espécie a analisar é aprisionado física ou quimicamente, e através do qual a espécie em análise (analito) se pode difundir [30].

A utilização do sol-gel em sensores para a medição de oxigénio tem sido recentemente explorada por vários investigadores com excelentes resultados [31-33]. O trabalho apresentado nesta tese utiliza diferentes precursores de sol-gel para a produção de filmes com diferentes composições e características, com o objectivo de avaliar o seu desempenho quando utilizados para o aprisionamento de um fluoróforo sensível ao oxigénio. Por esta razão, são considerados neste capítulo os aspectos relacionados com o processo de sol-gel que são de interesse para a produção de filmes sensíveis ao oxigénio.

3.2. HISTÓRICO

Desde a antiguidade que são utilizadas soluções coloidais para a produção de materiais decorativos, artísticos ou de construção, num processo similar ao do sol-gel. Vestígios destas aplicações podem ser encontradas nas pinturas (Figura 3.1a) nas grutas de *Lascaux*, França, que datam de há milhares de anos atrás. Os pigmentos utilizados nestas pinturas são constituídos por óxido de ferro, óxido de carbono e argila, transformados em pó muito fino e dispersos em água e óleos naturais como surfactantes activos.

Outros relatos, adicionam a utilização do fogo como uma técnica adicional à moagem e mistura de forma a alterar a química dos precursores. O livro de Génesis (o primeiro livro da Bíblia) refere a utilização de um tipo de gesso e tijolos, produzidos por um processo de aquecimento com fogo, na construção da Torre de Babel (Figura 3.1b), há cerca de 5000 anos atrás.

Génesis 11:1 : “E disseram uns aos outros: “Vamos, façamos tijolos e cozamo-los no fogo.” Serviram-se de tijolos em vez de pedras, e de betume em lugar de argamassa.”



a)

b)

Figura 3.1 – a) Pintura na gruta de Lascaux, França. b) “The tower of Babel” pintada por Pieter Bruegel , ca. 1556.

Para além destes dois exemplos, muito outros poderão ser encontrados na história sobre a utilização de técnicas de sol-gel na produção de materiais.

No último século o processo sol-gel foi largamente estudado e desenvolvido devido a novas aplicações para estes materiais. Numa fase inicial esse desenvolvimento ocorreu exclusivamente de forma empírica, mas nas últimas décadas já com uma abordagem mais científica [34].

As primeiras referências ao processo sol-gel são de 1846, em que um engenheiro francês, J.J. Elbeman, verificou que um alcóxido de metal preparado a partir de SiCl_4 e álcool, gelificava quando exposto à atmosfera em condições de humidade normais. Em 1876, Troost e Hautfeuille obtiveram derivados de alcóxidos de sílica através de um processo de hidrólise. Oito anos mais tarde

(1884), foi observada a hidrólise de tetrametilortosilicato (TMOS) para obter um sol de ácido sílico, por Grimaux .

Nos cerca de 50 anos seguintes, poucos desenvolvimentos científicos foram realizados nesta área, à excepção de W.A. Patrick, que foi pioneiro na área dos dessecantes (substâncias químicas com a capacidade de absorver água e outras substâncias), catalisadores e materiais absorventes, desenvolvendo processos que consistiam na secagem e aquecimento de um gel de sílica homogéneo até os 700 °C, de forma a produzir um material de sílica extremamente poroso. No seguimento da investigação nestas áreas, W.A. Patrick registou um número razoável de patentes, que incluíam a utilização de técnicas de sol-gel [35].

Nos anos 30 do século passado, W. Geffcken e E. Berger da empresa Schott Company, estabeleceram um protocolo referente a um processo sol-gel para produção de filmes de óxidos na indústria dos vidros por um processo de *dip-coating* [34].

Apesar de demonstrado em 1861 que estes materiais poderiam ser utilizados na conservação de materiais em pedra, a utilização de materiais de sol-gel só sofreu um grande avanço em 1941 com o registo de uma patente nos EUA, na área da conservação de edifícios, a que se seguiram duas publicações importantes nesta área de aplicação por H.D.Cogan e C.A.Setterstrom, em 1946 e 1947.

No início dos anos 60, H.Schroeder conseguiu depositar filmes transparentes em vidros com o objectivo de corrigir o índice de refração.

Nos anos 70, três grupos de investigação independentes, que trabalhavam na área dos materiais inorgânicos, publicaram trabalhos na preparação de vidro e materiais cerâmicos utilizando o processo sol-gel. Num desses grupos, H. Dislich sintetizou um vidro borossilicato para utilização em lentes, através do aquecimento de um alcóxido de metal a temperaturas inferiores a 650 °C. Noutro grupo, R.Roy preparou um vidro de sílica de pequena dimensão (na ordem dos milímetros) através de um processo de sol-gel a temperaturas inferiores a 1000 °C. Ainda, Mazdiyasi demonstrou que é possível obter materiais cerâmicos ferroelétricos a partir de sol-gel em pó, preparado a partir de soluções de alcóxidos de metais utilizado em processos de sinterização [35].

Estes resultados deram início a investigações sistemáticas por um conjunto elevado de outros grupos, tendo contribuído sobremaneira para o desenvolvimento e popularização da tecnologia sol-gel num curto período de tempo. Esta tecnologia apresentava a vantagem de produzir materiais com a forma pretendida, directamente a partir de uma solução, em vez da formação de pó do material, e a temperaturas muito inferiores comparativamente com outras tecnologias de produção de vidros e cerâmicas. A partir daqui, foram desenvolvidos novos materiais tais como filmes de revestimento, membranas, objectos compactos, fibras e muitos outros produtos comerciais [36].

As características únicas dos materiais de sol-gel ficaram evidentes quando no início dos anos 80, foram preparados materiais híbridos orgânicos-inorgânicos por H. Schmidt e materiais de sílica foram dopados com moléculas orgânicas funcionais por Avnir [37]. Estes materiais são produzidos a temperaturas baixas, próximas da temperatura ambiente e sem decomposição do material orgânico. Por esta razão, o processo sol-gel sofreu também amplo desenvolvimento na sua aplicação à produção de materiais orgânicos e biomateriais [36].

3.3. APLICAÇÕES

A variedade de aplicações para a tecnologia sol-gel deriva dos vários formatos que são possíveis obter a partir de uma solução inicial (monólitos, filmes, fibras e pós). A utilização do sol-gel nestas aplicações apresenta duas grandes vantagens:

- a possibilidade de produção de materiais inorgânicos não metálicos a temperaturas relativamente mais baixas quando comparado com outros processos;
- a produção de materiais porosos, cuja distribuição de tamanho de poros pode ser controlada ou pela composição química da solução inicial para a reacção, ou pela escolha adequada das condições durante a produção.

Por exemplo, o processo sol-gel permite incorporar na matriz do material moléculas orgânicas com uma determinada funcionalidade, o que não seria possível se o processo ocorresse a alta temperatura. Comparado com as matérias-primas convencionais para a produção de cerâmicos (normalmente produtos extraídos da terra), os precursores químicos utilizados no processo sol-gel podem ser obtidos de forma reprodutível e com elevada pureza, permitindo definir com elevado rigor a composição, logo as características do material produzido. Outros benefícios derivam das baixas temperaturas necessárias, pois permitem poupanças de energia no processo produtivo, minimização de perdas de solventes, redução da poluição atmosférica, eliminação de processos de separação e cristalização, etc [34].

No entanto, e apesar destas vantagens, não é esperado que a tecnologia sol-gel seja uma alternativa bem sucedida aos processos convencionais de produção de vidros e cerâmicos comuns, a não ser que novos vidros e cerâmicos com propriedades únicas e vantajosas sejam obtidas desta forma. Esta tecnologia também apresenta algumas desvantagens, tais como o elevado custo de produção dos precursores, a contracção do material, a existência de poros finos residuais, grupos hidroxil e carbono residual na estrutura do material, a utilização de soluções orgânicas com as questões dos perigos de saúde para trabalhadores que lhe estão associadas e os elevados tempos de produção do material.

Na sequência da crescente investigação realizada sobre o sol-gel, seria inevitável que fossem encontradas inúmeras aplicações onde as vantagens apresentadas por estes materiais tragam valor acrescentado a aplicações já existentes, ou então conduzissem a novas aplicações. Alguns exemplos destas aplicações serão ilustrados nos subcapítulos seguintes.

3.3.1. MATERIAIS ÓPTICOS

As novas formas de tecnologias de informação baseiam-se na transdução de sinais ópticos utilizando lasers, fibras ópticas, óptica não linear, etc. O método sol-gel tem sido intensivamente explorado de forma a obter componentes ópticos a baixa temperatura. Consideremos alguns exemplos.

3.3.1.1. Vidros não dopados

Por exemplo, as redes de difracção em guias de onda são normalmente utilizadas em óptica integrada como filtros de banda estreita, divisores de feixe, elementos de focagem, etc. Essas redes são tipicamente fabricadas através de radiação de escrita ou métodos holográficos. Utilizando a tecnologia sol-gel na sua produção, estas redes podem ser obtidas através da impressão de um molde com o padrão desejado no gel quando este ainda não completou as ligações cruzadas na sua estrutura [38].

Em aplicações em que são utilizados componentes ópticos delicados, tais como fibras ópticas, a incorporação de óxido de azoto na estrutura de silício do vidro é desejada, uma vez que melhora as características mecânicas, térmicas e químicas [39]. A preparação dos vidros com óxido de azoto é difícil de conseguir devido às temperaturas elevadas que são necessárias e estão limitados a uma composição de 12% de nitrogénio. A produção de uma fibra a partir de uma solução sol-gel com subsequente tratamento térmico em ambiente amoniacal conduziu à obtenção de uma composição em nitrogénio de 32% [40].

3.3.1.2. Vidros dopados

Algumas aplicações destes materiais derivam do facto de ser possível dopar a estrutura de silício com moléculas orgânicas, conferindo assim características desejadas ao material. Podem ser encontrados exemplos na área da construção de lasers, melhoria do comportamento de materiais ópticos não lineares (NLO – *non linear optical*) [41], fotocromismo [42], etc.

Na área da construção de lasers, temos o exemplo da alteração da gama de emissão do laser quando se utiliza uma matriz de óxido de polipropileno ligado covalentemente a trietoxissilano onde foi incorporado Coumarin-153, como elemento activo do laser [43].

Os materiais NLO apresentam características interessantes devido à sua utilização como duplicadores de frequência, interruptores ópticos, guias de onda, efeito electro-óptico linear, etc. Os materiais utilizados nesta área, são normalmente obtidos pela incorporação de cromóforos com hiperpolarização microscópica em polímeros. A falta de estabilidade temporal do comportamento não linear a temperaturas mais elevadas impede a implementação destes materiais. A tecnologia sol-gel tem permitido a incorporação de cromóforos NLO em filmes com elevada qualidade e que melhoram a estabilidade térmica [44].

3.3.1.3. Lentes de Contacto

Os materiais que constituem as lentes de contacto para utilização sobre a córnea do olho deverão satisfazer um conjunto de critérios tais como, flexibilidade, dureza, índice de refração, transparência, estabilidade química, molhabilidade e serem biologicamente inertes.

Também na área da fabricação de lentes de contacto os materiais fabricados pelo processo sol-gel têm mostrado ser uma alternativa interessante aos materiais normalmente utilizados [45].

3.3.2. CATALISADORES

Devido à natureza porosa das estruturas de sílica, estas têm sido extensivamente utilizadas como materiais catalíticos. São duas as características que se destacam nestas estruturas, sendo a primeira o elevado número de grupos hidroxilo na superfície que poderão actuar como catalisadores ácidos, e a segunda a possibilidade de ligar à superfície metais que actuarão como centros activos de catálise. Essa ligação pode ser realizada através de a) dopagem da solução inicial com o precursor metálico [46], b) deposição pós-síntese do metal na superfície da estrutura de sílica [47], e c) ligação de complexos metálicos a ligandos que estão ligados covalentemente à estrutura de sílica [48].

3.3.3. FILMES

As técnicas de sol-gel oferecem muitas vantagens no que diz respeito à deposição de filmes pois permitem a deposição de filmes finos e homogéneos em substratos de grande dimensão e com uma forma curva utilizando técnicas de deposição simples. Além disso, ainda permitem a obtenção de multicamadas de filme.

A deposição simples permite obter filmes de condução, filmes de passivação, filmes porosos, filmes para controlo óptico ou anti-reflexo, filmes de promoção ou resistência à adesão, filmes biocompatíveis, e muitos outros.

Como exemplo de utilização de filmes de sol-gel na indústria, empresas como Nippon Sheet Glass, Asahi Glass Company, e Central Glass Company, no Japão, introduziram aplicações com géis fotocatalíticos, filmes anti-humidade, aerogéis hidrofílicos, deposição de filmes na indústria automóvel e fabrico de ecrãs de televisão.

Após estudos intensivos para aplicação de filmes de sol-gel no ecrã de televisões, a Toshiba iniciou em 1922 a aplicação de um filme de absorção de sílica-zircónio com um pigmento orgânico e que melhorava significativamente o contraste de cores por absorção de luz nos 570 nm. A qualidade das cores apresentadas na televisão foi também significativamente melhorada com a aplicação de um filme anti-reflexo no ecrã [49].

3.3.4. MEMBRANAS

As operações de filtração e separação realizadas na microescala requerem a utilização de membranas. A propriedade principal destes materiais consiste na capacidade de reter selectivamente moléculas por um processo de exclusão baseado no tamanho destas. Esta capacidade deve-se à sua estrutura porosa altamente regular de dimensões moleculares. No entanto, existem ainda membranas que cumprem a sua função através de um processo electrostático ou hidrofóbico.

A maioria das membranas existentes é constituída por materiais poliméricos devido à facilidade com que podem ser produzidos. A utilização de materiais cerâmicos apresenta algumas vantagens em relação aos orgânicos, tais como longevidade elevada, resistência à deformação no caso de utilizadas em processos de alta pressão, estabilidade química, resistência a temperaturas elevadas (ex. processos de esterilização), imunes à acção de bactérias, etc [50].

A tecnologia sol-gel tem a vantagem de a porosidade ser uma característica inerente aos materiais produzidos desta forma, assim como a facilidade de manipulação do tamanho de poros e da química de superfície de filmes.

Uma das áreas de aplicação destas membranas cerâmicas é a separação de gases, onde por exemplo, filmes à base de silício e alumina são utilizados na separação de hidrogénio, nitrogénio e outros gases [51, 52].

A análise cromatográfica é uma área extensiva à da utilização de membranas e também aqui se encontram aplicações dos materiais sol-gel. Estes materiais podem ser utilizados na construção da própria coluna, como é o exemplo a construção de colunas multi-capilares de sol-gel para análise rápida em cromatografia gasosa de hidrocarbonetos leves [53]. Outro exemplo utiliza colunas de sol-gel funcionalizadas com grupos fenil distribuídos ao longo da matriz para interacção cromatográfica.

Estas colunas são utilizadas em electrocromatografia capilar para separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [54].

Técnicas cromatográficas também são habitualmente utilizadas na determinação de quantidades vestigiais de espécies químicas. Uma nova tecnologia envolve a utilização de materiais sol-gel para concentrar quantidades muito baixas de componentes químicos (microextração capilar) para posterior análise utilizando técnicas de cromatografia gasosa. Esta técnica permite detecção de componentes tais como aldeídos, cetonas, clorofenóis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e álcoois, em quantidades na ordem de 1 em 10^{15} partes [55].

3.3.5. SENSORES QUÍMICOS E BIOSENSORES

Uma larga gama de aplicações para medição da concentração de espécies químicas utiliza uma metodologia de aprisionamento de um reagente numa matriz de um material que funcionará como parte integrante de um sistema de transdução. A matriz pode ser constituída por substâncias orgânicas, no entanto, a utilização de materiais produzidos pelo processo sol-gel, apresentam características de interesse melhoradas como estabilidade química, transparência óptica, controlo da porosidade, permeabilidade, etc. A característica principal que tem motivado o crescente interesse nos materiais sol-gel, é a capacidade de aprisionar reagentes de diferentes dimensões e cargas numa matriz estável. Esta estrutura porosa permite ainda que as espécies em análise interajam com o reagente, através de um processo de difusão através da matriz.

São vários os exemplos de reagentes que podem ser incorporados numa matriz sol-gel, tais como proteínas, enzimas, anticorpos, indicadores fluorescente, quelatos, éteres de coroa, ciclodextrinas, etc. O trabalho desenvolvido nesta tese pertence a esta classe de aplicações.

3.3.6. OUTRAS APLICAÇÕES

Existem ainda outras aplicações para estes materiais que não são catalogados nos tipos apresentados anteriormente. Por exemplo, uma aplicação actual do sol-gel pode ser encontrada na área da cosmética. Sol-gel Technologies, Ltd, desenvolveu entre outros produtos, um creme solar para protecção de raios ultravioletas baseado em microcápsulas de sol-gel. As substâncias orgânicas que absorvem a radiação ultravioleta são aprisionadas em microcápsulas de sol-gel, com poros suficientemente pequenos para impedir a perda do material orgânico. Devido às suas propriedades químicas neutras, a aplicação do sol-gel neste produto permite aumentar a tolerância de algumas peles mais sensíveis a estes cremes [56].

3.4. PROCESSO REACCIONAL

A solução designada de “sol” consiste numa suspensão de partículas coloidais com movimento browniano (movimento aleatório de partículas) inseridas num líquido que constitui a matriz. Pelo facto de estas partículas terem uma dimensão extremamente reduzida (1 a 1000 nm), as forças gravitacionais são desprezáveis e as interações são dominadas por forças intermoleculares do tipo de van der Waals.

Diz-se que as dispersões coloidais são intermediárias entre as soluções verdadeiras e os sistemas heterogéneos, onde as partículas dispersas são maiores do que as moléculas mas não suficientemente grandes para se depositar pela acção da gravidade.

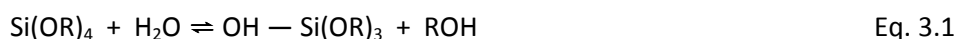
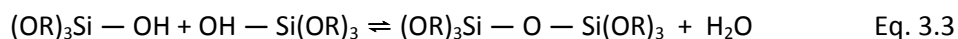
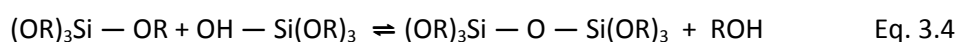
Os precursores utilizados para formar a suspensão coloidal, consistem em elementos metálicos ou metalóides (designação clássica e genérica de elementos químicos que exibem tanto características de metais quanto de não-metais, em relação às suas propriedades físicas e/ou químicas) ligados a vários elementos reactivos [34].

Por exemplo, a formação do óxido de alumínio pode ser obtida utilizando um sal inorgânico como o $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ou um precursor orgânico tal como $\text{Al}(\text{OC}_4\text{H}_9)_3$. Este último precursor é um exemplo de um alcóxido, sendo esta classe extensivamente utilizada na preparação de sol-gel. Os alcóxidos são ligandos obtidos através da remoção de um átomo de hidrogénio do grupo hidróxido de um álcool, tais como o metoxi ($\bullet\text{OCH}_3$, em que o ponto \bullet indica um electrão livre para estabelecer uma ligação) ou etoxi ($\bullet\text{OC}_2\text{H}_5$).

Os alcóxidos de metais são os precursores da classe dos metalorgânicos constituídos por um metal ligado a um grupo alcóxido. Os metalorgânicos são facilmente confundidos na literatura com os compostos organometálicos, tendo estes últimos ligações metal-carbono e não metal-oxigénio-carbono como no caso dos primeiros.

Os alcóxidos metálicos são os precursores de sol-gel mais amplamente utilizados devido à facilidade com que reagem com a água. Diversa bibliografia aborda de forma separada o processo sol-gel que envolve a utilização de silicatos dos não silicatos. Dado que neste trabalho foram produzidos filmes de sol-gel utilizando precursores de silício, apenas esta classe será abordada.

Os géis de silicato são normalmente sintetizados através da reacção de precursores alcóxidos tetrafuncionais que constituem os monómeros do processo reaccional, com a água, na presença de um catalisador que poderá ser ácido (ex. HCl) ou básico (ex. NH_3). Existem três tipos de reacções reversíveis que são utilizadas para descrever o processo de síntese de formação de sol-gel:

Hidrólise**Condensação de água****Condensação de álcool**

Na reacção de hidrólise (Eq. 3.1), ocorre a ligação de um grupo hidróxilo (OH) ao átomo metálico ou metalóide (neste caso é apresentado o silício como exemplo), e a libertação de álcool (ROH) em que R representa um protão ou outro ligando (se R for um grupo alquilo, então •OR é um grupo alcóxido).

Dependendo da quantidade de água e catalisador presente, a hidrólise poderá ser completa para que todos os grupos alcóxidos sejam substituídos por grupos hidroxilo (Eq. 3.2).

As reacções de condensação implicam a libertação de uma molécula de água ou de um álcool (Eq. 3.3) e subsequente formação de ligações silano (Si — O — Si). À medida que as reacções de condensação vão ocorrendo, a dimensão da molécula inicial vai crescendo por um processo equivalente à polimerização. O alcóxido de silício tem uma funcionalidade igual a 4, significando que poderá estabelecer quatro novas ligações com outros alcóxidos através de uma reacção de condensação. Quando uma molécula tem uma funcionalidade igual a dois, esta poderá crescer até assumir dimensões macroscópicas, mas a sua cadeia molecular será linear. Com uma funcionalidade igual a 4, a molécula crescerá de forma tridimensional, formando uma estrutura complexa. O diamante é o exemplo de uma estrutura em que os átomos de carbono que o constituem têm uma funcionalidade de 4, dando origem a uma estrutura cristalina perfeita. No caso dos alcóxidos de metal, o crescimento dá origem a uma estrutura aleatoriamente ramificada. Em determinadas condições de défice de água, ocorrem menos de quatro ligações por molécula, permanecendo alguns grupos alcóxido na estrutura final, que será conseqüentemente menos ramificada.

É de notar que as reacções de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, pois após a formação das primeiras moléculas de precursor hidrolisadas, estas ficam disponíveis para participar nas reacções de condensação.

3.5. GELIFICAÇÃO

À medida que as reacções de hidrólise e condensação ocorrem na solução, os aglomerados de sílica vão crescendo por uma de duas vias: o aglomerado estabelece ligações com partículas de sol isoladas ou dois aglomerados estabelecem pelo menos uma ligação de condensação entre dois pontos das respectivas estruturas, formando um único aglomerado de elevado volume.

O ponto de gelificação corresponde à formação de um aglomerado com uma estrutura ramificada de tal forma volumosa que ocupa a totalidade do recipiente que contém a solução.

Neste ponto, ainda existirão partículas individuais sol e aglomerados que embora aprisionados no aglomerado maior, ainda não estabeleceram quaisquer pontos de ligação com essa estrutura. Com o tempo, essas ligações acabarão por ser estabelecidas contribuindo para um aumento da ramificação da estrutura, embora o volume seja mantido constante.

L.C. Klein [57] avaliou a variação da viscosidade em função do tempo de reacção para soluções com diferentes razões água/TEOS e é notório que todas elas apresentam um aumento súbito da viscosidade a um dado momento (Figura 3.2). O aumento súbito da viscosidade corresponde ao ponto de gelificação, correspondendo também um aumento da elasticidade.

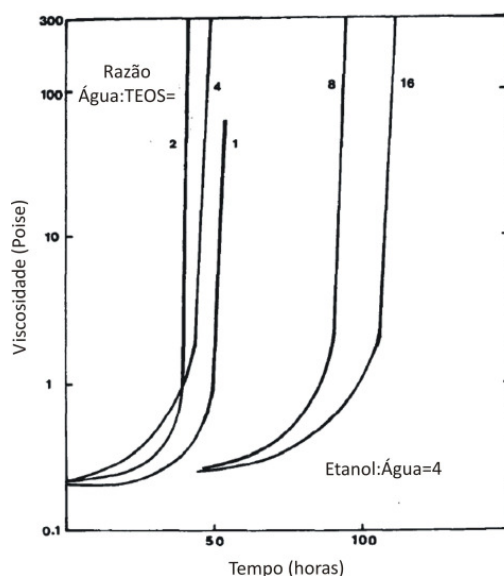


Figura 3.2 – Viscosidade de filmes de sol-gel preparados com diferentes razões água/TEOS (adaptado de [57]).

A observação do ponto de gelificação pode ser avaliada em monólitos, mas torna-se difícil a sua determinação em filmes. Tipicamente a determinação do ponto de gelificação é realizada visualmente quando a solução deixa de se movimentar livremente no recipiente. Por exemplo, ao deitar o recipiente onde foi preparada a solução o gel vai manter a sua forma, não entornando. Alternativamente, também pode avaliar-se a formação de uma marca na superfície (ex. impressão

digital quando se toca com os dedos) ou se existe uma fissura quando se aperta o recipiente. O tempo de gelificação é um termo não preciso e de valor apenas indicativo, pois a sua determinação é apenas qualitativa.

3.6. ENVELHECIMENTO APÓS A GELIFICAÇÃO

Após a gelificação, as reacções de hidrólise e condensação continuam a ocorrer com o consequente aumento de ligações cruzadas na estrutura, o que aumenta também o aprisionamento das fracções de sol ainda existentes nos poros da estrutura mãe.

Estudos de ressonância magnética (RMN) de amostras gelificadas [58] mostram que no momento da gelificação existe uma quantidade apreciável de espécies de silício Q^2 (silício ligado a outros átomos de silício através de 2 átomos de oxigénio), ocorrendo de seguida um gradual aumento do número de espécies de silício Q^3 e Q^4 . Este aumento é consequência da ligação entre grupos hidroxilo disponíveis na superfície dos aglomerados aprisionados e o aglomerado mãe, assim como grupos intra-aglomerado disponíveis.

Estas ligações podem continuar por meses com uma velocidade que dependerá do pH, temperatura e composição. Como consequência, a estrutura sofre um aumento gradual do seu endurecimento e contracção, devido ao estabelecimento de ligações intra-poros onde antes apenas existiam ligações fracas entre grupos alcoxilo e hidroxilo. A contracção força a expulsão de líquido existente nos poros, que no caso de amostras em recipientes fechados estas mudam progressivamente a sua aparência de géis homogéneos para monólitos submersos em líquido (Figura 3.3). Este processo é denominado de sinérese.



Figura 3.3 – Sinérese de um gel [59].

As alterações do material de sol-gel através do envelhecimento são muitas vezes encaradas como indesejáveis em aplicações tecnológicas, particularmente quando se deseja o aprisionamento na

matriz de espécies orgânicas ou biológicas em condições de baixa temperatura. Neste caso, será importante considerar as seguintes questões:

- O envelhecimento estabiliza de forma geral, as propriedades do material;
- O processo de envelhecimento pode ser controlado por alteração do pH, temperatura, pressão, solvente, composição da mistura precursora inicial, logo este pode ser otimizado;
- Nas situações de necessidade de uma produção regular, poderá considerar-se a acumulação em stock intermédio de material em estágio de envelhecimento, evitando assim um atraso na produção.

3.7. SECAGEM

O processo de secagem de um gel pode ser dividido em várias etapas [34]:

- 1- taxa de evaporação constante;
- 2- ponto crítico;
- 3- primeira diminuição da taxa de evaporação;
- 4- segunda diminuição da taxa de evaporação.

A primeira etapa (1) corresponde uma taxa de evaporação por unidade de área de secagem e é independente do tempo. Neste caso, toda a superfície do material está coberta por um filme de líquido, sendo a taxa de evaporação dependente da pressão de vapor do líquido, que por sua vez depende da temperatura e da pressão de vapor ambiente. Uma vez que a evaporação é um processo endoenergético, verifica-se uma diminuição da temperatura o que por sua vez faz diminuir a taxa de evaporação, até que esta atinge um valor constante. Nesta fase, o gel encolherá um volume equivalente à quantidade de água ou outro líquido perdido durante a evaporação.

À medida que o gel seca e encolhe, a sua estrutura vai ficando cada vez mais compacta até que atinge um ponto crítico (etapa 2). A partir deste ponto crítico, a evaporação continua a ocorrer, mas a estrutura está suficientemente compacta e rígida de forma a resistir a uma maior diminuição de volume. Devido à tensão superficial e a diminuição do tamanho dos poros, são geradas elevadas pressões no menisco de interface dentro dos poros. Em determinadas condições pouco favoráveis podem ocorrer tensões capilares suficientemente elevadas para que se formem fissuras no material. Por exemplo, quando uma estrutura tem uma diversidade de tamanho de poros, os poros mais largos são secos mais rapidamente por evaporação. Se a parede de um poro largo for adjacente a um poro mais estreito, formam-se tensões desiguais em cada lado da parede, o que poderá originar uma fissura (Figura 3.4).

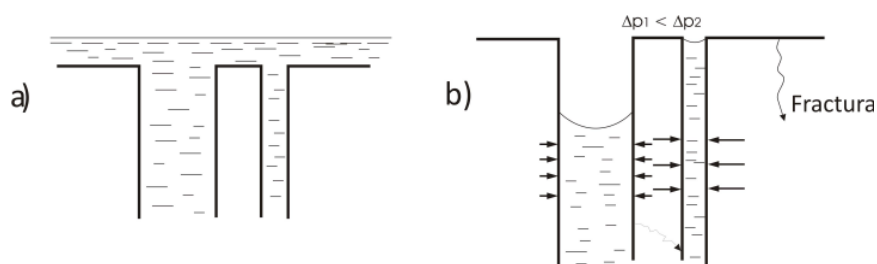


Figura 3.4 – Formação de tensões nos poros durante o processo de secagem: a) antes e b) após a formação de forças capilares (adaptado de [60]).

Na etapa seguinte (3), à medida que a evaporação continua, o menisco dentro dos poros regride formando-se um filme superficial na parede interna do poro.

Quando o menisco regride o exterior não fica imediatamente seco, pois estabelecem-se caminhos funiculares que continuam a transportar algum líquido até à superfície, e consequente evaporação neste ponto (Figura 3.5).

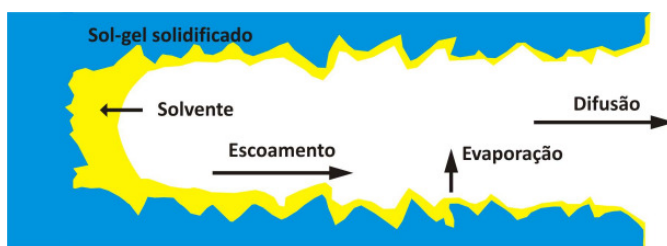


Figura 3.5 – Caminho funiculares de difusão do líquido para o exterior dos poros (adaptado de [34]).

Este fluxo de líquido ocorre devido a gradientes de tensões capilares. Uma pequena fracção da evaporação total ocorre directamente a partir do filme dentro dos poros, tornando a fase gasosa saturada sendo esta transportada para o exterior por um processo de difusão. Esta fase é caracterizada por uma diminuição gradual da taxa de evaporação, tendo como consequência um aumento de temperatura e aproximação desta à temperatura ambiente.

À medida que a distância entre a frente de evaporação e o exterior aumenta o gradiente de pressão capilar diminui e também o fluxo de líquido. A partir deste ponto, a evaporação ocorre exclusivamente por evaporação no interior do poro e difusão do vapor para o exterior (etapa 4). A temperatura aproxima-se bastante da temperatura ambiente e a taxa de evaporação fica menos dependente de condições externas (temperatura, humidade, etc.).

Um dos problemas mais indesejáveis que surgem durante a secagem é a formação de fissuras no material. O processo de secagem produz um gradiente de pressões na fase líquida do gel, o que conduz a diferentes taxas de contracção da estrutura de sílcio. Quando o exterior do material contrai

mais rapidamente que o interior, são formadas tensões que poderão causar o rompimento da estrutura no exterior, originando uma fissura superficial. Conforme observado na Figura 3.6, o material adjacente em cada lado da fissura passa a movimentar-se mais livremente, tornando favorável o aumento da fissura na superfície.

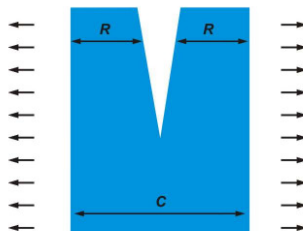


Figura 3.6 – Formação de fissura na superfície do material. R- região com contração livre, C- região sob tensão (adaptado de [34]).

De forma a minimizar ou mesmo eliminar o aparecimento de fissuras nos materiais de sol-gel, diferentes vias têm sido estudadas, para assim conseguir produtos finais de elevada qualidade. A adição de surfactantes à solução reaccional permite reduzir energia interfacial e como tal reduzir as tensões capilares, reduzindo assim o aparecimento de fissuras [60]. Outro grupo de químicos conhecidos como DCCA (*Drying Control Chemical Additives*), podem ser misturados na solução sol-gel, ajudando a reduzir o número de fissuras, no entanto, alteram também as propriedades do material resultante e a sua remoção é difícil de conseguir [61, 62].

Outra técnica que permite reduzir a probabilidade de formação de fissuras é a secagem supercrítica. Uma vez que a contração do material e formação de fissuras são produzidas por gradientes de forças capilares, Kistler sugeriu que esses problemas poderiam ser evitados através da remoção do líquido a valores superiores da temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c), pois nestas condições não há distinção entre as fases líquidas e de vapor, as densidades são iguais, não existe interface líquido-vapor e não existem forças capilares [36].

3.8. PARÂMETROS DE CONTROLO

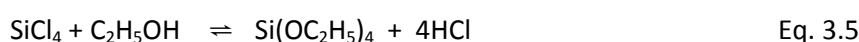
Conforme explicado anteriormente, a produção de materiais de sol-gel envolve uma complexa mistura de reacções que ocorrem simultaneamente. Existe um conjunto de parâmetros que condicionam estas reacções e que uma vez afinados podem ser utilizados para produzir um material com as características desejadas (ex. porosidade, distribuição de poros, transparência, adesão, etc.). A modificação destes parâmetros poderá ter efeitos desde o nível molecular, por exemplo com a alteração do tipo de precursor utilizado, ao macroscópico, com alterações de

estrutura através de tratamentos térmicos [35]. Nos subcapítulos seguintes serão abordados alguns dos parâmetros de controlo mais relevantes no processo sol-gel para a produção de materiais.

3.8.1. NATUREZA DO PRECURSOR

Os alcóxidos de silanos mais conhecidos são o tetraetoxisilano ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) e o tetrametoxisilano ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$), normalmente abreviados na literatura por TEOS e TMOS, respectivamente.

O método tradicional para preparar alcóxidos de silano tetrafuncionais é através da reacção de tetracloreto de silano (SiCl_4) com um álcool (Eq. 3.5). Quando é utilizado o etanol anidro, o produto resultante será o TEOS formando-se também ácido clorídrico como subproduto [63].



A hidrólise dos precursores alcóxidos de silício é muito sensível à dimensão dos grupos alcóxido, devido a um impedimento estérico. Este impedimento contribui para uma diminuição da reacção de alongamento da cadeia, mas mais especialmente da ramificação lateral da cadeia [35].

Quanto maior for a cadeia carbonatada do grupo alcóxido, mais difícil é o acesso ao átomo central, levando a que a velocidade de reacção seja mais baixa (Tabela 3.1). Por esta razão o TMOS é mais rapidamente hidrolizável que o TEOS.

Tabela 3.1 – Constantes cinéticas de hidrólise para diferentes precursores [35].

$\text{Si}(\text{OR})_4$; R=	Constante cinética da reacção de hidrólise ($10^{-2}\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}(\text{H}^+)^{-1}$)
C_2H_5^-	5.1
C_4H_9^-	1.9
$\text{C}_6\text{H}_{13}^-$	0.83
$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2^-$	0.30

Devido ao carácter mais ou menos hidrofóbico do precursor e uma vez que este é misturado com a água para que ocorra a reacção, poderá haver a necessidade de adição de uma maior ou menor quantidade de solvente para que ocorra a miscibilidade entre os reagentes [34].

3.8.1.1. Silicatos organicamente modificados (ORMOSILS)

Cada monómero de alcóxido de silício tetrafuncional pode estabelecer até 4 ligações na rede de silício. É possível alterar a funcionalidade do precursor e ao mesmo tempo conferir-lhe características diferentes através da substituição de um ou mais grupos alcóxidos por um grupo orgânico não

hidrolisável. Por exemplo, no caso de uma monosubstituição na molécula $\text{Si}(\text{OR})_4$, obteremos uma molécula em que um dos grupos não é hidrolisável, $\text{R}'\text{Si}(\text{OR})_3$, representando R' um grupo alquila.

O processo sol-gel é um método que permite produção de superfícies organicamente modificada através da introdução destes precursores com grupos funcionais alquila (organoalcoxisilanos) na solução de polimerização inicial. A mistura de precursores inorgânicos (ex. TEOS, TMOS, etc.) com organoalcoxisilanos permite obter materiais com melhores propriedades do que quando se utiliza os primeiros isoladamente. Estes materiais são normalmente referenciados na bibliografia como *ORMOSILs* (*organically modified precursors*) ou *CERAMERs* (*ceramic polymers*), e as suas características podem ser afinadas por misturas com precursores de diferentes tipos e em diferentes proporções.

Quando comparados os *ormosils* com materiais de sol-gel preparados a partir de precursores inorgânicos puros, os primeiros apresentam as seguintes vantagens:

- permitem obter filmes finos com ausência de fissuras;
- a funcionalização da superfície com grupos alquila específicos;
- introdução de grupos funcionais reactivos que poderão subseqüentemente ligar-se a grupos de reconhecimento de moléculas;

3.8.2. RAZÃO MOLAR ÁGUA:PRECURSOR

O aumento da razão molar água:precursor promove uma maior extensão da reacção de hidrólise. De acordo com as equações 3.3 e 3.4, em situações de défice estequiométrico de água ($2 < R$) a reacção da equação 3.4 é favorecida, enquanto que a reacção da equação 3.3 é favorecida quando $R > 2$ [34].

Em meios ácidos, um excesso de água levará à produção de monómeros de silício que, dependendo da quantidade de água em excesso, poderão não estar totalmente hidrolisados. Em meio básico formar-se-ão alguns monómeros de silício totalmente hidrolisados enquanto outros monómeros não terão sofrido qualquer hidrolisação, podendo esta situação originar a formação de duas fases líquidas.

É necessário ainda considerar que quando se aumenta a quantidade de água em relação ao precursor, e mantendo a quantidade de solvente constante, ocorre uma diminuição da concentração de precursor o que por sua vez reduz a velocidade de hidrolisação e condensação, com um conseqüente aumento do tempo de gelificação. L.C. Klein [57] demonstrou que para várias razões de etanol:TEOS, o aumento da razão água:TEOS promovia uma diminuição do tempo de gelificação até

um valor mínimo, após o que o aumento de R aumentava também o tempo de gelificação (Figura 3.7).

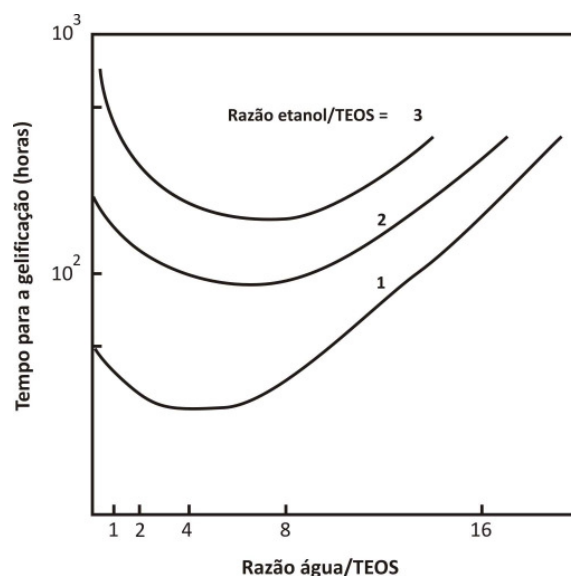


Figura 3.7 – Influência da razão água/TEOS no tempo de gelificação para diferentes quantidades de etanol (adaptado de [57]).

McDonagh estudou o efeito da razão da água/TEOs na porosidade do filme, por comparação de filmes produzidos com $R=2$ e $R=4$. O autor concluiu que com uma razão mais elevada, existe a diminuição da porosidade do filme. Um fluoróforo sensível ao oxigénio foi incorporado nestes filmes, tendo sido efectuadas medições da concentração de oxigénio em meio gasoso, tendo sido concluído que a constante de Stern-Volmer diminui com o aumento da razão água/precursor [64].

3.8.3. TIPO DE SOLVENTE

Na maior parte das condições de mistura, o alcóxido de silício e a água são imiscíveis, sendo necessário a adição de um solvente (ex. etanol) para que a reacção ocorra numa única fase. Em algumas condições é possível a preparação do sol-gel sem a adição de solvente, pois o álcool libertado na reacção de hidrólise irá progressivamente homogeneizando a mistura. O álcool para além de actuar como solvente, também interfere na cinética e extensão da reacção, pois é um produto das reacções de hidrólise e condensação de álcool.

Na Figura 3.8 é apresentado um diagrama ternário de solubilidade entre a água+TEOS+Etanol que relativiza as quantidades necessárias para que ocorra miscibilidade da mistura.

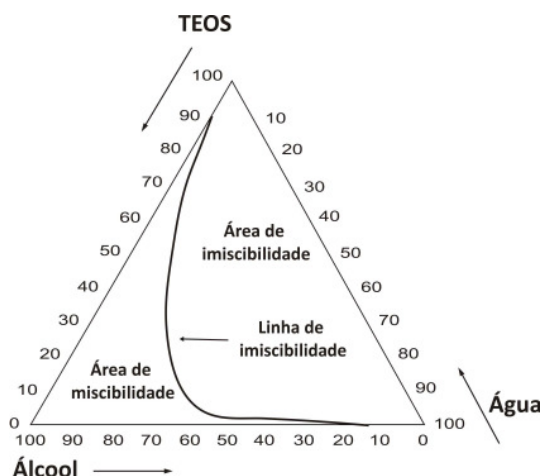


Figura 3.8 – Diagrama de fases ternário de solubilidade do sistema Água+Álcool+TEOS (adaptado de [34]).

Quanto maior a cadeia carbonatada do alcóxido, maior será a sua hidrofobicidade, logo maior a imiscibilidade deste com a água, havendo necessidade de uma maior quantidade de solvente, ou a utilização de um tipo de solvente diferente. Para além do álcool, outros solventes poderão ser utilizados, tais como, formamida, dimetilformamida, 1,4-dioxano e tetrahydrofurano. A escolha do solvente é importante, na medida que a utilização de um solvente diferente daquele que resulta da reacção de hidrólise pode levar a uma trans-esterificação e afectar a sequência reaccional da hidrólise e condensação.

O solvente escolhido, também desempenha um processo muito importante no processo de secagem, devido à sua maior ou menor volatilidade.

3.8.4. CATALISADOR

A hidrólise dos alcóxidos de silício é altamente favorecida através da utilização de catalisadores. Quando a reacção ocorre em condições ácidas, o passo inicial da hidrólise, isto é, a primeira substituição de um grupo alcóxido da molécula por um grupo hidróxido, ocorre muito rapidamente. Devido às características do mecanismo reaccional em meio ácido, após sofrer a primeira monosubstituição de um dos seus quatro grupos alcóxidos, a molécula fica menos susceptível a sofrer uma substituição do seu segundo grupo alcóxido. Consequentemente, o último grupo alcóxido é o que mais dificilmente sofrerá uma substituição. Isto significa que as reacções entre os grupos Si-OH e Si-OR de monómeros não hidrolisados ou parcialmente hidrolisados, desempenharão um papel importante na mistura reaccional. Devido ao efeito estérico dos grupos substituintes vizinhos, a reacção em meio ácido, produz primariamente cadeias longas e lineares de silício. Secundariamente ocorrerão reacções de ligação entre cadeias correspondentes à reacção do terceiro e quarto grupo

alcóxido. Este tipo de comportamento reaccional resulta na obtenção de materiais homogéneos e relativamente densos com poros de pequenas dimensões.

Na reacção em meio básico, ao contrário do que acontece no caso anterior, a reacção ocorre tanto mais favoravelmente quanto mais grupos alcóxidos estiverem substituídos. Isto significa que após a primeira substituição, a segunda ocorrerá mais facilmente, a terceira ainda mais facilmente, e a quarta será a mais favorável de todas. Há que considerar que devido ao crescimento aleatório e aos efeitos estéricos, alguns dos grupos alcóxido permanecerão ligados à molécula. Comparativamente ao meio ácido, neste caso as reacções de condensação ocorrem com velocidades cinéticas mais elevadas. Devido à ligação entre redes de silício quando estas já têm uma dimensão razoável, a estrutura resultante é bastante porosa.

Não é apenas o pH que influencia as reacções que ocorrem, mas também a própria natureza do catalisador utilizado. Por exemplo, quando se utiliza ácido fluorídrico (HF) em vez de ácido clorídrico, a gelificação é muito mais rápida, verificando-se também que a estrutura final apresenta ligações Si-F o que torna o sol-gel mais hidrofóbico [35].

3.8.5. ENVELHECIMENTO DA SOLUÇÃO

Os processos físico-químicos que ocorrem antes do ponto de gelificação desempenham um papel importante na estrutura do material final. No caso de formação de filmes, a solução é depositada sobre um substrato num determinado momento após o início da reacção e antes do ponto de gelificação. Nesse momento, a solução contém um conjunto de aglomerados de silício que cresceram até uma dimensão de acordo com a cinética da reacção. Quando a solução é depositada ocorre uma rápida evaporação do solvente e conseqüente aproximação desses aglomerados. Neste processo continua a ocorrer o crescimento dos aglomerados por condensação e a ligação entre aglomerados.

O tempo de envelhecimento da solução determina o tamanho dos aglomerados no momento em que eles se começam a interligar mutuamente. Por sua vez a dimensão dos aglomerados determina o tipo de estrutura resultante e mais especificamente a porosidade.

Dependendo dos precursores utilizados e respectivas razões com a água e solvente, o envelhecimento da solução pode ser essencial para que a solução tenha uma viscosidade suficientemente elevada para se proceder à deposição do filme sobre um substrato.

O aumento da porosidade com o tempo de envelhecimento tem um efeito positivo quando os filmes produzidos são utilizados como materiais sensores, pois existe um conseqüente aumento da difusão do analito na matriz assim como um aumento da sensibilidade [64].

3.9. FORMAÇÃO DE FILMES

A formação de um material sol-gel a partir da solução precursora pode ser facilmente obtida em várias configurações. Um fino filme de sílica pode ser depositado por *spin-coating* ou *dip-coating* na superfície de eléctrodos, lâminas de vidro, bolachas de sílica, fibras ópticas. Se a solução for colocada num tubo de vidro, cuvete, ou outro tipo de recipiente, será formado um monólito com a forma do meio receptor. Alternativamente, o pó monodisperso ou até mesmo fibras podem ser obtidas em condições específicas de fabrico. A Figura 3.9 esquematiza as possibilidades de produção de diferentes materiais a partir da mesma solução inicial.

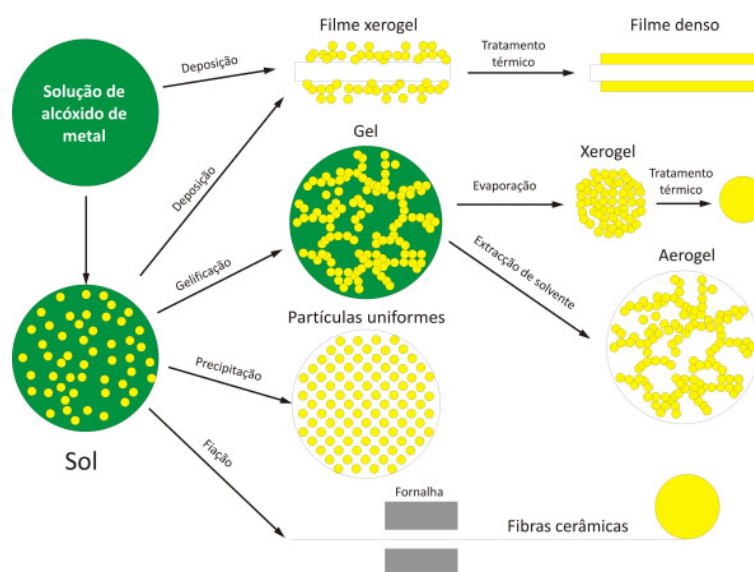


Figura 3.9 – Tipos de matérias formados a partir do sol-gel (adaptado de [65]).

Existem inúmeras aplicações para os produtos derivados do processo sol-gel. Uma das maiores áreas de aplicação, é o da produção de filmes de espessura muito baixa, que poderão ser depositados num substrato por um processo de *spin-coating* ou *dip-coating*. Outros métodos incluem aplicação por *spray*, *electrofórese*, *impressão com injectores de tinta*, ou aplicação com um processo de rolos [66].

A produção de material sol-gel durante o trabalho descrito nesta tese foi realizada através da deposição de filmes sobre um substrato de vidro pelo processo de *dip-coating*. Por esta razão, será apenas considerada a formação de filmes pela técnica utilizada.

3.9.1. FORMAÇÃO DE FILMES POR IMERSÃO (*DIP-COATING*)

As técnicas de *dip-coating* para deposição de filmes baseiam-se na imersão de um substrato num líquido e a sua remoção do banho, normalmente em posição vertical, a uma velocidade constante em condições controladas de temperatura e atmosfera. O *dip-coating* pode ser realizado por um processo contínuo ou descontínuo. No processo contínuo, o substrato entra e sai do líquido a uma

velocidade constante (Figura 3.10f). No processo descontínuo, podem ser considerados cinco passos: imersão, início, deposição, drenagem e evaporação (Figura 3.10a-e).

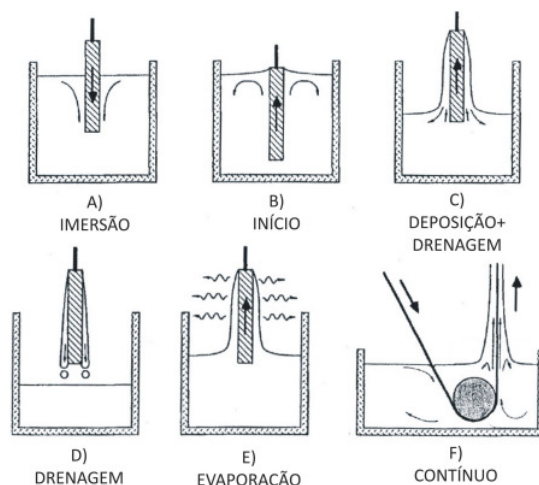


Figura 3.10 – Passos de formação de filmes por *dip-coating* (adaptado de [34]).

Quando os solventes são voláteis, tal como álcoois, a evaporação acompanha normalmente os passos início, deposição e drenagem. Quando o substrato é removido do banho, este arrasta duas camadas de líquido que acabam por se separar no ponto “S” ilustrado na Figura 3.11. A camada interna é arrastada verticalmente juntamente com o substrato e a camada externa volta de novo ao banho. A espessura do filme depositado dependerá da posição deste ponto S que divide as duas camadas. Por sua vez, a localização desse ponto depende da velocidade de remoção do substrato assim como da viscosidade do líquido. No filme interno que é arrastada juntamente com o substrato, as espécies inorgânicas são progressivamente concentradas devido à evaporação, seguindo-se os processos de gelificação e secagem já descritos anteriormente. Se o banho é um sistema reactivo, como é o caso das soluções sol gel que utilizam alcóxidos ou sistemas pré-hidrolizados, o controlo da atmosfera é indispensável, pois esta vai determinar a taxa de evaporação do solvente.

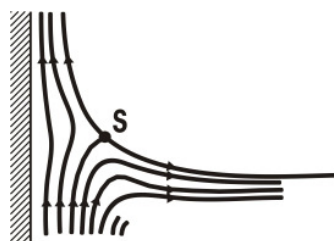


Figura 3.11 – Detalhe das linhas de fluxo de escoamento da solução sol-gel. S- ponto de estagnação (adaptado de [34]).

Este processo apresenta como vantagens a possibilidade de deposição de filmes em vários formatos e tipos de substratos de vidro, elevada homogeneidade superficial, flexibilidade na produção, possibilidade de revestimento de um ou dos dois lados do substrato, etc.

4. SENSORES ÓPTICOS PARA A MEDIÇÃO DE OXIGÉNIO

4.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um elevado desenvolvimento tecnológico nas áreas da microelectrónica, dispositivos ópticos e técnicas de processamento de sinais. A associação destas tecnologias ao elevado número de fenómenos ópticos tem possibilitado o aparecimento de novas plataformas instrumentais para a medição de diversos parâmetros.

Inicialmente, as pesquisas com os sensores ópticos foram direccionadas para a determinação de parâmetros físicos, tais como a temperatura, pressão, força, etc., mas mais tarde houve uma expansão para a sua utilização como sensores químicos.

O desenvolvimento de componentes ópticos miniaturizados como fontes de iluminação, fotodetectores e fibras ópticas com reduzidas perdas de sinal, oferece não só um aumento do desempenho dos esquemas sensoriais assim como a possibilidade de produção em grande escala a baixo custo [67].

Uma vantagem deste tipo de sensores, é que a utilização de fibras permite realizar a medição de parâmetros a longas distâncias, o que se torna uma vantagem evidente quando a amostra não está facilmente acessível (p. ex. dentro de um organismo) ou quando está colocada num ambiente agressivo ou hostil, como por exemplo, em ambientes contaminados biologicamente ou por radioactividade [68]. Outras vantagens incluem a imunidade a interferências electromagnéticas, pois existe uma total ausência de sinais eléctricos no terminal sensor onde ocorre a transdução.

As técnicas de espectroscopia mais utilizadas em sensores ópticos químicos são a absorção e a luminescência, no entanto, outras como a reflectometria, interferometria, etc., também têm sido aplicadas [69].

As características desejadas num sensor são elevada sensibilidade e selectividade para o analito (espécie medida), resposta linear com a concentração do analito, tempos de resposta baixos, boa razão sinal/ruído, ausência de histerese e excelente estabilidade a longo prazo.

4.2. COMPONENTES DOS SENSORES ÓPTICOS QUÍMICOS

Um sensor óptico químico é basicamente constituído por três elementos: uma fonte óptica, o elemento de transdução e um detector que transforma a propriedade óptica medida num sinal

eléctrico (Figura 4.1). As fibras ópticas poderão ser utilizadas para a transmissão óptica ou até mesmo como parte integrante do elemento de transdução.

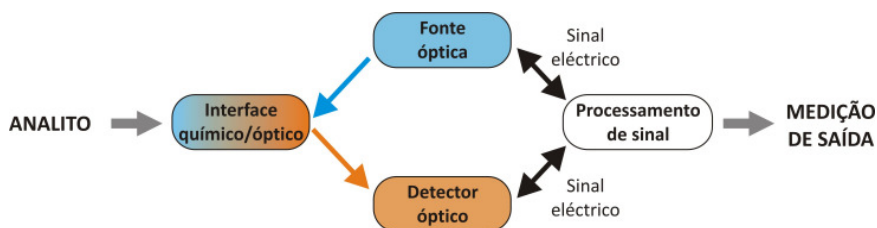


Figura 4.1 – Funcionamento genérico de um sensor óptico químico (adaptado de [70]).

4.2.1. FONTE ÓPTICA

Uma parte integrante do sensor de fibra óptica é a fonte de iluminação. A sua principal função é fornecer uma radiação com características apropriadas para que ocorra a transdução na zona interface químico/óptica. Isto significa que a potência de radiação transmitida deve ser adequada para interagir com o próprio analito ou um indicador (elemento cujas propriedades ópticas são alteradas pelo analito) e a gama de comprimento de ondas do espectro adequado para conseguir a máxima sensibilidade do sensor.

Existem vários tipos de fontes ópticas que diferem tanto no espectro emitido assim como na sua potência. Relativamente à banda espectral, estes podem ser classificados em três grupos:

- a) quasi-monocromáticos (lasers e díodos laser)
- b) pseudo-monocromáticos (LEDS)
- c) contínuos (lâmpadas incandescentes, lâmpadas de arco)

As lâmpadas incandescentes e de descarga de gás são denominadas de lâmpadas de luz branca porque emitem luz num espectro alargado. As lâmpadas contínuas mais utilizadas em sensores são as de arco de Xénon e emitem luz desde os UV até aos infravermelhos, no entanto, são dispendiosas e a potência de radiação não é estável. Se um sensor necessitar de excitação nos UV, as lâmpadas de deutério são mais adequadas, embora sejam caras e de curta duração (1000-2000h). As lâmpadas de tungsténio são de custo inferior, emitem um sinal estável e têm longa duração.

Estas lâmpadas apresentam como desvantagem relativamente aos outros tipos, a necessidade de sistemas de selecção óptica, tais como filtros de absorção ou interferométricos ou monocromadores. Os filtros de absorção conseguem obter um espectro com uma largura de banda de 50 nm, enquanto os interferométricos conseguem uma luz mais monocromática (1 nm), no entanto apresentam como desvantagem uma elevada atenuação da transmissão óptica. Os monocromadores são mais flexíveis, no entanto, são mais dispendiosos.

Os LEDs são fontes quase monocromáticas, pois a sua banda de emissão espectral tem uma largura típica de 20 a 50 nm. Existem LEDs disponíveis em toda a gama do visível, estendendo-se até à gama dos infravermelhos. A radiação emitida pelo LED depende da composição do material semiconductor com que é fabricado. Os LEDs podem ser utilizados em radiação contínua ou pulsada. O sucesso da aplicação dos LEDs em sensores ópticos químicos, deve-se ao seu baixo custo, elevado tempo de vida (pode ultrapassar as 100 000 horas) e as suas reduzidas dimensões.

Os díodos laser são fontes monocromáticas que apresentam uma banda espectral mais estreita que os LEDs, maior potência de emissão e uma menor dispersão angular da radiação. Como desvantagens são mais dispendiosos que os LEDs e mais dependentes da temperatura. Estas fontes também podem ser utilizadas para luz pulsada com uma instrumentação relativamente simples. A luz monocromática pode ainda ser obtida com lasers de estado sólido, gás, etc., que comparativamente com os díodos laser apresentam elevada potência, largura de banda mais baixa e com uma maior eficiência de injeção da luz em fibras. No entanto, são mais caros e o sistema de modulação mais complexo.

4.2.2. FOTODETECTORES

A função primária de um fotodetector existente num sensor óptico é a de transformar a medida transportada no sinal óptico num sinal eléctrico. Associado ao fotodetector, poderemos ter elementos ópticos (filtros, lentes, etc.) e amplificadores. Os factores mais importantes na escolha de um fotodetector para uma determinada aplicação são: a sensibilidade requerida, o nível de ruído inerente ao detector, a sua sensibilidade espectral, linearidade e tempo de resposta.

Os tubos fotomultiplicadores (PMT) são os detectores mais sensíveis, podendo detectar fótons individuais. A sua construção em tubo de vidro torna-os mecanicamente frágeis. Os fotodíodos semicondutores são dispositivos compactos e de dimensão mais reduzida que os anteriores. São adequados para aplicações de elevada/média intensidade luminosa. Uma das limitações é o ruído de base com várias ordens de magnitude superiores aos PMT. Os fotodíodos de avalanche (APD) surgiram como um produto intermédio dos dois anteriores e embora mais complexos que os fotodíodos semicondutores, o seu desempenho é superior.

4.2.3. FIBRAS ÓPTICAS

A função principal de uma fibra óptica é a transmissão de luz entre a fonte óptica e a interface química/óptica onde ocorre a transdução, e entre esta última e o fotodetector. Uma fibra óptica é um cabo cilíndrico com um diâmetro que pode ir desde cerca de 1 μm até várias centenas de

micrómetros [138]. Os materiais mais comuns utilizados no seu fabrico são o plástico, vidro e quartzo. A escolha do material depende da gama espectral do sinal que é transmitido ao longo da fibra. Por exemplo, para a transmissão de radiação visível podem ser utilizadas fibras de plástico ou vidro, no entanto, se radiação está na gama dos UV será necessário a utilização de fibras de quartzo.

A fibra óptica é normalmente constituída por três camadas: o núcleo, a bainha óptica e ainda o revestimento de protecção que constitui a camada exterior (Figura 4.2). A radiação propaga-se pelo núcleo sofrendo reflexões totais na interface núcleo-bainha. A transmissão só é possível devido a uma diferença do índice de refração entre a bainha e o núcleo, sendo o valor deste último mais elevado.

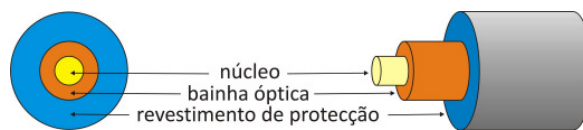


Figura 4.2 – Constituição de uma fibra óptica.

4.3. CLASSIFICAÇÃO DE SENSORES ÓPTICOS QUÍMICOS

Os sensores químicos ópticos podem ser classificados com base no suporte físico do elemento sensor. De acordo com McDonagh [69], desta classificação resultam basicamente dois tipos de suporte principais: a fibra óptica (FOCS- *fiber optic chemical sensor*) e os substratos planos (PWCS – *planar waveguides chemical sensor*) (Figura 4.3).

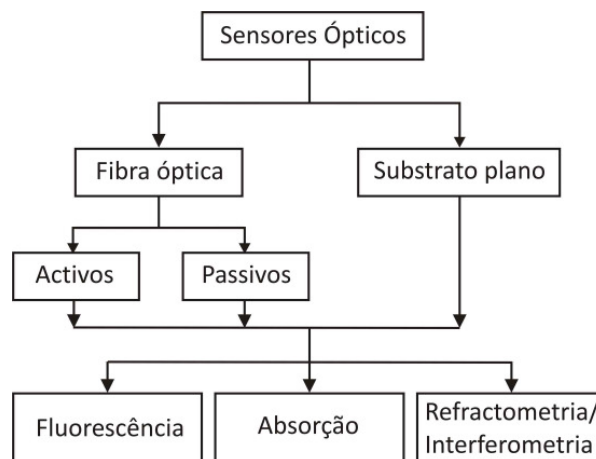


Figura 4.3 – Classificação de sensores quanto ao tipo de suporte do elemento sensor (adaptado de [69]).

Independentemente do tipo de suporte, o sistema de interrogação pode ser baseado em fluorescência, absorção ou refractometria/interferometria.

As fibras ópticas têm sido indiscutivelmente a plataforma mais utilizada para a construção de sensores ópticos químicos. Embora exista um número elevado de diferentes tipos de sensores químicos de fibra óptica, existe por sua vez, um número limitado de configurações físicas que são normalmente utilizadas na sua construção, conforme representado na Figura 4.4.

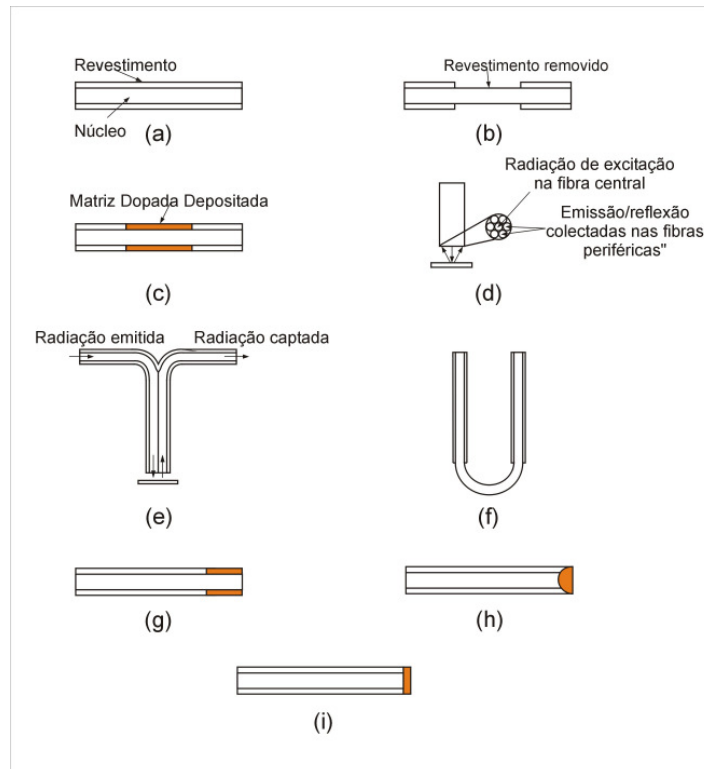


Figura 4.4 – Configurações de fibras ópticas utilizadas em sensores químicos: a) fibra óptica, b) fibra óptica com revestimento removido, c) fibra óptica com deposição lateral, d) transmissão de luz no terminal de um feixe de fibra óptica, e) transmissão de luz através de fibras ópticas, f) configuração em forma de U, g), h) e i) revestimento da ponta da fibra óptica com filme sensor [69].

Dependendo do papel que a fibra óptica desempenha no sistema sensorial, esta pode ser classificada de passiva ou activa. Considera-se que a fibra desempenha um papel passivo quando a transdução não está de forma alguma ligada a qualquer alteração das propriedades intrínsecas desta, tendo apenas a função de transportar o sinal de luz entre a fonte e o meio onde ocorre a transdução e/ou entre este e o sistema de detecção. Talvez o exemplo mais típico de um sensor passivo é o espectrofotómetro de fibra acoplada que corresponde à configuração e) da Figura 4.4, em que a luz proveniente da fonte percorre a fibra óptica incidindo sobre a amostra, sendo por esta absorvida. Através de um esquema de reflexão (utilizando um espelho), a luz não absorvida é reflectida e colectada por outra fibra, ou por um feixe de fibras ópticas (*bundle*) que enviam o sinal para o espectrofotómetro. O sinal recolhido pode ser utilizado para fornecer informação quantitativa ou qualitativa da amostra em análise. O terminal da fibra com o espelho reflector pode ser observado na Figura 4.5.



Figura 4.5 – Terminal sensor de uma fibra óptica para espectrofotometria.

As fibras são classificadas de activas, quando uma propriedade intrínseca da fibra responde a uma modificação do parâmetro que se pretende medir. Nesta classe inclui-se a modificação da fibra de forma a incorporar um elemento sensível ao parâmetro em análise. Isto pode ser conseguido através da deposição de uma matriz sólida que contenha um elemento sensor (ex. indicador fluorescente) na superfície do núcleo da fibra. A matriz sólida pode ser obtida através da remoção da bainha de protecção e do revestimento numa determinada secção da fibra (Figura 4.4 b,c) ou na ponta da fibra (Figura 4.4 g,h,i), e a deposição de uma solução líquida que solidificará após secagem.

Um exemplo de sensor de fibra óptica activo é apresentado por G.O.Keefe [71], que utilizou a configuração apresentada na Figura 4.4c para a construção de um sensor óptico de fluorescência para a medição de oxigénio gasoso (Figura 4.6). Neste caso, as moléculas fluorescentes sensíveis ao oxigénio estão depositadas numa camada de material que reveste lateralmente a fibra óptica. A excitação é conseguida devido às ondas evanescentes da radiação de excitação, que se propagam a partir da interface núcleo/matriz de suporte do fluoróforo. A fluorescência transmitida para o interior da fibra propaga-se ao longo desta, incidindo no detector colocado na extremidade.

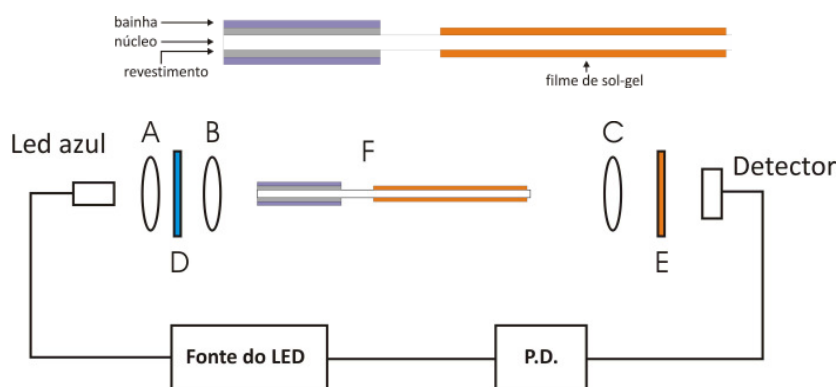


Figura 4.6 – Configuração óptica para a medição de oxigénio gasoso, através da fluorescência: A,B,C-lentes, D- filtro passa-baixo, E- filtro passa-alto, F- fibra óptica com revestimento do elemento sensor, P.D- detector de fase (adaptado de [71]).

Alternativamente às configurações apresentadas, pode ainda ser obtida uma configuração tipo “agulha” (Figura 4.7), por remoção da bainha óptica e do revestimento, seguido de ataque químico ao núcleo com ácido fluorídrico. Este tipo de configuração foi estudado por P.A.S Jorge [72] na construção de um sensor de oxigénio baseado em fluorescência, com evidentes vantagens em relação às configurações da Figura 4.4e,g, i.

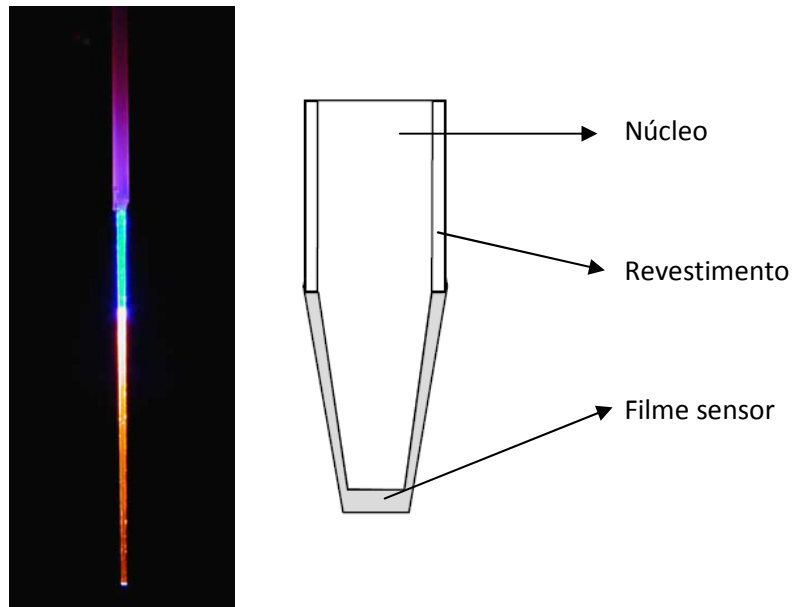


Figura 4.7 – Fibra óptica com a configuração tipo “agulha”, com filme sensor depositado na ponta (fluorescência laranja) [72].

O segundo tipo de sensores ópticos químicos apresentado na Figura 4.3 é caracterizado pelo formato do suporte onde está o elemento sensor, neste caso um substrato plano. Ao contrário do caso anterior em que o número de configurações é limitado, neste caso existe uma variedade crescente de configurações.

De forma genérica, neste tipo de sensores existe um substrato plano (ex: vidro, plástico, silicone, etc.) através do qual a radiação é transmitida (a incidente e/ou a captada). Por exemplo, em alguns sensores que utilizam a fluorescência, o campo evanescente causado pela radiação de excitação que é transmitida no interior do substrato plano, provoca a fluorescência das moléculas sensoras que estão a uma distância inferior a 100-200 nm da superfície (Figura 4.8).

A fluorescência pode ser captada pelo próprio substrato [73] ou por um elemento sensor externo localizado acima ou abaixo do substrato, conforme exemplificado pela Figura 4.9.

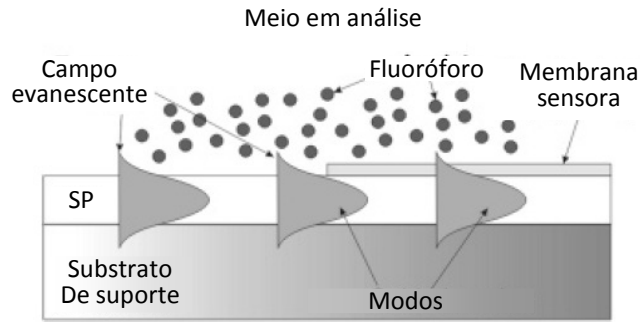


Figura 4.8 – Transmissão da radiação ao elemento sensor por evanescência das ondas guiadas através do substrato plano (SP) [69].

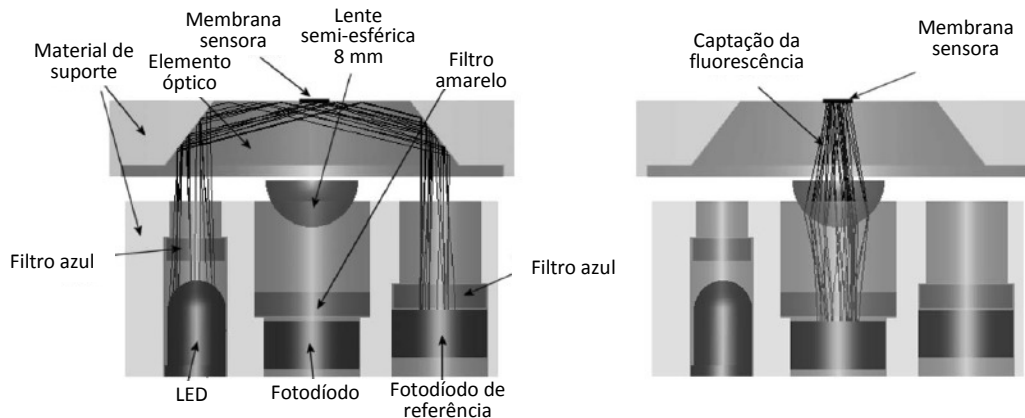


Figura 4.9 – Configuração óptica com a excitação através do substrato e a captação de fluorescência externa [74].

Ainda noutras configurações, pode não existir transmissão de luz ao longo do substrato, servindo este apenas de suporte do elemento sensor. Neste caso, tanto a radiação incidente como a captada, são transmitidas pelo exterior do substrato, conforme exemplificado na Figura 4.10.

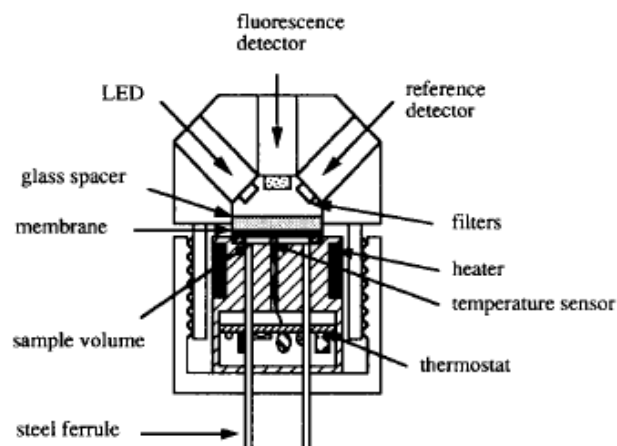


Figura 4.10 – Configuração óptica com a excitação e captação de fluorescência externo ao substrato [75].

4.4. MEDIÇÃO DE OXIGÉNIO POR LUMINESCÊNCIA

4.4.1. INTRODUÇÃO

Nos subcapítulos anteriores foi feita uma breve descrição do que é uma fibra óptica e dos tipos de configurações que são utilizados na construção de sensores ópticos químicos. A partir deste subcapítulo, serão destacados os principais tópicos relacionados com a construção de um sensor óptico de oxigénio.

Quase todos os sensores ópticos de oxigénio baseiam-se na utilização de fluoróforos cuja intensidade e tempo de vida de fluorescência, são dependentes da concentração de oxigénio no meio em análise. O decaimento da intensidade fluorescente de um fluoróforo devido à acção do oxigénio (supressão) tem sido amplamente estudado, desde que em 1939, Kautsky [76] descreveu este fenómeno, que está ilustrado na Figura 4.11.

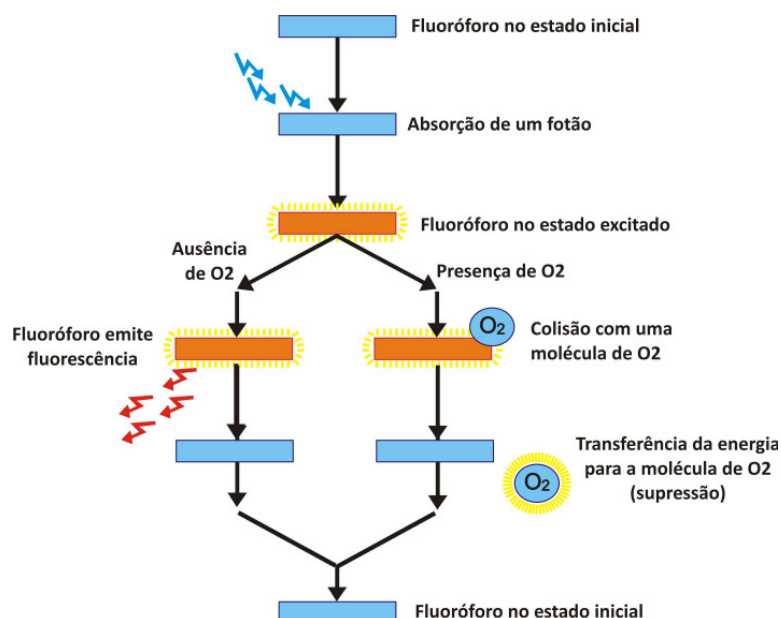


Figura 4.11 – Processo de supressão de um fluoróforo na presença de oxigénio [77].

Este é um processo fotofísico que não envolve qualquer reacção química, pelo que uma variação da concentração de oxigénio em ambos os sentidos, resulta numa variação da intensidade fluorescente de forma reversível.

De forma geral, estes sensores são constituídos por um fluoróforo sensível ao oxigénio que é incorporado na matriz de um material compatível, e que por sua vez é depositada no suporte do sensor que estará em contacto com o meio onde se efectuará as medições da concentração de oxigénio. Actualmente, grande parte da investigação realizada sobre os sistemas ópticos para

medição da concentração de oxigénio tem sido baseada na procura e caracterização de novos fluoróforos e forma de suportá-los em matrizes adequadas [68].

O sistema óptico é ainda constituído por uma fonte de excitação (LEDs ou laser), filtros ópticos para a selecção da gama de comprimentos de onda adequada, pode incluir guias de onda (p. ex., fibra óptica ou substrato plano), fotodetectores (p. ex., fotodíodo ou tubo fotomultiplicador) e um sistema de processamento do sinal. O grande avanço que se tem verificado no desenvolvimento deste tipo de sensores, deve-se em grande parte ao desenvolvimento tecnológico destes componentes nas últimas décadas.

4.4.2. TÉCNICAS DE MEDIÇÃO DE O₂

Os esquemas de interrogação utilizados nos sensores ópticos de oxigénio baseiam-se normalmente na medição da intensidade de fluorescência ou na medição do tempo de vida de fluorescência, já referidas no capítulo da fluorescência.

Ambos os métodos recorrem à utilização da equação de *Stern-Volmer* que estabelece uma relação linear entre a concentração de oxigénio no meio e a razão entre as intensidades ou tempos de vida, em meio desoxigenado e oxigenado, na seguinte forma [71]:

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_{SV} [O_2] \quad \text{Eq. 2.24 e Eq. 2.27}$$

Os esquemas sensoriais que são baseados na medição da intensidade de fluorescência apresentam alguns problemas difíceis de ultrapassar e que estão relacionados com a intensidade de referência. Variações da intensidade fluorescente podem ocorrer devido a outros factores, sem que a concentração de oxigénio tenha sofrido qualquer alteração. Alguns desses factores são as flutuações da potência da fonte de excitação, alterações das propriedades de transmissão óptica, alterações das características do fotodetector, fotodegradação do fluoróforo, lixiviamento (*leaching*) do fluoróforo da matriz que o suporta, etc. O desvio do valor de referência conduz a erros na leitura da concentração de oxigénio.

Algumas abordagens para a resolução deste problema incluem a introdução de uma referência interna. Estas podem incluir a introdução de um outro fluoróforo na matriz, que não seja sensível ao oxigénio e apresente diferentes espectros de emissão. Desta forma, pode ser detectada quaisquer variações de sinal decorrentes de alteração das propriedades da fonte de excitação. Os esquemas com referências aumentam a complexidade do sistema, como no exemplo do caso referido, em que é necessária a separação e tratamento de duas emissões fluorescentes. Esta abordagem apenas consegue eliminar alguns dos problemas atrás referidos [78].

Os esquemas ópticos de medição de oxigénio baseados no tempo de vida têm apresentado a vantagem de ultrapassar algumas das limitações referidas, pois o tempo de vida é uma propriedade intrínseca do fluoróforo e independente de outros factores. No entanto, outras limitações persistem, como por exemplo, o facto de poder ocorrer lixiviamento do fluoróforo para fora da matriz. Esta situação é crítica em aplicações onde não são admitidas contaminações (ex. indústria alimentar), embora não haja interferência no comportamento do sensor.

Enquanto a medição da intensidade é um processo simples e directo, na medição do tempo de vida através do método de fluorometria de fase, o filme sensor é exposto a uma radiação de excitação com modelação sinusoidal da intensidade, sendo lido o correspondente atraso de fase entre este sinal e o resultante sinal de fluorescência.

A leitura de vários valores do atraso de fase (ϕ_ω) para diferentes frequências (f) de excitação, permite determinar o tempo de vida (τ) a partir do declive obtido na regressão linear desses pontos, de acordo com a equação 2.18.

$$\tan(\phi_\omega) = \omega \tau = 2\pi f \tau \quad \text{Eq. 2.18}$$

em que ω , corresponde à frequência angular.

A sensibilidade do filme avaliada através da medição do atraso de fase a uma frequência específica, depende não só das propriedades da membrana onde o fluoróforo está inserido, mas também da própria frequência de modulação seleccionada.

A partir da equação 2.18 e 2.24, pode obter-se a equação de *Stern-Volmer*, de forma a estabelecer uma relação directa entre a fase medida e a concentração de oxigénio:

$$\tan(\phi_0)/\tan(\phi) = 1 + K_{SV} [O_2] \quad \text{Eq. 4.1}$$

em que $\tan(\phi_0)$ e $\tan(\phi)$ correspondem às medições de fase efectuadas na ausência e presença de oxigénio, respectivamente. A medição das fases a uma determinada frequência para diferentes concentrações de oxigénio, permite a determinação da constante de *Stern-Volmer*.

Apesar da frequência escolhida não afectar a constante de *Stern-Volmer*, o seu valor afecta a razão sinal/ruído e conseqüentemente a resolução do sistema. De forma a reduzir os erros experimentais e os desvios relativamente às considerações teóricas, é importante determinar a frequência óptima para cada medição.

A frequência óptima pode ser determinada através da medição das fases para concentrações nos extremos da gama em que se pretende medir. A frequência que conduzir a uma maior diferença de fase deve ser a escolhida para a obtenção de resultados mais rigorosos. De acordo com V.Ogurtsov [79, 80], a frequência óptima teórica também pode ser obtida pela seguinte equação:

$$f_{opt} = \frac{1}{2\pi\sqrt{\tau_{Q1}\tau_{Q2}}} \quad \text{Eq. 4.2}$$

em que,

f_{opt} – frequência óptima

τ_{Q1} e τ_{Q2} – tempos de vida para as concentrações limite da gama a medir.

4.4.3. PARÂMETROS DE SENSIBILIDADE

Através do conhecimento dos parâmetros que controlam a sensibilidade de um sensor óptico de oxigénio, é possível a sua optimização em função da especificidade de cada aplicação. Pode ser desejável um aumento da sensibilidade em gamas específicas de concentração, como por exemplo, na medição da respiração de um paciente em que a pressão parcial de O_2 medida não se afasta muito das 0.21 atm, ou no caso de embalagens fechadas de alimentos em que a medição é efectuada em valores inferiores a 0.002 atm.

A quantificação da sensibilidade do sensor pode ser obtida pela determinação do valor da constante de Stern-Volmer. Quanto mais elevado for o valor de K_{SV} , maior é a sensibilidade do sensor óptico de oxigénio [78]. De acordo com a equação 2.27, a constante K_{SV} é dada por:

$$K_{SV} = k_s \tau_o \quad \text{Eq. 4.3}$$

O tempo vida natural de vida está directamente relacionado com as propriedades do fluoróforo escolhido. Enquanto a escolha da matriz de imobilização do fluoróforo praticamente não afecta o tempo de vida natural deste [81], o mesmo já não acontece com a constante de velocidade de supressão.

A constante K_{SV} depende fortemente das propriedades do fluoróforo escolhido, devido ao tempo natural de vida que este apresenta. A constante K_{SV} também é fortemente dependente das características do material de imobilização escolhido, devido à maior ou menor difusão do analito (ver Eq.2.27 a Eq.2.30).

Por estas razões, a escolha adequada do fluoróforo e da matriz de suporte são dois dos factores determinantes para a construção de um sensor óptico de elevada sensibilidade.

Quando se realizam estudos comparativos da sensibilidade de filmes, é vulgar a utilização da eficiência de supressão (S) expresso na seguinte forma [82]:

$$S(\%) = \frac{(I_o - I)}{I_o} \times 100 = \frac{(\tau_o - \tau)}{\tau_o} \times 100 \quad \text{Eq. 4.4}$$

A supressão revela uma característica intrínseca do filme sensor, nomeadamente a capacidade que o oxigénio tem de reduzir a fluorescência desse filme. Do ponto de vista experimental, quando se aplica uma frequência específica na fluorometria de fase, uma maior diferença de fase medida no equipamento instrumental significa um valor da eficiência de supressão mais elevado.

4.4.4. DESVIO À LINEARIDADE DA EQUAÇÃO DE STERN-VOLMER

Idealmente, a relação entre I_0/I e τ_0/τ com a concentração de oxigénio deverá ser linear, pois desta forma é possível uma calibração simples nos sensores que apresentam este tipo de comportamento. Esta situação ocorre quando estamos na presença de sistemas homogéneos, em que o fluoróforo se encontra uniformemente distribuído em toda a matriz.

No entanto, em alguns casos, verificam-se múltiplos decaimentos do tempo de vida dos fluoróforos, originando comportamentos não lineares da equação de *Stern-Volmer*. Isto deve-se a problemas de solubilidade do fluoróforo na matriz, resultando em zonas na membrana com diferentes concentrações de fluoróforo e diferentes polaridades, logo, diferentes permeabilidades das moléculas de oxigénio. Em casos mais críticos, esta ineficiente solubilidade resulta no aparecimento de agregados de fluoróforos na nano ou microescala.

A heterogeneidade dos filmes pode ser classificada de acordo com três categorias [78]: 1) macroheterogeneidades, 2) microheterogeneidades e 3) nanoheterogeneidades. As macroheterogeneidades podem ser detectadas por análise visual na forma de coloração ou transparência heterogénea e aparecimento de cristais visíveis. Estas características classificam o material de inadequado para utilização futura, havendo a necessidade de alteração dos parâmetros do método de fabrico para eliminar estes problemas. As microheterogeneidades ocorrem na microescala e podem dever-se à cristalização da matriz (ex: no caso dos polímeros) ou do fluoróforo e microfissuras. Estes problemas podem ser detectados por microscopia de fluorescência [83]. As nanoheterogeneidades podem surgir numa escala abaixo da resolução dos microscópios convencionais. Estas podem ocorrer no caso de duas moléculas de fluoróforo apresentarem uma disposição espacial diferente na matriz, ou sofrerem de diferentes perturbações das suas propriedades luminescentes devido à da estrutura envolvente. A única forma de quantificar estas diferenças, é através da realização de medições individuais às propriedades de fluorescência das moléculas de fluoróforo [84].

Nos casos de heterogeneidade, a equação de *Stern-Volmer* baseado num único decaimento exponencial do tempo de vida não consegue descrever o comportamento fluorescente do filme. Como alternativa, pode ser utilizado um modelo não linear que admite a existência de vários tipos de

ambiente diferentes (considerado no capítulo 2). No caso de se admitirem dois tipos de ambiente, com dois tempos de vida distintos, o modelo utilizado é o seguinte:

$$\frac{I_o}{I} = \left[\frac{f_1}{1 + K_{SV1} [O_2]} + \frac{f_2}{1 + K_{SV2} [O_2]} \right]^{-1} \quad \text{Eq. 4.5}$$

em que f_1 e f_2 representam as contribuições das intensidades de fluorescência de cada um dos ambientes, e K_{SV1} e K_{SV2} as respectivas constantes de *Stern-Volmer* [72, 85]. Para situações de multi-supressão, pode considerar-se modelos de distribuição normal ou log-normal da constante de *Stern-Volmer* [86].

A obtenção de um modelo que se adequa na perfeição aos pontos experimentais, pode ser fundamental quando se pretende realizar estudos rigorosos de sistemas complexos. No entanto, para aplicações sensoriais de medição de oxigénio, uma calibração baseada no modelo simples é normalmente suficiente. Alternativamente, poderão ser considerados mais do que um modelo linear ajustável a uma determinada gama de concentrações.

4.4.5. TEMPO DE RESPOSTA DO SENSOR

O tempo de resposta de um sensor é um parâmetro extremamente importante em algumas aplicações, especialmente se o sensor é utilizado em sistemas de controlo. A constante de tempo é um parâmetro utilizado na caracterização de um sensor (ou outro elemento transdutor) que indica o tempo decorrido desde o momento em que ocorre uma variação do tipo degrau do sinal de entrada até que o sinal de saída do sensor atinja 63.2% da sua variação total [87]. No caso de elementos com uma resposta rápida é comum utilizar indicadores com uma variação percentual mais elevada. Por exemplo, o parâmetro t_{90} corresponde a uma variação de 90% do sinal de saída do sensor. O valor de t_{90} é pode ser determinado directamente por análise gráfica, conforme representado na Figura 4.12.

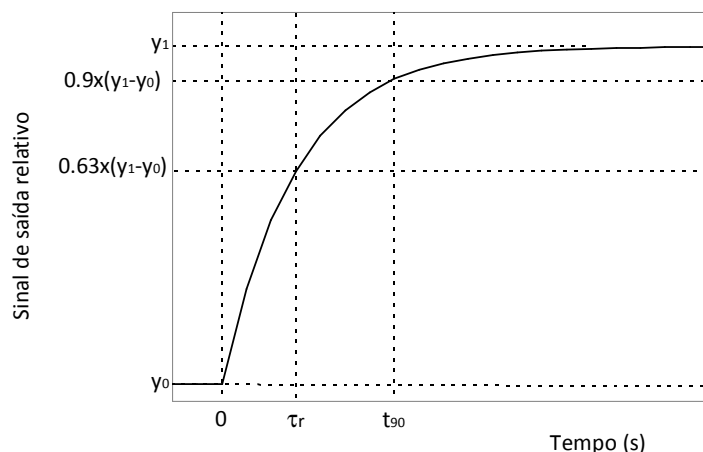


Figura 4.12 – Determinação da constante de tempo de t_{90} de um sensor por análise gráfica.

4.5. ESCOLHA DO FLUORÓFORO

Independentemente do esquema óptico utilizado na determinação da concentração de oxigénio, a escolha do fluoróforo desempenha um papel crucial no sucesso da aplicação. Eis alguns critérios [78, 88] que deverão ser considerados na escolha:

- o tempo de vida do fluoróforo deve ser suficientemente elevado para que este exiba supressão por choques colisionais com as moléculas de oxigénio;
- o parâmetro de fluorescência medido deve ser suficientemente sensível a variações na gama da concentração de oxigénio que se pretende medir;
- um coeficiente de extinção e eficiência quântica elevados são importantes de forma a garantir uma boa razão sinal-ruído;
- os fluoróforos deverão ser selectivos, modificando as suas propriedades fluorescentes exclusivamente com o analito;
- os fluoróforos com propriedades fotofísicas insensíveis à temperatura permitem esquemas de calibração mais simples;
- o fluoróforo deve ter um espectro de absorção que permita a utilização de comprimentos de onda de excitação o suficientemente elevados, para que seja possível a utilização de LEDs ou díodos laser;
- um desvio de *Stokes* elevado garante que haja uma boa discriminação entre o sinal de excitação e o de emissão, minimizando erros na quantificação da intensidade fluorescente, tempo de vida ou fase medida, dependendo da técnica de análise utilizada;
- dado que os sensores de fibra óptica são baseados no suporte de apenas uma pequena quantidade de fluoróforo na matriz, é essencial que este apresente uma elevada estabilidade química e fotoestabilidade;
- os fluoróforos deverão ser compatíveis com a matriz que os suporta (ex. boa solubilidade).

Os fluoróforos mais utilizados em esquemas ópticos de medição de oxigénio são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), os complexos de metais de transição (Ru(II), Os(II), Ir (III), etc.) , as metaloporfirinas (Ex. Pt(II), Pd(II), Rh(II), etc.), e ainda fulereno (C₆₀ e C₇₀) [4].

Em estudos iniciais, os HPA foram frequentemente utilizados como fluoróforos na medição da concentração de oxigénio [89, 90]. Estes compostos apresentam tempos de vida na ordem dos nanosegundos, com máximos do espectro de absorção no ultravioleta ou azul exigindo fontes de excitação não facilmente disponíveis [91].

Os HPA foram progressivamente substituídos por alguns compostos organometálicos à medida que se descobria que estes últimos apresentavam características mais vantajosas, tais como uma elevada intensidade fluorescente e tempos de vida longos o que os torna adequados para utilização em sensores de oxigénio (ver Tabela 4.1). Estes podem ser classificados em duas categorias principais: os complexos de metais de transição e as metaloporfirinas.

Tabela 4.1 – Propriedades fotofísicas de fluoróforos utilizados na medição da concentração de oxigénio [4, 27].

Classe /Fluoróforo	λ máx. (absorção)	λ máx. (emissão)	tempo de vida
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos			
PBA	365	376,396,474	200 ns
Decaciclono (DCY)	380	510	
<i>Perylene dibutyrate</i>	457	512	
Complexos de metais de transição			
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	450	611	700 ns
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dpp})]^{2+}$	452	612	1.97 μs
$[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dpp})_2]^{2+}$	455	613	4.10 μs
$[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$	337,457	612	4.89 μs
$[\text{Os}(\text{dpp})_3]^{2+}$	454, 500, 580, 650	729	290 ns [89]
$[\text{Os}(\text{fenantrolina})_3]^{2+}$	432, 478, 660	720	367 ns [89]
$[\text{Ir}(2\text{-fenilpiridina})_3]^{2+}$	376	512	2.00 μs
Metaloporfirinas			
PdOEP	393, 512, 546	663	770 μs
PtOEP	381, 535	646	100 μs [92]
PtTFPP	395, 541	648	46 μs [93]
PdOEPK	410, 603	790	480 μs [94]
PtOEPK	398, 592	759	62 μs [94]

Os complexos de metais de transição têm tempos de vida elevados (na ordem das centenas de nanosegundos até às dezenas de microsegundos) o que permite a implementação de esquemas de medição mais simples e menos dispendiosos do que os que são necessários para os fluoróforos orgânicos. A sua eficiência quântica é independente do comprimento de onda de excitação e pode exceder em alguns casos excepcionais o valor de 0.5, embora valores de 0.04 a 0.2 sejam mais comuns. O facto de serem excitados com radiação visível, permite a utilização de fontes de excitação facilmente disponíveis. Estes compostos apresentam elevada estabilidade química, térmica e fotoquímica tornando-os adequados para utilização em situações de esterilização [95].

Dentro desta última classe, os complexos de polipiridil ligados a ruténio, na forma $[\text{Ru}(\text{L})_3]^{2+}$, em que L representa o ligando polipiridil, são os mais comuns em medição de oxigénio. Os grupos ligandos mais utilizados são o 2,2'-bipiridil (bpy) e o 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (dpp), podendo ainda formar complexos com ligandos mistos da forma $[\text{Ru}(\text{bpy})_x(\text{dpp})_y]^{2+}$ (em que $x+y=3$) [96]. Os complexos de polipiridil ligados a ósmio têm a particularidade de absorver radiação em comprimentos de onda mais elevados (vermelho) do que os complexos de ruténio possibilitando a utilização de fontes de radiação com elevada potência e de baixo custo, como são os díodo lasers. Estes complexos são

considerados mais estáveis que os de ruténio, embora apresentem como desvantagem uma supressão mais baixa o que conduz a uma menor sensibilidade [4, 89].

As metaloporfirinas apresentam tempos de vida numa gama entre 0.1 e 50 ms e sofrem elevada supressão, pelo que são particularmente adequadas para medição de pequenas concentrações de oxigénio [68]. Deste grupo destacam-se as octaetilporfirinas de platina e paládio, PtOEP e PdOEP, respectivamente, que apresentam elevada fosforescência à temperatura ambiente com tempos de vida relativamente longos (Tabela 4.1). Alguns esquemas de medição de oxigénio que utilizam estas metaloporfirinas têm sido reportados por vários autores [97, 98]. Quando as metaloporfirinas referidas anteriormente são ligadas a um grupo cetona (PtOEPK e PdOEPK) apresentam uma estabilidade química e fotoquímica superior e um desvio dos espectros de emissão e excitação para comprimentos de onda mais elevados o que constitui uma vantagem [94].

Independentemente das propriedades luminescentes do fluoróforo, é essencial que este apresente uma boa compatibilidade com a matriz de suporte. As propriedades fotofísicas dos fluoróforos sofrem normalmente pequenos desvios em função da matriz onde estão inseridos, pelo que isto deverá ser tido em conta [78].

No sensor apresentado neste trabalho o fluoróforo escolhido foi o complexo de ruténio $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ (Figura 4.13) por ser reconhecidamente um dos mais adequados para o desenvolvimento de sensores de oxigénio [99]. Também foram estudadas a aplicabilidade das metaloporfirinas PtOEPK e PdOEPK.

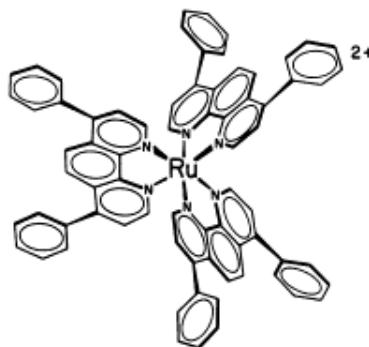


Figura 4.13 – Estrutura molecular do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$.

Apesar das vantagens da utilização de fibras ópticas neste tipo de sensores, estas têm como desvantagem apresentarem uma elevada atenuação de sinal para comprimentos de onda inferiores a 450 nm. Dado que o complexo de ruténio tem um máximo de absorção aos 457 nm, e de emissão aos 612 nm, este fluoróforo é adequado em aplicações que utilizem fibras ópticas.

Adicionalmente, McDonagh *et al* [100] estudaram a aplicabilidade deste fluoróforo em matrizes de sol-gel tendo concluído que oferecem a possibilidade de se produzirem sensores com elevada qualidade, o que constituiu mais um motivo para a escolha efectuada.

4.6. MATRIZ DE SUPORTE DO FLUORÓFORO

Idealmente, a matriz de suporte para os fluoróforos deve cumprir as seguintes funções:

- servir de suporte para o fluoróforo sem alterar as propriedades fotofísicas favoráveis que este apresenta;
- proteger o fluoróforo de lixiviamento, ou seja, da perda de material por arrastamento para fora da matriz;
- exibir elevada permeabilidade ao oxigénio;
- apresentar propriedades ópticas e mecânicas adequadas.

Dependendo da composição e da técnica de imobilização adoptada, o mesmo fluoróforo pode apresentar comportamentos diversos. Isto é evidenciado pelo trabalho efectuado por C. McDonagh, que demonstrou que o complexo $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ apresenta diferentes sensibilidades ao oxigénio quando incorporado em diferentes matrizes [64]. Muitos autores têm investigado novas formas de imobilização, com o objectivo de melhorar um ou vários dos aspectos acima referidos. Quando essa melhoria é conseguida, normalmente existe um consequente aumento do valor da constante de Stern-Volmer ou da razão sinal/ruído.

Existem dois grandes grupos de matrizes utilizadas em sensores ópticos no que diz respeito à composição, os baseados em polímeros e o sol-gel.

Os materiais poliméricos mais utilizados são: o silicone, o poliestireno (PS) [101-104], o policloreto de vinilo (PVC) [105], o polimetil metacrilato (PMMA) [106], o polidimetil siloxano (PDMS) [107], polietilenoglicol (PEG) [7], e os derivados de celulose (ex. etilcelulose, acetato butirato de celulose) [81]. Devido ao seu carácter hidrofóbico, as matrizes constituídas por PMMA e PDMS são as mais adequadas para medição de OD [69]. Uma das maiores dificuldades quando se utiliza matrizes poliméricas consiste na solubilização do fluoróforo. Este problema é mais crítico no caso particular da utilização dos complexos de Ruténio [78]. Em alguns casos, o indicador fluorescente sofre de cristalização na matriz do polímero algum tempo após o seu fabrico. Este problema pode ser minimizado pela escolha de polímeros mais polares, ou seja, com melhores propriedades de solubilização do fluoróforo. Apesar disso, a escolha de polímeros apolares, tal como o silicone, continua a ser preferível pela sua elevada permeabilidade e selectividade ao oxigénio. Esta

selectividade impede a entrada na membrana sensora de moléculas interferentes no processo de supressão (ex. iões metálicos).

Apesar do desenvolvimento inicial de sensores ópticos de oxigénio ter sido baseado na utilização de matrizes poliméricas, actualmente, a tecnologia sol-gel tem recebido uma crescente atenção por parte dos investigadores [68] como matriz preferencial para o suporte físico dos fluoróforos. Quando comparado com os polímeros, os filmes de sol-gel apresentam uma estabilidade fotoquímica mais elevada.

Uma das vantagens mais destacadas do sol-gel, baseia-se na facilidade com que se podem alterar as propriedades da matriz por alteração da composição ou das condições de síntese. Desta forma é possível modificar a sensibilidade do filme, uma vez que esta é função da permeabilidade da matriz ao oxigénio.

Outras vantagens da utilização do processo sol-gel têm sido referidas por diversos investigadores [108], tais como:

- fabrico de materiais à temperatura ambiente;
- elevada estabilidade térmica e química;
- excelentes propriedades ópticas (ex. transparência);
- facilidade de dopagem dos filmes com os fluoróforos;
- material inerte quimicamente, não interferindo com o meio em análise;
- custo baixo;
- baixa fluorescência intrínseca.

Explicado de uma forma simplificada, o processo sol-gel envolve a hidrólise e policondensação de uma solução de alcóxidos de metal, originando uma matriz vítrea e porosa em que o fluoróforo que foi previamente misturado fica encapsulado numa estrutura permeável às moléculas de oxigénio.

Os alcóxidos de metal tipicamente utilizados como precursores síntese de filmes sol-gel são o TEOS (tetraetoxisilano) e TMOS (tetrametoxisilano). Os filmes resultantes da utilização destes precursores apresentam uma excelente sensibilidade ao oxigénio gasoso. A estrutura porosa de sílica destes filmes é caracterizada pelo elevado número de grupos hidroxil na sua superfície. Daqui resulta que o material apresenta propriedades hidrofílicas, logo, uma elevada solubilidade da água na sua estrutura porosa. Devido à baixa solubilidade do oxigénio na água, o número de moléculas de oxigénio dissolvido disponíveis por unidade de volume é cerca de 30 vezes inferior ao existente em meio gasoso. Daqui resulta que a sensibilidade destes filmes é muito inferior quando utilizados para a medição de OD.

O carácter hidrofóbico dos precursores organicamente modificados (vulgarmente designados de *ormosils*) tem motivado a sua utilização em aplicações para a medição de OD. A utilização dos *ormosils*, faz aumentar a hidrofobicidade dos filmes, por substituição dos grupos hidroxilo existentes na superfície, por grupos alquilo. Quanto maior o número de grupos alquilo e quanto mais hidrófobo for este grupo, menor será a solubilidade da água, resultando no aumento do volume da fase gasosa aprisionada no interior da matriz. Esta fase gasosa está em equilíbrio com a fase aquosa e é caracterizada por uma concentração de moléculas de oxigénio muito superior. A sensibilidade do filme é resultante das contribuições da supressão que ocorre em cada uma destas fases. Estudos conduzidos por C. McDonagh comprovaram o aumento de sensibilidade dos filmes para medição de OD, através da introdução de *ormosils* [109].

A propriedade hidrófoba dos *ormosils* foi uma das razões que motivou a escolha destes materiais para o desenvolvimento do sensor de oxigénio apresentado nesta tese. Pretendeu-se avaliar como a composição dos *ormosils* utilizados na produção dos filmes afecta a sensibilidade destes ao oxigénio.

4.7. TEMPERATURA

À semelhança dos sensores convencionais para medição de oxigénio, o sinal de resposta dos sensores ópticos também é dependente da temperatura.

A razão primária desta dependência deve-se ao aumento da eficiência dos processos de decaimento não radiativos com o aumento da temperatura (ver cap. 2), o que origina tempos de vida e intensidades de fluorescência mais baixas. De acordo com K. Mongey [27], a imobilização do fluoróforo em sol-gel, diminui significativamente a dependência da fluorescência com a temperatura. Isto é explicado pela natureza rígida do sol-gel, que restringe os movimentos moleculares do fluoróforo diminuindo assim a constante de decaimento não radiativo.

A constante K_{SV} depende da difusão do supressor conforme evidenciado nas equações 2.27 a 2.29. Por sua vez, a difusão aumenta com a temperatura (Eq. 2.30). Isto significa que para a mesma concentração de oxigénio existe um aumento na resposta do sensor com a temperatura.

As características dos vários elementos que constituem o sensor também são susceptíveis de sofrer alteração das suas características com a temperatura, afectando desta forma o sinal obtido. Por exemplo, o comprimento de onda de corte de um filtro passa alto ou passa baixo pode sofrer um desvio com a temperatura [110], alterando desta forma a intensidade transmitida.

Para corrigir a variação do sinal do sensor com a temperatura, é importante a medição da temperatura do meio e a aplicação de esquemas de correcção do valor medido.

4.8. VANTAGENS DOS SENSORES ÓPTICOS DE OXIGÉNIO

Algumas das vantagens dos sensores ópticos para a medição de oxigénio estão relacionados com o facto de utilizarem a óptica na sua construção (conforme referido no cap. 4.1), mas outras estão relacionadas com o princípio de funcionamento baseado na luminescência. Quando se fala em vantagens e desvantagens muitas vezes a comparação é feita com os sensores de Clark, pois estes são os que se encontram mais amplamente difundidos.

O sensor óptico de oxigénio pode ainda ser conjugado com outros tipos de sensores. Por exemplo, A. Kocincova [111] descreve micro-sensores ópticos com uma ponta sensora de cerca de 140 μm para a medição simultânea de OD e pH, e a medição simultânea de OD e da temperatura. S.M. Borisov [112] apresenta uma aplicação sensorial baseada em fluorescência que permite a medição simultânea de oxigénio e dióxido de carbono gasosos.

As vantagens inerentes ao facto de estes sensores serem baseados em luminescência são a reversibilidade e ausência de reacção química dos mecanismos que afectam as propriedades luminescentes do indicador. Neste processo, não é consumido oxigénio o que permite realizar medições sem interferir com o próprio meio. Esta questão é particularmente importante quando se pretende realizar medições de concentrações muito baixas.

Outras vantagens referidas por diversos autores são a sua elevada selectividade, sensibilidade e tempos de resposta baixos [64, 71, 113].

Quando comparados com os sensores electroquímicos apresentam ainda a vantagem de não dependerem de agitação.

Apesar das vantagens que os sensores de oxigénio apresentam, existem algumas limitações que poderão inviabilizar a sua utilização em algumas aplicações. Por exemplo, no caso de sensores de OD, existe a possibilidade de contaminação do meio por lixiviamento do fluoróforo, o que torna restritivo o seu uso em aplicações biológicas ou em contacto com bens alimentares [78]. Existe também a possibilidade de sensibilidade cruzada com outras espécies químicas, falseando as medições efectuadas [91].

II – PARTE EXPERIMENTAL

5. INTRODUÇÃO

Os principais objectivos do trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado consistiram 1) na construção de um sensor óptico baseado em fluorescência para medição da concentração de oxigénio dissolvido e oxigénio gasoso, e 2) a optimização de alguns parâmetros relativos à membrana sensora.

Como ponto de partida, foram investigadas dois aspectos de importância fundamental para definição do esquema experimental para a medição de oxigénio: a escolha do fluoróforo e o tipo da membrana de suporte.

Na revisão bibliográfica efectuada, foram identificados três fluoróforos com potencial para aplicação no sensor: o $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ na classe dos compostos organometálicos, e a PdOEPK (*platinum octaethylporphyrin ketone*) e PtOEPK (*palladium octaethylporphyrin ketone*) na classe das metaloporfirinas. A viabilidade da utilização destes fluoróforos em aplicações para medição de oxigénio foi comprovada por diversos autores [7, 71, 94, 114]. Os fluoróforos foram sintetizados em laboratório e posteriormente caracterizados.

Durante a revisão bibliográfica, foram ainda estudadas algumas estratégias de imobilização de fluoróforos que utilizam o sol-gel como membrana de suporte e que motivaram a escolha deste tipo matriz para o suporte do fluoróforo. Algumas qualidades interessantes do sol-gel são: a resistência a elevadas temperaturas, a resistência química, a estabilidade mecânica, etc. [115]. De acordo com diversos autores [31, 109], as características da matriz de sol-gel são facilmente modificadas através da alteração de alguns parâmetros de síntese. Como tal, um dos parâmetros da membrana sensora que se pretendeu optimizar, foi a composição do filme de sol-gel com o objectivo de aumentar a sensibilidade ao oxigénio revelada por este.

C. McDonagh [109] concluiu que os filmes obtidos exclusivamente com um dos precursores convencionais mais utilizados no fabrico de filmes sol-gel, o TEOS, conduzem a bons resultados quando se trata de medir a concentração de oxigénio gasoso. Por sua vez, P.Lavin [116] concluiu que a utilização dos precursores *ormosils*, em substituição dos convencionais TEOS e TMOS, conduzem a filmes mais estáveis e com maior sensibilidade nas medições em meio aquoso. Ainda outro autor, Mahmoud R. Shahriari [117], conclui que a mistura de TEOS com um *ormosil*, mesmo em pequenas

quantidades, confere à estrutura uma maior estabilidade em relação à formação de fissuras. Este autor refere que o grau de hidrofobicidade está ligado à sensibilidade do filme, podendo esta ser estabelecida pela razão de TEOS/*ormosil* na mistura.

Para a preparação dos filmes utilizados neste trabalho, seleccionou-se um conjunto de 5 precursores *ormosils* e o TEOS. As soluções de sol-gel foram preparadas utilizando cada um dos precursores na sua forma pura, assim como diferentes misturas entre cada um dos *ormosils* e o TEOS. Dada a limitada disponibilidade do fluoróforo, foi inicialmente preparado um conjunto de filmes não dopados, de forma a avaliar algumas propriedades fundamentais tais como a transparência, a adesão do filme ao substrato e homogeneidade da superfície. Após uma análise visual qualitativa, foi possível identificar algumas composições de precursores de sol-gel que originaram filmes de má qualidade, tendo estas sido excluídas da caracterização posterior. Os restantes filmes foram submetidos a ensaios para determinação da sua hidrofobicidade.

Seguiram-se ensaios de síntese de filme de sol-gel com a incorporação do fluoróforo na matriz, tendo sido utilizados os três fluoróforos referidos. Simultaneamente, foi preparada uma montagem experimental que permitiu a realização de ensaios de medição de intensidade de fluorescência e determinação dos tempos de vida por fluorometria de fase, dos filmes sensores produzidos. A montagem permitiu a medição da concentração de oxigénio em meio aquoso ou gasoso.

Os filmes foram testados, tendo as metaloporfirinas revelado sinais de resposta muito baixos o que originou razões sinal-ruído muito baixas. Nesta fase, foi decidido continuar a caracterização do sensor de oxigénio exclusivamente com o complexo de ruténio.

Foram preparados novos filmes de sol-gel dopados com o complexo de ruténio, apenas para as composições que resultaram em filmes de qualidade aceitável na avaliação anterior. Para cada composição, foram produzidos filmes com diferentes tempos de envelhecimento da solução antes da deposição do filme no substrato de vidro, dado que este é um dos parâmetros da síntese com forte influência na estrutura final da matriz [118].

Na fase seguinte, foi realizada uma caracterização da sensibilidade dos filmes ao oxigénio, utilizando a fluorometria de fase para a determinação dos tempos de vida de fluorescência, em meio nitrogenado e arejado. Com esses dados, determinou-se também a supressão (*quenching*) de cada amostra, sendo este parâmetro normalmente utilizado neste tipo de caracterizações e frequentemente referido em diversa bibliografia [30, 72, 109]. Os ensaios foram realizados em meio gasoso com ar e nitrogénio, e em meio aquoso em equilíbrio com cada um destes gases. Devido à falta de uma linha de fornecimento de oxigénio puro e de um sistema de controlo do caudal de ar e nitrogénio para a regulação da concentração de oxigénio na mistura, apenas foram testadas as concentrações de oxigénio de zero e a correspondente ao ar atmosférico. Neste estudo, foi possível

avaliar a influência das composições e do tempo de envelhecimento da solução de sol-gel antes da deposição do filme, na sensibilidade ao oxigénio.

Com os resultados anteriores, foram identificadas as amostras mais promissoras para a medição de oxigénio e estabeleceu-se como objectivo a determinação das curvas de calibração para esses filmes entre o meio desoxigenado (utilizando nitrogénio) e oxigenado. As constantes de *Stern-Volmer* (K_{SV}) foram calculadas, estando estas constantes associadas à sensibilidade do filme, pelo que foram tiradas conclusões sobre as composições com melhor desempenho em meio gasoso e aquoso.

Ao longo deste trabalho, são apresentados também alguns estudos necessários para a construção da montagem experimental utilizada na medição de intensidades e tempos de vida. Também são apresentadas algumas caracterizações realizadas aos filmes tais como a fotodegradação, o erro de medição, o limite de detecção (LOD) e ainda os tempos de resposta.

Todo o trabalho apresentado nesta tese foi desenvolvido no Laboratório de Diagnóstico Biomolecular do ITQB (Instituto de Tecnologia Química e Biológica), à excepção da determinação das constantes de *Stern-Volmer* (capítulo 9), que foi efectuado na unidade piloto do IBET (Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica).

6. CARACTERIZAÇÃO DOS FLUORÓFOROS

Na fase inicial deste trabalho, foi dada particular atenção à escolha e caracterização dos fluoróforos a serem utilizados na preparação dos filmes sensores ao oxigénio. Foram estudados três fluoróforos: um complexo de ruténio e duas metaloporfirinas. Uma vez que estes fluoróforos foram sintetizados em laboratório, foi necessário efectuar alguns estudos de caracterização para determinar com exactidão algumas características da instrumentação que devem ser utilizadas na montagem experimental. Por exemplo, deste estudo dependeu a escolha do tipo de fonte de excitação e dos filtros ópticos. Também foi importante avaliar em que medida cada fluoróforo tem a sua intensidade de fluorescência diminuída na presença de oxigénio, assim como perceber se existe um suficiente afastamento entre o sinal de excitação e o de emissão fluorescente (desvio de *Stokes*) de forma a poder isolar estes dois sinais de forma mais eficiente.

6.1. COMPLEXO DE RUTÉNIO

O complexo de ruténio utilizado neste trabalho foi o $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$. De acordo com o espectro de absorção (Figura 6.1) obtido através de espectroscopia UV-Vis o fluoróforo (em solução de etanol) apresenta um máximo de absorção aos 462 nm. Este valor é bastante próximo dos 457 nm referidos na bibliografia [4], o que é indicador da boa qualidade do material sintetizado.

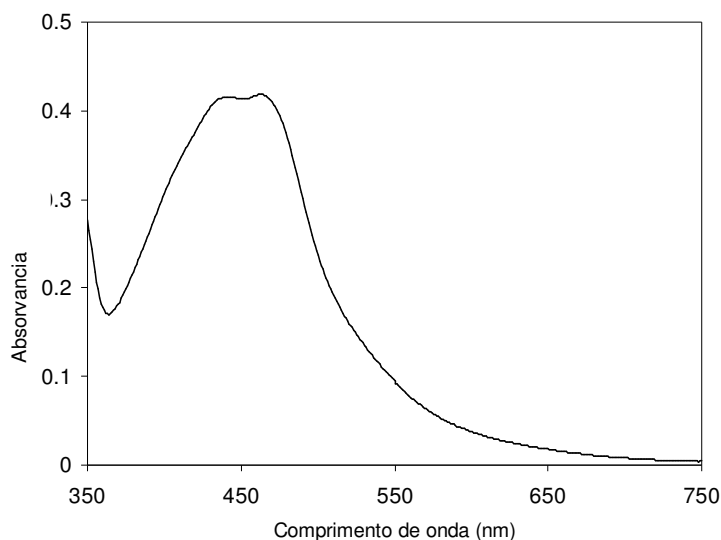


Figura 6.1 – Espectro de absorção do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ utilizado na produção de filmes.

Adicionalmente, foram obtidos os espectros de excitação e emissão por espectrofluorimetria (Figura 6.2). O espectro de excitação realizado aos 612 nm, revela um máximo aos 482 nm quando seria esperado um valor próximo do determinado no espectro de absorção (462 nm). Os espectros de

emissão com excitação aos 463 nm e aos 482nm, revelam ambos um máximo de emissão aos 611 nm, sendo este valor bastante próximo dos esperados 612 nm referido por K.F. Mongey [27].

O c.d.o de excitação ideal é aquele que maximiza o sinal de fluorescência (482 nm), no entanto observa-se no espectro obtido que para c.d.o mais baixos, a diminuição do sinal é pouco significativa.

Por exemplo, se for utilizada uma fonte de excitação com um pico de emissão aos 463 nm, existirá uma diminuição na radiação de excitação de pico em cerca de 6% comparativamente com a utilização de uma fonte com um c.d.o máximo de 482nm. Apesar desta desvantagem, existe o benefício de se aumentar o afastamento dos máximos de excitação e emissão de fluorescência (aumento do desvio de *Stokes*) e assim obter boa separação destes sinais.

Esta gama de c.d.o possibilita a utilização de um LED azul como fonte de radiação, com todas as vantagens inerentes. No entanto, a escolha do comprimento de onda exacto estará sempre dependente dos LEDs disponíveis no mercado.

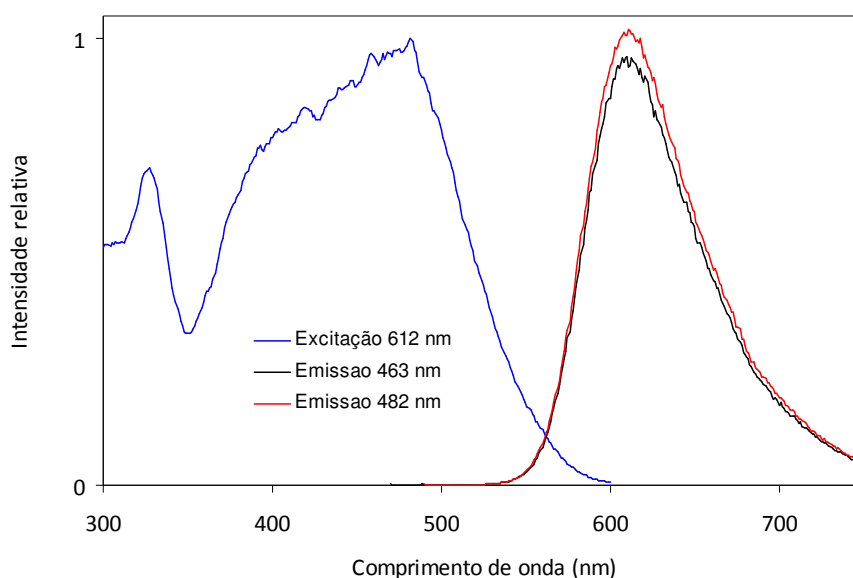


Figura 6.2 – Espectros de excitação e emissão do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$.

Determinou-se ainda a sensibilidade do fluoróforo à variação de temperatura, excitando a 463 nm e analisando a 612 nm, entre os -5°C e 45°C (Figura 6.3). Os resultados revelaram uma diminuição do sinal de fluorescência com o aumento de temperatura entre os -5°C e 5°C , seguido de um aumento acentuado até aos 35°C e uma ligeira descida ou até mesmo estabilização até aos 45°C . Estes resultados não apresentam uma clara tendência de variação da intensidade de fluorescência com a temperatura.

Para confirmar esta variação, foi realizado um ensaio idêntico com uma amostra do mesmo complexo adquirida à ABCR. Os resultados obtidos foram semelhantes, confirmando o tipo de

variação registada anteriormente. A taxa de variação da intensidade fluorescente relativa ao valor máximo varia desde um mínimo de 0.1%/°C na gama de 5°C a 15°C, até um máximo de 0.9%/°C na gama de 25°C a 35°C. Esta informação é importante na concepção de sistemas de correcção do sinal de fluorescência em aplicações onde possam ocorrer variações de temperatura.

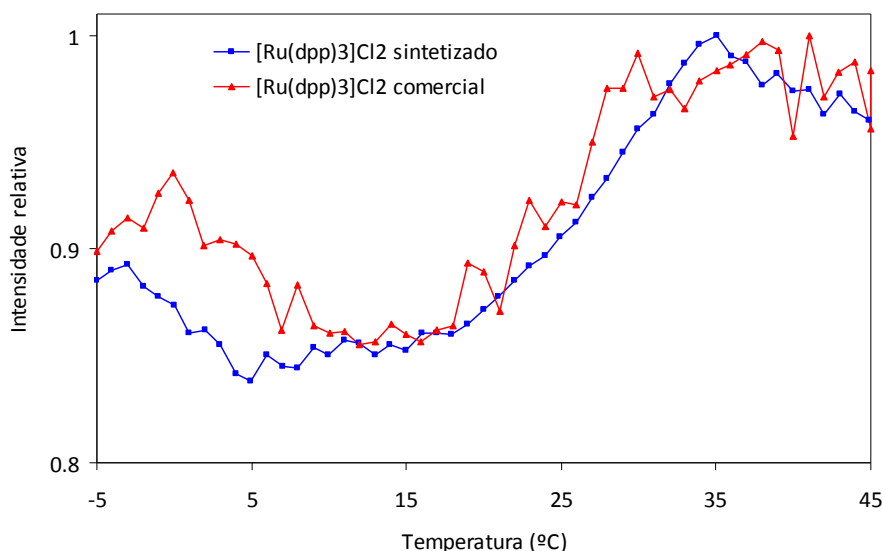


Figura 6.3 – Variação da fluorescência do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ com a temperatura.

Após a montagem experimental ter sido configurada para a utilização deste fluoróforo (utilizando um LED de 455 nm), foram realizados ensaios preliminares dos filmes de sol-gel previamente preparados com uma mistura de ETEOS+TEOS numa razão de 1:1, conforme será descrito posteriormente. Na Figura 6.4, pode visualizar-se o espectro do LED cujo máximo de intensidade foi medido aos 463 nm e uma outra banda centrada aos 602 nm que corresponde à fluorescência do complexo de ruténio. No ensaio de espectrofluorometria (Figura 6.2) em que se obteve o comprimento de onda máximo de 611 nm, o fluoróforo foi testado numa solução de etanol. O desvio para os 602 nm verificados neste ensaio, justifica-se pela alteração do meio que rodeia as moléculas de fluoróforo, conforme investigado por K. Mongey [96].

A comparação do máximo destas duas bandas, permite perceber a diferença entre a grandeza do sinal de excitação e de emissão. A intensidade de fluorescência (em meio nitrogenado) apresenta um valor de pico cerca de 20 vezes inferior ao pico da radiação de excitação, o que é indicativo da necessidade da utilização de filtros para a eliminação da radiação proveniente do LED, do sinal de fluorescência a ser medido. Também se observa que existe uma diminuição do máximo de intensidade do LED quando passamos a irradiar a amostra fluorescente, sendo esta diminuição resultante da absorção de parte da radiação pelo fluoróforo.

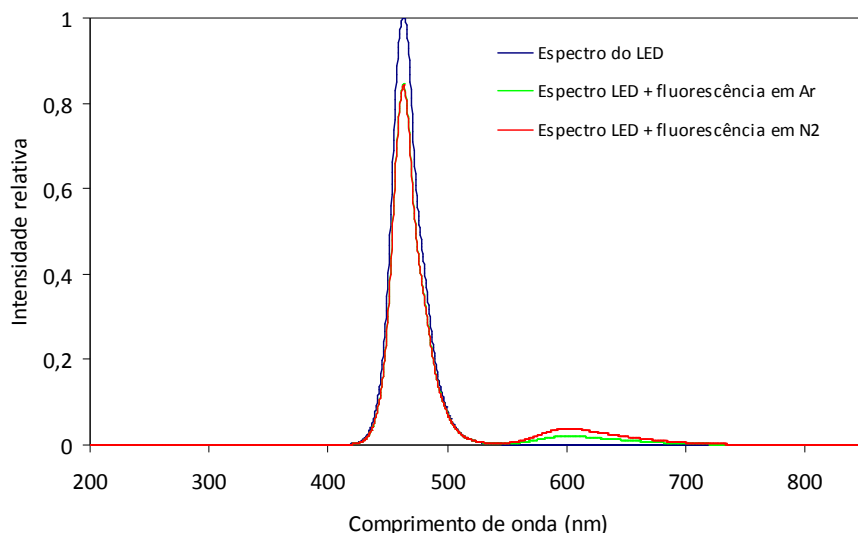


Figura 6.4 – Espectros do LED e emissão fluorescente em meio gasoso nitrogenado e arejado.

Na Figura 6.5 (modificação de escala da Fig.6.4) é visível que o sinal de fluorescência é cerca de duas vezes superior (pico máximo) em meio nitrogenado quando comparado com meio arejado. Estes resultados preliminares constituiriam bons indicadores para utilização deste fluoróforo em ensaios posteriores, uma vez que existe um bom sinal de fluorescência assim como uma boa sensibilidade ao oxigênio.

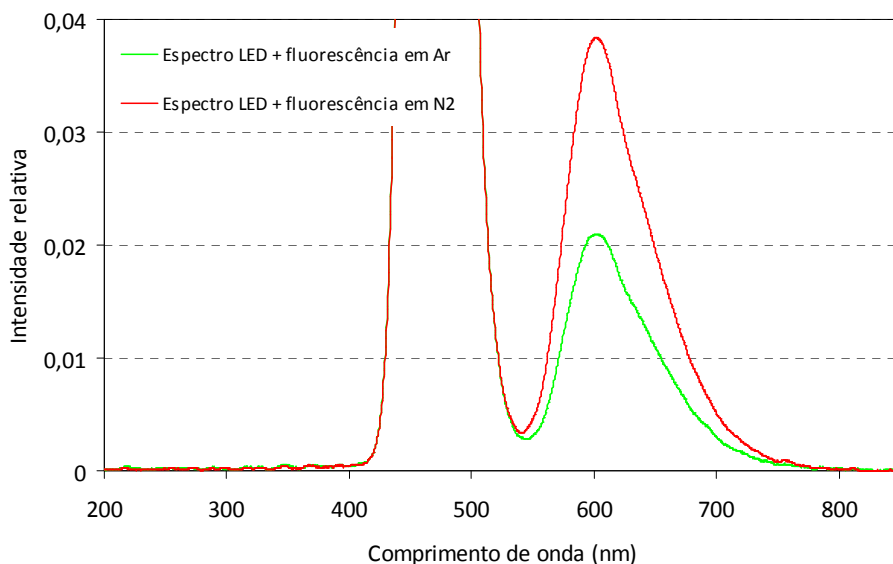


Figura 6.5 – Espectros do LED e emissão fluorescente em meio gasoso nitrogenado e arejado (modificação de escala da figura 6.4).

6.2. METALOPORFIRINAS

As duas metaloporfirinas preparadas no decorrer deste trabalho foram caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis (Figura 6.6a) e espectrofluorimetria (Figura 6.6b e c). Na Figura 6.6a, verificamos que ambos os complexos apresentam duas bandas de absorção que são características das metaloporfirinas: a) as bandas B ou bandas de Soret na gama dos 400 nm; b) e as bandas Q correspondendo a máximos de 603 nm (PdOEPK) e 592 nm (PtOEPK). Destas, as bandas Q são aquelas que apresentam maior compatibilidade com a utilização de LEDs como fontes de excitação. Estes espectros de absorção são equivalentes aos apresentados na literatura por D.Papovski [94].

No espectro de emissão da amostra PtOEPK (Figura 6.6b) observa-se um máximo de emissão aos 763 nm para ambos os c.d.o de excitação de 398 nm e 592 nm. No espectro de excitação, foi registrada a intensidade de fluorescência aos 763 nm para um varrimento da radiação de excitação, tendo sido observado máximos aos 379 nm e 592 nm.

Em relação ao PdOEPK, o espectro de excitação revelou dois picos aos 398 nm e 599 nm, coincidindo com o espectro de absorção anterior. O espectro de emissão obtido com excitação aos 410 nm (Figura 6.6c) revela um máximo de emissão aos 693 nm. Com uma excitação de 603 nm, existe um pico de fluorescência de baixa intensidade aos 794 nm. Este comportamento não seria esperado, dado que no espectro de absorção temos a indicação que existe forte absorção de radiação aos 603 nm. Para além disso, a bibliografia [94] indica que existe uma forte luminescência aos 790 nm para uma excitação próxima de 603 nm. Dado que apenas a excitação aos 603 nm é compatível com a utilização de LEDs e que nestas condições a intensidade de luminescência é muito baixa, a utilização deste fluoróforo em ensaios posteriores foi descartada.

Paralelamente à realização dos ensaios anteriores, foram preparados filmes de sol-gel com as metaloporfirinas. Apesar de ambos os complexos exibirem alguma resistência à sua solubilização nos componentes da mistura sol-gel, após algum tempo em aquecimento e com um aumento do solvente etanol no caso da PdOEPK, foi possível obter soluções púrpura/azul escuras aparentemente homogêneas. A produção de filmes com estas soluções (ver Tabela 7.1) resultou na incorporação uniforme dos fluoróforos na matriz sol-gel a julgar pela observação macroscópica dos filmes.

Utilizando o setup experimental para medições de intensidade de luminescência (cap. 8.1.1) e como fonte de excitação um LED de cor âmbar (emissão centrada aos 590 nm), obtiveram-se os espectros da Figura 6.7 para as duas metaloporfirinas. Os resultados confirmam a ausência do sinal de luminescência para a PdOEPK e uma intensidade muito baixa para a PtOEPK quando comparada com a obtida pelo complexo de ruténio. A diferença dos sinais obtidos entre as duas metaloporfirinas é em parte justificada por uma baixa eficiência quântica e conseqüentemente intensidade, para a PdOEPK [94].

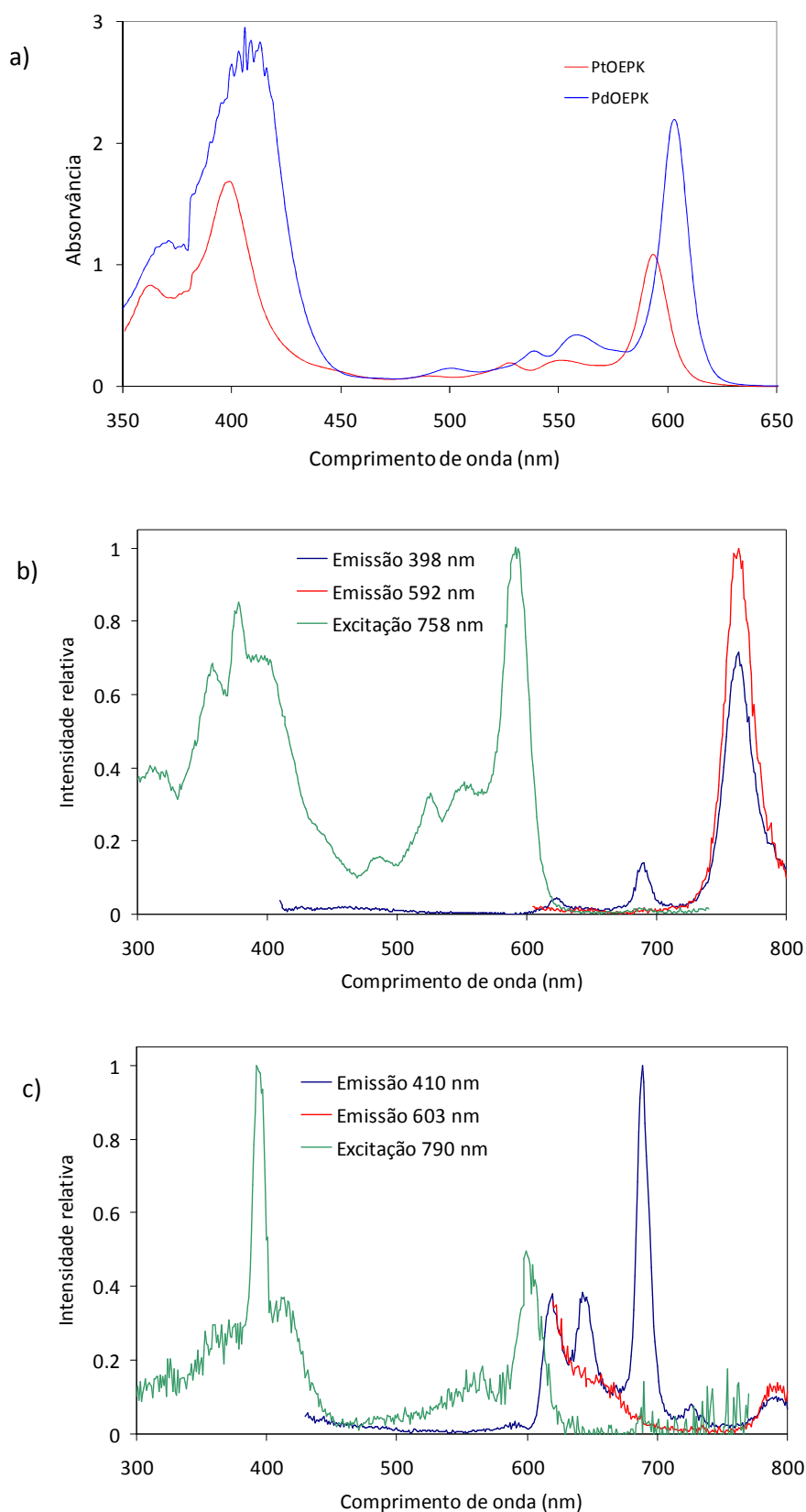
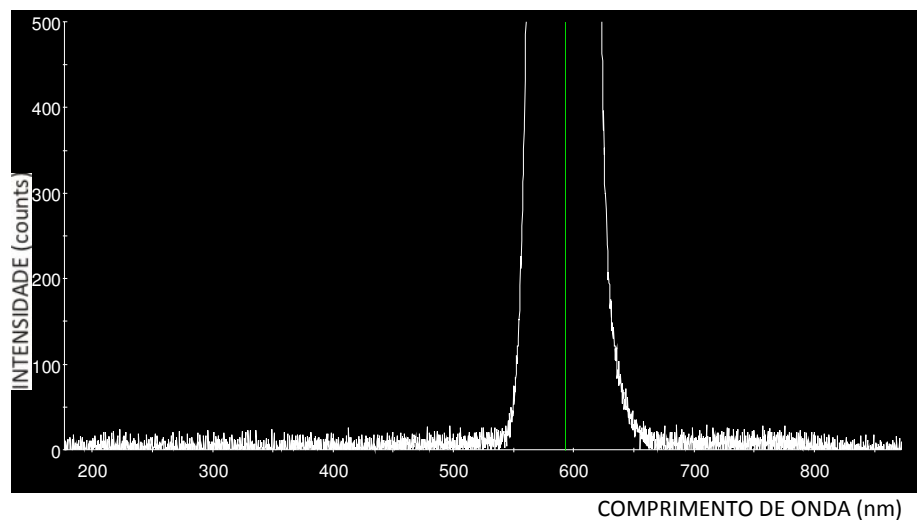
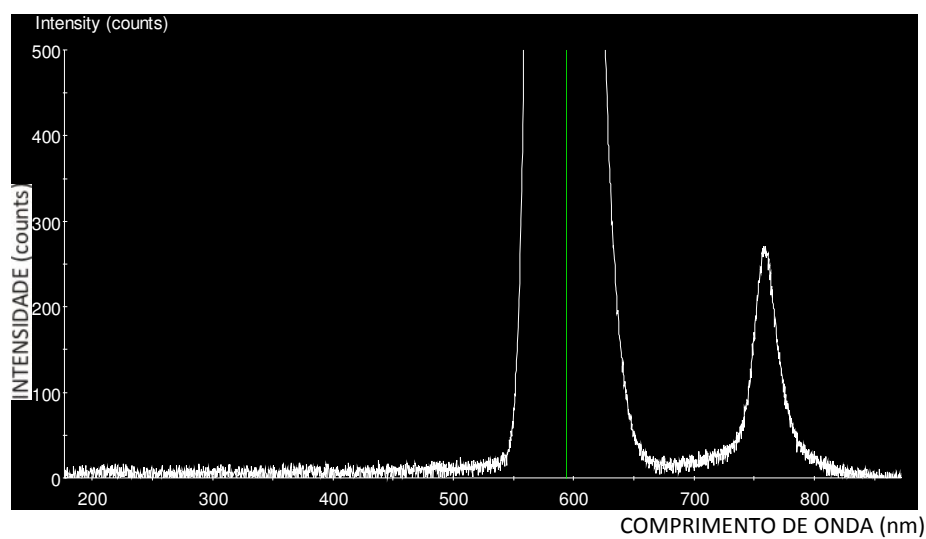


Figura 6.6 – a) Espectro de absorção das metaloporfirinas PdOEPK e PtOEPK em CHCl_3 ; espectros de excitação e emissão das metaloporfirinas b) PtOEPK e c) PdOEPK, em CHCl_3 , meio arejado e a T_{ambiente} .

Embora a resposta luminescente das porfirinas se tenha revelado pouco intensa, é de salientar que os resultados aqui discutidos foram recolhidos num contexto de caracterização preliminar. O tempo previsto para a realização deste trabalho não permitiu a introdução de estudos subsequentes à utilização da PtOEPK, pelo que foi decidido continuar exclusivamente com o complexo de ruténio.



a)



b)

Figura 6.7 – Resposta luminescente: **a)** PdOEPK, e **(b)** PtOEPK em atmosfera de azoto. A banda de valor mais elevado, centrado em 590 nm, corresponde a fonte de excitação (LED âmbar).

7. PRODUÇÃO DE FILMES DE SOL-GEL

Os filmes de sol-gel foram produzidos em duas etapas. Numa primeira fase, foram produzidos filmes de sol-gel não dopados com o fluoróforo, para avaliação preliminar da qualidade do filme no que diz respeito à homogeneidade, transparência, adesão ao substrato e ausência de fissuras no filme. Para tal, foram preparadas soluções com os precursores TEOS e *ormosils* na sua forma pura, e ainda misturas *ormosil*/TEOS com razões molares de 1:1 e 3:1.

Os *ormosils* utilizados foram o tetraetoxissilano (TEOS), metiltrietoxissilano (MTEOS), etiltrietoxissilano (ETEOS), isobutiltrietoxissilano (BTEOS), feniltrietoxissilano (PTEOS) e octiltrietoxissilano (OTEOS).

Desta avaliação qualitativa resultou a eliminação de todas as composições que utilizavam o precursor na sua forma pura, pois estas apresentaram uma deficiente homogeneidade. Na fig. 7.1, pode ser observado o exemplo de um filme com qualidade aceitável (a) e outro com qualidade não aceitável (b). As soluções preparadas com o precursor OTEOS apresentaram duas fases líquidas imiscíveis resultantes da não solubilidade entre o etanol e o precursor, como tal este precursor foi excluído dos ensaios seguintes.

Os filmes que apresentaram uma homogeneidade e adesão satisfatórias foram caracterizados quando à sua hidrofobicidade, conforme documentado no capítulo 9.

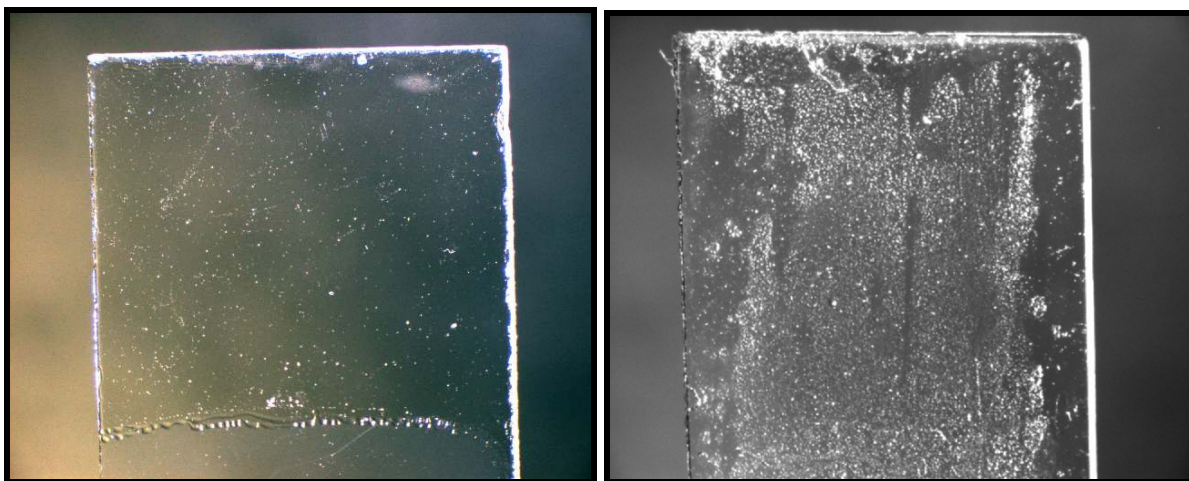


Figura 7.1 – a) Filme PTEOS+TEOS (1:1) de qualidade aceitável; b) Filme de BTEOS puro de qualidade não aceitável.

Na fase seguinte, foi repetida a produção de filmes das composições aprovadas na avaliação qualitativa anterior, mas desta vez foi introduzido o fluoróforo. Todos os restantes ensaios e estudo apresentados neste trabalho foram realizados com este conjunto de amostras.

7.1. MATERIAIS

Os precursores de sol-gel, tetraetoxisilano (TEOS, 99%), metiltriethoxisilano (MTEOS, 98%), etiltriethoxisilano (ETEOS, 97%), isobutiltriethoxisilano (BTEOS, 97%) e feniltriethoxisilano (PTEOS, 97%) foram adquiridos à ABCR, o precursor octiltriethoxisilano (OTEOS, >97%) à Merck e o etanol (99,8%) à Pronolab. Todas as soluções foram utilizadas tal como foram recebidas, sem qualquer alteração de composição. Como catalisador da reacção, foi utilizada uma solução aquosa de HCl com pH=1, tendo esta sido preparada em laboratório utilizando água desionizada e ácido clorídrico (32%) adquirido à Merck. Os fluoróforos [Ru(dpp)₃]Cl₂, PdOEPK e PtOEPK, foram sintetizados em laboratório.

Como substrato de suporte para deposição dos filmes de sol-gel, foram utilizadas lâminas de vidro (Deltalab, 26×76 mm). A agitação das amostras foi efectuada com um agitador (MS1 Minishaker). O envelhecimento das soluções foi realizado num agitador térmico (Eppendorf–Confort). Para preparação dos filmes pelo processo de *dip-coating*, foi utilizado um equipamento construído no laboratório e que permite o deslocamento vertical do substrato de vidro a velocidade controlada (Figura 7.2).

7.2. PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO

Regra geral, todas as soluções foram preparadas utilizando uma razão volumétrica etanol: precursor de 1:1 e uma razão molar água:precursor 3:1. A concentração de referência do complexo de ruténio foi de 1 gL⁻¹. As soluções foram preparadas em recipientes de poliestireno (8 mL). Na Tabela 7.1, podem ser consultados as quantidades utilizadas na preparação das soluções dopadas com o fluoróforo.

Tabela 7.1 – Composição das soluções de sol-gel.

	Precursor		Razão	Etanol	Água	V _{TOTAL}	Fluoróforo
	mL	mL	Molar	mL	mL	mL	mg
Filmes dopados com [Ru(dpp)₃]Cl₂							
MTEOS	0.860	TEOS 0.950	1:1	1.810	0.457	4.08	7.9
ETEOS	0.876	TEOS 0.910	1:1	1.786	0.442	4.01	4.2
BTEOS	0.954	TEOS 0.850	1:1	1.804	0.413	4.02	4.0
PTEOS	0.936	TEOS 0.860	1:1	1.796	0.418	4.01	4.1
MTEOS	1.293	TEOS 0.480	3:1	1.773	0.466	4.01	4.1
ETEOS	1.328	TEOS 0.460	3:1	1.788	0.447	4.02	4.0
BTEOS	1.415	TEOS 0.420	3:1	1.835	0.408	4.08	4.0
PTEOS	1.404	TEOS 0.430	3:1	1.834	0.418	4.09	4.1
Filmes dopados com PtOEPK							
ETEOS	0.876	TEOS 0.910	1:1	1.786	0.442	4.01	2.4
Filmes dopados com PdOEPK							
ETEOS	0.770	TEOS 0.800	1:1	3.140	0.388	5.10	1.5

Para a preparação das soluções de sol-gel não dopadas, o etanol foi adicionado ao recipiente seguindo-se a mistura do(s) precursor(s). A mistura foi agitada durante 10 minutos para homogeneização e solubilização do(s) precursor(s). A reacção foi iniciada com a adição de água (pH=1, aferida com HCl) seguindo-se o aquecimento da solução com o recipiente fechado, a uma temperatura de 70°C com agitação permanente no *thermomixer*. O período de tempo em que a solução permanece aquecida, durante o qual ocorrem as reacções de hidrólise e condensação, é designado de tempo de envelhecimento.

Para a preparação das soluções dopadas, o fluoróforo em pó foi inicialmente dissolvido em etanol seguindo-se uma agitação durante 5 minutos antes de serem adicionada(s) a(s) solução(s) precursor(s). As etapas seguintes foram idênticas.

7.3. PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO DE SUPORTE

As lâminas de vidro foram cortadas em dimensões de aproximadamente 10×38 mm. Este tamanho foi o necessária para que no processo de *dip-coating* (imersão), o substrato de vidro pudesse ser introduzido no recipiente que continha a solução de sol-gel. Após o corte das lâminas, é essencial uma boa limpeza para que o filme produzido por *dip-coating* esteja isento de defeitos, que podem ser causados pela existência de partículas de pó na superfície, ou de gordura que impeça uma perfeita molhabilidade do substrato. Por esta razão, adoptou-se um procedimento de limpeza que consistiu na lavagem em água corrente e detergente, seguido de enxaguamento com água desionizada e secagem com ar comprimido. De seguida, adaptou-se um procedimento referido por McDonagh [109, 116] que produziu filmes com excelente adesão. Este procedimento consistiu em lavagens faseadas utilizando água destilada, etanol, acetona e novamente água destilada com secagens intercaladas utilizando ar comprimido. Metodologias adicionais que empregam banhos com soluções ácidas ou alcalinas, têm como objectivo criar grupos silanol livres na superfície do vidro para que estes se possam ligar eficazmente aos precursores de sol-gel, no entanto, optou-se por manter o referido esquema de limpeza simplificado uma vez que mostrou ser eficaz na obtenção de filmes com boa adesão. Após a limpeza das lâminas, estas foram guardadas em recipiente fechado.

7.4. PRODUÇÃO DE FILMES POR *DIP-COATING*

Conforme já indicado nos fundamentos teóricos, o *dip-coating* é um processo de produção de filmes por imersão de um substrato numa solução que contém o material que constituirá o filme. Para este processo, foi utilizado um equipamento que permite o controlo de velocidade de deslocamento vertical de um suporte de lâminas construído para o efeito (Figura 7.2).

A espessura dos filmes obtidos depende de vários parâmetros, tais como o tempo de envelhecimento, o pH, a razão molar água:precursor, a composição da solução de sol-gel e a velocidade de deslocamento vertical no sentido ascendente [118]. Para além da velocidade de remoção do substrato da solução, deve ainda ser definido o número de ciclos de imersão do substrato e o tempo de espera entre ciclos. Para todas amostras produzidas foi utilizado 1 ciclo de imersão com uma velocidade de 1mm/s [109].

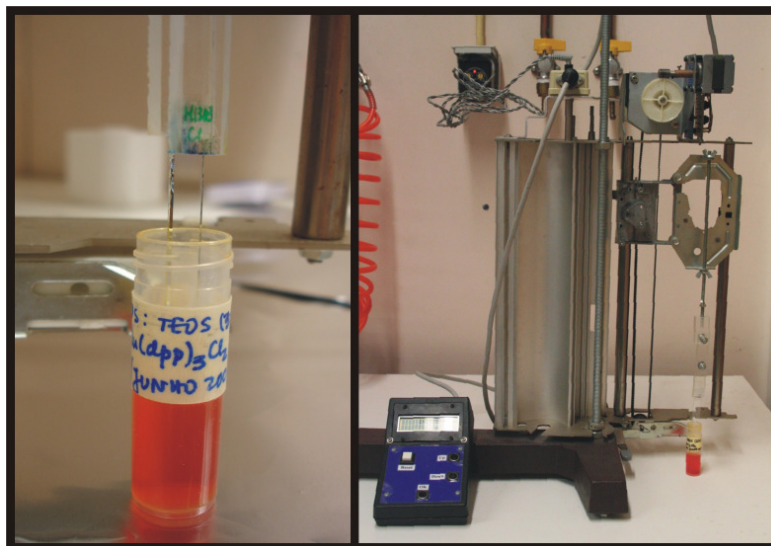


Figura 7.2 – Equipamento utilizado para o processo de *dip-coating*.

Uma vez que as soluções de sol-gel estão em agitação a 70°C durante o processo de envelhecimento, estas foram deixadas a arrefecer até à temperatura ambiente (24°C) durante 30 minutos, seguido de agitação durante 1 minuto e só depois se procedeu ao *dip-coating*. A temperatura à qual se realiza o *dip-coating* é um parâmetro importante pois influencia a viscosidade da solução e consequentemente a espessura da camada depositada. Para além disso, e uma vez que o solvente é etanol, uma temperatura baixa minimiza a evaporação do etanol da solução enquanto o recipiente está aberto, o que é importante para não alterar a quantidade relativa do solvente na solução ao longo das sucessivas aberturas do recipiente para a produção de filmes com diferentes tempos de envelhecimento. Para evitar essa evaporação, procurou-se minimizar o tempo de abertura do recipiente com a solução.

7.5. PRODUÇÃO DE FILMES COM DIFERENTES TEMPOS DE ENVELHECIMENTO

A mistura da água à solução de precursores de sol-gel determina o momento de início da reacção. Após esta adição, a solução é colocada num agitador com controlo de temperatura a 70°C (*thermomixer*). Um dos parâmetros que determina a microestrutura do filme é o tempo de reacção antes da deposição da solução no substrato, o chamado tempo de envelhecimento. Neste trabalho,

procurou-se avaliar qual o efeito deste parâmetro no grau de sensibilidade ao oxigênio dos filmes resultantes. Para isso, e para cada solução preparada, foram produzidos filmes de forma periódica até à gelificação da solução. Em alguns casos, apesar da solução não estar totalmente gelificada, os filmes produzidos apresentavam qualidade insuficiente (ex. fissuras, falta de adesão) que inviabilizou serem testados (Figura 7.3).

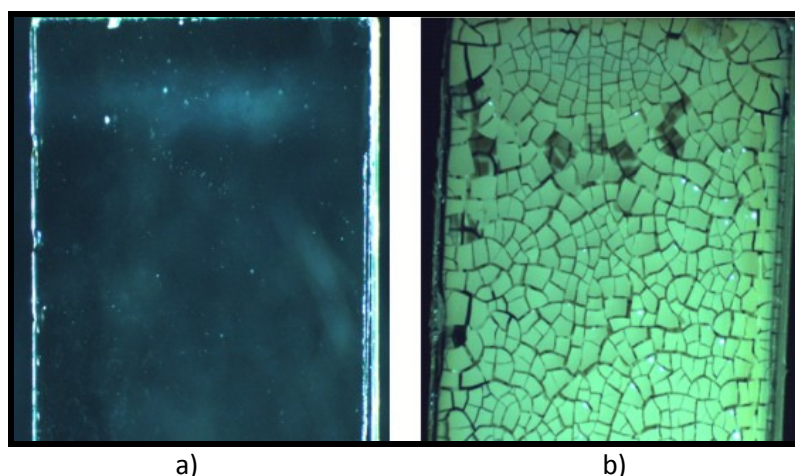


Figura 7.3 – Diferença entre dois filmes de sol-gel MTEOS:TEOS (3:1) marcados com $\text{Ru}(\text{dpp})_3\text{Cl}_2$, produzidos por *dip-coating*, com 125 h (a) e 240 h (b) de tempo de envelhecimento.

Para cada tempo de envelhecimento da reação foram produzidas três amostras. As amostras com diferentes tempos de envelhecimento foram referenciadas com letras diferentes (Tabela 7.2). Letras idênticas em soluções diferentes não significam iguais tempos de envelhecimento. Ao longo do trabalho, as amostras serão referidas de forma abreviada, como por exemplo, ET11F (Mistura: ETEOS:TEOS; Razão 1:1 e 350 horas de envelhecimento).

Tabela 7.2 – Tempos de envelhecimento dos filmes produzidos para cada solução (todos os valores em horas).

Referência	Tempos de envelhecimento (horas)							
	MTEOS : TEOS		ETEOS : TEOS		BTEOS : TEOS		PTEOS : TEOS	
	1:1	3:1	1:1	3:1	1:1	3:1	1:1	3:1
A	3	33	22	26	4	20	22	21
B	17	95	89	58	49	72	47	72
C	92	125	188	121	72	163	91	163
D	115	169	257	152	95	184	211	183
E	138	240	306	194	118		258	254
F	161		350	263	164		387	333
G	214		426	361	190		545	
H			470	429	212			
I			645	479	256			
J			713	522	375			
K			806	599				
L			931	694				
M				819				
N				980				

8. MONTAGEM EXPERIMENTAL

8.1. DESCRIÇÃO GERAL

Para a determinação dos parâmetros de fluorescência que permitem a caracterização dos filmes dopados com o complexo de rutênio, foi preparada e utilizada uma montagem experimental que será pormenorizadamente descrita neste capítulo.

A montagem experimental foi preparada para permitir medições de intensidade e tempos de vida de fluorescência. Os esquemas da montagem experimental correspondentes a cada uma das configurações estão representados na Figura 8.1.

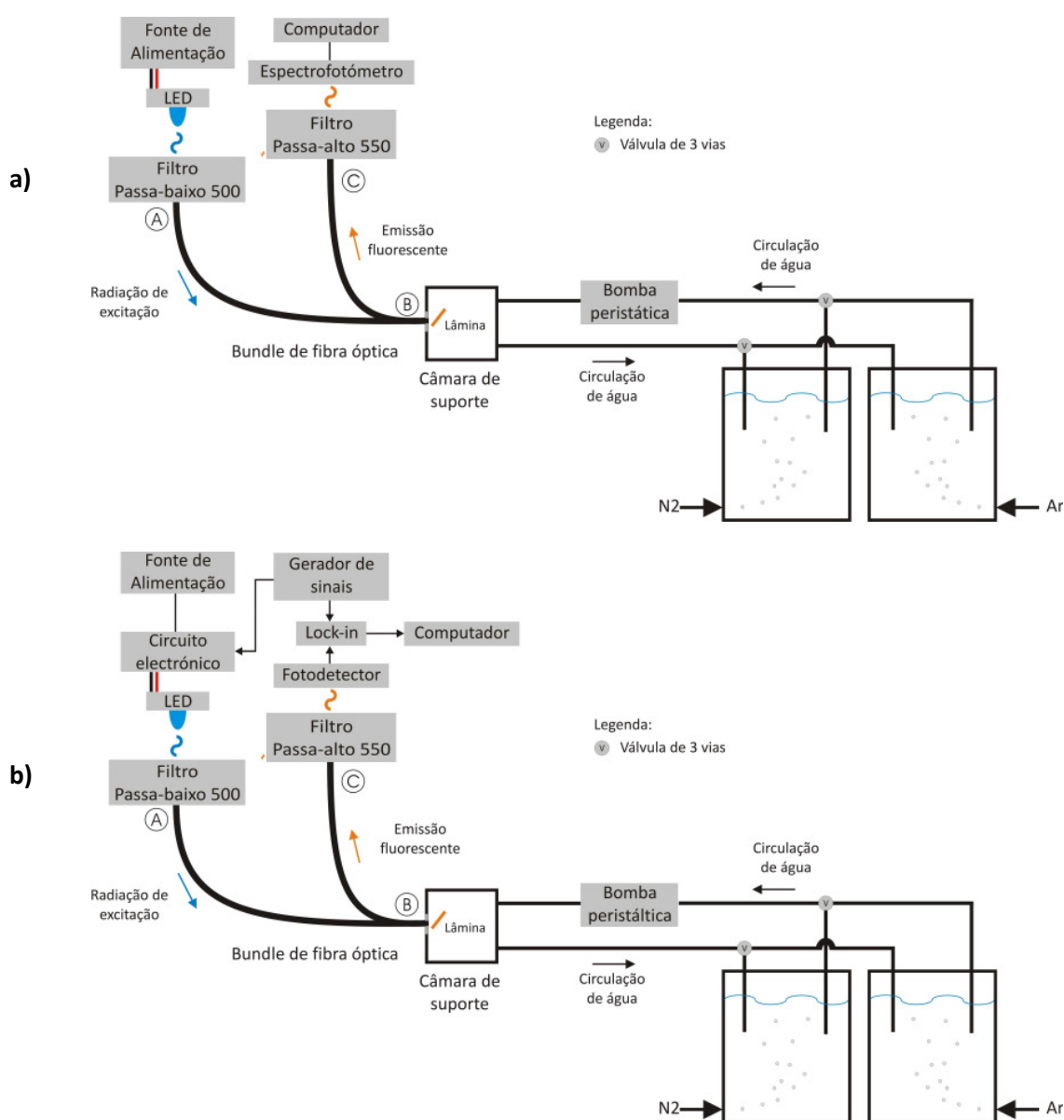


Figura 8.1 – Montagem experimental para medições em meio aquoso de a) intensidade, e b) tempos de vida.

8.1.1. DESCRIÇÃO DA MONTAGEM PARA DETERMINAÇÃO DE INTENSIDADES

A montagem experimental para a medição de intensidades em meio aquoso está representada na Figura 8.1a.

A fonte óptica utilizada para excitação do filme sensor é um LED de 3W de potência da *Philips Lumileds*, com um máximo de radiação centrado nos 455 nm, de acordo com a indicação do fabricante. O LED é alimentado por uma fonte de alimentação (*Statron 3231*) com tensão variável, o que permite regular a intensidade luminosa. Com o objectivo de maximizar a captação de luz emitida pelo LED, foi acoplada uma lente concentradora (*Fraen FFLI – Luxeon Leds*). Para a eliminação da radiação de comprimento de onda superior a 500 nm emitida pelo LED, foi montado um filtro óptico passa-baixo (*Thorlabs FES0500*) a seguir à lente concentradora.

A radiação de excitação proveniente do LED é introduzida num dos terminais (A) do *bundle* de fibra óptica bifurcado (*Oriel 77533*), incidindo sobre a amostra colocada na outra extremidade (B). Após a excitação do filme sensor, a emissão fluorescente é colectada pelas fibras ópticas do *bundle* que conduzem a radiação para o outro terminal (C) onde se encontra montado um espectrofotómetro UV-Vis (*Ocean Optics 2000*). O espectrofotómetro permite o registo do espectro numa gama de 177 nm aos 872 nm. Entre o terminal (C) do *bundle* de fibra óptica e o espectrofotómetro é colocado um filtro passa alto (*Schott KV550*), de forma a impedir que a radiação de comprimento de onda inferior a 550 nm e que se origina no LED, incida sobre o sensor do espectrofotómetro. Através do espectro de fluorescência (tipicamente entre os 550 nm e 850nm) a intensidade é medida pelas unidades de contagem do pico máximo de intensidade.

Em função da dimensão (10x38 mm) adoptada para as lâminas de vidro que servem de suporte aos filmes sensores, houve a necessidade de construir uma câmara em acrílico (ver Figura 8.10) com as dimensões adequadas para o suporte destas lâminas. A câmara foi concebida de forma estanque e permite a leitura da concentração de oxigénio em meios aquosos ou gasosos. Esta câmara tem um orifício de entrada para um dos terminais (B) do *bundle* de fibra óptica e outros dois orifícios para a circulação do meio gasoso ou aquoso.

Para o caso das medições em meio gasoso, o gás (ar ou N₂) proveniente das linhas disponíveis no laboratório é introduzido directamente na câmara de suporte circulando junto do filme sensor e sai por um tubo de 15 cm de comprimento. Para medições em meio aquoso (Figura 8.1a), foram utilizados dois recipientes com água destilada e com difusores colocados no fundo, através dos quais se faz borbulhar ar e nitrogénio. Após um tempo de espera de cerca de 1 hora para a estabilização da concentração de oxigénio no meio, estes dois recipientes terão uma concentração de oxigénio de 8.4 mg/L (a 24°C) e zero, respectivamente.

Uma bomba peristáltica (*Watson-Marlow 502S*) força a circulação da água através de um circuito fechado existente entre um dos recipientes e a câmara de suporte do filme sensor. Através de um sistema de válvulas, é possível alterar o recipiente que alimenta o circuito fechado, modificando desta forma a concentração de oxigênio do meio onde o filme está inserido.

O pormenor da colocação da bomba de circulação antes da câmara obriga a que esta esteja a uma pressão ligeiramente superior à atmosférica. Desta forma, evitou-se a introdução de ar atmosférico na câmara através de zonas de estanqueidade deficiente. Nas medições em meio aquoso, uma das dificuldades existentes durante estes ensaios, foi a eliminação de bolhas de gás dentro da câmara de suporte das amostras. A existência de bolhas retardam a obtenção do meio com concentração pretendida, ou até mesmo podem alterar o sinal obtido caso se fixem na superfície do filme sensor.

A montagem para a determinação de intensidades de fluorescência foi utilizada na caracterização dos fluoróforos (cap. 6), na escolha dos filtros (cap. 8.3), nos estudos do posicionamento da lâmina com o filme sensor (cap. 8.4) e ainda na avaliação da fotodegradação (cap. 9.2).

8.1.2. DESCRIÇÃO DA MONTAGEM PARA DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE VIDA

A montagem experimental para determinação de tempos de vida baseia-se nas técnicas de fluorometria de fase.

A configuração do sistema instrumental é idêntica ao descrito no capítulo anterior, mas com a diferença que a corrente de alimentação do LED é modulada sinusoidalmente (Figura 8.1b). A modulação do sinal é conseguida através de um gerador de funções (*TTI, TG2000, 20 MHz DDS*) que está simultaneamente ligado ao LED e a um amplificador *lock-in* (*Model SR830 DSP, Stanford Research Systems*), fornecendo a este último o sinal de referência sobre o qual vai ser determinado o atraso de fase.

Da incidência da radiação de excitação sobre o filme sensor, resulta um sinal de fluorescência sinusoidal que é medido por um fotodetector (*Thorlabs PDA55*) e enviado ao amplificador *lock-in*. Este último tem a função de analisar os sinais de excitação e emissão e determinar a diferença de fase na frequência escolhida.

8.2. CARACTERIZAÇÃO DO LED

A fonte de radiação utilizada neste trabalho foi um LED de alta potência comercializado pela *Philips Lumileds*, de cor azul e com comprimento de onda de intensidade máxima anunciado pelo fabricante de 455nm. Uma das preocupações na escolha da fonte de radiação consistiu na necessidade de uma radiação com uma intensidade suficientemente elevada de forma a se obter um sinal de

fluorescência com uma boa razão sinal/ruído. Devido à inexistência de laser díodos no comprimento de onda pretendido e os elevados custos de um laser, optou-se por um LED de alta potência, que para além de ser uma opção económica, condição essencial em aplicações comerciais, serviu também de teste da aplicabilidade deste nível de potência de radiação.

O LED utilizado apresenta uma potência radiométrica de 220 mW para uma corrente máxima de 350 mA [119]. A corrente máxima aplicada nos ensaios foi de 300 mA, evitando assim operar o LED na sua potência máxima.

Foi medido o espectro de radiação do LED (Figura 8.2), que revelou uma radiação máxima centrada nos 462 nm, com cerca de 90% da radiação emitida entre os 448 nm e os 495 nm (largura de banda de 47 nm).

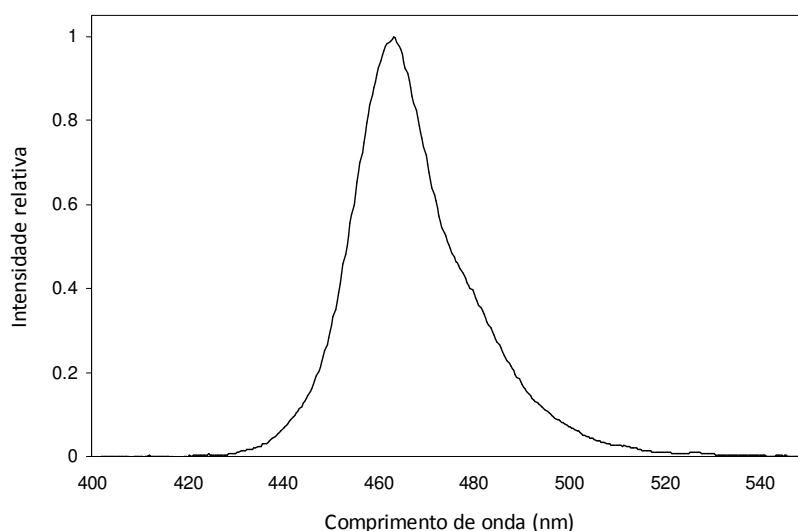


Figura 8.2 – Espectro de radiação do LED azul utilizado.

Ao contrário dos lasers em que toda a radiação está concentrada num raio de pequeno diâmetro, no LED, a radiação produzida espalha-se com um ângulo elevado. De acordo com o fabricante, o LED adquirido tem uma dispersão de 90% da sua luz num ângulo total de 160 graus. Dos vários padrões de dispersão de luz disponíveis (*lambertian*, *batwing* e *side*) para LEDs, optou-se pelo *lambertian* devido à maior concentração de radiação na zona central (Figura 8.3).

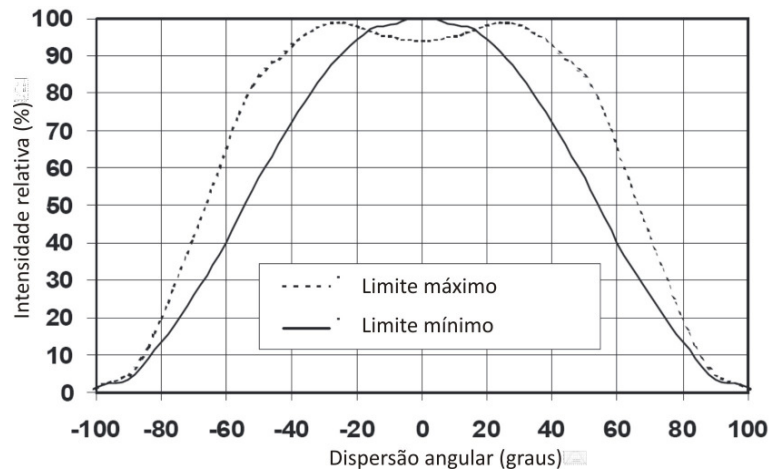


Figura 8.3 – Dispersão angular do LED (tipo *lambertian*) utilizado como fonte de radiação [119].

De forma a maximizar a radiação introduzida no *bundle* de fibra óptica, optou-se por utilizar uma lente de concentradora de luz (*FFLI – Luxeon Leds*) específica para este tipo de LEDs que permite reduzir a dispersão angular (medido na secção onde a intensidade tem metade do valor máximo) de cerca de 110 graus para cerca de 45 graus [120].

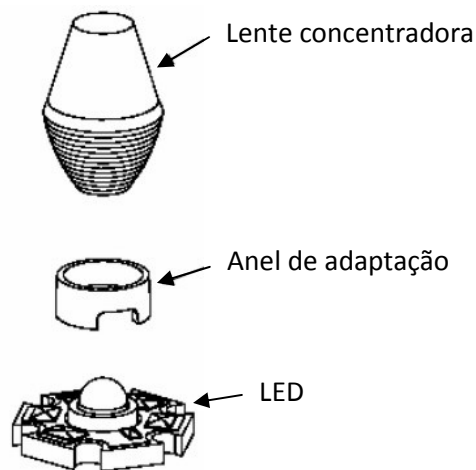


Figura 8.4 – Acoplamento da lente de concentração com o LED [120].

Qualquer modificação da posição relativa entre o LED, a lente concentradora e a extremidade do *bundle* de fibra óptica, devido a movimentos ou choques acidentais, tem como consequência a alteração da intensidade de radiação que chega ao filme sensor. Dado que em medições de intensidade, esta é uma situação crítica, houve a necessidade de fixar o LED num suporte de alumínio que serviu ao mesmo tempo de dissipador de calor devido à elevada temperatura atingida. Para além da construção de peças em PVC, foram também utilizados diversos acessórios adquiridos à *Thorlabs* para fixação da lente e do *bundle* de fibra óptica (Figura 8.5).

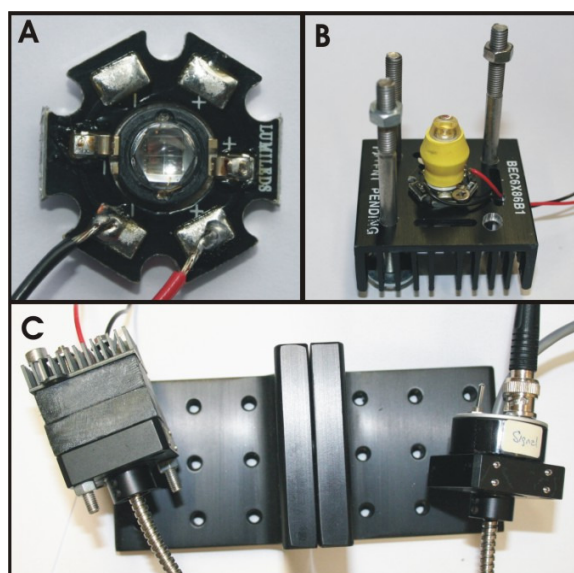


Figura 8.5 – a) LED, b) Acoplamento da lente no LED montado em dissipador de calor, c) Bloco que suporta a fonte de radiação (à esquerda) e o fotodetector (à direita).

8.3. FILTROS ÓPTICOS

A resposta dos filmes sensores à concentração de oxigénio do meio a que vão ser submetidos deverá ser avaliada exclusivamente através do sinal da fluorescência. Consequentemente, todas as outras fontes de radiação não correspondentes à fluorescência do $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$, deverão ser evitadas de forma a não cheguem ao detector (fotodetector ou espectrofotómetro). Esta questão é fulcral nos ensaios baseados na intensidade da fluorescência, e de menor relevo na fluorimetria de fase dado que nesta última apenas a radiação com a frequência seleccionada é analisada. No entanto, mesmo neste último caso, uma pequena contribuição da radiação azul emitida pelo LED pode resultar num erro na leitura da fase pelo *lock-in*, uma vez que essa radiação tem a mesma frequência do sinal de fluorescência, mas com uma fase diferente.

Uma fracção da radiação proveniente do LED é reflectida pelo filme e substrato, e juntamente com a radiação da fluorescência é conduzida através do *bundle* de fibra óptica até ao detector. Foi utilizado um filtro passa-alto (LP) de 550 nm à entrada do fotodetector de forma a reduzir a radiação azul do LED que é medida conjuntamente com o sinal fluorescente.

A fracção da luz branca ambiente (cujo espectro é apresentado na Figura 8.6a) inferior a 550 nm também é eliminada, mas existe ainda uma contribuição significativa desta radiação que será misturada com o sinal de fluorescência e que não pode ser desprezada (Figura 8.6b). Por esta razão, os ensaios de medição de intensidade foram realizados com uma capa de protecção opaca sobre a câmara de suporte de amostras e com as luzes do laboratório desligadas, tendo-se verificado uma completa ausência da contribuição da luz ambiente.

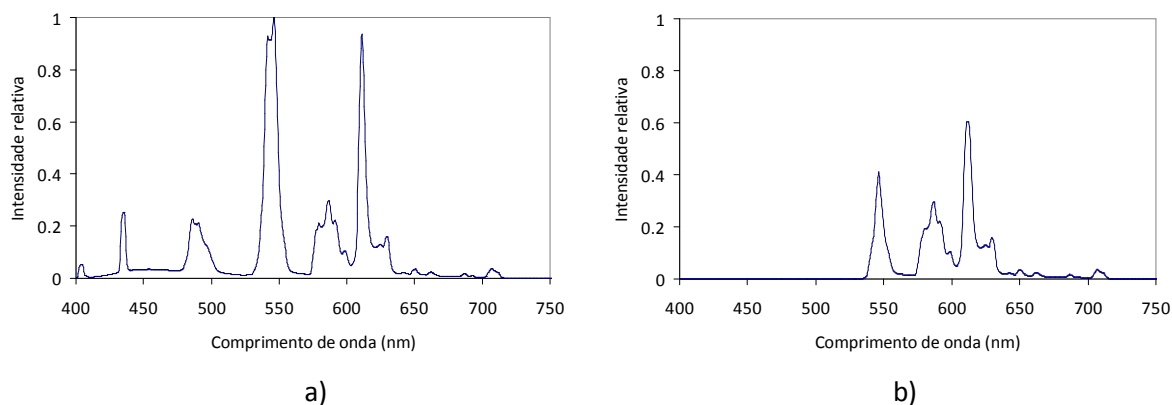


Figura 8.6 – Espectro da luz ambiente do laboratório a) não filtrada b) filtrada abaixo dos 550 nm.

Após a montagem experimental estar finalizada, foram realizados testes em meio gasoso de forma a definir os filtros a utilizar. Colocou-se uma lâmina de vidro sem filme de forma a medir a radiação azul do LED que é reflectida de volta para o *bundle* de fibra óptica. Uma análise cuidada ao espectro do LED, revela que existe uma fracção de radiação de baixa intensidade acima dos 550 nm (analisar a curva “Vidro” na Figura 8.7 e Figura 8.8 - as considerações seguintes serão referentes a estas figuras).

Ainda sem a utilização dos filtros ópticos, a análise a um filme sensor (curva “Filme”) revelou o sinal de fluorescência centrado nos 601 nm juntamente com o sinal correspondente à reflexão azul. Nota-se que a curva correspondente à reflexão azul baixou ligeiramente a sua intensidade, devendo-se tal à absorção desta radiação pelo fluoróforo.

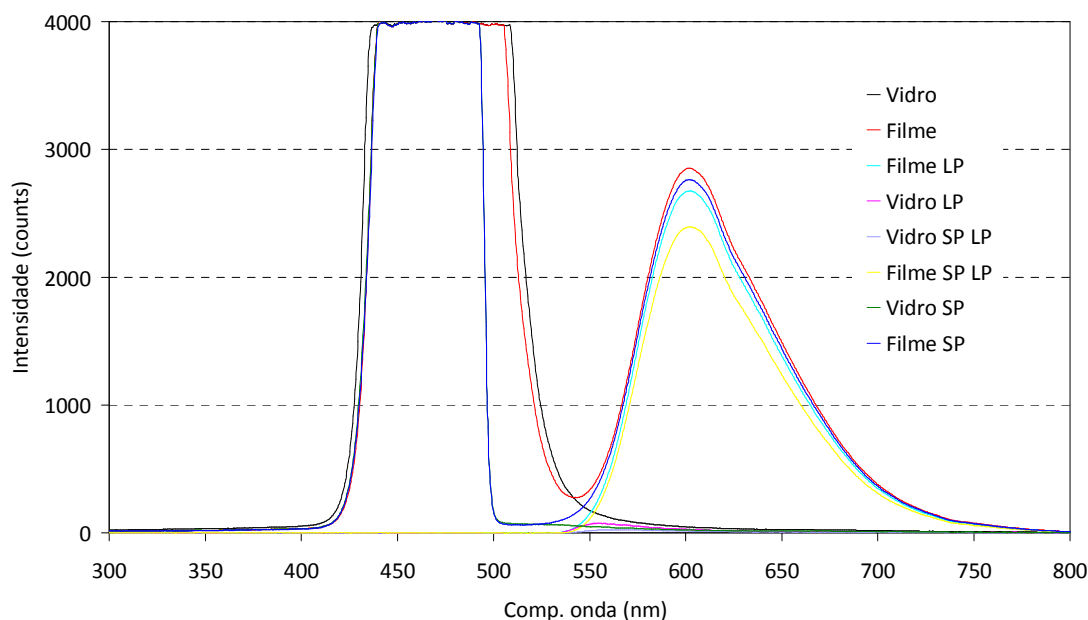


Figura 8.7 – Espectros obtidos utilizando apenas a reflexão de LED e o sinal fluorescente com várias combinações de filtros.

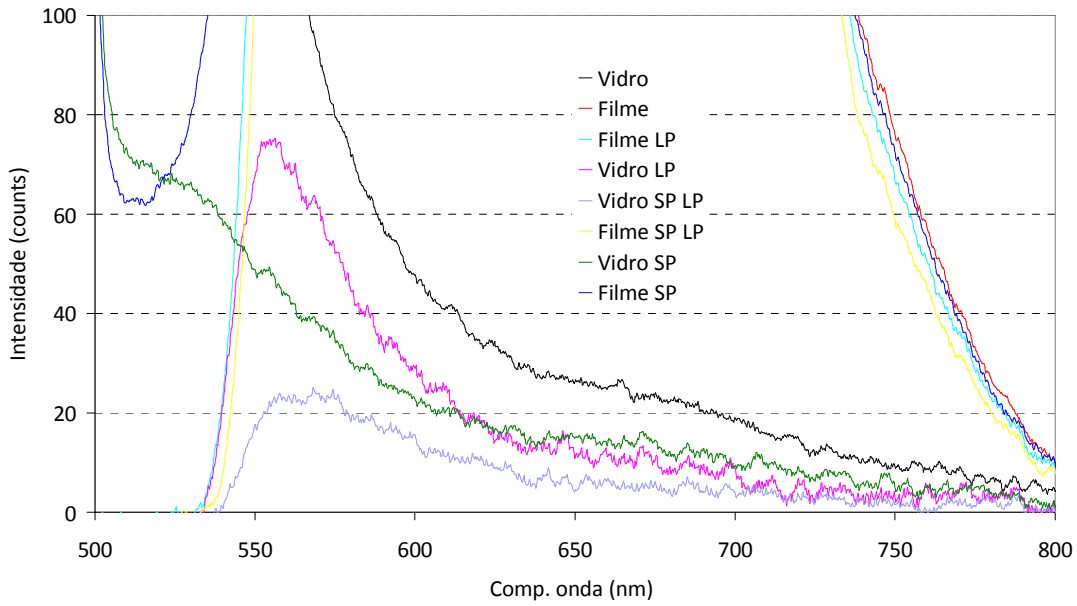


Figura 8.8 – Espectros obtidos utilizando apenas a reflexão do LED e o sinal fluorescente com várias combinações de filtros (escala modificada da fig. 8.7).

Uma vez que a intensidade de excitação do LED é muito superior à intensidade do sinal de fluorescência, o sinal azul acima dos 550 nm que é reflectido e misturado com o sinal de fluorescência, introduz um erro não desprezável. Esta fracção corresponde a cerca de 3 % do sinal de fluorescência acima dos 550 nm. A utilização de um filtro passa baixo aos 500 nm colocado logo a seguir ao LED permite reduzir a intensidade de luz reflectida acima dos 550 nm, como se pode observar na curva “Filme SP”.

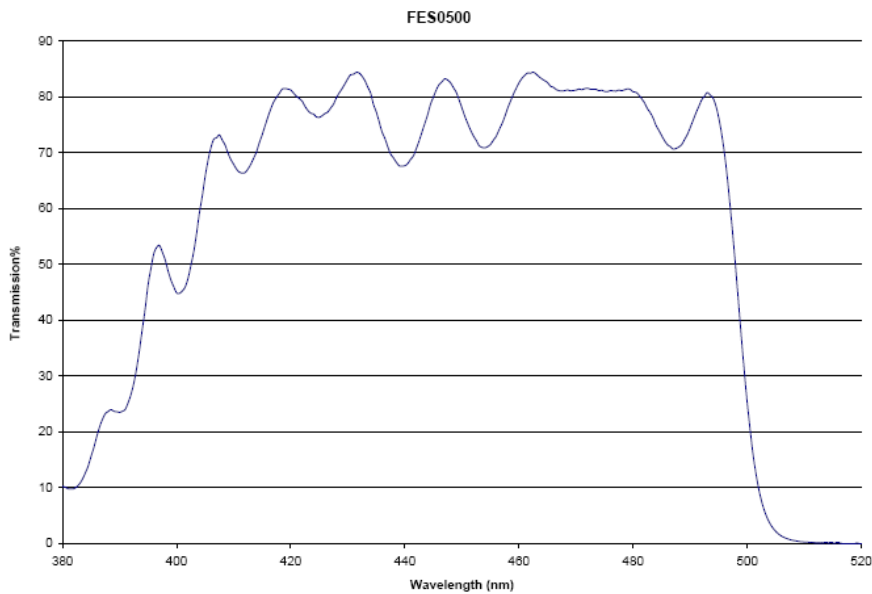


Figura 8.9 – Transmitância do filtro FES0500 da *Thorlabs* [E03].

O filtro SP é um filtro de filme dielétrico com uma transmitância máxima de cerca de 80% (Figura 8.9), significando que ao utilizar este filtro estamos a diminuir a intensidade de radiação de excitação e consequentemente o sinal de fluorescência. No caso da montagem experimental utilizada, isto não constituiu um problema pois em todas as medições o LED não foi utilizado na sua potência máxima, significando que esta situação poderia ser compensada caso fosse necessário. Como resultado da utilização do filtro passa-baixo, o espectro do LED tem uma acentuada redução de intensidade aos 500 nm (“Filme SP” e “Vidro SP”).

Dado que é necessário eliminar toda a radiação azul que está misturada com o sinal de fluorescência, foi utilizado um filtro passa-alto de 550 nm. Com a utilização dos dois filtros, obtém-se um espectro em que a contribuição da luz proveniente do LED azul é bastante inferior à inicial, podendo esta ser observada na curva “Vidro SP LP”. A fracção desta contribuição em relação ao sinal de fluorescência é de 0.9%.

8.4. CONSTRUÇÃO DA CÂMARA DE SUPORTE DE AMOSTRAS

Para a medição dos filmes sensores em diversos meios, foi necessário construir uma câmara de suporte em acrílico (Figura 8.10). A câmara, com um volume de 25 cm³, tem uma entrada e duas saídas de água/gás. As duas saídas estão colocadas em pontos diferentes em relação à posição da lâmina com o filme sensor, minimizando assim fluxos preferenciais dentro da caixa que dificultem a homogeneização do meio a medir. Existe também um orifício vedado para suporte do terminal do *bundle* de fibra óptica. A caixa pode ser aberta no topo para substituição das lâminas.

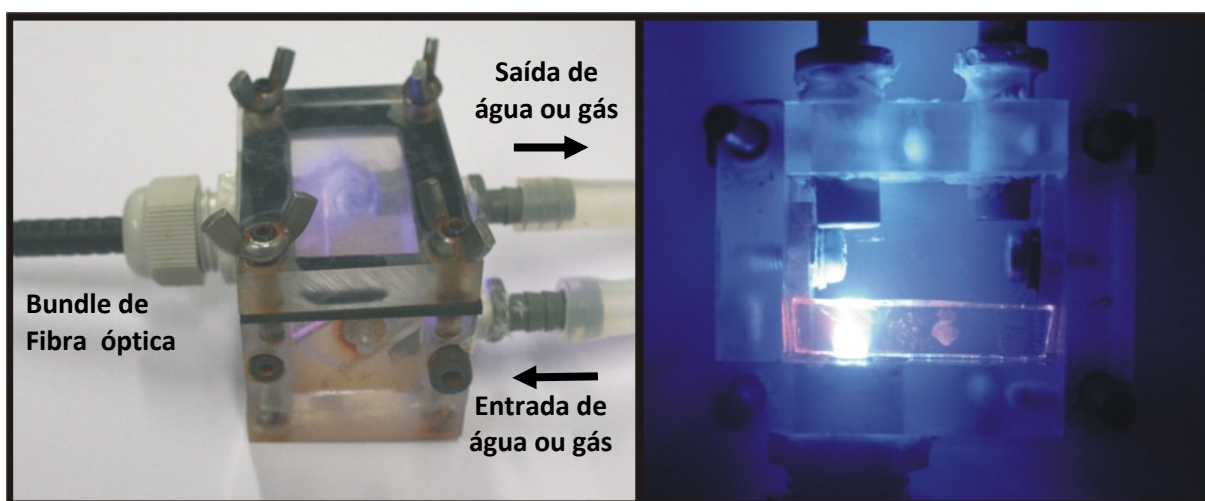


Figura 8.10 – Caixa de suporte de amostras.

A modificação da composição do meio aquoso que alimenta a câmara de suporte é efectuada por alternância do recipiente de onde provém a água. No caso dos ensaios em meio gasoso, o tubo de

alimentação da câmara de suporte é directamente ligado à linha de fornecimento de ar ou azoto, disponíveis no laboratório. Após cada mudança, é necessário esperar o tempo suficiente para que a concentração de oxigénio na câmara de suporte estabilize, antes de se efectuarem as medições.

Para estimar esse tempo, foi utilizado um modelo que indica como varia a concentração de uma espécie "A" numa câmara de fluxo contínuo com mistura perfeita [121]. Esse modelo estipula que:

$$C_A(t) = C_{A0} - C_{A0} \exp(-t/\tau_R) \quad \text{Eq. 8.1}$$

em que C_{A0} é a concentração inicial (neste caso $C_{A0}=0$), t é o tempo e τ_R o tempo de residência ($\tau=V/Q$, V -volume da câmara, Q – caudal volumétrico de entrada).

Uma vez que o caudal dos gases utilizados foi de 2L/min, o tempo médio de residência em meio gasoso é de 0.75 segundos. Esta expressão teórica permite determinar que após a alteração da alimentação, a concentração do gás atinge os 99% do seu valor final após 3 segundos e 99.9% após os 5 segundos. Para a medição em meios aquosos, a alimentação da câmara foi efectuada com um caudal de 470 cm³/min. Neste caso, a alteração de 99% da concentração total no meio só ocorre passados 14 segundos e 99.9% após 22 segundos.

Dado que a câmara construída não tem as características de um sistema perfeitamente agitado, os tempos referidos devem ser ampliados para garantir que as medições efectuadas sejam obtidas com a concentração desejada. Como referência, estipulou-se tempos de espera para a estabilização da concentração do meio de 1 minuto para ensaios gasosos e 2 minutos para ensaios aquosos.

Na construção da câmara foi também definida a forma como a lâmina deveria estar posicionada em relação ao *bundle* de fibra óptica, no sentido de maximizar o sinal de fluorescência e minimizar a reflexão de luz azul.

A partir de uma posição da lâmina perpendicular com o eixo do bundle, procurou-se garantir uma distância entre estes dois elementos que permitisse a fácil renovação do meio a ser medido nesse volume, mas ao mesmo tempo não reduzir muito a captação da emissão fluorescente devido a esse afastamento. De forma a avaliar esta questão, foram realizados ensaios em que se mediu a intensidade fluorescente em função do afastamento entre as duas superfícies desde 1 mm até 12 mm (Figura 8.11).

Os resultados obtidos (Figura 8.12) revelam que existe uma diminuição média de cerca de 7% da intensidade por cada 1 mm de afastamento, sugerindo que esse afastamento deverá ser o mais baixo possível. Para o afastamento máximo de 12 mm, a redução do sinal é de cerca de 78%.

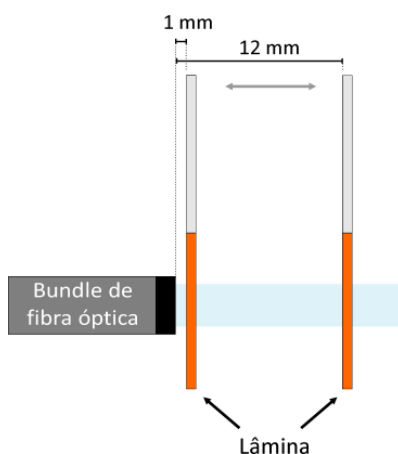


Figura 8.11 – Variação da distância entre a lâmina e o *bundle* de fibras ópticas.

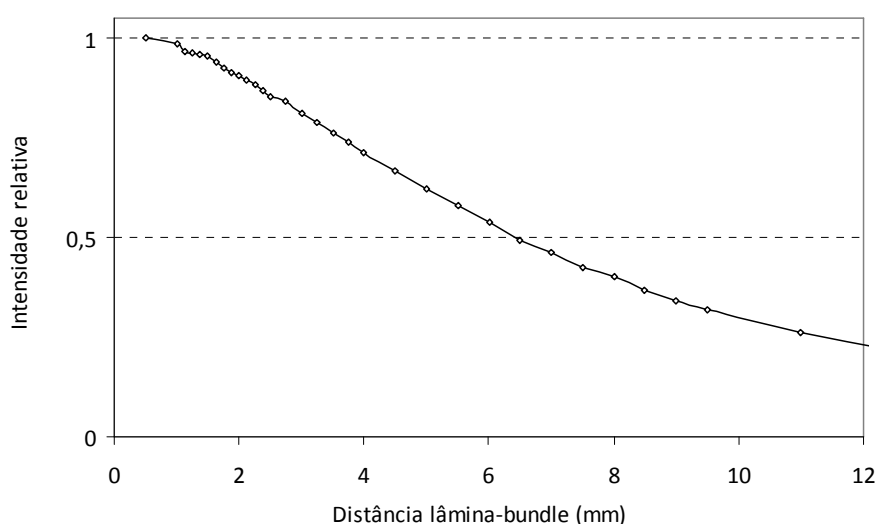


Figura 8.12 – Variação da intensidade fluorescente com a distância entre a lâmina e o *bundle* de fibras ópticas.

Conforme abordado no capítulo referente à escolha dos filtros (cap. 8.3), existe uma pequena fracção de luz acima dos 550 nm com origem no LED azul, que é misturada com o sinal de fluorescência. Devido à elevada potência do LED, mesmo uma pequena fracção de luz azul reflectida poderá contribuir com um apreciável erro na leitura da intensidade de fluorescência ou da fase medida, conforme demonstrado por P.Jorge [72]. Portanto, a redução desta luz reflectida, através do posicionamento da lâmina em relação ao *bundle* de fibra óptica representa uma optimização importante do sistema sensorial.

Assim, foi considerada a possibilidade de se diminuir o ângulo da lâmina com a superfície do *bundle*, para que a direcção de incidência da luz azul não estabeleça um ângulo de 90 graus com a superfície da lâmina, evitando assim uma elevada reflexão da luz azul. Colocou-se uma lâmina de vidro sem filme sensor com um afastamento médio de 5 mm e mediu-se a radiação azul reflectida para diferentes ângulos entre a direcção da luz e a superfície da lâmina (Figura 8.13), com o eixo de rotação colocado no centro do feixe de luz e na superfície da lâmina mais próxima do *bundle*. Como

referência, considera-se que o alinhamento da lâmina numa posição paralela com a direcção do feixe de luz corresponde a um ângulo de zero graus.

Os resultados deste estudo apontam para uma significativa redução da radiação azul reflectida quando se utiliza ângulos inferiores a 70°. Comparativamente ao valor de referência inicial (90 graus) existe uma redução para cerca de 0.8% da radiação azul reflectida quando se utiliza um ângulo de 45 graus.

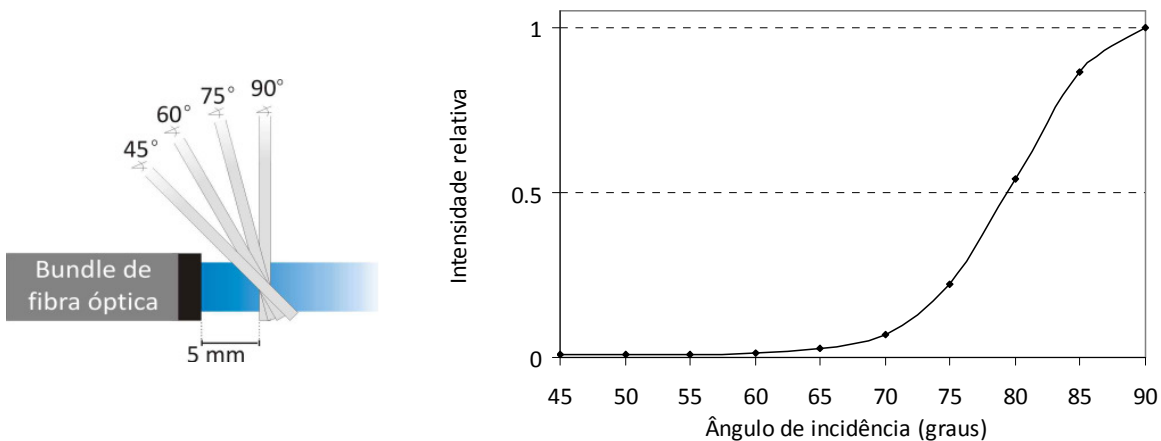


Figura 8.13 – Intensidade da radiação azul captada pelo fotodetector devida à reflexão no substrato de vidro.

Nos ensaios com o filme sensor, observou-se que a fluorescência de cor laranja era relativamente mais intensa nas extremidades da lâmina. Consequentemente, foi efectuado um estudo do ângulo de posicionamento da lâmina semelhante ao anterior, mas com a extremidade da lâmina na zona central do *bundle* de fibra óptica de forma a captar a radiação fluorescente daí proveniente. Foram novamente ensaiados diferentes ângulos de posicionamento, com o eixo de rotação localizado na extremidade da lâmina, de acordo com a Figura 8.14. Para registo do espectro com os sinais de fluorescência e da luz azul reflectida, foi removido o filtro passa-alto.

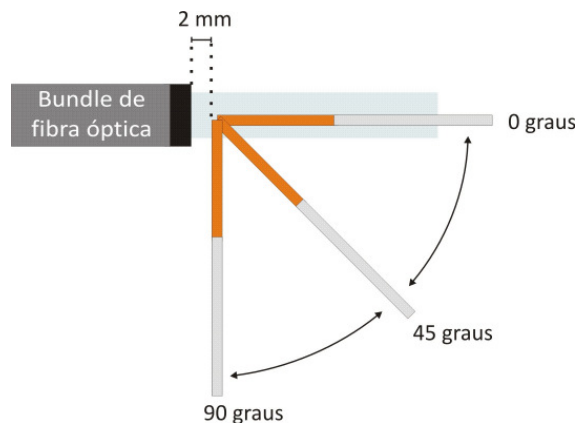


Figura 8.14 – Posição da lâmina nos ensaios de estudo do ângulo de incidência.

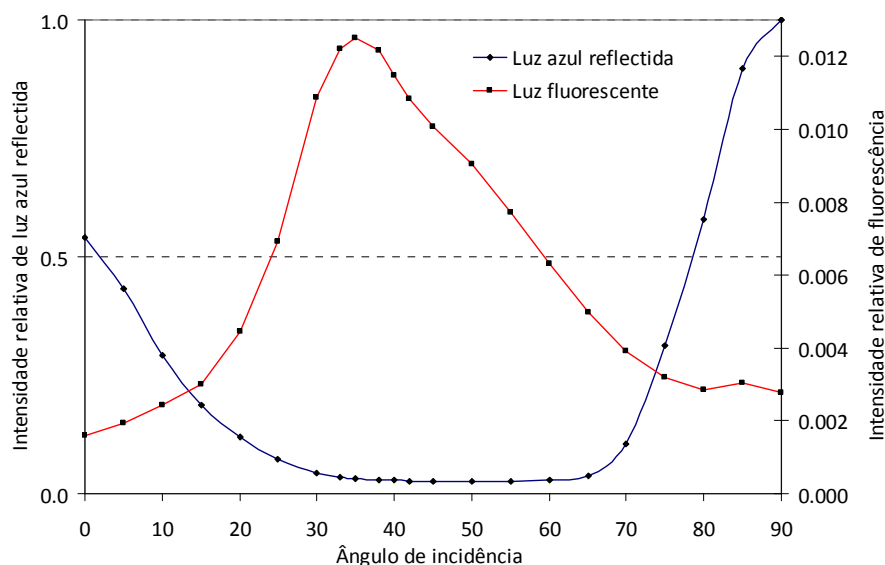


Figura 8.15 – Estudo da intensidade de fluorescência com o ângulo de incidência.

Os resultados apresentados na Figura 8.15 revelam que existe um aumento substancial da intensidade de fluorescência, quando se passa de uma situação de perpendicularidade (90 graus) para um ângulo de cerca de 35 graus, tendo sido esse aumento de cerca de 4.5 vezes.

Esta situação pode ser explicada pelo facto de que quando o fluoróforo emite fluorescência em todas as direcções, uma grande parte é radiada para o interior do substrato de vidro que tem um índice de refração superior ao do meio exterior, quer seja ar, nitrogénio ou água. A emissão da luminescência na direcção do substrato segue um padrão semelhante ao da Figura 8.16, em que a maior parte da radiação é designada de fluorescência de ângulo supercrítico.

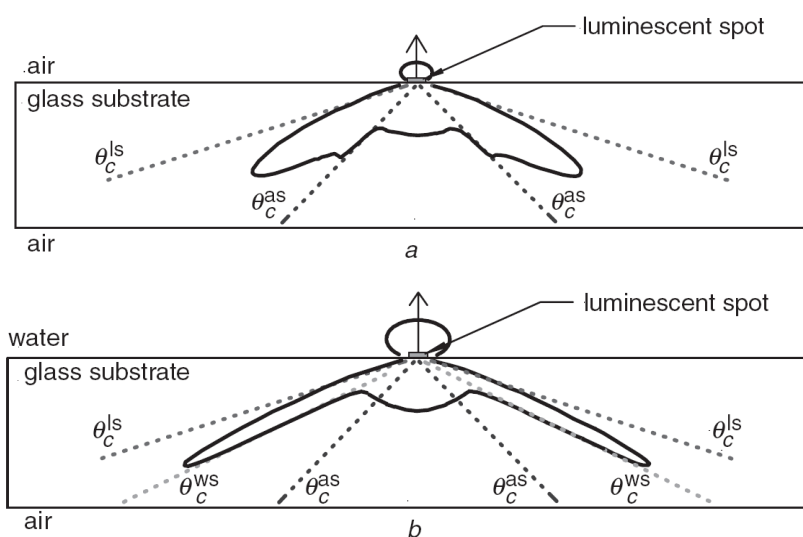


Figura 8.16 – Propriedades angulares da luminescência irradiada por um fluoróforo depositado num substrato de vidro em a) ar e, b) água. As linhas a cheio representam a distribuição espacial da luminescência, e a tracejado os ângulos supercríticos em que ls=filme, as=ar e w=água [122].

Isto significa que a radiação que se propaga através do substrato com ângulos acima do ângulo crítico da interface substrato/meio externo sofre uma reflexão interna total, o que significa que o substrato de vidro funciona como guia de ondas. Quando o ângulo de incidência da radiação é menor que o crítico, o que tipicamente acontece nas extremidades da lâmina, esta sai para o exterior com um ângulo preferencial (Figura 8.17) [122].

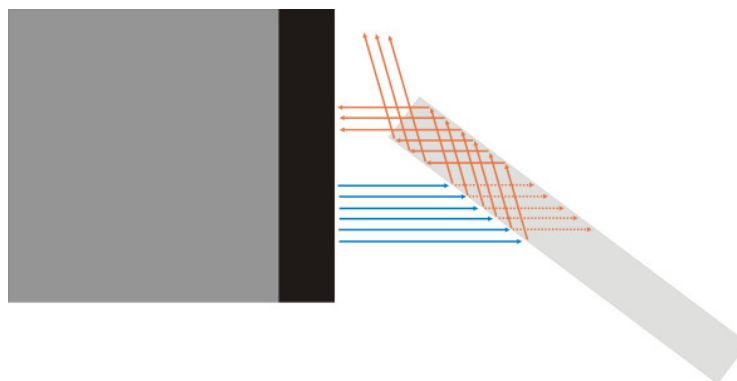


Figura 8.17 – Saída da luminescência do substrato com um ângulo preferencial.

Os resultados obtidos anteriormente indicam que a radiação luminescente que entra no substrato sai preferencialmente nas extremidades com um ângulo de cerca de 35 graus, pelo que a lâmina deverá estar posicionada com a extremidade colocada sobre o *bundle* de fibra óptica com o referido ângulo no caso de querermos maximizar a captação da fluorescência. No entanto, a análise exclusiva da variação da fluorescência com o ângulo de incidência não é totalmente esclarecedor, pois a radiação azul captada também sofre influência e esta deverá ser minimizada.

A radiação azul captada, resulta não só da que é reflectida directamente pela superfície da lâmina, mas também da fracção de luz azul que entra no substrato de vidro (em função dos ângulos de ataque) e que após múltiplas reflexões internas, sai também pela extremidade da lâmina.

Na Figura 8.15, a variação da intensidade da radiação correspondente à contribuição azul é apresentada. Neste caso, a variação entre os 45-90 graus é equivalente mas não tão acentuada como a da Figura 8.13, pelas razões já referidas. A gama de ângulos onde a reflexão é mínima ocorre entre os 30 e os 60 graus.

Dado que a decisão para a escolha do ângulo de colocação da lâmina deve basear-se na maximização da fluorescência e na minimização da reflexão azul, foi determinado a razão entre o sinal de fluorescência sobre o sinal correspondente à reflexão azul (Figura 8.18). Como resultado desta análise, o ângulo de incidência utilizado na construção de câmara foi de 38 graus.

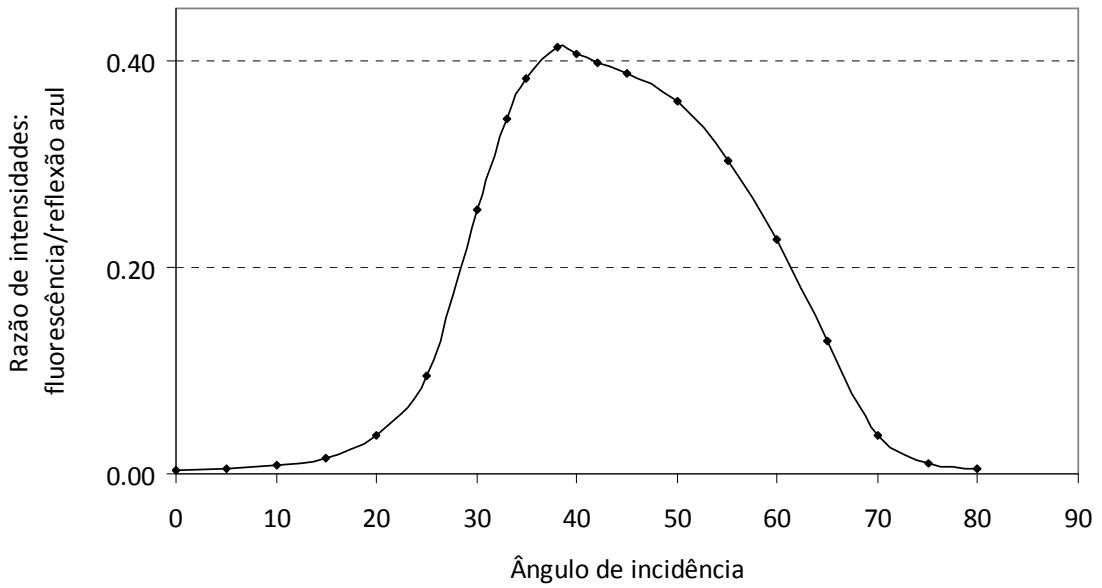


Figura 8.18 – Razão entre a intensidade de fluorescência e reflexão azul em função do ângulo de incidência.

O estudo seguinte procurou avaliar se existe melhoria do sinal obtido quando se desloca a extremidade da lâmina a partir da sua posição central utilizada no teste anterior. Para isso, mantendo a distância entre a superfície do *bundle* e a extremidade da lâmina em 2 mm, realizaram-se medições de intensidade da fluorescência para diversas posições, tendo como referência (0 mm) a indicada na Figura 8.19.

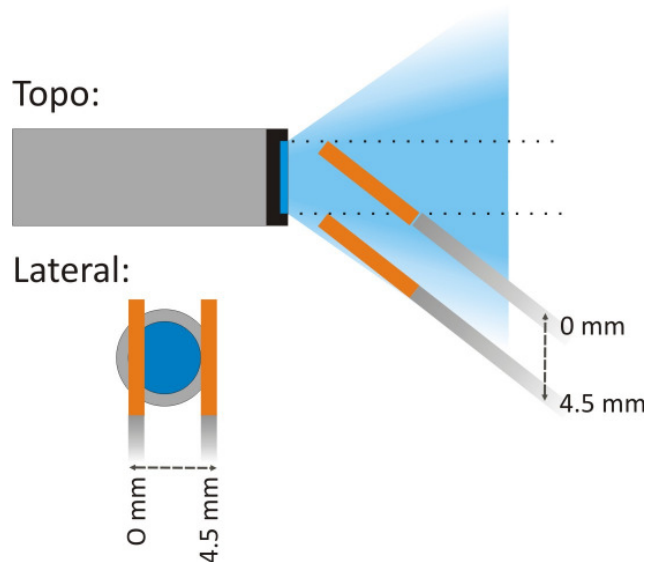


Figura 8.19 – Variação da posição relativa entre a lâmina e o *bundle*.

A extremidade do *bundle* de fibra óptica tem um diâmetro de radiação de 4.5 mm. Analisou-se a variação do sinal de fluorescência e luz azul reflectida com a posição da lâmina (Figura 8.21). Estabelecendo uma razão entre estes dois sinais (Figura 8.22), conclui-se que a posição mais

favorável corresponde a uma distância de 1.5 mm da extremidade de referência. Nesta nova posição, existe um aumento da intensidade de fluorescência de 18% em relação à posição central (2.3 mm) utilizada nos ensaios do estudo anterior.

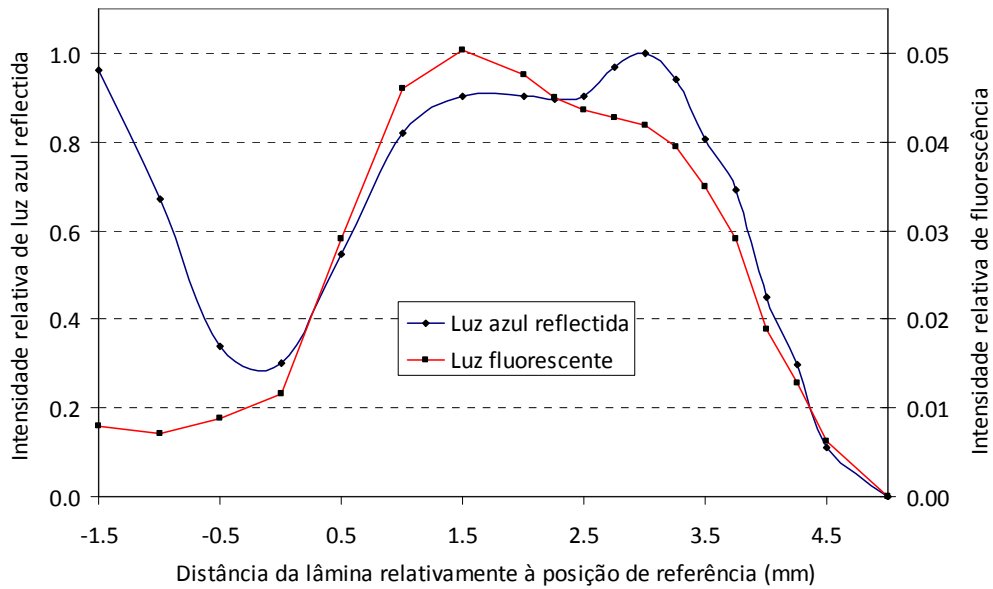


Figura 8.20 – Variação da intensidade com a posição relativa entre a lâmina e o *bundle*.

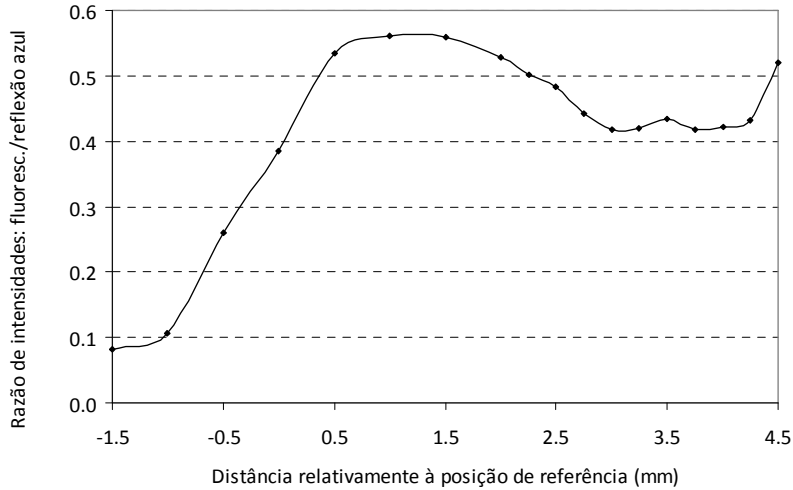


Figura 8.21 – Variação da razão de fluorescência, com a posição relativa entre a lâmina e o *bundle*.

Como resultado destes estudos, a caixa de suporte de amostras foi construída de forma a manter as lâminas na posição óptima de 38 graus de inclinação, a 2 mm de distância do *bundle* e a 1.5 mm de distância da extremidade de referência.

8.5. ATRASO DE FASE DA COMPONENTE ELECTRÓNICA

Nos ensaios realizados por fluorimetria de fase, pretendeu-se medir exclusivamente o atraso da fase introduzido pelo processo de fluorescência do filme sensor, que conforme abordado anteriormente depende da concentração de oxigénio. O amplificador *lock-in* tem a função de comparar o sinal sinusoidal de referência alimentado ao LED com o sinal de saída do fotodetector, e daí determinar o atraso na fase. No entanto, esse atraso, para além do processo de fluorescência tem outros componentes associados, nomeadamente os atrasos devidos aos tempos de resposta dos elementos electrónicos e que fazem parte dos sistemas de medição.

Se assumirmos que a configuração de filtros impede que a radiação azul proveniente do LED chegue ao fotodetector, a fase medida, ϕ_M , é dada por:

$$\phi_M = \phi_F + \phi_E \quad \text{Eq. 8.2}$$

em que ϕ_F é o atraso de fase devido ao tempo de vida do fluoróforo, e ϕ_E corresponde ao atraso de fase introduzido pelos elementos electrónicos e percurso óptico [19, 72].

A medição do atraso de fase ϕ_E foi efectuada através da colocação de uma lâmina de vidro sem filme sensor na câmara de suporte e a remoção do filtro passa-alto (550 nm) colocado à entrada do fotodetector. Para medições a frequência constante, o valor da fase foi memorizado pelo *lock-in* e descontado automaticamente nas subseqüentes medições. Para a determinação dos tempos de vida, foi medido o atraso de fase ϕ_E para as diferentes frequências testadas (Figura 8.22) e subtraído esse valor ao medido, ϕ_M , para obter o ϕ_F .

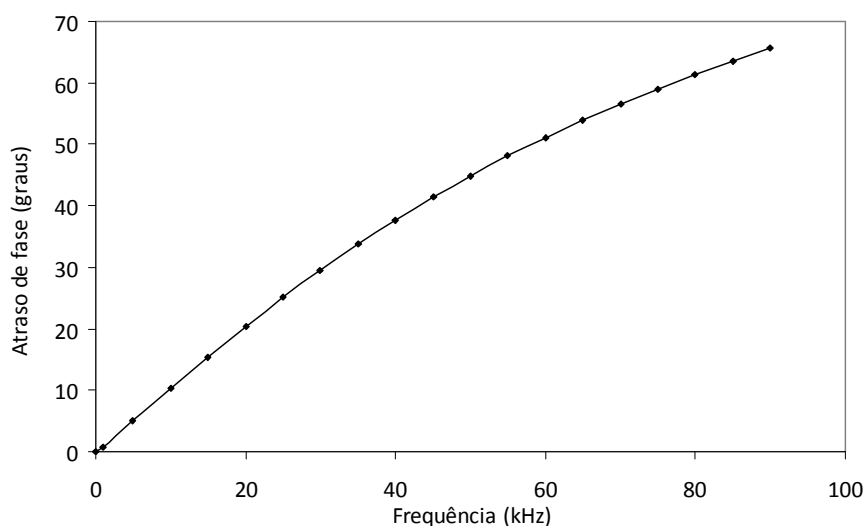


Figura 8.22 – Atraso de fase correspondente aos elementos electrónicos e percurso óptico em função da frequência.

O atraso de fase (ϕ_E) obtido para uma frequência de 45 kHz foi de 41.44 graus. Deste atraso, uma fracção corresponde ao tempo que a luz demora a percorrer a distância de cerca de 1.8 metros ao longo das fibras ópticas. O valor calculado é de cerca de 0.15 graus num meio de vidro e para 45 kHz [123]. Conclui-se que o atraso de fase deve-se maioritariamente aos elementos electrónicos.

9. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE SOL-GEL

9.1. CARACTERIZAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DOS FILMES

Um dos factores críticos que determinam o comportamento dos filmes quando utilizados em meio aquoso é a sua hidrofobicidade. Conforme abordado na parte teórica desta tese, uma elevada hidrofobicidade dos filmes de sol-gel dificulta o preenchimento dos poros pela fase líquida aumentando a fracção gasosa no interior da matriz através da qual as moléculas de oxigénio provocam a supressão do fluoróforo. Devido à baixa solubilidade do oxigénio na água o número de moléculas disponíveis na fase gasosa é relativamente mais elevado, pelo que um aumento da fracção desta, aumenta o número de moléculas de oxigénio que provoca a supressão da fluorescência, logo a aumenta a sensibilidade do filme.

Os precursores *ormosils* são conhecidos por uma hidrofobicidade mais elevada relativamente aos tetralcoxisilanos, resultante da existência de um grupo alquilo na estrutura molecular em substituição de um grupo hidroxilo [109]. Quando os filmes são preparados por mistura de precursores tetralcoxisilanos e *ormosils*, a hidrofobicidade resultante depende da proporção entre os dois reagentes, assim como do grupo alquilo do *ormosil*.

Neste capítulo, é apresentada uma caracterização dos filmes produzidos relativamente à hidrofobicidade, sendo esta determinada através da medição do ângulo de contacto estabelecido por uma gota de água depositada na superfície do filme. Quanto mais elevado o ângulo de contacto, maior é a hidrofobicidade do filme.

Com os resultados obtidos foi avaliada a influência do tempo de envelhecimento da solução reaccional na hidrofobicidade dos filmes. Foi comparada a diferença de hidrofobicidade entre filmes produzidos a partir dos mesmos precursores mas com quantidades relativas diferentes, e identificados os precursores que originam filmes mais hidrofóbicos. A avaliação da hidrofobicidade dos filmes produzidos permite identificar aqueles que possam revelar maior sensibilidade à concentração de oxigénio.

9.1.1. MEIOS E MÉTODOS

A caracterização da hidrofobicidade foi realizada em filmes de sol-gel produzidos a partir de soluções de sol-gel preparadas sem a introdução do fluoróforo.

As medições dos ângulos de contacto estáticos dos filmes de sol-gel foram efectuadas num goniómetro da marca *Kruss*, modelo *DSA10* (Figura 9.1).

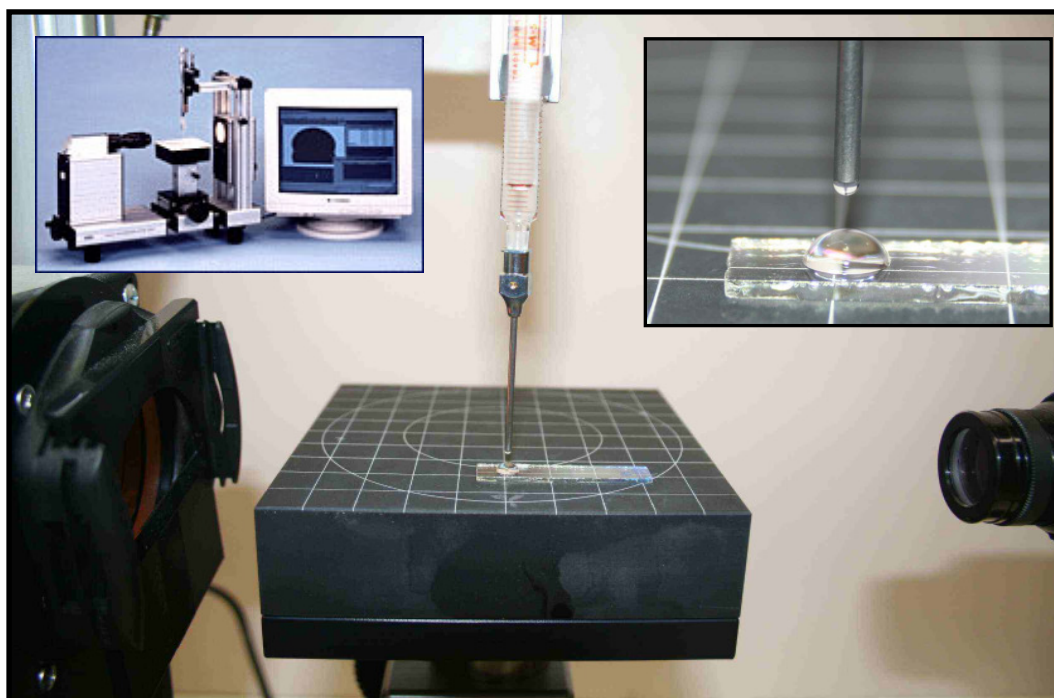


Figura 9.1 – Equipamento utilizado na determinação dos ângulos de contacto dos filmes produzidos.

O equipamento é constituído por uma fonte de iluminação, uma mesa de suporte da amostra onde se encontra acoplada uma seringa (diâmetro da agulha = 1.5 mm) para deposição da gota e uma câmara de vídeo que efectua a aquisição de imagem.

A imagem da gota depositada obtida pela câmara é sujeita a análise pelo programa *DSA10-software*. Este programa efectua a medição do ângulo de contacto por tratamento da imagem recorrendo a um dos métodos disponíveis: *Tangent method 1*, *Tangent Method 2*, *Height-width method*, *Circle fitting method* e *Young-Laplace (sessile drop fitting)* [124]. Estes métodos diferem no modelo matemático utilizado na análise da forma da gota. Nas medições efectuadas aos filmes de sol-gel, foi utilizado o método *Young-Laplace*. De todos os métodos referidos este é o mais complexo mas também o teoricamente mais exacto. Neste método, todo o perfil da gota é analisado e inclui um factor de correcção que assume que a forma da gota é obtida não somente pelas interacções na interface mas que existe alguma distorção provocada pelo próprio peso da gota.

Para a determinação do ângulo de contacto, a lâmina com o filme sol-gel é colocado na mesa de suporte de amostras com a superfície em análise virada para o topo. Uma seringa com água bi-destilada é posicionada sobre a área onde se pretende efectuar a deposição da gota. Após a deposição da gota (70 μ l), é efectuada a captura de imagem (Figura 9.2). A linha base da amostra é

definida e efectua-se o cálculo do ângulo de contacto. Para cada lâmina revestida com o filme sol-gel, foram efectuadas 4 medições, evitando sempre a deposição da gota numa área previamente medida.

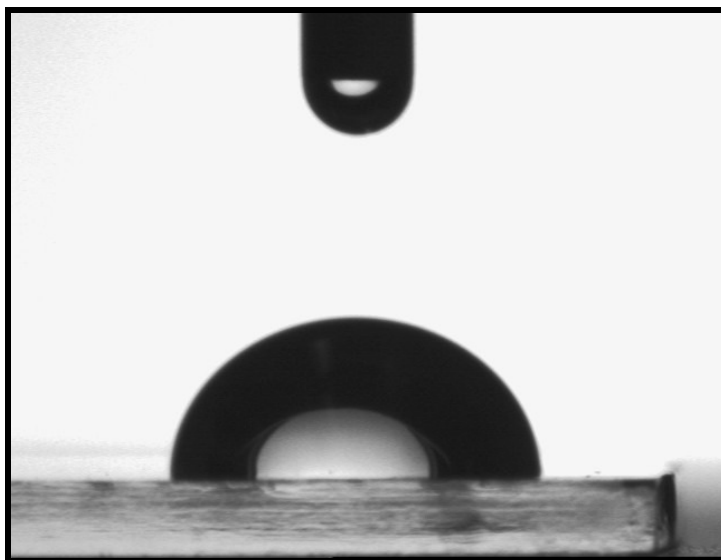


Figura 9.2 – Deposição de gota sobre o filme sol-gel para determinação do ângulo de contacto do filme ET31.

9.1.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Os valores dos ângulos de contacto médios dos filmes e respectivos desvio padrão estão representados em função do tempo de envelhecimento da solução de sol-gel, na Figura 9.3.

Para cada composição de sol-gel, pode afirmar-se que o ângulo de contacto médio apresenta variações baixas ao longo do tempo de envelhecimento e dentro do desvio padrão dos pontos medidos. Por esta razão, não é possível concluir sobre uma tendência clara de aumento ou diminuição do ângulo de contacto com o tempo de envelhecimento. As medições efectuadas na mesma lâmina não apresentam uma reprodutibilidade muito elevada, o que é reflectido no valor elevado dos desvios padrão. Tal poderá dever-se a uma heterogeneidade na composição da superfície do filme e/ou a alguma rugosidade microscópica.

A comparação dos filmes em que foram utilizados os mesmos precursores mas com quantidades relativas diferentes, permite concluir que os filmes que apresentam uma razão *ormosil*:TEOS de 3:1, são os que apresentam ângulos de contacto mais elevados.

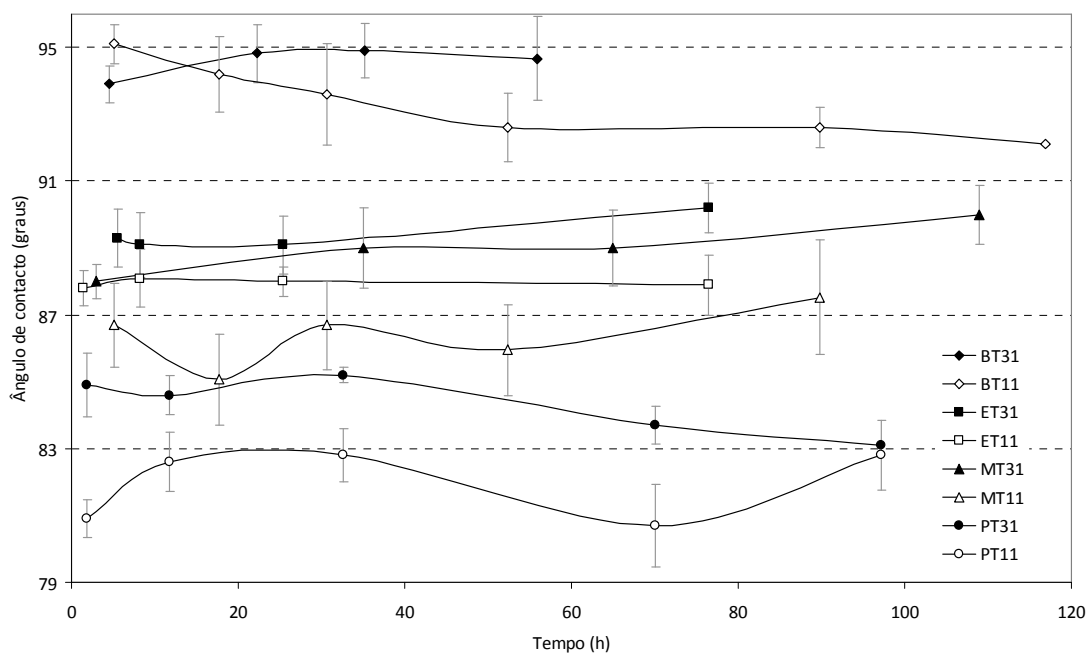


Figura 9.3 – Representação gráfica da variação do ângulo de contacto de cada filme em função do tempo de envelhecimento da solução de sol-gel.

Quando comparamos os filmes com diferentes composições mas com a mesma razão *ormosil*:TEOS, é possível estabelecer uma ordem crescente do grau de hidrofobicidade em função do *ormosil* utilizado. Para cada uma das razões 3:1 e 1:1, a ordem é PTEOS < MTEOS < ETEOS < BTEOS. Para as duas razões nota-se uma maior proximidade dos valores dos filmes em que se utiliza MTEOS e ETEOS, enquanto os filmes com BTEOS e PTEOS apresentam valores distintamente mais elevados e mais baixos, respectivamente.

9.1.3. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos não demonstram existir uma dependência da hidrofobicidade do filme com o tempo de envelhecimento. Conforme apresentado nos fundamentos teóricos, o tempo de envelhecimento apenas altera a estrutura do material e conseqüentemente a sua porosidade. Isto significa que a porosidade não afecta a hidrofobicidade dos filmes.

A hidrofobicidade depende maioritariamente da existência de grupos na superfície do material com maior ou menor afinidade para a água. Isto é evidente quando se comparam os filmes com razões de precursores diferentes. Os grupos alquilo, conferem à superfície do material um carácter mais hidrofóbico, pelo que uma maior concentração destes grupos aumenta a hidrofobicidade do material.

Os resultados revelam que quanto maior a cadeia carbonatada do grupo alquilo maior a hidrofobicidade apresentada pelo material. O grupo fenil, derivado da molécula apolar de benzeno, é o que apresenta os valores mais baixos de hidrofobicidade. Estes resultados são indicativos que as composições que misturam os precursores BTEOS e TEOS poderão ser os mais promissores para a obtenção de filmes sensores ao oxigénio dissolvido de elevada sensibilidade.

9.2. AVALIAÇÃO DA FOTODEGRADAÇÃO

A fotodegradação é um processo de perda das características fluorescentes por parte do fluoróforo com evidentes desvantagens em sistemas de medição de oxigénio, quer estes se baseiem na intensidade, quer na fluorometria de fase.

No primeiro caso, a diminuição da fluorescência afecta directamente os resultados, dado que existe uma relação directa entre a intensidade de fluorescência e a concentração de oxigénio determinada. No caso da fluorometria de fase, esta tem sido apresentada como uma técnica que é imune à fotodegradação [71], no entanto, isto apenas é verdade se os produtos resultantes da fotodegradação não exibirem eles próprios fluorescência, ou não provocarem a supressão da fluorescência do fluoróforo [32]. Um estudo da fotodegradação do complexo de ruténio utilizado neste trabalho, em matrizes de PVC e poliestireno, demonstrou que para além da diminuição da intensidade de fluorescência, ocorre também uma variação das fases medidas, embora esta última seja relativamente menos acentuada [125]. Isto significa que para além do processo de degradação do fluoróforo para produtos sem fluorescência, ocorrem outros que afectam os parâmetros relacionados com o tempo de vida. Adicionalmente, mesmo no caso de a fotodegradação não afectar directamente as medições, a razão sinal/ruído diminuirá com a intensidade fluorescente, pelo que a longo prazo ocorrerá a uma degradação da exactidão das medidas efectuadas.

A taxa degradação do fluoróforo é tanto maior quanto maior for a intensidade da fonte de excitação, o poder energético da radiação de excitação (menor comprimento de onda) e o tempo de exposição.

Os testes apresentados neste capítulo avaliaram exclusivamente o efeito do tempo de exposição na alteração do sinal obtido em medições efectuadas através dos dois sistemas montados

9.2.1. MEIOS E MÉTODOS

Neste estudo utilizou-se a montagem para determinação de intensidades (Figura 8.1a), em que foi avaliada a diminuição da intensidade fluorescente de um filme sensor ao longo de 60 minutos de exposição contínua à fonte de excitação (LED a 150 mA). Nesse período, foram efectuadas medições de intensidade ao filme ET11G em meio gasoso arejado e nitrogenado, de forma alternada. Foram

determinadas as diminuições da intensidade de fluorescência em cada um dos meios, assim como variação da supressão durante o período de estudo. Todos os testes foram realizados à temperatura ambiente de 24°C.

Para a avaliação da variação do atraso de fase com o tempo de exposição à fonte de radiação, foi utilizada a montagem da fluorometria de fase (Figura 8.1b) e seguida a metodologia anterior. Neste caso, dado que a intensidade de radiação de excitação varia sinusoidalmente, foi estabelecido um pico máximo de radiação de 300 mA, com uma média de radiação equivalente a 150 mA. Neste ensaio, o tempo de exposição do filme sensor foi de cerca de 110 minutos, tendo sido utilizada uma nova amostra do mesmo filme. A frequência de modulação foi de 45 kHz.

9.2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação da intensidade do sinal medido ao longo do tempo de exposição à fonte de excitação, pode ser observado na Figura 9.4. Na Figura 9.4a pode observar-se uma diminuição progressiva da intensidade medida quer em meio nitrogenado (valores que iniciam com uma intensidade relativa de 1) quer em meio arejado, confirmando que este fluoróforo sofre fotodegradação quando exposto a uma fonte de radiação, conforme sugerido em várias referências bibliográficas [71, 125]

Nas Figura 9.4b e c, podem ser observadas as variações de intensidades que ocorrem exclusivamente em meio nitrogenado e arejado, respectivamente. A redução do sinal de intensidade foi de cerca de 7% dos valores iniciais, nos dois meios. Estas variações podem ser ajustadas a modelos polinomiais de 2ª ordem, sendo estes apenas válidos nos 60 min de ensaio.

Com os valores de intensidade em cada instante de tempo, determinou-se a variação da supressão utilizando a equação 4.4, tendo sido observado que não existe uma tendência evidente de aumento ou diminuição deste parâmetro (Figura 9.5). A variação ocorrida está compreendida num intervalo reduzido (cerca de 0.4%) pelo que podemos concluir que a supressão não é significativamente afectada pela fotodegradação.

Se considerarmos a calibração de um sensor que obedeça à equação de *Stern-Volmer* (Eq. 2.28), com os valores iniciais de intensidade registados nos dois meios, ao final de 60 min de exposição obteríamos os desvios apresentados na Tabela 9.1.

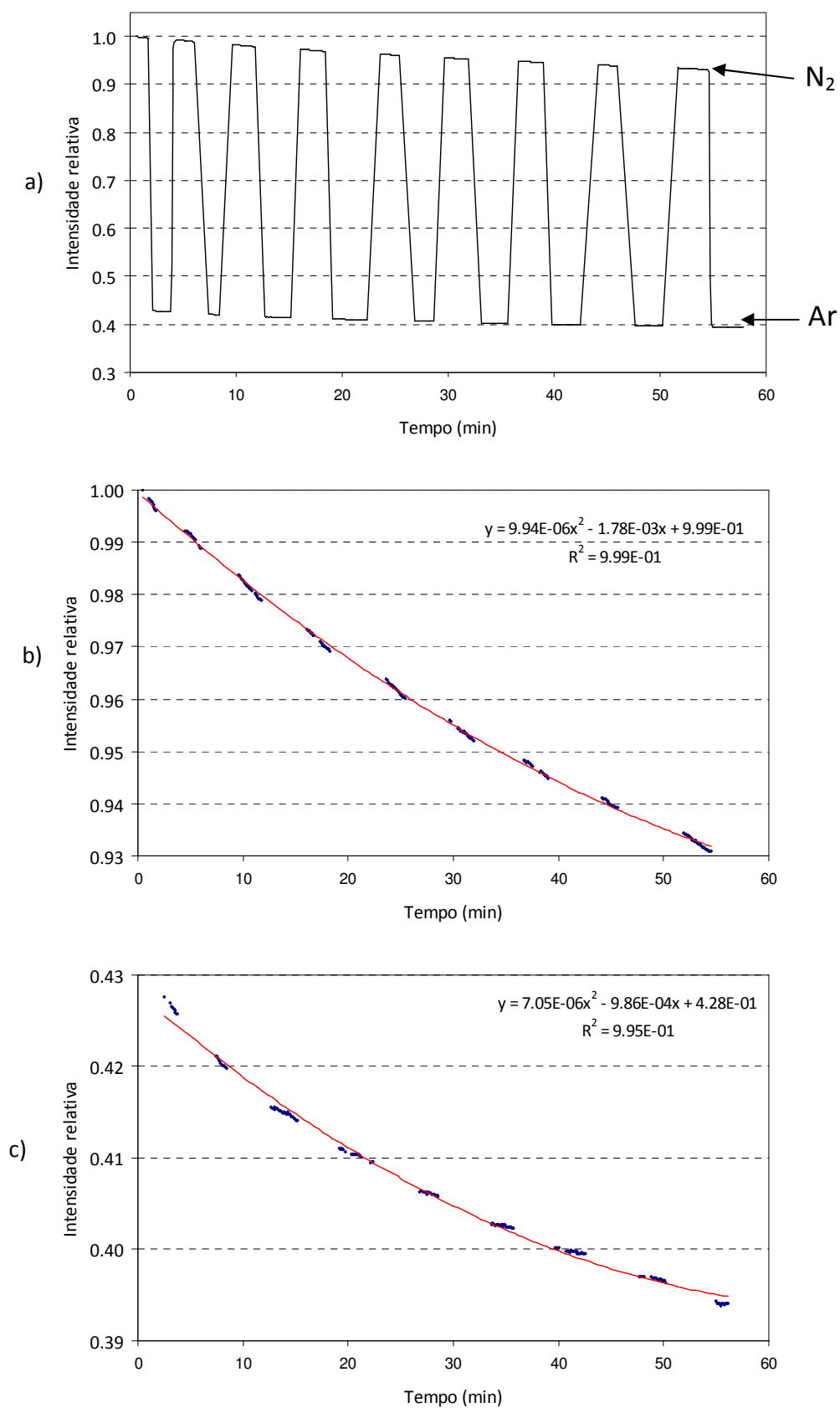


Figura 9.4 – a) Variação do sinal de intensidade em meio gasoso: b) nitrogenado, e c) arejado, com o tempo de exposição à radiação de excitação.

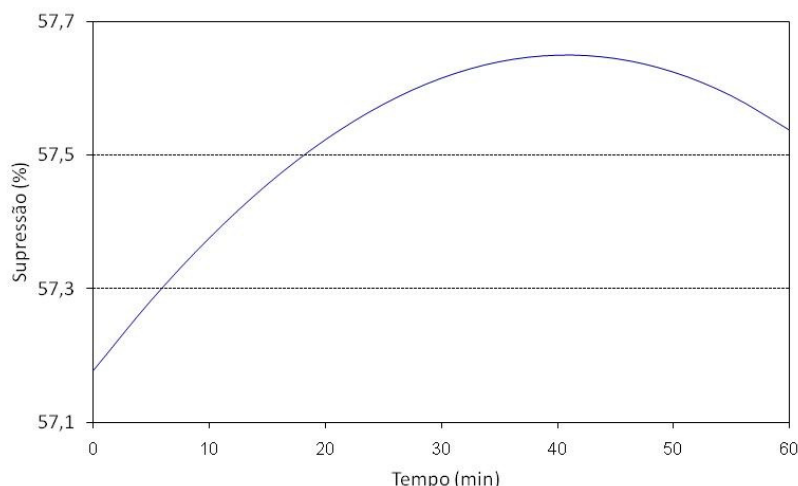


Figura 9.5 – Variação da supressão com o tempo de exposição à radiação.

Tabela 9.1 – Desvios nas medições de $[O_2]$ utilizando a equação de *Stern-Volmer* (com base nas intensidades), após 60 min de exposição contínua à fonte de radiação.

$[O_2]$ real (% v/v)	$[O_2]$ medida (% v/v)	Desvio (% O_2)
0	1.2	+1.2
20.95	24.1	+3.2

Em estudos similares, D.P. O’Neal [7] reporta uma diminuição e estabilização da intensidade em testes realizados a este fluoróforo numa matriz de hidrogel fabricada a partir de polietileno glicol após algumas horas de radiação. Em testes posteriores, após a exposição contínua de 24 horas sobre os filmes sensores, afirma não terem sido detectadas variações de intensidade.

Noutro estudo, S. Pieper [126] apresenta resultados obtidos por exposição deste fluoróforo numa matriz de silicone, a um laser díodo com um comprimento de onda nos 405 nm. O teste realizado ao longo de 48 horas revela uma diminuição da intensidade de forma acentuada nas primeiras 8 horas para cerca de 66% do valor inicial, seguida de uma variação aproximadamente linear até atingir cerca de 57% do valor inicial no final do ensaio.

De forma a avaliar como a exposição à fonte de excitação afecta o atraso de fase medido, foram realizados ensaios em condições idênticas aos anteriores.

Os resultados apresentados na Figura 9.6 revelam que existe uma pequena variação do valor da fase medido em ambos os meios arejado e nitrogenado, sendo essa variação mais significativa em meio nitrogenado. As variações de fase ocorridas correspondem a cerca de 1.4% e 2.3% dos valores iniciais para os meios arejado e nitrogenado, respectivamente.

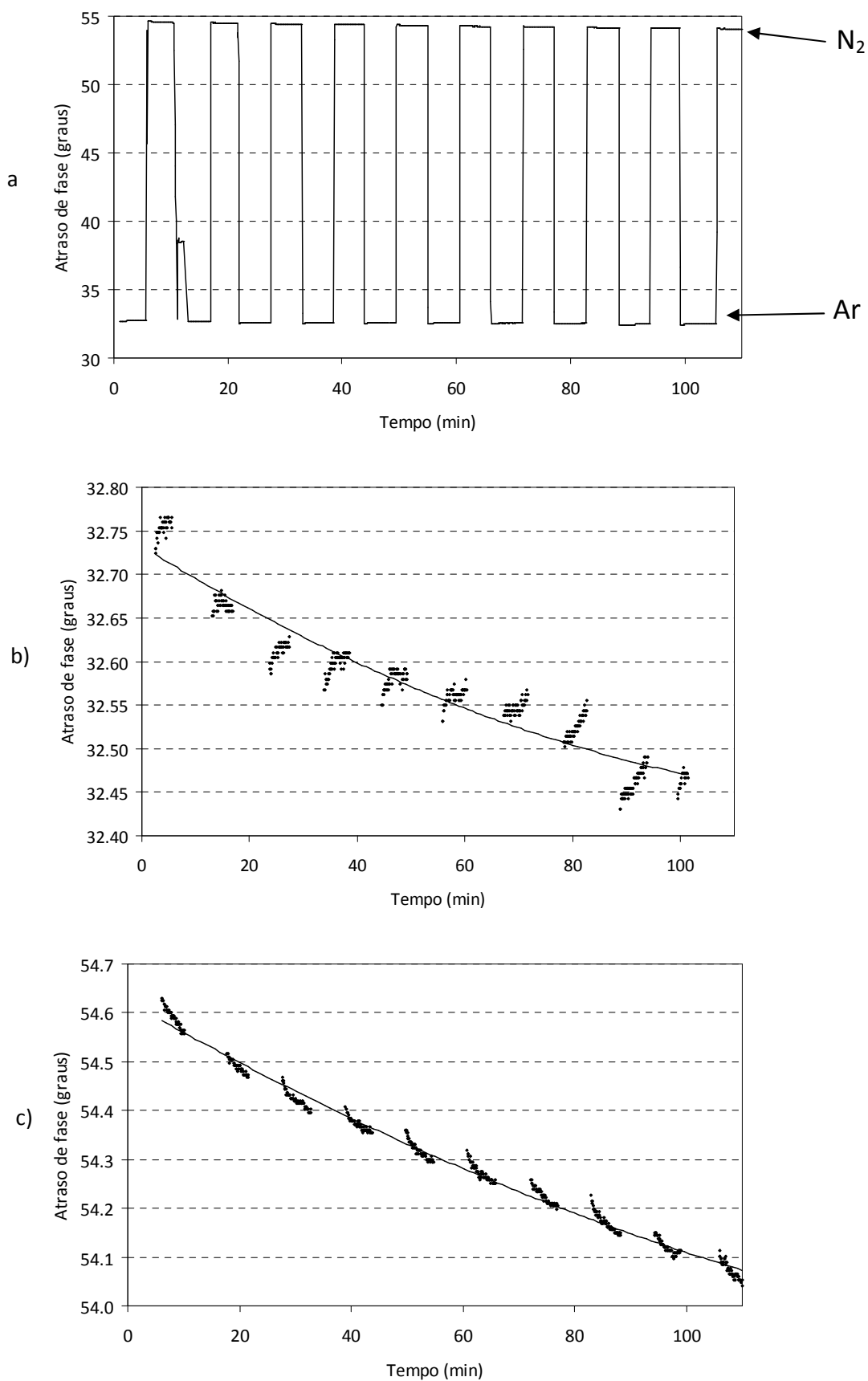


Figura 9.6 – Variação da fase em meio arejado e nitrogenado com o tempo de exposição: a) ciclos ar/ N_2 , b) meio arejado, c) meio nitrogenado.

Se os valores de fase iniciais forem utilizados na calibração de um sensor que obedeça à equação de *Stern-Volmer* (Eq.4.1), ao fim de 110 min de exposição contínua à fonte de radiação serão obtidos os desvios apresentados na Tabela 9.2.

Tabela 9.2 – Desvios nas medições de $[O_2]$ utilizando a equação de *Stern-Volmer* (com base nas fases), após 110 min de exposição contínua à fonte de radiação.

$[O_2]$ real (% v/v)	$[O_2]$ medida (% v/v)	Desvio (% O_2)
0	0.3	+0.3
20.95	21.3	+0.4

9.2.3. CONCLUSÕES

Para aplicações que requerem uma monitorização dos níveis de oxigénio a longo prazo, a medição de oxigénio por técnicas de medição de intensidade com uma exposição contínua do fluoróforo, não constitui uma opção devido ao elevado erro introduzido com a diminuição do sinal. Já no que diz respeito às medições por fluorometria de fase, verificou-se que uma exposição prolongada introduz uma variação dos sinais de fase, resultando em erros na medição da concentração de oxigénio relativamente baixos (0.3% a 0.4%). Embora a utilização da fluorometria de fase em sensores de oxigénio apresente vantagens relativamente às medições de intensidade, terá que ser assegurada uma calibração em intervalos de tempo adequados de forma a manter a exactidão dentro de valores previamente definidos e que deverão ser em função da aplicação pretendida. O projecto de um sensor óptico baseado em fluorometria de fase, deverá ter em consideração que a minimização do tempo de exposição do sensor pelo LED permite aumentar os períodos entre calibrações. Como opção, pode diminuir-se a intensidade de excitação do LED, minimizando assim a fotodegradação, mas neste caso estaremos a comprometer uma boa razão sinal/ruído que por sua vez afecta o erro associado às medições.

9.3. ENSAIOS DE PRECISÃO E LIMITE DE DETECÇÃO

A aplicação da modulação de fase para a medição da concentração de oxigénio resulta na leitura de um valor de fase para cada concentração. Para avaliar a precisão dos valores de fase lidos, um filme sensor foi submetido de forma alternada a meios gasosos de ar e N_2 . De forma a evitar a interferência da fotodegradação do fluoróforo no sinal medido, estes ensaios foram realizados em períodos de tempo relativamente curtos.

Com este estudo foi possível obter uma estimativa da ordem de grandeza da precisão (traduzido no erro de leitura) a partir das várias leituras da concentração de oxigénio. Neste caso, dado que as

medições são efectuadas com valores de concentração de oxigénio conhecidos, o erro determinado constitui também uma medida da exactidão do filme sensor.

O limite de detecção (LOD- *limit of detection*) também é um parâmetro importante na caracterização de sensores. Como tal, foram determinados os limites de detecção de oxigénio gasoso e dissolvido, para o filme testado.

Para a determinação dos parâmetros referidos, foram calculadas médias e desvios padrão associados às medições para concentrações de oxigénio próximas de zero e em meio arejado, quer para o meio aquoso, quer gasoso.

9.3.1. MEIOS E MÉTODOS

Os testes de reprodutibilidade foram realizados com o filme sensor BTEOS:TEOS (1:1) obtido a partir da solução de sol-gel com 95 horas de envelhecimento. A amostra foi introduzida na câmara de suporte das amostras e submetida a ciclos alternados de meios gasosos arejado e nitrogenado e posteriormente a meios aquosos em equilíbrio com atmosferas de ar e nitrogénio.

Estes ensaios foram efectuados em espaços de tempo reduzidos para minimizar o tempo de exposição à radiação de excitação, e desta forma evitar que as medições efectuadas fossem afectadas pela fotodegradação. Dado que em meio gasoso a mudança da concentração é muito rápida, efectuou-se uma exposição contínua da radiação de excitação durante cerca de 12 minutos, ao passo que em meio aquoso, optou-se por desligar o LED durante o período de estabilização da concentração de oxigénio na caixa de amostras.

Durante estes ciclos foram registados os valores da fase resultantes de uma excitação a 45 kHz, correspondentes ao tempo de vida que o fluoróforo apresenta em cada um dos meios. Com os valores médios obtidos em cada ciclo, determinou-se as correspondentes exactidões nas leituras da concentração de oxigénio e o limite de detecção (LOD). Como referência, foram ainda calculados os tempos de resposta de cada um dos sistemas gasoso e aquoso.

9.3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 9.7 são apresentados os valores da fase lidos ao longo de 5 ciclos de alternância do meio gasoso, num tempo de ensaio de cerca de 12 minutos.

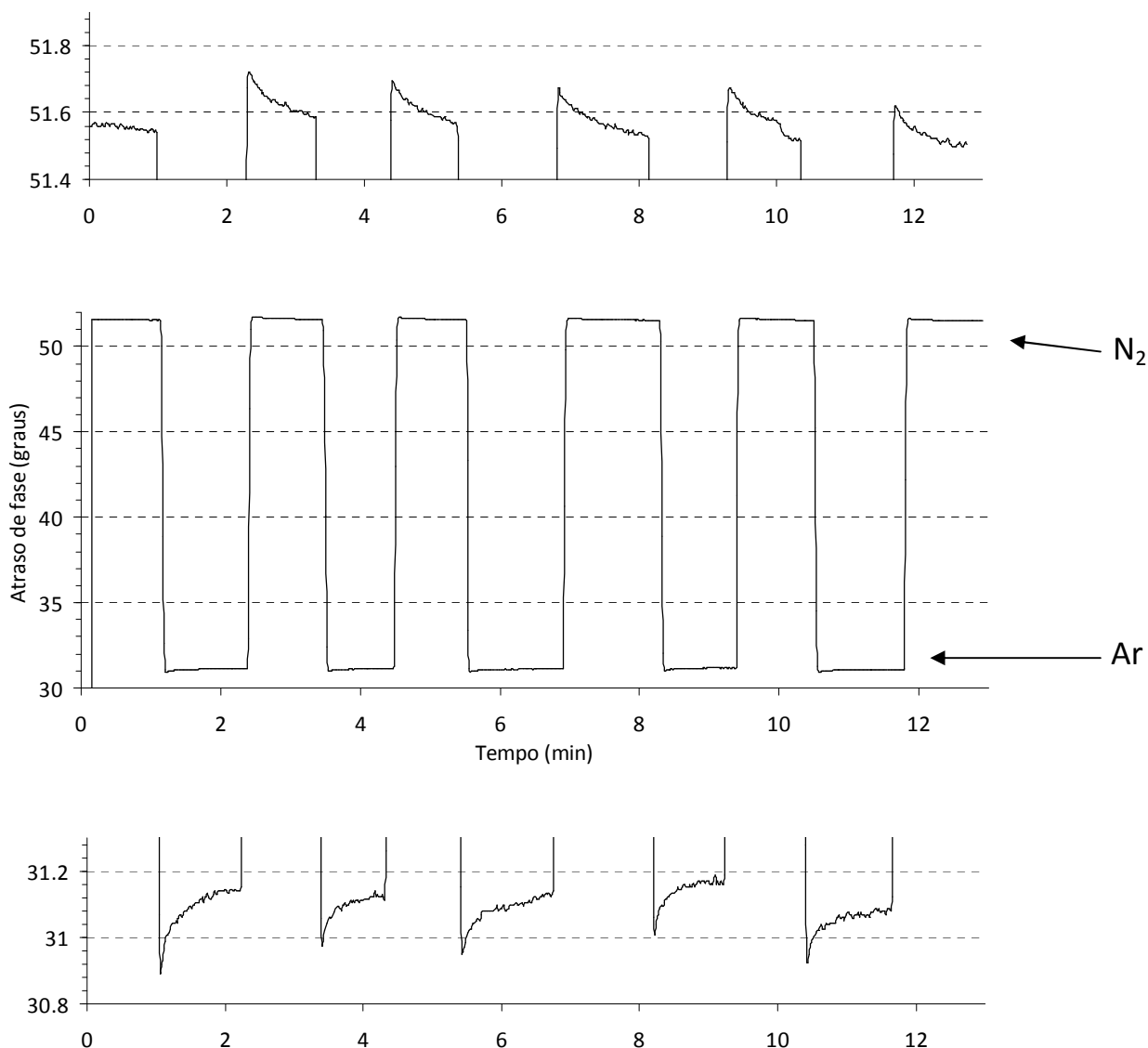


Figura 9.7– Medição da fase em ciclos ar/nitrogénio para o filme BT11D.

Os resultados permitem concluir que existe uma boa repetibilidade dos valores de fase medidos (cerca de 31 graus para meio gasoso arejado e 51 graus para meio nitrogenado). Embora não visível no gráfico devido à escala utilizada, observou-se que o tempo de resposta de 99% da variação de sinal foi de 6 segundos em cada mudança da concentração do meio. Este tempo de resposta é apenas indicativo não correspondendo ao tempo de resposta do filme sensor, pois inclui o tempo de renovação do meio gasoso na caixa de suporte de amostras. Foram calculadas as médias da fase em cada um dos patamares apresentados na Figura 9.7, tendo sido utilizado os valores medidos 30 segundos após o momento da mudança de gás. Esta metodologia resulta do facto de se observar que após a mudança do meio gasoso a fase atinge um valor extremo, após o que sofre uma certa estabilização. O cálculo dos desvios padrões das médias é apresentado na Tabela 9.3.

Tabela 9.3 – Desvio padrão da fase obtido numa sequência de ciclos ar/nitrogénio em meio gasoso.

Ciclos	1	2	3	4	5	Fase média global (graus)	Desvio padrão (graus)
	Média fase (graus)						
M. Arejado	31.129	31.123	31.115	31.164	31.073	31.121	0.029
M. Nitrogenado	51.549	51.602	51.581	51.549	51.548	51.566	0.022

De acordo com a equação de *Stern-Volmer*, pode estabelecer-se uma relação linear da seguinte forma:

$$\tan(\phi_o)/\tan(\phi) = 1 + KSV [O_2] \quad \text{Eq. 4.1}$$

Dada a relação linear, são necessários apenas dois pontos para estabelecer a curva de calibração, sendo esta da seguinte forma:

[O ₂] (% v/v)	$\tan(\phi_o)/\tan(\phi)$
0	1
20.95	2.087

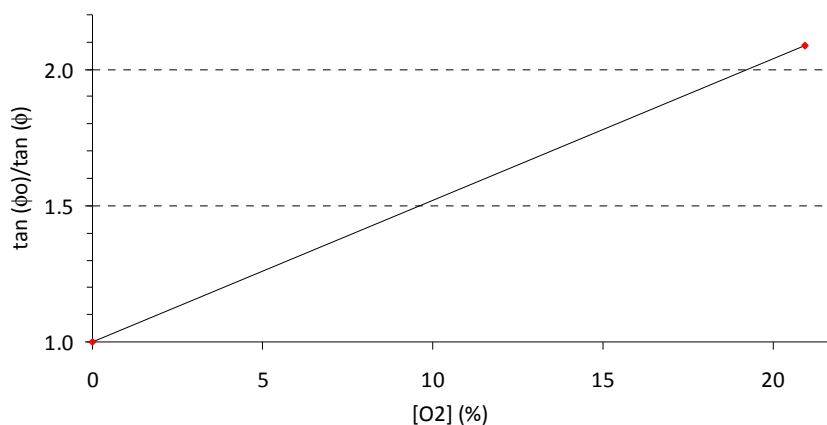


Figura 9.8 – Curva de calibração para meio gasoso do filme BT11D (2 pontos).

O desvio padrão obtido é traduzido num erro na leitura da concentração de 0.0066 % (v/v)¹ e 0.0017 % de oxigénio gasoso, para medições em meio arejado e nitrogenado, respectivamente. Calculando o erro de leitura (exactidão) com base num intervalo de confiança de 95% (correspondente a 1.96 vezes o desvio padrão), obtemos os valores de 0.0129% e 0.0033% de O₂, respectivamente. Considerando que o limite de detecção [127] corresponde a três vezes o desvio padrão das leituras para uma amostra sem oxigénio, estimou-se um valor mínimo de 0.0051% de oxigénio para a sua detecção.

¹ Todas as concentrações de oxigénio para o meio gasoso consideradas nesta tese são em % volumétrica. No caso de gases ideais, a fracção volumétrica é igual à fracção molar. Embora o ar atmosférico não seja um gás ideal, este tem um comportamento o suficientemente próximo de um gás ideal para que as fracções referidas sejam consideradas iguais.

Estes ensaios foram repetidos em meio aquoso, com alternância do meio em equilíbrio com ar e nitrogénio. Neste caso, a estabilização é mais prolongada relativamente ao meio gasoso devido ao caudal de alimentação da câmara de suporte de amostras ser mais baixo, mas também devido à maior viscosidade do líquido, o que origina uma renovação mais lenta do fluido junto à zona de medição. A Figura 9.9 corresponde à medição do atraso de fase em meio aquoso arejado, seguindo-se um ciclo completo de alteração do meio aquoso arejado para nitrogenado e de novo para arejado.

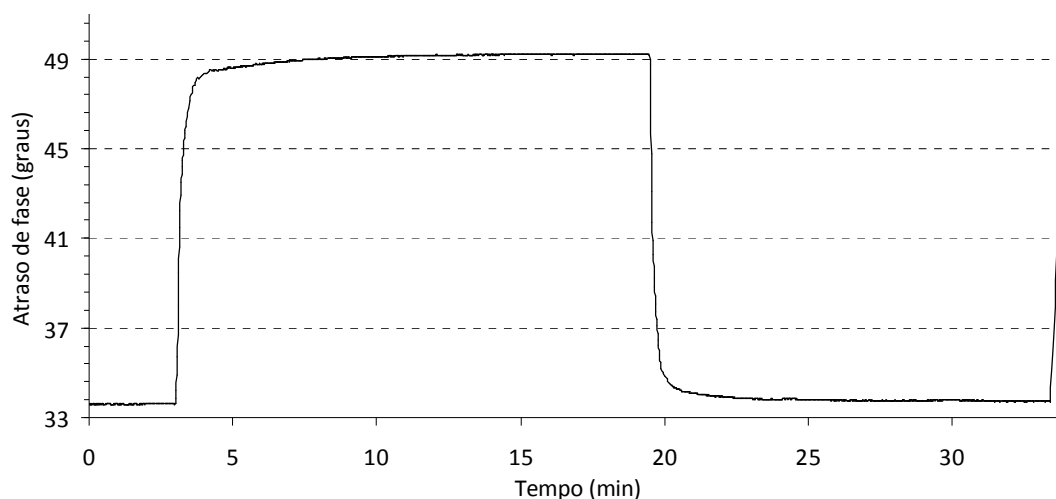


Figura 9.9 – Atraso de fase lido para o filme BT11D, durante um ciclo de mudança da concentração de oxigénio do meio aquoso .

Foi calculado o tempo de resposta do sistema para 95% e 99% da variação total do sinal e foram obtidos os valores de 0.68 e 5.08 minutos para a estabilização em meio aquoso nitrogenado, e 0.63 e 2.52 minutos para a estabilização em meio aquoso arejado. Estes resultados mostram que o tempo de estabelecimento do equilíbrio quando se introduz um analito (neste caso o oxigénio) em meio aquoso é mais baixo do que quando se pretende remover o analito desse meio. Resultados similares foram apresentados por A. Mils [128, 129].

Foram realizadas leituras da fase do filme sensor, quando submetido a um conjunto de ciclos seguidos com períodos de estabilização de 15 minutos após a mudança do meio aquoso (arejado ou nitrogenado) alimentado à câmara de suporte. A Figura 9.10 apresenta apenas os valores lidos após cada estabilização. Isto significa que cada variação brusca de fase entre os cerca de 33 e 49 graus apresentada na figura é antecedida de 15 minutos de estabilização do meio dentro da câmara. Como tal, o tempo apresentado não corresponde ao tempo de ensaio, mas antes, ao tempo de exposição do filme à radiação.

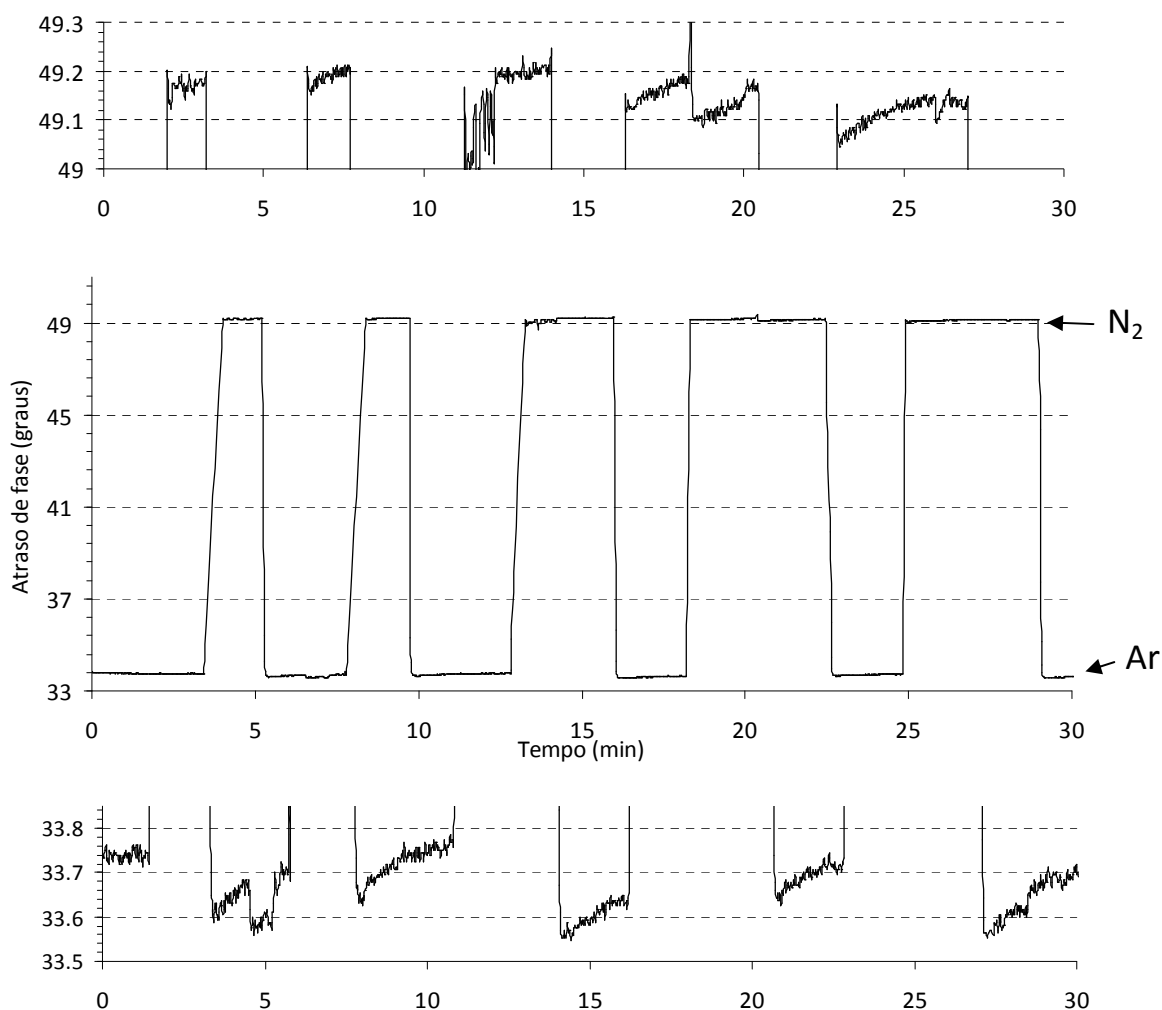


Figura 9.10 – Medição da fase em ciclos alternados de meio aquoso arejado e nitrogenado para o filme BT11 (95h).

De forma análoga ao ensaio em meio gasoso, foram calculadas as médias da fase em cada um dos patamares apresentados na Figura 9.10, assim como o cálculo do desvio padrão das médias dos ciclos (Tabela 9.4).

Tabela 9.4 – Desvio padrão da fase obtido numa sequência de ciclos ar/nitrogénio em meio aquoso.

Ciclos	1	2	3	4	5	Fase média global (graus)	Desvio padrão (graus)
	Média fase (graus)						
M. Arejado	33.638	33.722	33.603	34.692	33.646	33.660	0.047
M. Nitrogenado	49.168	49.187	49.149	49.144	49.116	49.153	0.027

De acordo com o Anexo A, a concentração do oxigénio em meio aquoso em equilíbrio com o ar a 24°C (temperatura dos ensaios) e à pressão atmosférica, é de 8.4 mg/L. Deste modo, e de acordo com a equação 4.1, é obtida a seguinte relação linear:

[O ₂] (mg/L)	tan (φ _o)/tan (φ)
0	1
8.4	1.737

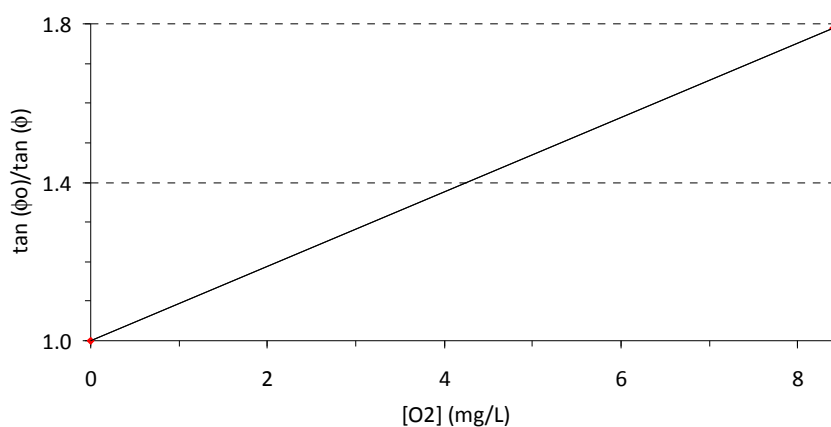


Figura 9.11 – Curva de calibração para meio aquoso do filme BT11D (2 pontos).

Os desvios padrões obtidos para as medições em meio aquoso traduzem-se em erros de medição da concentração de oxigénio dissolvido (para um intervalo de confiança de 95%) de ± 0.073 mg/L e ± 0.017 mg/L, para meio arejado e nitrogenado, respectivamente. Neste caso o limite de detecção é de 0.027 mg/L.

9.3.3. CONCLUSÕES

Os erros absolutos (95% confiança) determinados para os ensaios em meio gasoso arejado e nitrogenado foram de $\pm 0.0129\%$ e $\pm 0.0033\%$, respectivamente. Para comparação destes valores, foram pesquisadas as características de alguns sensores de oxigénio comerciais, e encontraram-se produtos baseados em fluorometria de fase [130] e sensores galvânicos [131] com um erro mais elevado que o obtido para o filme testado, na ordem dos $\pm 0.2\%$ de O₂. No entanto, existem também sensores específicos para medição de baixas concentrações [132] e que apresentam erros inferiores, na ordem dos $\pm 0.0005\%$ de O₂.

Nos ensaios em meio aquoso, o erro calculado foi de ± 0.073 mg/L e ± 0.017 mg/L de oxigénio dissolvido em meio aquoso arejado e nitrogenado, respectivamente. A *Mettler* apresenta na sua gama de produtos sensores de oxigénio dissolvido com um erro de 1% + 0.1 ppbm do valor medido, para um sensor amperométrico, e 1% + 2 ppbm para um sensor óptico [132]. Estes sensores, apresentam um erro inferior para concentrações baixas, mas para soluções arejadas apresentam um erro mais elevado de ± 0.085 mg/L e ± 0.086 mg/L, respectivamente. Outros sensores comerciais apresentam erros de leitura mais baixos, como alguns polarográficos com valores na ordem de

0.2 mg/L [133]. Sensores ópticos desenvolvidos recentemente e referidos como de 2ª geração (baseados na fluorimetria de fase) apresentam erros mínimos de 0.1 mg/L, cerca de 3 vezes superior ao valor máximo obtido nestes ensaios [130, 134].

Os erros determinados nestas medições foram apresentados anteriormente em valor absoluto. Para comparação dos erros de leitura entre os dois meios é útil a determinação dos erros relativos (em % do valor medido). Os erros relativos obtidos em meio arejado gasoso e aquoso são respectivamente, de $\pm 0.03\%$ e $\pm 0.44\%$ do valor medido, verificando-se que o erro em meio aquoso é cerca de 14 vezes mais elevado. Esta diferença pode ser explicada em parte, devido à maior diferença entre o índice de refração ar/vidro, em relação diferença dos meios água/vidro. Conforme demonstrado na Figura 8.16, o ângulo supercrítico da interface ar/vidro é superior à água/vidro, provocando um maior “aprisionamento” da radiação fluorescente que é emitida em direcção ao substrato de vidro, no primeiro caso. Conforme também referido, as extremidades da lâmina são zonas preferenciais para a saída dessa radiação, pois a radiação que se propaga ao longo da lâmina, encontra nas extremidades ângulos de ataque inferiores ao supercrítico. Uma vez que a lâmina está posicionada de forma a otimizar a captação dessa radiação, verifica-se que em meio gasoso existe um aumento do sinal fluorescente captado. A menor intensidade do sinal de fluorescência captado em meio aquoso resulta numa diminuição do SNR, causando uma maior influência do ruído nas leituras, logo uma menor exactidão na leitura de valores.

Relativamente aos limites de detecção calculados, estes foram de 0.0051% de O₂ em meio gasoso e 0.027 mg/L (27 ppbm) de oxigénio dissolvido. Estes valores são mais favoráveis do que outros sensores ópticos de oxigénio baseados em intensidade e que apresentaram valores de limite de detecção de 0.62% de O₂ em meio gasoso e 300 ppbm em meio aquoso [73]. Outro esquema sensorial baseado em intensidade fosforescente apresenta um LOD para meio gasoso de 0.09% de O₂ [135]. Os sensores da *Mettler* referidos anteriormente, são específicos para medições de valores de oxigénio dissolvido muito baixos e apresentam valores de LOD de 0.1 ppbm.

Os resultados obtidos com o filme sensor desenvolvido são promissores, pois apresentam valores de exactidão e LOD mais favoráveis do que alguns dos sistemas sensoriais comerciais e desenvolvidos por diversos autores.

9.4. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS FILMES

Este capítulo inclui uma avaliação da sensibilidade dos filmes produzidos e que constam na Tabela 7.2, excepto a composição BT31, pelo facto de estes filmes terem sofrido degradação após a sua preparação.

O parâmetro de sensibilidade considerado nesta avaliação foi a supressão que os filmes apresentam entre o meio gasoso arejado e nitrogenado, e ainda entre o meio aquoso em equilíbrio com uma atmosfera de ar e nitrogénio.

Foi estudada a influência do tempo de envelhecimento da solução, da natureza dos precursores *ormosils* e a sua proporção na mistura com o TEOS, no parâmetro de sensibilidade referido. Desta forma, foi possível identificar as combinações de precursores mais promissoras para a construção de um sensor de oxigénio. De acordo com alguns autores [64], o tempo de envelhecimento desempenha um papel importante na porosidade da estrutura de sol-gel e conseqüentemente na sensibilidade. Neste estudo, foi também avaliado se o tempo de envelhecimento afecta de igual forma a sensibilidade de todas as composições.

A utilização de diferentes precursores na preparação dos filmes de sol-gel, altera não só a composição e a estrutura da matriz, mas também confere graus de hidrofobicidade diferentes o que pode ser determinante em medições em meio aquoso [101, 131].

Os resultados obtidos neste estudo foram importantes para a escolha dos filmes que sofreram uma caracterização posterior mais rigorosa, numa gama de concentração de oxigénio de 0 a 100% quer em meio gasoso, quer em meio aquoso em equilíbrio com a fase gasosa com estas concentrações.

9.4.1. MEIOS E MÉTODOS

A supressão foi determinada através da utilização da equação 4.4. Para esse cálculo é necessário medir previamente os tempos de vida de fluorescência dos filmes sensores na ausência de oxigénio e em meio arejado. Os tempos de vida foram determinados utilizando a montagem experimental apresentada na Figura 8.1b, que utiliza a fluorometria de fase. Para cada filme, foi realizado um varrimento de frequências de 10 a 50 kHz com a medição das respectivas fases. Utilizando a equação 2.18, que estabelece uma relação linear entre as tangentes das fases e a frequência, foi possível obter o tempo de vida através de uma regressão linear aos pontos e determinação do declive.

Previamente à realização destes ensaios, foi medido o atraso de fase correspondente ao tempo de resposta dos componentes electrónicos do sistema, para cada valor de frequência imposto. Conforme referido na secção 8.5, estes valores foram subtraídos aos atrasos de fase medidos com os filmes sensores.

9.4.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

Conforme referido anteriormente, o cálculo do tempo de vida é obtido após a linearização dos valores do atraso de fase em função da frequência de excitação do filme sensor. Como exemplo de

cálculo, a Figura 9.12 apresenta na forma gráfica os valores da fase medidos em meio aquoso para a lâmina BT11A.

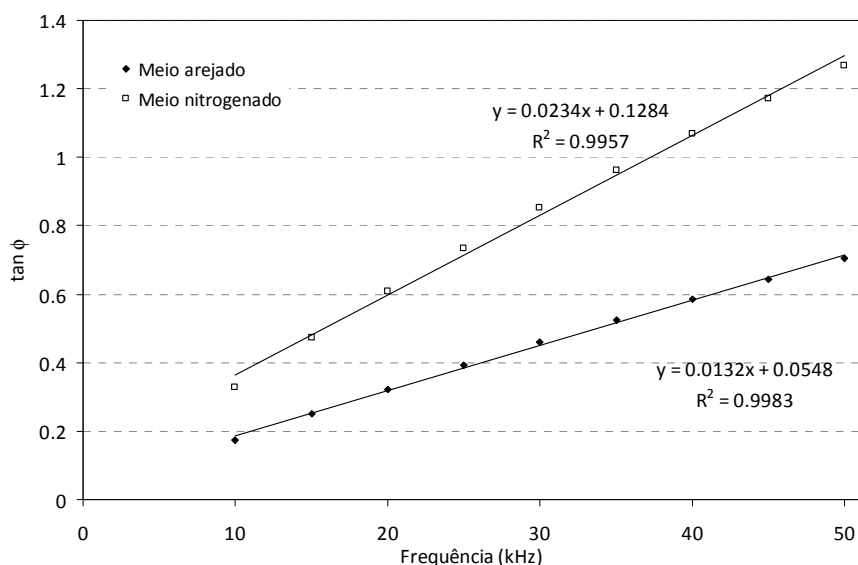


Figura 9.12 – Relação linear entre a $\tan(\phi)$ e a frequência.

De acordo com a equação 2.18, os declives resultantes da regressão linear das curvas correspondem a $2\pi\tau$, pelo que os tempos de vida calculados são de:

$$\left. \begin{array}{l} \tau_{N_2} = 3.72 \mu s \\ \tau_{AR} = 2.10 \mu s \end{array} \right\} \Delta\tau = 1.62 \mu s$$

Para este filme sensor, a supressão é determinado pela equação 4.4:

$$S = (\tau_o - \tau) / \tau_o = (3.72 - 2.10) / 3.72 = 0.435 \rightarrow 43.5\%$$

O mesmo tratamento foi realizado a todas os filmes testados, estando os resultados apresentados no Anexo B. Nas figuras 9.13 a 9.14, pode observar-se a variação da supressão em meio gasoso e aquoso em função do tempo de envelhecimento da solução precursora que deu origem aos filmes.

Os resultados obtidos permitem concluir que, de forma generalizada, existe um aumento dos valores da supressão com o tempo de envelhecimento, sendo esse aumento mais pronunciado em determinadas composições. Isto significa que, na produção de filmes sensores de oxigénio é possível aumentar a sensibilidade do filme através de um prolongamento do tempo de envelhecimento da solução. Para cada composição, os filmes com os tempos de envelhecimento mais elevados são alvo de uma caracterização mais detalhada no subcapítulo seguinte. Estes filmes foram obtidos com tempos de reacção da solução de precursores muito próximos do tempo de gelificação. Ainda foram produzidos filmes com tempos mais elevados, no entanto, estes apresentavam uma qualidade óptica, adesão e homogeneidade insatisfatórias pelo que não foram considerados neste estudo. A

má qualidade dos filmes produzidos com um tempo de envelhecimento perto do ponto de gelificação é confirmada por estudos conduzidos por C.McDonagh [64].

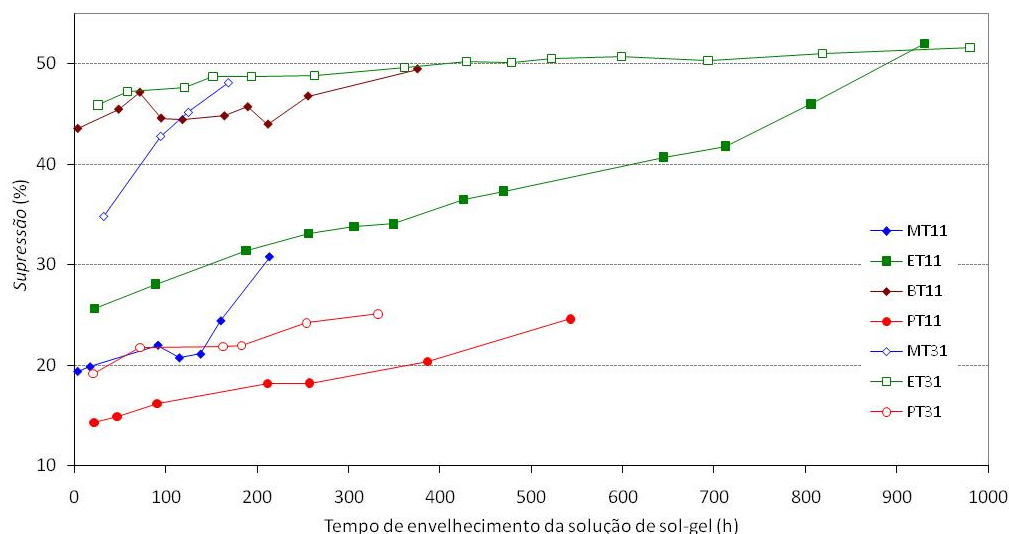


Figura 9.13 – Valores da supressão obtidos em meio aquoso arejado e nitrogenado para filmes com diferentes tempos de envelhecimento.

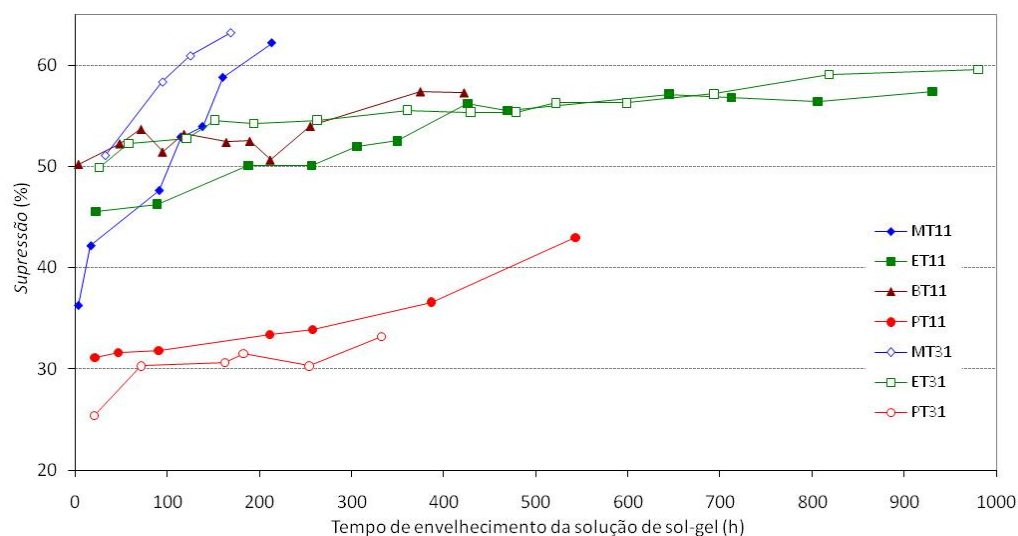


Figura 9.14 – Valores da supressão obtidos em meio gasoso arejado e nitrogenado para filmes com diferentes tempos de envelhecimento.

O tempo de envelhecimento do último filme produzido em cada composição é naturalmente diferente, uma vez que a cinética de reacção de cada solução também é diferente. Dos filmes produzidos, destacam-se os da família MTEOS:TEOS que apresentam um tempo de gelificação mais curto, e no lado oposto, temos a composição ETEOS:TEOS com tempos de gelificação mais longos.

O aumento percentual da supressão entre o primeiro e último filme produzido em cada composição, pode ser observado na Tabela 9.5, o que permite tirar algumas conclusões. O aumento da sensibilidade é mais significativo para as famílias ETEOS:TEOS (1:1) em medições no meio aquoso e MTEOS:TEOS (1:1) em medições no meio gasoso. A composição BTEOS:TEOS (1:1) apresenta a menor variação percentual da supressão nos dois meios.

Observa-se que, regra geral, a supressão sofre uma maior variação percentual entre os primeiros e últimos filmes produzidos, quando a composição da solução é de 1:1 (*ormosil*:TEOS). Pode concluir-se que nestes últimos filmes, o prolongamento do envelhecimento da solução tem um efeito maior no aumento da sensibilidade dos mesmos.

Tabela 9.5 – Aumento percentual da supressão entre os filmes com menor e maior tempo de envelhecimento.

		MTEOS : TEOS		ETEOS : TEOS		BTEOS : TEOS		PTEOS : TEOS	
		1:1	3:1	1:1	3:1	1:1	1:1	3:1	
Aumento	Meio aquoso	61	38	102	12	11	72	31	
Supressão	Meio gasoso	71	24	31	19	14	38	31	

Quando se comparam os valores da supressão (figuras 9.13 e 9.14) obtidos para as diferentes composições, os filmes os que apresentam sensibilidade mais elevada são os da família ET31 nas medições em meio aquoso e a família MT31 nas medições em meio gasoso.

A comparação entre a sensibilidade exibida pelo mesmo filme quando submetido a meio aquoso e gasoso, revela que sem excepção, os valores são sempre superiores no meio gasoso. Estes resultados eram esperados, dado que na medição em meio aquoso, uma fracção do volume dos poros de cada filme está parcialmente preenchida pelo meio aquoso, sendo a concentração de oxigénio neste meio inferior à existente em meio gasoso, logo a sensibilidade será menor.

A comparação dos resultados obtidos em meio aquoso para as composições que utilizam os mesmos precursores, mas com proporções diferentes (1:1 e 3:1), revela que o aumento da quantidade relativa do *ormosil* na composição do filme tem um efeito positivo na sensibilidade do mesmo. Estes resultados eram esperados, pois o aumento da proporção do *ormosil* confere uma maior hidrofobicidade ao filme. Daqui resulta, uma menor solubilidade da água no filme, logo uma menor fracção da fase líquida dentro dos poros do filme, com conseqüente aumento do número de moléculas de oxigénio que colidem com o fluoróforo [109]. Dado que a sensibilidade dos filmes BT11 é superior a todos os outros com a mesma proporção *ormosil*:TEOS de 1:1, estes resultados sugerem que se os filmes BT31 tivessem apresentado qualidade suficiente, provavelmente também apresentariam a maior sensibilidade nessa proporção. É de notar também que essa diferença é tanto maior quanto menor for o envelhecimento do filme. Porque as proporções 1:1 sofrem um aumento

mais acentuado da sensibilidade, essa diferença é atenuada quando comparamos os últimos filmes produzidos de cada composição. Por exemplo, para a família ETEOS:TEOS testada em meio aquoso, a supressão medida para os primeiros filmes produzidos são de 25.7% e 45.9%, para as razões 1:1 e 3:1, respectivamente, enquanto que para os últimos filmes produzidos são de 52.0% e 51.6%. Esta tendência verifica-se igualmente para a família PTEOS:TEOS, sendo menos evidente na família MTEOS:TEOS.

Quanto ao meio gasoso, não é esclarecedor se o aumento da hidrofobicidade do filme poderá ser um factor que provoque o aumento da sensibilidade, pois na família PTEOS:TEOS a razão 1:1 apresenta valores sempre mais elevados da supressão, apesar de os estudos anteriores terem indicado que a razão 3:1 é mais hidrofóbica.

Nos testes realizados em laboratório foi utilizado ar desumidificado, no entanto é de crer que em medições de meios gasosos em que possa existir algum grau de humidade, a hidrofobicidade seja um factor importante. Esta questão embora não tenha sido amplamente investigada, foi verificada através da medição da supressão das lâminas BT11E (95 h) e PT11A (22h) em meio gasoso arejado com ar desumidificado e ar atmosférico. Foram escolhidas estas duas lâminas, por terem apresentado valores dos ângulos de contacto muito afastados, o que evidencia o diferente grau de hidrofobicidade destes filmes.

O filme BT11E apresentou valores de supressão de 51,5% e 45.7% em ar desumidificado e ar atmosférico, respectivamente, o que representa uma diminuição percentual da supressão de 11% em relação ao valor inicial. De forma análoga, mediu-se a supressão do filme PT11A, nas mesmas condições, tendo sido obtidos valores de 31.1% e 23.5%, significando que a humidade atmosférica provoca uma redução relativa da supressão de 24%. A humidade atmosférica não foi medida localmente pelo que estes resultados apenas são válidos para a comparação entre estes dois filmes, uma vez que as medições da supressão foram efectuadas nas mesmas condições. Conclui-se daqui, que o filme menos hidrofóbico, o PT11A, é mais afectado pela humidade relativa do ar.

9.4.3. CONCLUSÕES

O tempo de envelhecimento da solução de sol-gel é um parâmetro que influencia positivamente a sensibilidade dos filmes de todas as composições testadas, quer em meio aquoso, quer em meio gasoso. Isto deve-se a uma maior difusão do oxigénio, em resultado de uma maior porosidade, quando se aumenta o tempo de envelhecimento [64].

Desta forma, deverão ser preparados filmes com elevados tempos de envelhecimento na construção de sensores de oxigénio. Filmes com tempos de envelhecimento demasiado próximos do tempo de

gelificação resultam em membranas com adesão pobre, fissuração e má qualidade óptica, pelo que deverá haver algum cuidado na escolha do tempo de envelhecimento em cada composição.

Observou-se que para a medição de oxigénio em meio aquoso, os filmes com maior proporção de *ormosil* apresentam sensibilidades mais elevadas, como resultado da maior hidrofobicidade revelada por estes filmes. Os filmes preparados a partir de precursores mais hidrófobos apresentam ainda a vantagem de sofrerem uma menor redução da sua sensibilidade quando são testados em meios gasosos não desumidificados.

Comparando as diferentes composições, conclui-se que para meio aquoso, a composição ET31 apresenta os melhores valores da supressão. No entanto, a supressão dos últimos filmes produzidos das composições ET11, ET31, MT31 e BT11, apresentam valores muito próximos. Em meio gasoso, os filmes com tempo de envelhecimento mais elevado das composições MT11 e MT31, foram os que apresentaram maior sensibilidade.

Como resultado deste estudo, foi seleccionado um filme de sensibilidade elevada por cada composição, para uma caracterização mais detalhada, e que será apresentada no subcapítulo seguinte.

9.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE *STERN-VOLMER*

Do estudo anterior resultou a selecção de um conjunto de amostras, uma por composição. Os filmes escolhidos foram, regra geral, os que apresentaram uma maior sensibilidade em cada composição e que corresponderam aos de tempo de envelhecimento mais elevados. Estes foram submetidos a ensaios para a determinação da linearidade das curvas de calibração numa gama de 0% a 100% de O₂, assim como a determinação das constantes K_{SV}.

A determinação da constante K_{SV} foi efectuada através da medição da fase de um conjunto de 19 pontos ao longo da gama de concentrações, o que permitiu concluir com maior rigor sobre a sensibilidade dos filmes. Os tempos de envelhecimento dos filmes testados podem ser consultados na Tabela 9.6. As medições foram realizados em meio aquoso e gasoso.

Tabela 9.6 – Tempos de envelhecimento das amostras testadas.

Precursores	Razão	Tempo envelhecimento
ETEOS+TEOS	1:1	931
BTEOS+TEOS	1:1	375
PTEOS+TEOS	1:1	545
MTEOS+TEOS	3:1	169
ETEOS+TEOS	3:1	819
PTEOS+TEOS	3:1	254

9.5.1. MEIOS E MÉTODOS

Estes ensaios foram realizados numa montagem experimental para medições em meio aquoso similar à apresentada na Figura 8.1b, mas com pequenas alterações. Os dois recipientes onde borbulhavam ar e nitrogénio na configuração anterior, foram substituídos por um único vaso de 2L (habitualmente utilizado como fermentador) onde o nitrogénio, ar e oxigénio são borbulhados em água destilada, com caudais individuais definidos de forma a estabelecer um meio de concentração de oxigénio conhecida. O caudal total de borbulhamento foi de 500 mL/min. Dado que o vaso está equipado com agitador, foi aplicada uma agitação de 500 rpm para mais rápida homogeneização do meio. Os filmes foram ensaiados utilizando meios em equilíbrio com o gás borbulhado, numa gama de concentrações de 0% a 100% de oxigénio. O equipamento estava equipado com um sensor de oxigénio polarográfico que permitiu o controlo da concentração de oxigénio. Todos os ensaios foram realizados a uma temperatura controlada de 30°C. A disposição do equipamento utilizado pode ser analisado na Figura 9.15.



Figura 9.15 – Disposição do equipamento e instrumentação utilizados na determinação dos parâmetros de Stern-Volmer.: A- vaso com água; B- caixa de suporte de amostras; C- bomba peristáltica; D- dispositivo para remoção de bolhas; E- agitador; F- LED; G- fotodetector; H-Lock-in; I- Fonte de alimentação do LED; J- Gerador de funções; M-Controlador de caudais de gases de borbulhamento e temperatura; N- Visualização para registo de resultados.

Devido à agitação e borbulhamento no vaso, verificou-se a entrada de bolhas de pequena dimensão na caixa de suporte das amostras, formando uma fase gasosa. A existência dessa fase gasosa é indesejável, pois esta faz aumentar os tempos de estabilização da concentração do meio aquoso dentro da caixa, sempre que ocorre uma alteração da composição do gás que é borbulhado no vaso. Para eliminar este problema foi construído um dispositivo que impediu a entrada dessas bolhas na caixa de suporte de amostras (Figura 9.16).

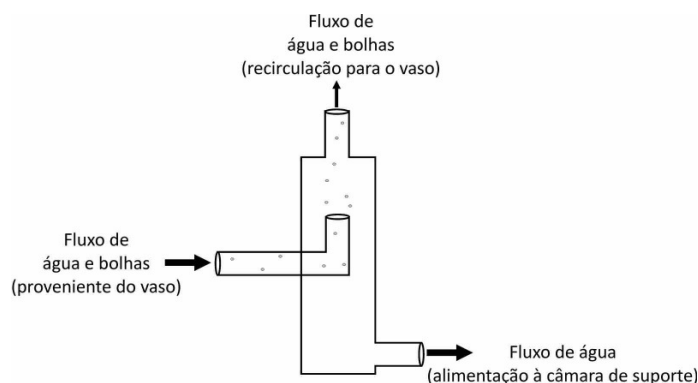


Figura 9.16 – Remoção de bolhas de ar no fluxo de água que entra na caixa de suporte de amostras.

Foram realizados ensaios preliminares, de forma a estabelecer o tempo necessário para o equilíbrio após a mudança de concentração do gás borbulhado. Estes ensaios conduziram à definição do seguinte protocolo:

Início do ensaio

- Ar (1 minuto)
- O₂ puro (80 minutos)
- N₂ puro (60 minutos)
- Ar com 2.1% de O₂ (28 minutos)
- Ar com 4.2 % de O₂ (28 minutos)
- Variação de 2.1% de O₂ até os 21% de O₂ (ou 100% Ar; a cada intervalo de 28 min.)
- Ar com 31.5% de O₂ (28 minutos)
- Ar com 42.0% de O₂ (28 minutos)
- Ar com 52,5% de O₂ (28 minutos)
- Ar com 63.0% de O₂ (28 minutos)
- Ar com 73.5% de O₂ (28 minutos)
- Ar com 84.0% de O₂ (28 minutos)
- Ar com 94.5% de O₂ (28 minutos)
- O₂ puro (28 minutos)
- Ar (tempo indefinido)

Fim do ensaio

Este protocolo foi programado no sistema de controlo da unidade piloto do IBET para a alimentação do gás de borbulhamento no vaso fermentador, onde foi montado o sistema para medição de oxigénio.

Antes do início do ensaio de cada filme, foi realizado um varrimento de frequências com medição da fase correspondente ao atraso de fase da componente electrónica. Ainda antes do início do ensaio, é realizado a medição das fases para determinação do tempo de vida em meio aquoso arejado, para uma gama de frequências de 5 a 85 kHz (com um intervalo de 5 kHz).

Após o início do protocolo, os caudais de alimentação ao vaso vão sendo regulados automaticamente para cada uma das composições definidas, havendo um registo contínuo da fase com o tempo, com uma taxa de amostragem de 1 medição a cada 10 segundos.

Logo após o início do ensaio, quando o meio é estabilizado em meio aquoso com borbulhamento de oxigénio e a seguir de nitrogénio, foram efectuados varrimentos de frequências para cada um dos meios, na mesma gama de frequências referida anteriormente. Estes dados serviram para o cálculo dos tempos de vida e da supressão. Após o varrimento de frequências em meio aquoso nitrogenado, a frequência foi regulada para um valor óptimo, para a determinação do atraso de fase das restantes concentrações. A frequência óptima do ensaio de cada um dos filmes testados foi determinada no estudo anterior e corresponde à maior diferença de fase em meios aquosos em equilíbrio com o nitrogénio e o ar.

Os ensaios foram repetidos para meio gasoso, em que os gases puros ou em mistura, foram alimentados directamente à câmara de suporte de amostras. Dado que os tempos de estabilização da concentração de oxigénio são mais reduzidos, os tempos de espera do protocolo anterior foram redefinidos em 8 minutos para a alimentação inicial de O₂ e N₂, e 70 segundos para as restantes concentrações. Para cada composição, foram lidos os atrasos de fase num varrimento da frequência de 10 kHz a 40 kHz ($\Delta f = 10\text{kHz}$). Nestes ensaios, a taxa de amostragem foi de 1 medição/segundo.

9.5.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Na Figura 9.17, pode ser observado o perfil completo de medições da fase para o filme BT11J em meio aquoso, após início do protocolo atrás descrito.

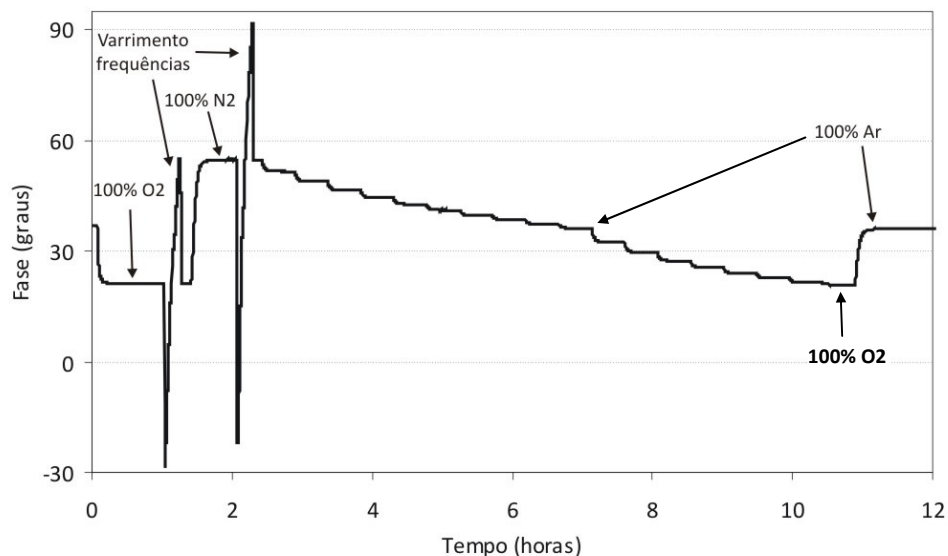


Figura 9.17 – Medições de fase efectuadas a diferentes concentrações para a lâmina BT11J.

Para a determinação do atraso da fase devido exclusivamente à fluorescência do filme, foi necessário subtrair à fase medida o atraso de fase corresponde à componente electrónica. Como exemplo dessa correcção, pode observar-se na Figura 9.18 as representações das fases medidas, as correspondentes à componente electrónica e as corrigidas, obtidas para a lâmina BT11J, em meio nitrogenado.

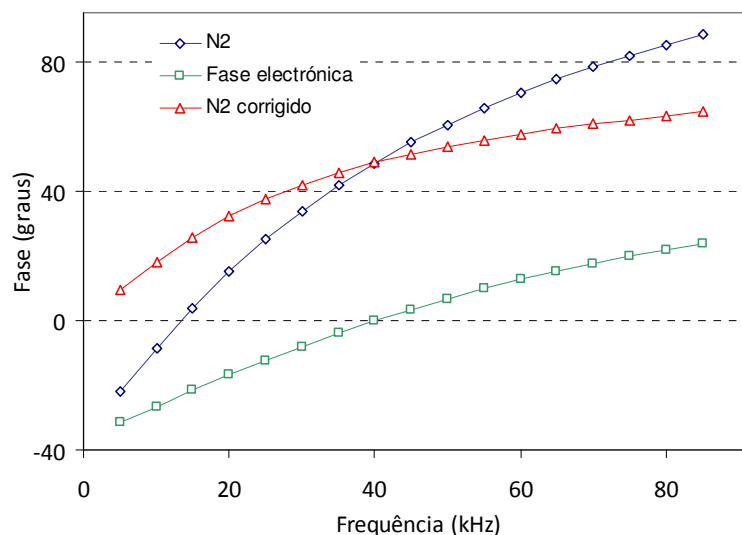


Figura 9.18 – Fases medidas para a componente electrónica e meio aquoso nitrogenado, para o filme BT11J.

A comparação das curvas das fases em função da frequência (Figura 9.19) obtidas para os meios aquosos oxigenado, arejado e nitrogenado, permite a determinação da frequência óptima a implementar nas medições, e que corresponde à diferença máxima entre as fases.

Na Figura 9.20, pode ser observada a diferença de fase entre os meios referidos em função da frequência. Para medições de concentração de oxigénio numa gama entre o meio desoxigenado e arejado, a frequência óptima é de 45 kHz. Na gama de concentrações entre o meio arejado e o meio oxigenado, a frequência óptima está acima da máxima utilizada neste estudo (85 kHz). Se o filme sensor for utilizado em meios cuja concentração de oxigénio percorre toda a gama possível valores, a frequência óptima também estará acima dos 85 kHz, no entanto poder-se-á considerar frequências a partir dos 60 kHz, pois a diferença de fase não sofre grandes variações até aos 85 kHz (< 2 graus).

As frequências utilizadas para a determinação da curva de Stern-Volmer de cada filme (Tabela 9.8) foram as que corresponderam a uma maior diferença de fase na gama de concentrações de oxigénio entre o meio desoxigenado e arejado.

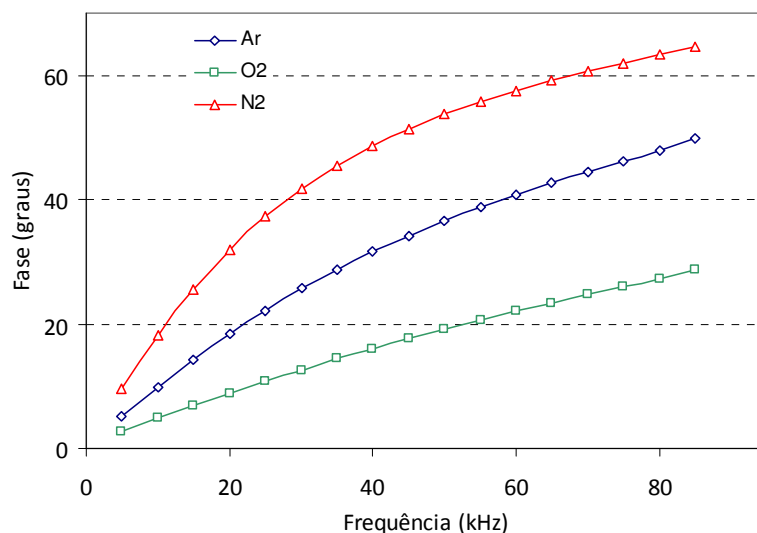


Figura 9.19 – Variação da fase com a frequência (filme BT11J).

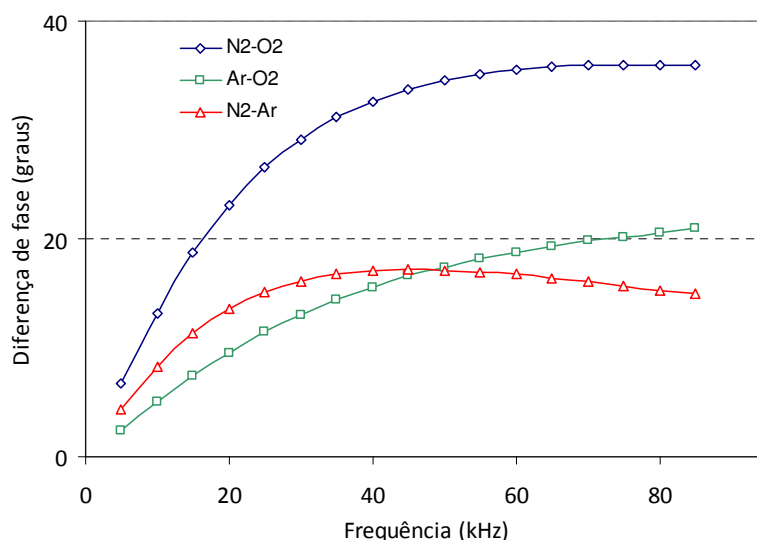


Figura 9.20 – Diferença de fase entre os meios aquosos nitrogenados, arejado e oxigenado, para diferentes frequências de modulação (filme BT11J).

De acordo com a equação 2.18, a determinação do tempo de vida pode ser obtida a partir do declive da relação linear apresentada. Na Figura 9.21, estão representadas as curvas que permitem a determinação dos tempos de vida em meio aquoso nitrogenado, arejado e oxigenado, para o filme sensor referido anteriormente.

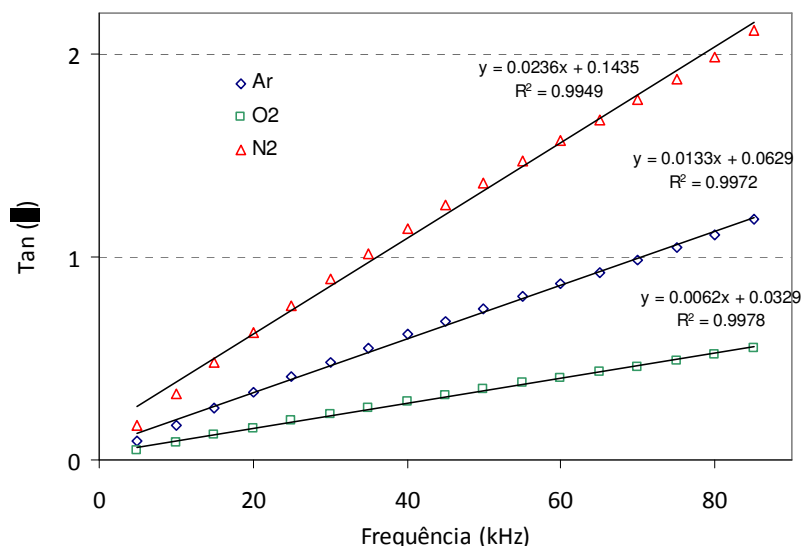


Figura 9.21 – Tangente da fase (ϕ) em função da frequência de modulação, para o filme BT111.

Apesar da representação gráfica confirmar a existência de uma boa linearidade ($r^2 > 0.99$), pode observar-se que com o aumento da frequência o desvio à linearidade é mais acentuado. I. Ogurtsov [136] refere que com aumento da frequência de modulação existe uma diminuição da intensidade luminescente, resultando num aumento do ruído de fase. De forma minimizar a introdução de erros no cálculo dos tempos de vida, foram consideradas as frequências até 45 kHz.

Na Tabela 9.7, são apresentados os valores dos tempos de vida para as três concentrações de oxigénio em meio aquoso já referidas, para os vários filmes sensores estudados. Também são apresentados os respectivos valores da diferença de tempos de vida.

Tabela 9.7 – Tempos de vida e diferenças de tempo de vida determinados para os filmes de sol-gel.

Precursosores	Razão	Tempo de Vida (μs)			$\Delta\tau(\mu\text{s})$		
		O ₂	Ar	N ₂	O ₂ -N ₂	O ₂ -Ar	Ar-N ₂
ETEOS+TEOS	1:1	1,03	2,35	4,41	3.38	1.32	2,06
BTEOS+TEOS	1:1	1,05	2,37	4,70	3.65	1.32	2,32
PTEOS+TEOS	1:1	1,85	3,44	4,61	2.76	1.59	1,17
MTEOS+TEOS	3:1	1,23	2,57	4,61	3.38	1.34	2,04
ETEOS+TEOS	3:1	1,14	2,54	4,74	3.61	1.40	2,20
PTEOS+TEOS	3:1	2,14	3,71	4,91	2.77	1.57	1,20

Os tempos de vida das amostras, revelam uma elevada proximidade dos valores obtidos para o meio nitrogenado. Neste meio, os tempos de vida deveriam ser todos iguais, pois o fluoróforo é o mesmo. As diferenças verificadas poderão dever-se à interferência do sol-gel nas propriedades do fluoróforo e a erros experimentais.

De forma a perceber se as frequências utilizadas na determinação das curvas de Stern-Volmer foram as mais adequadas, determinaram-se as frequências ótimas teóricas, para as diferentes gamas de concentrações de oxigénio (Tabela 9.8). Para tal, utilizou-se a equação 4.2 e os tempos de vida anteriormente calculados.

Tabela 9.8 – Frequências utilizadas nos ensaios e frequências ótimas teóricas, determinadas pelos tempos de vida.

Precusores	Razão	Frequência			
		utilizada (kHz)	Frequência óptima (kHz)		
		N ₂ -Ar	N ₂ -Ar	Ar-O ₂	N ₂ -O ₂
ETEOS+TEOS	1:1	40	49	75	102
BTEOS+TEOS	1:1	45	48	72	101
PTEOS+TEOS	1:1	35	40	55	63
MTEOS+TEOS	3:1	45	46	67	90
ETEOS+TEOS	3:1	45	46	69	94
PTEOS+TEOS	3:1	35	37	49	56

A frequência de 45 kHz determinada graficamente para o filme ET11 (Figura 9.20) para a gama N₂-Ar ajusta-se ao valor calculado teoricamente de 46 kHz. Para os restantes filmes também não existem diferenças significativas. Na gama Ar-O₂, os 69 kHz teóricos ajustam-se à zona de pouca variabilidade referida anteriormente e para a gama N₂-O₂, os 94 kHz estão acima do limite de 85 kHz estudado anteriormente.

As frequências ótimas apresentadas na Tabela 9.8, correspondem à frequência que deve ser escolhida no caso da utilização exclusiva do sensor nas gamas de concentração apresentadas. Por exemplo, se um sensor apenas vai ser utilizado para meios aquosos com concentrações de oxigénio inferiores à que se verifica quando o meio está em equilíbrio com o ar, então a frequência que maximiza a razão sinal/ruído é a óptima determinada para essa gama. Se o sensor é utilizado em toda a gama de concentrações de oxigénio, a frequência que de uma forma global minimiza os desvios entre os valores medidos e os reais é a óptima determinada nessa gama. Isto significa que para um sensor de oxigénio dissolvido construído com um determinado filme sensor, a frequência de excitação pode ser ajustada no sentido de aumentar o desempenho.

9.5.2.1. Determinação das curvas de *Stern-Volmer* em meio aquoso

Conforme já referido, os ensaios foram realizados à temperatura de 30°C. A escolha desta temperatura foi limitada pela temperatura ambiente que se verificou durante os ensaios.

Quando existe uma alteração da temperatura de um meio aquoso arejado, o sinal de fluorescência que quantifica a concentração de oxigénio também é alterada por várias razões: devido à variação das propriedades de fluorescência (cap. 4.7), devido à dependência da solubilidade do oxigénio com a temperatura (Figura 1.1) e devido à dependência da velocidade de difusão do oxigénio na matriz de sol-gel (eq. 2.31). Isto significa que existem diferenças entre os resultados dos ensaios realizados a 24°C (subcap. 9.4) e os aqui apresentados.

Por exemplo, enquanto o oxigénio dissolvido a 24°C é de 8.4 mg.L⁻¹ para um meio aquoso arejado (considerando a pressão atmosférica de 760 mmHg), para 30°C esse valor será de 7.5 mg.L⁻¹ (consultar Anexo A).

De acordo com a equação 1.1, a solubilidade do oxigénio em água pura obedece à lei de Henry. Através da tabela de solubilidade de oxigénio em água pura apresentadas no Anexo A, podemos determinar a respectiva constante de Henry para uma temperatura de 30°C:

$$k_H = [\text{O}_2(\text{aq})] / p\text{O}_2 = 1.1145 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}.\text{atm}^{-1}$$

A partir desta relação, os valores anteriormente apresentados em % de O₂ (no protocolo dos ensaios) serão agora convertidos para mg.L⁻¹.

As constantes K_{SV} foram calculadas a partir da equação 4.1 que relaciona as tangentes das fases determinadas a várias concentrações. Às fases medidas para cada concentração de oxigénio foi subtraída a fase correspondente ao atraso da componente electrónica, determinada à respectiva frequência a que cada lâmina foi testada. As representações gráficas utilizadas no cálculo das constantes de *Stern-Volmer* podem ser analisadas na Figura 9.22.

As curvas obtidas apresentam uma não linearidade que pode resultar do facto do fluoróforo não estar homogeneamente distribuído na matriz de suporte. Daqui resulta a existência de vários tipos de microambientes que afectam de forma diferente a acessibilidade das moléculas de oxigénio aos fluoróforos, conduzindo a diferentes sensibilidades. Normalmente, a utilização de um modelo de ajuste a dois tipos de ambientes [85], fornece uma boa aproximação dos resultados. Do ponto de vista instrumental, a utilização deste modelo não é muito prático porque tem muitos parâmetros que necessitam de calibração.

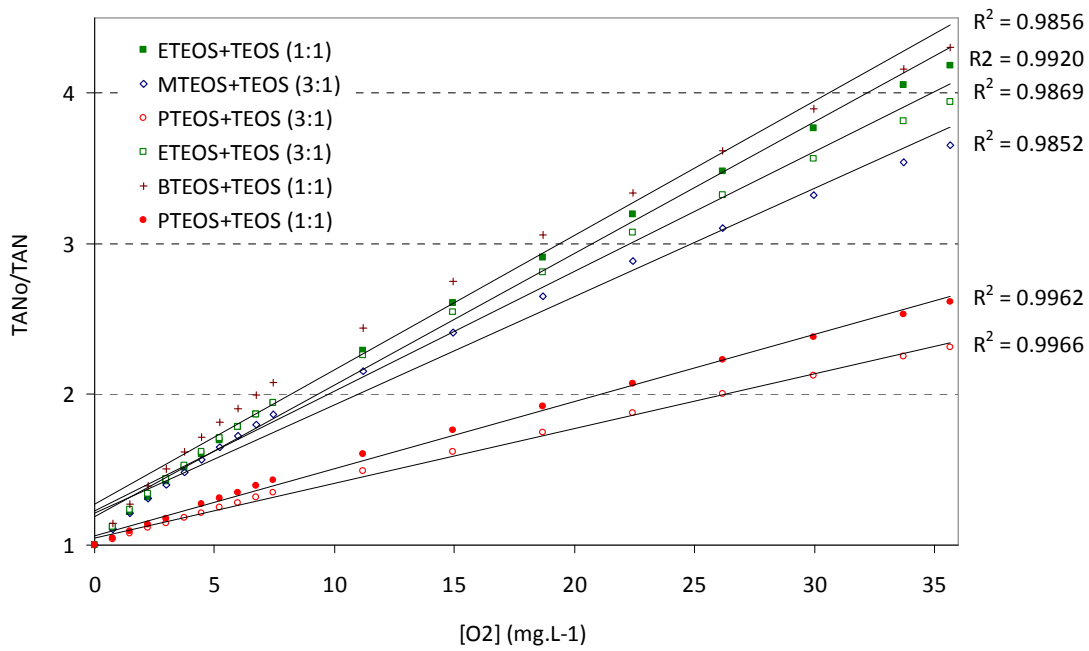


Figura 9.22 – Curvas de *Stern-Volmer* para os filmes testados em meio aquoso.

Alternativamente, para situações em que o sensor é utilizado em gamas limitadas de concentração de oxigênio, pode ser utilizado o modelo simples da equação de *Stern-Volmer*. A análise ao gráfico da Figura 9.22, permite perceber que existe um aumento substancial da linearidade se forem consideradas duas gamas de medições, dos 0 – 7.5 mg.L⁻¹ (correspondente a concentrações inferiores ao equilíbrio do ar com o meio aquoso) e 7.5 – 35.7 mg.L⁻¹. A representação gráfica nestas duas gamas pode ser observada nas figuras 9.22 e 9.23. Os valores das constantes de *Stern-Volmer* podem ser consultados na Tabela 9.9.

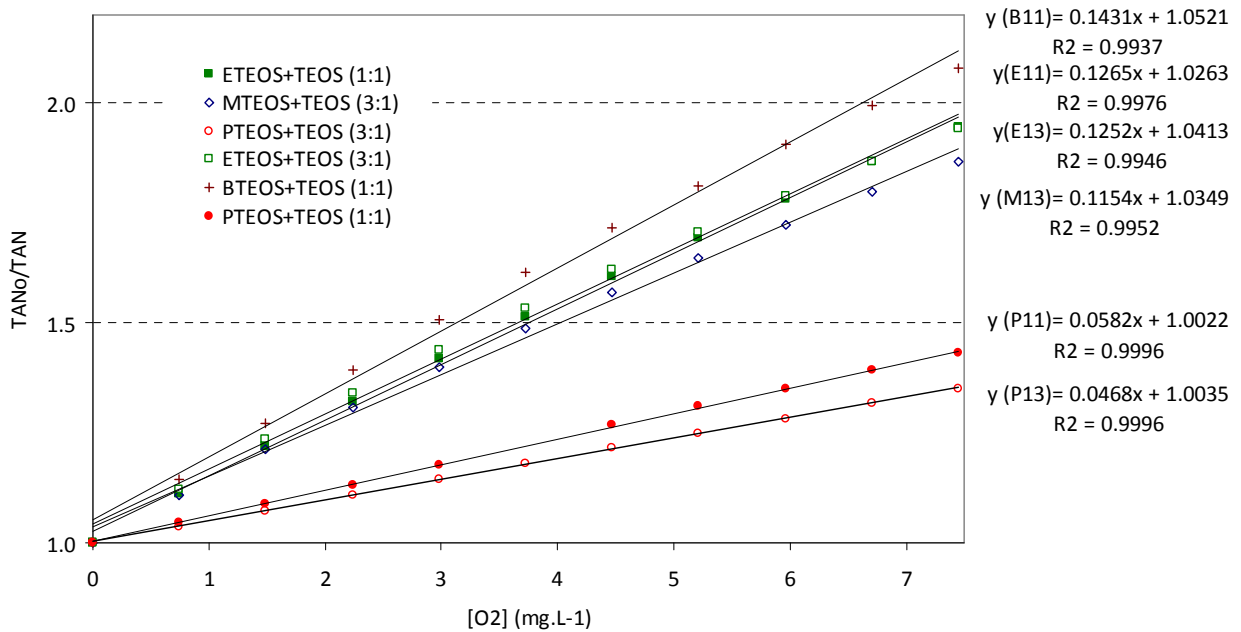


Figura 9.23 – Curvas de *Stern-Volmer* para os filmes testados em meio aquoso, na gama de 0 – 7.5 mg.L⁻¹.

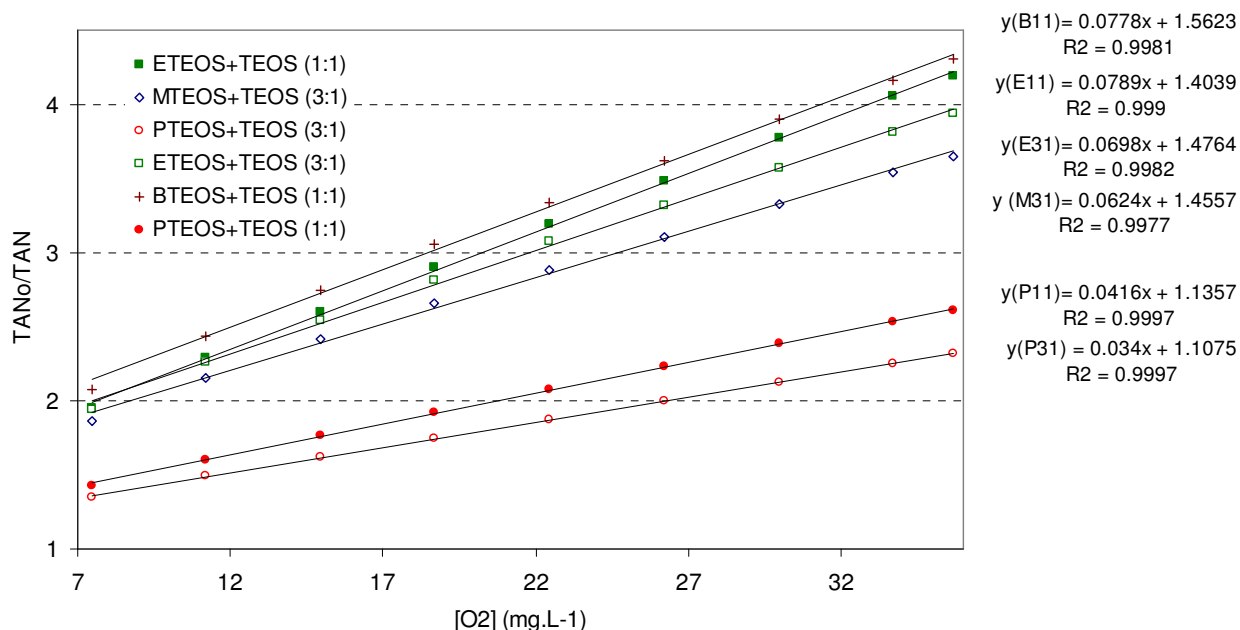


Figura 9.24 – Curvas de Stern-Volmer para os filmes testados em meio aquoso, na gama de 7.5 – 35.7 mg.L⁻¹.

Tabela 9.9 – Valores da constante de Stern-Volmer obtidos em meio aquoso.

Precusores	Razão	[O ₂] = 0 – 7.5 mg.L ⁻¹		[O ₂] = 7.5 – 35.7 mg.L ⁻¹		[O ₂] = 0 – 35.7 mg.L ⁻¹	
		K _{SV} (10 ⁻² L.mg ⁻¹)	R ²	K _{SV} (10 ⁻² L.mg ⁻¹)	R ²	K _{SV} (10 ⁻² L.mg ⁻¹)	R ²
ETEOS+TEOS	1:1	12.65	0.9976	7.89	0.9990	8.74	0.9920
BTEOS+TEOS	1:1	14.31	0.9937	7.78	0.9981	8.92	0.9856
PTEOS+TEOS	1:1	5.82	0.9996	4.16	0.9997	4.46	0.9962
MTEOS+TEOS	3:1	11.54	0.9952	6.24	0.9977	7.19	0.9852
ETEOS+TEOS	3:1	12.52	0.9946	6.98	0.9982	7.96	0.9869
PTEOS+TEOS	3:1	4.68	0.9996	3.40	0.9997	3.64	0.9966

9.5.2.2. Determinação das curvas de Stern-Volmer em meio gasoso

Os filmes sensores testados para a determinação das curvas de Stern-Volmer em meio aquoso foram novamente utilizados com o objectivo de avaliar a sua sensibilidade em meio gasoso.

Neste caso, dado ter sido medido o atraso de fase para várias frequências em cada composição de oxigénio gasoso, foi possível a determinação dos tempos de vida em toda a gama de concentrações.

Tomando como exemplo o filme BT11, pode observar-se na Figura 9.25, a variação do tempo de vida de fluorescência com a concentração de oxigénio. Observa-se que, a variação do tempo de vida de fluorescência do filme BT11J é mais acentuada para uma gama de concentrações inferior ao meio arejado.

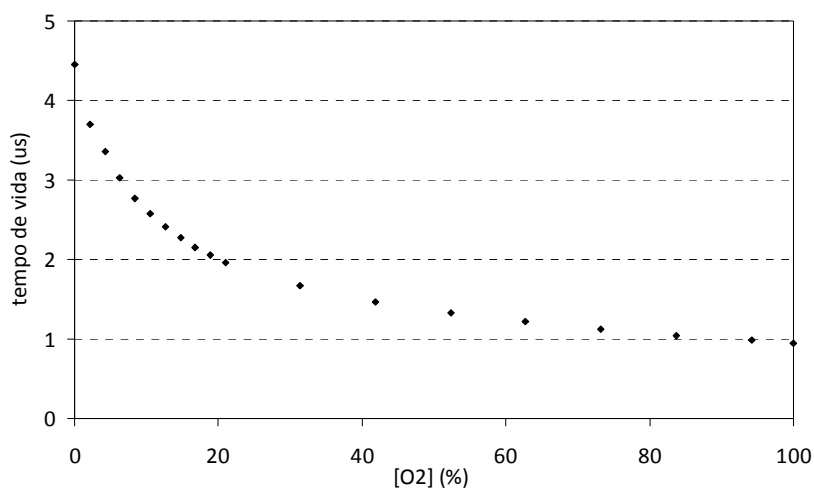


Figura 9.25 – Variação do tempo de vida com a concentração de oxigénio em meio gasoso, para o filme BT11.

A equação de *Stern-Volmer* permite relacionar a concentração de oxigénio com uma razão entre os tempos de vida ou com uma razão das tangentes de fase, conforme expresso na eq. 2.25 e eq. 4.1. Nos ensaios em meio aquoso, os cálculos foram efectuados com as tangentes das fases. Dado que o primeiro método requer a obtenção da fase a várias frequências (neste caso foram utilizadas 4 medições) e o segundo método apenas uma, poderemos considerar o primeiro como sendo mais rigoroso. É de salientar que, para um sensor de aplicação comercial não é prático a determinação da concentração de oxigénio pelo cálculo dos tempos de vida, dado o elevado número de medições necessárias. A representação gráfica das curvas de *Stern-Volmer* em que se utiliza os tempos de vida calculados pode ser observada na Figura 9.26

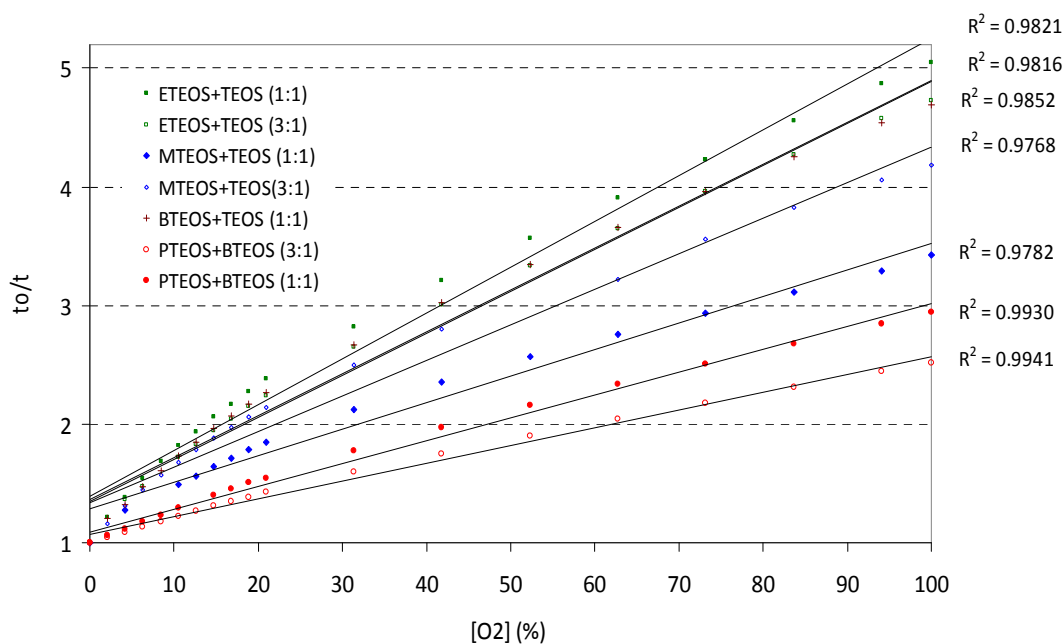


Figura 9.26 – Curvas de *Stern-Volmer* para os filmes testados em meio gasoso.

De forma análoga ao tratamento efectuado às curvas de *Stern-Volmer* obtidas em meio aquoso, em meio gasoso também foi considerado a existência de duas gamas distintas, de 0% a 21% de O₂ e de 21% a 100% de O₂ (Figura 9.27 e 9.27).

Os valores das constantes de *Stern-Volmer* calculadas, assim como os coeficientes de correlação podem ser observados na Tabela 9.10.

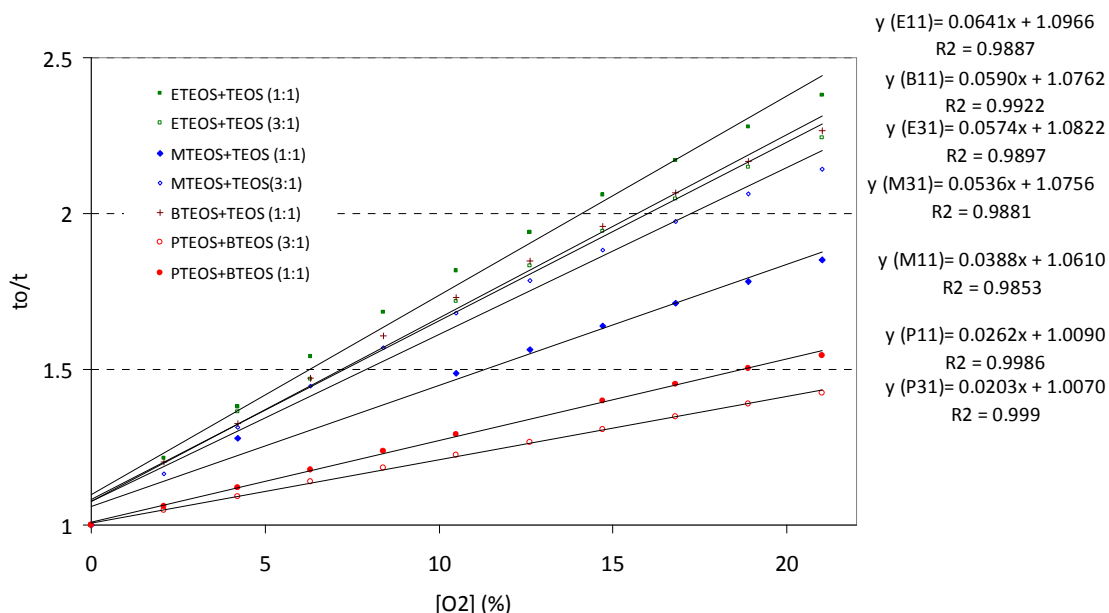


Figura 9.27 – Curvas de *Stern-Volmer* para os filmes testados em meio gasoso, na gama de 0 – 21% de O₂.

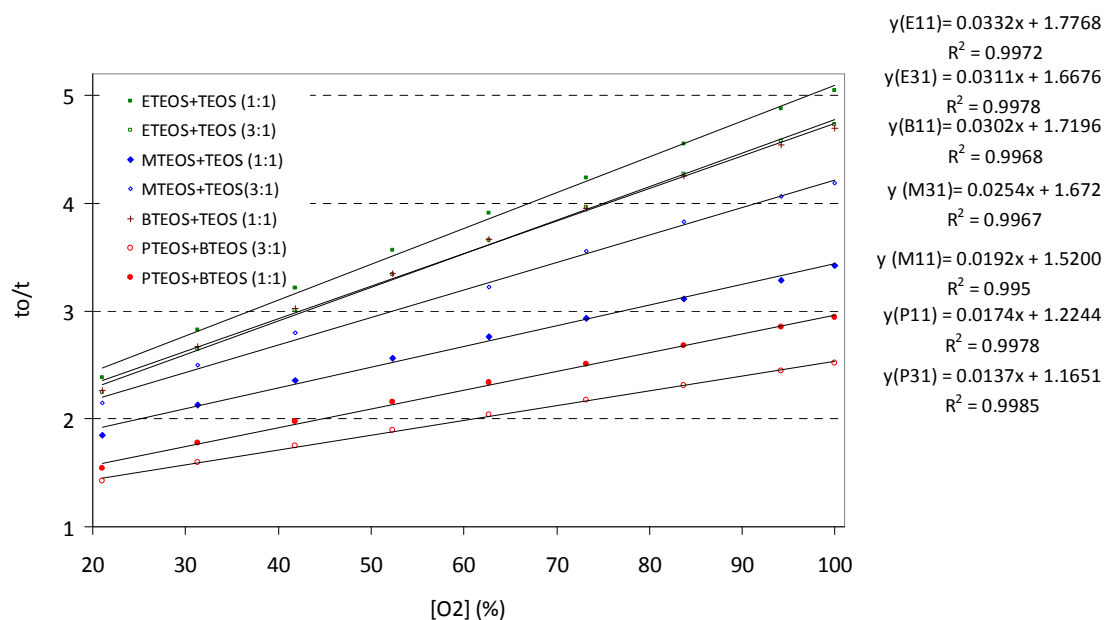


Figura 9.28 – Curvas de *Stern-Volmer* para os filmes testados em meio gasoso, na gama de 21 – 100% de O₂.

Tabela 9.10 – Valores da constante de *Stern-Volmer* obtidos em meio gasoso.

Precursosores	Razão	[O ₂] = 0 – 21%		[O ₂] = 21-100%		[O ₂] = 0 – 100%	
		K _{SV} (10 ⁻² % ⁻¹)	R ²	K _{SV} (10 ⁻² % ⁻¹)	R ²	K _{SV} (10 ⁻² % ⁻¹)	R ²
MTEOS+TEOS	1:1	3.88	0.9853	1.92	0.9950	2.24	0.9782
ETEOS+TEOS	1:1	6,41	0.9887	3.32	0.9972	3.86	0.9821
BTEOS+TEOS	1:1	5.90	0.9922	3.02	0.9968	3.54	0.9816
PTEOS+TEOS	1:1	2.62	0.9986	1.74	0.9978	1.92	0.9930
MTEOS+TEOS	3:1	5.36	0.9881	2.54	0.9967	3.00	0.9768
ETEOS+TEOS	3:1	5.74	0.9897	3.11	0.9978	3.53	0.9852
PTEOS+TEOS	3:1	2.03	0.9990	1.37	0.9985	1.50	0.9941

O cálculo das constantes de *Stern-Volmer*, através da medição da fase para diferentes concentrações de oxigénio numa dada frequência, conduziu a resultados muito próximos dos determinados pelos tempos de vida. Tomando como exemplo o filme sensor de BT11J, as curvas de *Stern-Volmer* obtidas pelas duas formas de cálculo estão representadas nas Figura 9.29 e 9.30.

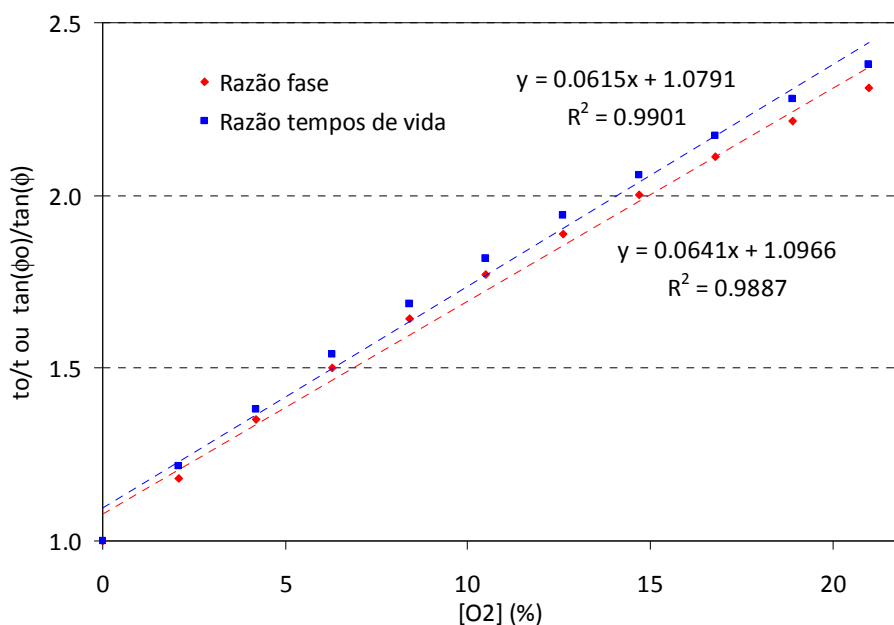


Figura 9.29 – Curvas de *Stern-Volmer* obtidas em meio gasoso para o filme BT11J, através da determinação da razão de fases e da razão de tempos de vida, no intervalo de 0-21% de oxigénio.

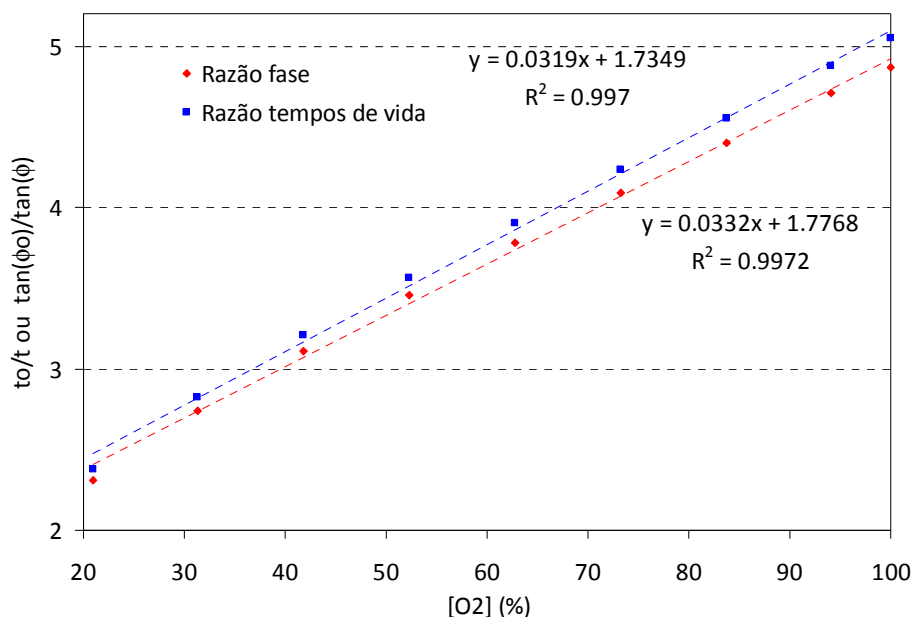


Figura 9.30 – Curvas de *Stern-Volmer* obtidas em meio gasoso para o filme BT11, através da determinação da razão de fases e da razão de tempos de vida, no intervalo de 21-100 % de oxigênio.

Como se pode observar nestas figuras, existe uma elevada linearidade em ambos os casos. Os declives que correspondem às constantes de *Stern-Volmer* também apresentam valores próximos. A ordenada na origem, que idealmente deverá ser igual à unidade, está mais próxima desta nos resultados que se utilizam os tempos de vida, corroborando a afirmação sobre a maior exactidão deste método.

Na Tabela 9.11, estão indicadas as constantes de *Stern-Volmer* obtidas através da medição das fases a uma frequência óptima e a diferença percentual quando comparados com as constantes obtidas pelos tempos de vida e que constam na Tabela 9.10.

Tabela 9.11 – Constantes de *Stern-Volmer* em meio gasoso, obtidas pela medição da fase a uma frequência óptima e diferenças percentuais relativamente aos obtidos pela medição dos tempos de vida.

Precursores	Razão	[O ₂] = 0 – 21%		[O ₂] = 21-100%	
		K _{SV} (10 ⁻² % ⁻¹)	Δ _{KSV} (%)	K _{SV} (10 ⁻² % ⁻¹)	Δ _{KSV} (%)
MTEOS+TEOS	1:1	4.06	+4.6	1.90	-1.0
ETEOS+TEOS	1:1	6.15	-4.2	3.19	-3.9
BTEOS+TEOS	1:1	5.93	+0.5	3.00	-0.7
PTEOS+TEOS	1:1	2.76	+5.3	1.76	+1.1
MTEOS+TEOS	3:1	5.32	-0.8	2.33	-8.3
ETEOS+TEOS	3:1	5.81	+1.2	3.02	-2.9
PTEOS+TEOS	3:1	2.06	+1.5	1.36	-0.7

9.5.3. CONCLUSÕES

As curvas de *Stern-Volmer* obtidas para todos os filmes nos meios aquoso e gasoso apresentam uma elevada linearidade. Quando se comparam os coeficientes de correlação das curvas de *Stern-Volmer* obtidas em meio gasoso (Tabela 9.10) com as obtidas em meio aquoso (Tabela 9.9), concluiu-se que existe uma menor linearidade no primeiro caso. O número de moléculas de oxigénio por unidade de volume existente em meio gasoso é de cerca de 30 vezes superior ao número existente em meio aquoso, devido ao limite de solubilização do oxigénio na água. Ainda que ocorra uma partição entre uma fase gasosa e a fase líquida no interior da matriz de sol-gel, esta não é completa. Isto significa que as moléculas de oxigénio entram em contacto com o fluoróforo através das duas fases. A redução da intensidade e do tempo de vida de fluorescência na presença de oxigénio resulta da contribuição das reduções que ocorrem em cada uma destas fases. Na Figura 9.26, a não linearidade observada nas curvas aumenta com a concentração de oxigénio. Se considerarmos, que o número de moléculas de oxigénio que acedem ao fluoróforo em meio aquoso oxigenado é relativamente inferior a um meio gasoso com 100% O₂, poderemos dizer de forma grosseira que as curvas de *Stern-Volmer* em meio aquoso são uma fracção das respectivas em meio gasoso. Isto significa que será expectável uma maior linearidade, como os resultados confirmam.

Uma análise à constante K_{SV} como parâmetro que define a sensibilidade dos filmes sensores, permite concluir que os filmes da composição BT11 com elevado tempo de envelhecimento são os mais adequados para a construção de filmes sensores para medição em meio aquoso, independentemente da gama de análise. Os restantes filmes testados apresentam no entanto sensibilidades muito próximas, à excepção das composições em que é utilizado o precursor PTEOS.

Em meio gasoso, a composição ET11 foi a que revelou uma sensibilidade mais elevada em toda a gama de concentrações.

Neste estudo também foi possível concluir que a determinação das constantes SV a partir da medição exclusiva das fases a uma única frequência, origina resultados muito próximos dos obtidos a partir dos tempos de vida.

9.6. TEMPOS DE RESPOSTA EM MEIO GASOSO

A determinação do tempo de resposta pode ser realizada através de um ensaio em que se obtém a resposta do sistema a uma variação de entrada do tipo degrau. Para tal, é necessário que o sinal de entrada do sistema (concentração de oxigénio na câmara de suporte de amostras) sofra uma variação brusca de valor e a análise da variação temporal do sinal de saída (o atraso da fase).

Os ensaios realizados para a determinação da constante de Stern-Volmer em meio gasoso envolveram alterações súbitas da concentração de oxigénio da alimentação à câmara de suporte de amostras, pelo que foram utilizados para a determinação dos tempos de resposta do sensor.

Do sistema sabe-se que a câmara de suporte tem um volume de 25 mL e que o caudal gasoso é de 500 mL/min, o que significa que a renovação do meio gasoso demora no mínimo 3 segundos. O tempo de estabilização da concentração de oxigénio depende também do tipo de escoamento que se verifica entre o ponto de entrada e saída da câmara. No caso de recipientes com arestas (como é o caso) existe a possibilidade de existirem zonas mortas, que ajudam a prolongar o tempo de estabilização da concentração do meio.

Dado que os tempos de resposta medidos têm associado o tempo de estabilização da concentração de oxigénio na câmara, os tempos de resposta efectivos do sensor serão inferiores aos apresentados.

Como exemplo, a Figura 9.31 apresenta a análise gráfica do tempo de resposta do filme ET11 para uma variação de 2.1% (de 2.1 para 4.2% O₂) da concentração de oxigénio.

Na Tabela 9.12 são apenas apresentados os tempos de resposta para o filme ET11, pois os obtidos para os restantes filmes foram todos muito próximos.

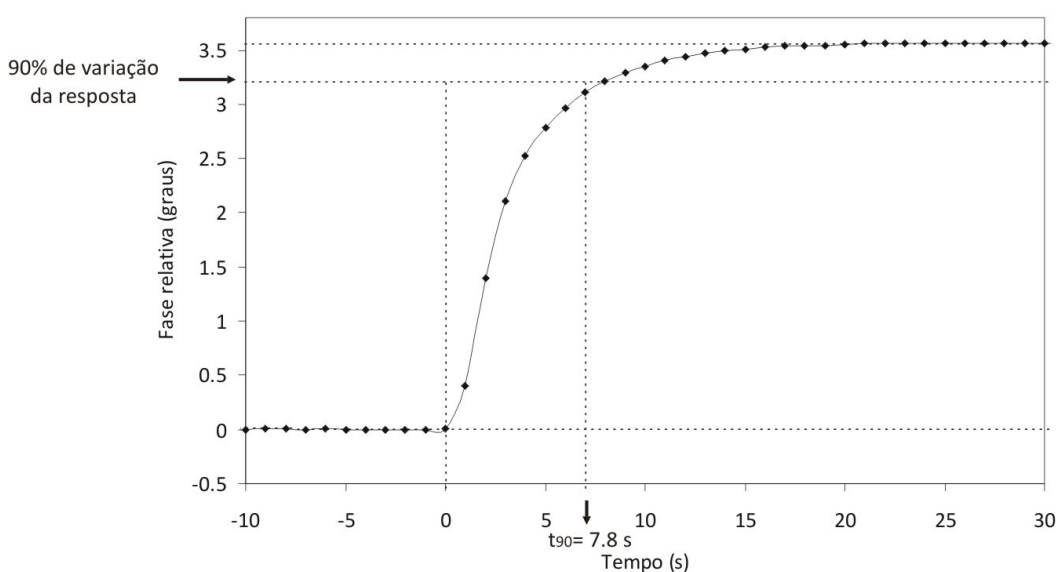


Figura 9.31 – Avaliação do tempo de resposta do filme ET11, na passagem de 2.1% para 4.2% de O₂.

Os tempos de resposta obtidos encontram-se na mesma ordem de grandeza dos obtidos por outros autores. Por exemplo, B.D MacCraith [137] refere um tempo de resposta de 5 segundos numa variação de 0% a 100% de oxigénio para um sensor de oxigénio gasoso. J.Costa-Fernández [108] apresenta uma aplicação similar com tempos de resposta anunciados inferiores a 5 segundos.

Tabela 9.12 – Tempos de resposta obtidos para as variações de %O₂ (ET11).

Variações (valores em %de O ₂)	Tempo resposta (s)
21 – 100	6
100 – 0	14
0 – 2.1	10
2.1 – 4.2	8
4.2 – 6.3	8
6.3 – 8.4	8
8.4 – 10.5	8
10.5 – 12.6	8
12.6 – 14.7	8
14.7 – 16.8	8
16.8 – 18.9	7
18.9 – 21	8
21 – 31.4	9
31.4 – 41.8	8
41.8 – 52.3	8
52.3 – 62.7	7
62.7 – 73.2	7
73.2 – 83.7	8
83.7 – 94.2	8
94.2 - 100	8
100 - 21	11

10. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

10.1. CONCLUSÕES

Esta tese apresenta o trabalho realizado no desenvolvimento e optimização de um sensor óptico para a medição de oxigénio (gasoso e dissolvido) por fluorescência.

O desenvolvimento do sensor consistiu na produção dos filmes sensores e na construção do sistema instrumental para a medição da intensidade e dos tempos de vida fluorescência

Os filmes sensores foram produzidos através do processo de sol-gel. Este processo tem vários parâmetros de controlo possibilitando obter materiais com características distintas. Neste trabalho, estudou-se a influência da composição do filme de sol-gel e do tempo de envelhecimento da solução antes da deposição dos filmes na medição de oxigénio pelo filme resultante.

Nos filmes produzidos foi incorporado um fluoróforo cujas propriedades fluorescentes são modificadas na presença de oxigénio através de um processo reversível de supressão. De entre os fluoróforos estudados previamente, o complexo de ruténio foi o escolhido por apresentar intensidade de fluorescência significativamente superior à das metaloporfirinas PdOEPK e PtOEPK. Além disso, o complexo de ruténio apresentou supressão de cerca de 50%.

Sabendo que a hidrofobicidade aumenta a sensibilidade dos filmes sensores na medição de oxigénio dissolvido, efectuou-se a avaliação desta propriedade nos filmes produzidos. Os resultados mostraram que a hidrofobicidade não depende do tempo de envelhecimento dos filmes sensores. Relativamente à composição química dos filmes, observou-se que o aumento do número de carbonos na cadeia linear do alcóxido contribui para o aumento da hidrofobicidade. Por conseguinte, exclui-se o PTEOS, que apresenta um grupo fenil e em cujos filmes se registou a hidrofobicidade mais baixo. O aumento do *ormosil* na composição dos filmes resultou também num aumento de hidrofobicidade.

Relativamente à construção do sistema instrumental, os estudos realizados ao posicionamento da lâmina de vidro onde foi depositado o filme sensor, revelaram-se fundamentais para a obtenção de uma boa razão sinal/ruído. A escolha adequada dos filtros ópticos permitiu a minimização da mistura da radiação proveniente do LED com o sinal de fluorescência.

Nos estudos de caracterização, foi avaliada a fotodegradação do filme sensor com o tempo de exposição à radiação. Obteve-se uma redução da intensidade fluorescente de cerca de 7% ao longo de cerca de 1 hora de ensaio. No mesmo período de tempo, verificou-se que existe igualmente um desvio das fases medidas quando se utiliza a fluorometria de fase. Os resultados são indicativos da

necessidade de esquemas de calibração regulares para minimizar os erros de medição. Foram obtidos valores para a precisão e o limite de detecção mais baixos dos apresentados por alguns sensores comerciais.

A determinação dos tempos de vida por fluorometria de fase, permitiu determinar a supressão dos filmes produzidos. Os resultados permitiram concluir que o tempo de envelhecimento é um parâmetro muito importante no aumento da sensibilidade do filme. O aumento de sensibilidade é devido ao aumento da porosidade dos filmes, o que por sua vez aumenta a difusão do analito na matriz de sol-gel. Os filmes com os tempos de envelhecimento mais elevados foram os que apresentaram uma sensibilidade relativamente maior.

Na avaliação da sensibilidade através da determinação das constantes de *Stern-Volmer*, conclui-se que a composição BT11 é a mais adequada para a construção de filmes sensores para a medição em meio aquoso. Apesar da composição BT11 não ter sido a que apresentou os resultados mais positivos nas medições em meios gasosos, estes ficaram bastante próximos da melhor composição neste meio, a ET11. Por esta razão o filme BT11 é uma boa solução para um sensor que apresente a versatilidade de poder ser utilizado para medição simultânea de meios gasosos e aquosos. No entanto, também se pode afirmar que a composição ET11, não apresentou resultados muito afastados da BT11 em meio aquoso. Conclui-se que ambos os filmes são promissores para a medição de oxigénio, podendo o ET11 ser utilizado em aplicações mais indicadas para meio gasoso, com a possibilidade de medição em meio aquoso, e vice-versa no que diz respeito ao BT11. A hidrofobicidade mais elevada obtida para o BT11 em relação aos filmes testados neste ensaio é um dos factores contributivos para a sua elevada sensibilidade em meio aquoso. Outro factor é o aumento de porosidade proporcionado pelo aumento do tempo de envelhecimento. Apesar do ET11 apresentar uma hidrofobicidade mais baixa que o BT11, a proximidade dos valores de sensibilidade em meio aquoso pode ser justificada por uma porosidade relativa mais elevada.

Verificou-se ainda que a frequência óptima para a excitação do fluoróforo é modificada com a gama de concentrações de oxigénio que se pretende medir. Desta forma a frequência pode ser otimizada quando a gama de concentrações de oxigénio a ser medida é muito reduzida, minimizando assim erros de leitura derivados de um SNR mais elevado.

10.2. TRABALHO FUTURO

Devido ao elevado número de parâmetros que permitem a alteração das propriedades dos filmes de sol-gel, a síntese e caracterização de novos filmes para a avaliação da sua sensibilidade é uma tarefa muito extensa. No entanto ficam algumas sugestões para trabalho futuro:

- Alteração do solvente utilizado na síntese dos filmes de sol-gel que utilizaram o OTEOS;
- Modificação das condições de síntese ou do solvente para produzir filmes BT31 com maior estabilidade estrutural ao longo do tempo. Alternativamente, poderão ser produzidos filmes com uma razão BTEOS/TEOS=2;
- Produção de filmes com uma razão molar água/precursor superior a 2;
- Alteração do pH da solução precursora;
- Substituição do catalisador HCl por HF, na produção de novos filmes.

Para os filmes produzidos, são recomendados os seguintes testes de caracterização:

- Avaliação da alteração do sinal com a temperatura e desenvolvimento de esquemas de correcção;
- Avaliação da influência da humidade atmosférica em ensaios gasosos.
- Avaliação do lixiviamento (*leaching*) do fluoróforo em medições em meio aquoso.
- Estudar a influência da temperatura e tempo do tratamento térmico nas características de sensibilidade e estabilidade física dos filmes. Por exemplo, procurar com estes parâmetros produzir filmes BT31 estáveis.

O sistema instrumental actual cumpre a função de caracterizar a sensibilidade dos filmes produzidos em lâminas. Uma vez avaliados os filmes mais adequados para aplicação específica, a etapa seguinte passa pela construção de um sistema sensor para a medição real de oxigénio. A produção de filmes sensores depositados em fibra óptica é uma solução atractiva, pela versatilidade, miniaturização e portabilidade que confere ao sistema sensorial. A utilização de fibras ópticas obrigará a uma reconfiguração do sistema instrumental (ex. acoplamento de luz, avaliação da potência da fonte de radiação, etc.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choi, M.M.F. and D. Xiao, *Single standard calibration for an optical oxygen sensor based on luminescence quenching of a ruthenium complex*. *Analytica Chimica Acta*, 2000. **403**: p. 57-65.
2. Ramamoorthy, R., P.K. Dutta, and S.A. Akbar, *Oxygen sensors: Materials, methods, designs and applications*. *Journal of Materials Science*, 2003. **38**: p. 4271-4282.
3. Arthur Colvin, J., et al., *A Novel Solid-State Oxygen Sensor in John Hopkins Apl. Technical Digest*. 1996.
4. Amao, Y., *Probes and Polymers for Optical Sensing of Oxygen*. *Microchimica Acta*, 2003. **143**(1): p. 1-12.
5. *Dissolved Oxygen Measurement In Wastewater Treatment — Three Different Technologies* [cited 26/07/2009]; Available from: <http://www.wateronline.com>
6. Lynne, K., L.B. Aaron, and W. Louise, *Oxygen and its reactions in beer*. *Packaging Technology and Science*, 2006. **19**(1): p. 25-32.
7. O'Neal, D.P., et al., *Oxygen sensor based on the fluorescence quenching of a ruthenium complex immobilized in a biocompatible Poly(Ethylene glycol) hydrogel*. *Sensors Journal, IEEE*, 2004. **4**(6): p. 728-734.
8. Lide, D.R., *Handbook of Chemistry and Physics*. 2005, CRC Press.
9. Eaton, A.D., et al., *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 2005, Washington, D. C.: American Public Health Association.
10. Falck, D., *Amperometric Oxygen Electrodes*. *Current Separations*, 1997. **16**: p. 19-22.
11. Rao, G., et al., *Application of Fluorescence Sensing to Bioreactors*, in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 2002, Springer, p. 417-448.
12. Benammar, M. and W.C. Maskell, *Theory and simulation of a miniature zirconia sensor for control of the air-to-fuel ratio in combustion systems*. *Sensors Journal, IEEE*, 2001. **1**(4): p. 283-287.
13. Hering, D., *Paramagnetic oxygen measurement*, in *Dräger Review*. 2000, Dräger Sicherheitstechnik GmbH.
14. Silva, G., *Instrumentação Industrial*. 2004: IPS-ESTS.
15. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2002: Wiley.
16. Levine, I.N., *Quantum Chemistry*. 5th ed. 2002: Prentice Hall.
17. Lakowicz, J.R., *Topics in fluorescence spectroscopy, vol. 4. Probe design and chemical sensing* 2002: Kluwer Academic Publishers.
18. Colin, D.M., et al., *Selective excitation of tryptophan fluorescence decay in proteins using a subnanosecond 295 nm light-emitting diode and time-correlated single-photon counting*. *Applied Physics Letters*, 2005. **86**(26): p. 261911.
19. Nakaema, M.K.K. and R. Sanches, *Fluorometria no domínio da frequência*. *Química Nova*, 1999. **22**: p. 412-416.
20. Ross, J.A. and D.M. Jameson, *Time-resolved methods in biophysics. 8. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008. **7**: p. 1301-1312.
21. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1999, Kluwer Academic
22. Konopásek, I., et al., *Short-lived fluorescence component of DPH reports on lipid-water interface of biological membranes*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2004. **130**(2): p. 135-144.
23. Gutierrez-Merino, C., et al., *Preferential Distribution of the Fluorescent Phospholipid Probes NBD-Phosphatidylcholine and Rhodamine-Phosphatidylethanolamine in the Exofacial Leaflet of*

- Acetylcholine Receptor-Rich Membranes from Torpedo marmorata*. *Biochemistry*, 2002. **34**(14): p. 4846-4855.
24. Hutterer, R., A.B.J. Parusel, and M. Hof, *Solvent Relaxation of Prodan and Patman: A Useful Tool for the Determination of Polarity and Rigidity Changes in Membranes*. *Journal of Fluorescence*, 1998. **8**(4): p. 389-393.
25. Guo, X.-Q., F.N. Castellano, and L. Li, *A long-lifetime Ru(II) metal-ligand complex as a membrane probe*. *Biophysical Chemistry*, 1998. **71**: p. 51-62.
26. Sacksteder, L., et al., *Long-lived, highly luminescent rhenium(I) complexes as molecular probes: intra- and intermolecular excited-state interactions*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **115**(18): p. 8230-8238.
27. Mongey, K.F., et al., *Photophysics of mixed-ligand polypyridyl ruthenium(II) complexes immobilised in silica sol-gel monoliths*. *J. Mater. Chem.*, 1997. **7**(8): p. 1473-1479.
28. Rendell, D., *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*. 1987: John Wiley Sons.
29. Collinson, M.M., *Analytical applications of organically modified silicates*. *Microchimica Acta*, 1998. **129**(3): p. 149-165.
30. Mac Craith, B.D., et al., *Optical Chemical Sensors Based on Sol-Gel Materials: Recent Advances and Critical Issues*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1997. **8**(1): p. 1053-1061.
31. McEvoy, A.K., C. McDonagh, and B.D. MacCraith, *Optimisation of Sol-Gel-Derived Silica Films for Optical Oxygen Sensing*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1997. **8**(1): p. 1121-1125.
32. Klimant, I., et al., *Fast Response Oxygen Micro-Optodes Based on Novel Soluble Ormosil Glasses*. *Microchimica Acta*, 1999. **131**(1): p. 35-46.
33. Campbell, A. and D. Uttamchandani, *Optical dissolved oxygen lifetime sensor based on sol-gel immobilisation*. *Science, Measurement and Technology, IEE Proceedings -*, 2004. **151**(4): p. 291-297.
34. Brinker, C.J., *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. 1990: Academic Press.
35. Wright, J.D. and N.A.J.M. Sommerdijk, *Sol-Gel Materials: Chemistry and Applications*. 2000: Taylor & Francis.
36. *Handbook of Sol-Gel Science and Technology Processing, Characterization and Applications, II - Characterization of Sol-Gel Materials and Products*, ed. R.M. Almeida. 2005: Kluwer Academic.
37. Avnir, D., D. Levy, and R. Reisfeld, *The nature of the silica cage as reflected by spectral changes and enhanced photostability of trapped Rhodamine 6G*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1984. **88**(24): p. 5956-5959.
38. Istvan, S., *Art and practice to emboss gratings into Sol-Gel waveguides*, in *Functional Integration of Opto-Electro-Mechanical Devices and Systems*, M.R. Descour and J.T. Rantala, Editors. 2001, SPIE.
39. Sakka, S., *Structure, properties and application of oxynitride glasses*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1995. **181**(3): p. 215-224.
40. Sekine, M., S. Katayama, and M. Mitomo, *Preparation of silicon oxynitride glass fibers by ammonolysis of silica gels*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1991. **134**(3): p. 199-207.
41. Pier, P.L., et al. *Thin films for nonlinear optics: sol-gel preparation, Raman and XAS characterization of alpha-Fe[sub 2]O[sub 3]*. 1998: SPIE.
42. Levy, D., *Photochromic Sol-Gel Materials*. *Chemistry of Materials*, 1997. **9**(12): p. 2666-2670.
43. Stathatos, E., et al., *Study of laser action of Coumarine-153 incorporated in sol-gel made silica/poly(propylene oxide) nanocomposite gels*. *Chemical Physics Letters*, 2001. **345**(5-6): p. 381-385.
44. Wen-Jang, K., H. Ging-Ho, and J. Ru-Jong, *All Organic NLO Sol-Gel Material Containing a One-Dimensional Carbazole Chromophore*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2001. **202**(9): p. 1782-1790.
45. Philipp, G. and H. Schmidt, *New materials for contact lenses prepared from Si- and Ti-alkoxides by the sol-gel process*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1984. **63**(1-2): p. 283-292.

46. Kaddouri, A., et al., *Sol-Gel Processing of Copper-Chromium Catalysts for Ester Hydrogenation*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 1998. **53**(2): p. 533-545.
47. Meynen, V., et al., *Post-synthesis deposition of V-zeolitic nanoparticles in SBA-15*. Chem. Commun., 2004(7): p. 898-899.
48. Murphy, E.F., et al., *Nondestructive Sol-Gel Immobilization of Metal(salen) Catalysts in Silica Aerogels and Xerogels*. Chemistry of Materials, 2001. **13**(4): p. 1296-1304.
49. Sakka, S., *Current sol-gel activities in Japan*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2006. **37**(2): p. 135-140.
50. Agoudjil, N., N. Benmouhoub, and A. Larbot, *Synthesis and characterization of inorganic membranes and applications*. Desalination, 2005. **184**(1-3): p. 65-69.
51. de Lange, R.S.A., et al., *Permeation and separation studies on microporous sol-gel modified ceramic membranes*. Microporous Materials, 1995. **4**(2-3): p. 169-186.
52. Lee, S.-Y., et al., *Preparation of sol-gel driven alumina membrane modified by soaking and vapor-deposition method*. Journal of Membrane Science, 1995. **108**(1-2): p. 97-105.
53. Sidelnikov, V.N., Y.V. Patrushev, and Y.P. Belov, *Sol-gel multicapillary columns for gas-solid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2006. **1101**(1-2): p. 315-318.
54. L.Yan, et al., *Preparation and evaluation of organic-inorganic hybrid silica-based monolithic columns for capillary electrochromatography*. Chinese Journal of Chromatography, 2005. **23**(5): p. 499-503.
55. Kabir, A., C. Hamlet, and A. Malik, *Parts per quadrillion level ultra-trace determination of polar and nonpolar compounds via solvent-free capillary microextraction on surface-bonded sol-gel polytetrahydrofuran coating and gas chromatography-flame ionization detection*. Journal of Chromatography A, 2004. **1047**(1): p. 1-13.
56. Technologies, S.G. [cited 27/07/2009]; Available from: <http://www.sol-gel.com/>.
57. Klein, L.C., *Sol-Gel Processing of Silicates*. Annual Review of Materials Science, 1985. **15**(1): p. 227-248.
58. Vega, A.J. and G.W. Scherer, *Study of structural evolution of silica gel using ¹H and ²⁹Si NMR*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1989. **111**(2-3): p. 153-166.
59. [cited 23/02/2009]; Available from: <http://zeolite.com.pl>.
60. Zarzycki, J., M. Prassas, and J. Phalippou, *Synthesis of glasses from gels: the problem of monolithic gels*. Journal of Materials Science, 1982. **17**(11): p. 3371-3379.
61. Uchida, N., et al., *Chemical effects of DCCA to the sol-gel reaction process*. Journal of Materials Science, 1994. **29**(19): p. 5188-5192.
62. Hench, L.L. and D.R. Ulrich, *Science of Ceramic Chemical Processing*. 1986: Wiley.
63. Bradley, D.C., R.C. Mehrotra, and D.P. Gaur, *Metal alkoxides* 1978, London ; New York Academic Press.
64. McDonagh, C., et al., *Characterisation of porosity and sensor response times of sol-gel-derived thin films for oxygen sensor applications*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2002. **306**: p. 138-148.
65. [cited 25/08/2009]; Available from: <http://www.chemat.com/html/solgel.html>.
66. Hench, L.L. and J.K. West, *The sol-gel process*. Chemical Reviews, 2002. **90**(1): p. 33-72.
67. Puyol, M., et al., *Absorbance-Based Integrated Optical Sensors*, in *Frontiers in Chemical Sensors*. 2005. p. 1-44.
68. Wolfbeis, O.S., *Materials for fluorescence-based optical chemical sensors*. J. Mater. Chem., 2005. **15**: p. 2657-2669.
69. McDonagh, C., C.S. Burke, and B.D. MacCraith, *Optical Chemical Sensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 400-422.
70. Dybko, A., *Fundamentals of Optoelectronics*, in *Optical Chemical Sensors*. 2006. p. 47-58.

71. G. O'Keefe, B.D.M., A. K. McEvoy, C. M. McDonagh, J. F. McGilp, *Development of a LED-based phase fluorimetric oxygen sensor using evanescent wave excitation of a sol-gel immobilized dye*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1995. **29**(1-3): p. 226-230.
72. Jorge, P.A.S., et al., *Optical fiber probes for fluorescence based oxygen sensing*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2004. **103**(1-2): p. 290-299.
73. Burke, C.S., et al., *Development of an integrated optic oxygen sensor using a novel, generic platform*. The Analyst, 2005. **130**(1): p. 41-45.
74. Burke, C.S., et al., *Development of an optical sensor probe for the detection of dissolved carbon dioxide*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006. **119**(1): p. 288-294.
75. Trettnak, W., et al., *Recent progress in optical oxygen sensor instrumentation*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1995. **29**(1-3): p. 219-225.
76. Kautsky, H., *Quenching of luminescence by oxygen*. Trans. Faraday Soc., 1939. **35**: p. 216-219.
77. [cited 13/12/2008]; Available from: <http://www.in-situ.com/>
78. Geddes, C.D. and J.R. Lakowicz, *Reviews in Fluorescence*. 2005: Springer.
79. Ogurtsov, V.I. and D.B. Papkovsky, *Application of frequency spectroscopy to fluorescence-based oxygen sensors*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006. **113**(2): p. 608-616.
80. Holst, G., et al., *A microoptode array for fine-scale measurement of oxygen distribution*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1997. **38**(1-3): p. 122-129.
81. Mills, A. and A. Lepre, *Controlling the Response Characteristics of Luminescent Porphyrin Plastic Film Sensors for Oxygen*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(22): p. 4653-4659.
82. McEvoy, A.K., C.M. McDonagh, and B.D. MacCraith, *Dissolved oxygen sensor based on fluorescence quenching of oxygen-sensitive ruthenium complexes immobilized in sol-gel-derived porous silica coatings*. Analyst, 1996. **121**(6): p. 785 - 788.
83. Bowman, R.D., et al., *Conventional, confocal and two-photon fluorescence microscopy investigations of polymer-supported oxygen sensors*. Journal of Microscopy, 2003. **211**: p. 112-120.
84. Mei, E., S. Vinogradov, and R.M. Hochstrasser, *Direct Observation of Triplet State Emission of Single Molecules: Single Molecule Phosphorescence Quenching of Metalloporphyrin and Organometallic Complexes by Molecular Oxygen and Their Quenching Rate Distributions*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(43): p. 13198-13204.
85. Carraway, E.R., et al., *Photophysics and photochemistry of oxygen sensors based on luminescent transition-metal complexes*. Analytical Chemistry, 2002. **63**(4): p. 337-342.
86. Mills, A., *Optical sensors for oxygen: a log-gaussian multisite-quenching model*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1998. **51**: p. 69-76.
87. Bequette, B.W., *Process Control: Modeling, Design and Simulation*. 2003: Prentice Hall.
88. Park, K., *Topics in fluorescence spectroscopy, vol. 4. Probe design and chemical sensing : Editors: Joseph R. Lakowicz*. Plenum Press, New York, 1994. Journal of Controlled Release, 1996. **42**(3): p. 301-301.
89. Xu, W., et al., *Oxygen Sensors Based on Luminescence Quenching of Metal Complexes: Osmium Complexes Suitable for Laser Diode Excitation*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(15): p. 2605-2609.
90. Kroneis, H.W. and H.J. Marsoner, *A fluorescence-based sterilizable oxygen probe for use in bioreactors*. Sensors and Actuators, 1983. **4**: p. 587-592.
91. Papkovsky, D.B., K.S. Chandan, and L.S. Gregg, *Methods in Optical Oxygen Sensing: Protocols and Critical Analyses*, in *Methods in Enzymology*. 2004, Academic Press. p. 715-735.
92. Amao, Y., et al., *Novel optical oxygen sensing material: platinum porphyrin-fluoropolymer film*. Polymers for Advanced Technologies, 2000. **11**(8-12): p. 705-709.

-
93. Amao, Y., A. Keisuke, and O. Ichiro, *Oxygen sensing based on lifetime of photoexcited triplet state of platinum porphyrin-polystyrene film using time-resolved spectroscopy*. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2000. **4**(3): p. 292-299.
 94. Papkovsky, D.B., et al., *Phosphorescent Complexes of Porphyrin Ketones: Optical Properties and Application to Oxygen Sensing*. *Analytical Chemistry*, 1995. **67**(22): p. 4112-4117.
 95. Demas, J.N. and B.A. DeGraff, *Design and applications of highly luminescent transition metal complexes*. *Analytical Chemistry*, 2008. **63**(17): p. 829A-837A.
 96. Mongey, K.F., et al., *The photophysical properties of monomeric and dimeric ruthenium polypyridyl complexes immobilized in sol-gel matrices*. *Coordination Chemistry Reviews*, 1999. **185-186**: p. 417-429.
 97. Gillanders, R.N., et al., *Thin film dissolved oxygen sensor based on platinum octaethylporphyrin encapsulated in an elastic fluorinated polymer*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **502**(1): p. 1-6.
 98. Douglas, P. and K. Eaton, *Response characteristics of thin film oxygen sensors, Pt and Pd octaethylporphyrins in polymer films*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2002. **82**: p. 200-208.
 99. Choi, M.M.F. and D. Xiao, *Oxygen-sensitive reverse-phase optode membrane using silica gel-adsorbed ruthenium(II) complex embedded in gelatin film*. *Analytica Chimica Acta*, 1999. **387**: p. 197-205.
 100. McDonagh, C.M., et al., *Optical Sol-Gel-Based Dissolved Oxygen Sensor: Progress Towards a Commercial Instrument*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1998. **13**: p. 207-211.
 101. Kohls, O. and T. Scheper, *Setup of a fiber optical oxygen multisensor-system and its applications in biotechnology*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2000. **70**: p. 121-130.
 102. Hartmann, P., M.J.P. Leiner, and M.E. Lippitsch, *Luminescence Quenching Behavior of an Oxygen Sensor Based on a Ru(II) Complex Dissolved in Polystyrene*. *Analytical Chemistry*, 2002. **67**(1): p. 88-93.
 103. Hartmann, P., M.J.P. Leiner, and M.E. Lippitsch, *Response characteristics of luminescent oxygen sensors*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1995. **29**(1-3): p. 251-257.
 104. Draxler, S., et al., *Effects of Polymer Matrixes on the Time-Resolved Luminescence of a Ruthenium Complex Quenched by Oxygen*. *The Journal of Physical Chemistry*, 2002. **99**(10): p. 3162-3167.
 105. Trettnak, W., et al., *Miniaturized luminescence lifetime-based oxygen sensor instrumentation utilizing a phase modulation technique*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1996. **36**(1-3): p. 506-512.
 106. Mills, A. and M. Thomas, *Fluorescence-based Thin Plastic Film Ion-pair Sensors for Oxygen*. *Analyst*, 1997. **122**: p. 63-68.
 107. Huang, T., et al., *High Performance Oxygen Sensors Based on New Pyrene Derivatives*. *Sensor Letters*, 2008. **6**: p. 381-385.
 108. Costa-Fernández, J.M., M.E. Diaz-García, and A. Sanz-Medel, *Sol-gel immobilized room-temperature phosphorescent metal-chelate as luminescent oxygen sensing material*. *Analytica Chimica Acta*, 1998. **360**(1-3): p. 17-26.
 109. McDonagh, C., B.D. MacCraith, and A.K. McEvoy, *Tailoring of Sol-Gel Films for Optical Sensing of Oxygen in Gas and Aqueous Phase*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(1): p. 45-50.
 110. Jorge, P., et al., *Luminescence-Based Optical Fiber Chemical Sensors*. *Fiber And Integrated Optics*, 2005. **24**: p. 201-225.
 111. Kocincova, A.S., et al., *Fiber-Optic Microsensors for Simultaneous Sensing of Oxygen and pH, and of Oxygen and Temperature*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(22): p. 8486-8493.
 112. Borisov, S.M., et al., *Composite Material for Simultaneous and Contactless Luminescent Sensing and Imaging of Oxygen and Carbon Dioxide*. *Advanced Materials*, 2006. **18**(12): p. 1511-1516.
 113. Orellana, G., *Luminescent optical sensors*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004. **379**(3): p. 344-346.
 114. Papkovsky, D. and T. O'Riordan, *Emerging Applications of Phosphorescent Metalloporphyrins*. *Journal of Fluorescence*, 2005. **15**(4): p. 569-584.
-

115. Lenza, R.F.S., R.O.R. Costa, and W.L. Vasconcelos, *Obtenção e caracterização de membranas assimétricas via sol-gel*. Cerâmica, 2002. **48**: p. 49-53.
116. Lavin, P., C.M. McDonagh, and B.D. MacCraith, *Optimization of Ormosil Films for Optical Sensor Applications*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 1998. **13**: p. 641-645.
117. Mahmoud, R.S., T.M. Michael, and K. Hyeog-Chan. *Ormosil thin films for chemical sensing platforms*. 1997: SPIE.
118. McDonagh, C., et al., *Characterisation of sol-gel-derived silica films*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1996. **194**: p. 72-77.
119. *Ficha LED* [cited 15/07/09]; Available from: <http://www.philipslumileds.com/pdfs/DS23.pdf>.
120. *Ficha lente* [cited 22/01/2009]. Available from: http://www.fraensrl.com/images/FLLI_Datasheet.pdf.
121. Fogler, H.S., *Elements of Chemical Reaction Engineering*. 4 ed. 2005: Prentice Hall. 1120p.
122. Blue, R., et al., *Platform for enhanced detection efficiency in luminescence-based sensors*. ELECTRONICS LETTERS, 2005. **41**(12).
123. Pedrotti, F.L. and L.S. Pedrotti, *Introduction to optics*. 1993, Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall.
124. *Measurement contact angle* [cited 23/05/09]; Available from: <http://www.kruss.de/en/theory/measurements/contact-angle/measurement-contact-angle.html>.
125. Hartmann, P., M.J.P. Leiner, and P. Kohlbacher, *Photobleaching of a ruthenium complex in polymers used for oxygen optodes and its inhibition by singlet oxygen quenchers*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1998. **51**(1-3): p. 196-202.
126. Pieper, S.B., *Optical Properties of Ru(dpp)₃ for Phosphorescence Biosensors*. 2007, Colorado State University: Fort Collins, Colorado.
127. MacDougall, D. and W.B. Crummett, *Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry*. Analytical Chemistry, 1980. **52**(14): p. 2242-2249.
128. Mills, A. and Q. Chang, *Fluorescence plastic thin-film sensor for carbon dioxide*. Analyst, 1993. **113**: p. 839-843.
129. Mills, A. and F. Collé Williams, *Chemical influences on the luminescence of ruthenium diimine complexes and its response to oxygen*. Thin Solid Films, 1997. **306**(1): p. 163-170.
130. *ROX® Optical Dissolved Oxygen Sensor*. [cited 25/05/2009]; Available from: https://www.ysi.com/ysi/Products/Product_Family/Product?productID=EMS_SEN01_ROX.
131. DrDAQ. *DD103 Oxygen sensor* [cited 16/06/2009]; Available from: http://www.drdaq.com/oxygen_sensor.html.
132. Mettler. *InPro® 6000 Sensor Series*. [cited 25/07/2009]; Available from: <http://pt.mt.com>
133. *Vernier Tech Info Library TIL #1413*. [cited 13/07/2009]; Available from: <http://www.vernier.com/til/1413.html>.
134. *In-Situ Rugged Dissolved Oxygen* [cited 25/07/2009]; Available from: http://www.in-situ.com/In-Situ/Downloads/pdf/Brochures/SS_RDOSensor_101608_LR.pdf.
135. Ramasamy, S.M. and R.J. Hurtubise, *Oxygen sensor via the quenching of room-temperature phosphorescence of perdeuterated phenanthrene adsorbed on Whatman 1PS filter paper*. Talanta, 1998. **47**(4): p. 971-979.
136. Ogurtsov, V.I. and D.B. Papkovsky, *Selection of modulation frequency of excitation for luminescence lifetime-based oxygen sensors*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1998. **51**(1-3): p. 377-381.
137. MacCraith, B.D., et al., *Sol-gel coatings for optical chemical sensors and biosensors*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1995. **29**(1-3): p. 51-57.
138. Yappert, M.C., *A Tutorial on Fiber-Optic Chemical Sensors*. The Chemical Educator, 1997. **1**(6): p.1-10

Anexos

Temp °C	Atmospheric pressure, in millimeters of mercury																				
	795	790	785	780	775	770	765	760	755	750	745	740	735	730	725	720	715	710	705	700	
30.0	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9
30.5	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.9
31.0	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.9	6.8	6.8
31.5	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7
32.0	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.7
32.5	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6
33.0	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6
33.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5
34.0	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6	6.5	6.5	6.5
34.5	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.5	6.4	6.4
35.0	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.4	6.3
35.5	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.3
36.0	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2
36.5	7.1	7.0	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.3	6.2	6.2
37.0	7.0	7.0	6.9	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1
37.5	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6.1
38.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6.0	6.0
38.5	6.9	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6.0	6.0	6.0
39.0	6.8	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6.0	6.0	6.0	6.0
39.5	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.5	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6.0	6.0	6.0	5.9	5.9
40.0	6.7	6.7	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6.0	6.0	5.9	5.9	5.9	5.9

B – TEMPOS DE VIDA MEDIDOS E VALORES DA SUPRESSÃO OBTIDOS PARA AS FAMÍLIAS DE FILMES PRODUZIDOS (T=24 °C)

MTEOS : TEOS (1:1)									
Refer. Amostra	Tempo envelhecimento (h)	Meio aquoso				Meio gasoso			
		t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)	t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)
A	3	4.33	3.49	0.84	19.4	3.8	2.42	1.38	36.3
B	17	4.38	3.51	0.87	19.9	3.91	2.26	1.65	42.2
C	91	4.41	3.44	0.97	22.0	4.05	2.12	1.93	47.7
D	115	4.29	3.4	0.89	20.7	3.76	1.77	1.99	52.9
E	138	4.31	3.4	0.91	21.1	4.04	1.86	2.19	54.0
F	160	4.26	3.22	1.04	24.4	4.03	1.66	2.37	58.8
G	214	4.39	3.04	1.35	30.8	3.97	1.5	2.47	62.2

ETEOS : TEOS (1:1)									
Refer. Amostra	Tempo Envelhecimento (h)	Meio aquoso				Meio gasoso			
		t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)	t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)
A	22	4.56	3.39	1.17	25.7	4.74	2.58	2.16	45.6
B	89	4.56	3.28	1.28	28.1	4.73	2.54	2.19	46.3
C	188	4.71	3.23	1.48	31.4	4.87	2.43	2.45	50.1
D	257	4.74	3.17	1.57	33.1	4.89	2.44	2.45	50.1
E	306	4.79	3.17	1.62	33.8	4.94	2.37	2.57	52.0
F	350	4.67	3.08	1.6	34.0	4.91	2.33	2.58	52.5
G	426	4.58	2.91	1.66	36.5	4.87	2.09	2.78	57.1
H	470	4.61	2.89	1.72	37.3	4.97	2.21	2.77	55.5
I	645	4.57	2.71	1.85	40.7	4.88	2.09	2.79	57.2
J	713	4.57	2.66	1.91	41.8	4.89	2.11	2.78	56.9
K	806	4.48	2.42	2.06	46.0	4.94	2.15	2.79	56.5
L	931	4.33	2.08	2.25	52.0	4.91	2.09	2.82	57.4

BTEOS : TEOS (1:1)									
Refer. Amostra	Tempo Envelhecimento (h)	Meio aquoso				Meio gasoso			
		t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)	t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)
A	4	3.72	2.10	1.62	43.5	3.86	1.92	1.95	50.3
B	49	3.96	2.16	1.79	45.5	4.13	1.97	2.16	52.3
C	72	3.84	2.03	1.81	47.1	4.02	1.86	2.16	53.7
D	95	4.15	2.30	1.85	44.6	4.41	2.14	2.27	51.5
E	118	4.12	2.29	1.84	44.4	4.47	2.09	2.38	53.2
F	164	4.13	2.28	1.85	44.8	4.50	2.14	2.36	52.4
G	190	4.18	2.27	1.91	45.7	4.51	2.14	2.37	52.5
H	212	4.07	2.28	1.79	44.0	4.36	2.15	2.21	50.7
I	256	4.32	2.30	2.02	46.8	4.59	2.11	2.48	54.0
J	375	4.39	2.27	2.12	48.3	4.89	2.08	2.81	57.5

Anexos

PTEOS : TEOS (1:1)

Refer. Amostra	Tempo Envelhecimento (h)	Meio aquoso				Meio gasoso			
		t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)	t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)
A	22	4.34	3.72	0.63	14.3	4.33	2.99	1.35	31.1
B	47	4.37	3.72	0.65	14.9	4.36	2.98	1.38	31.6
C	91	4.45	3.73	0.72	16.2	4.41	3.01	1.40	31.8
D	211	4.40	3.60	0.80	18.2	4.38	2.92	1.46	33.4
E	258	4.39	3.59	0.80	18.2	4.42	2.92	1.50	33.9
F	387	4.27	3.40	0.87	20.4	4.41	2.79	1.61	36.6
G	545	4.35	3.28	1.07	24.6	4.47	2.55	1.92	43.0

MTEOS : TEOS (3:1)

Refer. Amostra	Tempo envelhecimento (h)	Meio aquoso				Meio gasoso			
		t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)	t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)
A	33	4.57	2.98	1.59	34.8	4.72	2.31	2.41	51.1
B	95	4.37	2.5	1.86	42.8	4.58	1.91	2.68	58.4
C	125	4.36	2.39	1.97	45.2	4.63	1.8	2.82	61.0
D	169	4.3	2.23	2.07	48.1	4.61	1.69	2.92	63.3

ETEOS : TEOS (3:1)

Refer. Amostra	Tempo envelhecimento (h)	Meio aquoso				Meio gasoso			
		t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)	t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)
A	26	4.49	2.43	2.06	45.9	4.83	2.42	2.41	49.9
B	58	4.68	2.47	2.21	47.2	5.00	2.39	2.61	52.3
C	121	4.66	2.44	2.22	47.6	5.02	2.37	2.65	52.8
D	152	4.97	2.55	2.42	48.7	5.34	2.42	2.91	54.6
E	194	4.97	2.55	2.42	48.7	5.33	2.44	2.89	54.3
F	263	4.92	2.52	2.41	48.8	5.31	2.41	2.90	54.6
G	361	5.08	2.56	2.52	49.6	5.46	2.42	3.03	55.6
H	429	5.10	2.54	2.56	50.2	5.49	2.45	3.04	55.4
I	479	5.15	2.57	2.58	50.1	5.52	2.46	3.06	55.4
J	522	5.11	2.53	2.58	50.5	5.5	2.41	3.10	56.3
K	599	5.13	2.53	2.60	50.7	5.52	2.41	3.11	56.3
L	694	5.15	2.56	2.59	50.3	5.46	2.34	3.13	57.2
M	819	5.12	2.51	2.61	51.0	5.39	2.20	3.18	59.1
N	980	5.02	2.43	2.59	51.6	5.50	2.22	3.28	59.6

PTEOS : TEOS (3:1)

Refer. Amostra	Tempo envelhecimento (h)	Meio aquoso				Meio gasoso			
		t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)	t _{N2} (μs)	t _{Ar} (μs)	Δt (μs)	Supr.(%)
A	21	4.7	3.80	0.90	19.1	4.94	3.68	1.26	25.4
B	72	4.64	3.63	1.01	21.8	4.82	3.51	1.31	30.3
C	163	4.76	3.72	1.03	21.8	4.98	3.62	1.36	30.6
D	183	4.73	3.69	1.05	22.0	4.93	3.58	1.35	31.5
E	254	4.75	3.60	1.15	24.2	4.95	3.45	1.50	30.3
F	333	4.78	3.58	1.2	25.1	4.96	3.32	1.64	33.2