

## Capítulo 15

# Espectrometria de Luminescência Molecular

**T**rês tipos de métodos ópticos relacionados entre si são abordados neste capítulo, a saber: **fluorescência molecular**, **fosforescência** e **quimiluminescência**. Em todos eles, moléculas do analito são excitadas para resultar em uma espécie cujo espectro de emissão fornece informação para análise qualitativa ou quantitativa. Esses procedimentos são conhecidos coletivamente como métodos de **luminescência molecular**.

A fluorescência e a fosforescência são similares, no tocante em que a excitação é feita por absorção de fótons. Conseqüentemente, os dois fenômenos são freqüentemente mencionados pelo termo mais genérico **fotoluminescência**. Como será mostrado a seguir, a fluorescência difere da fosforescência pelo fato de que as transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência não envolvem uma mudança de spin eletrônico. Conseqüentemente, a fluorescência apresenta tempo de vida curto, com a luminescência cessando quase imediatamente ( $< 10^{-5}$  s). Em contraste, uma mudança no spin eletrônico acompanha a emissão por fosforescência, o que faz com que a radiação se mantenha por um tempo facilmente detectável após o término da irradiação – freqüentemente vários segundos ou ainda mais. Na maior parte dos casos, a emissão de fotoluminescência, seja fluorescência ou fosforescência, tem comprimento de onda maior que a radiação usada para a sua excitação.

A quimiluminescência está baseada no espectro de emissão de uma espécie excitada que é formada no decorrer de uma reação química. Em algumas circunstâncias, a espécie excitada é o produto de uma reação entre o analito e um reagente apropriado (normalmente um oxidante forte, como ozônio ou peróxido de hidrogênio); o resultado é um espectro característico do **produto de oxidação** do analito ou do reagente, em vez daquele do próprio analito. Em outras circunstâncias, o analito não está di-

retamente envolvido na reação de quimiluminescência; o efeito de inibição ou catalítico do analito sobre uma reação quimiluminescente serve como parâmetro analítico.

A medida da intensidade de fotoluminescência ou quimiluminescência permite a determinação quantitativa de uma variedade de espécies orgânicas e inorgânicas importantes a níveis de traço. Atualmente, o número de métodos fluorimétricos é significativamente maior que o número de aplicações de procedimentos de fosforescência e quimiluminescência.

Um dos aspectos mais atraentes dos métodos de luminescência é a sua sensibilidade intrínseca, com limites de detecção freqüentemente de uma a três ordens de grandeza menores que os encontrados em espectroscopia de absorção. Os limites de detecção típicos estão na faixa de partes por bilhão.

Outra vantagem dos métodos fotoluminescentes é a sua extensa faixa de concentração linear, que, com freqüência, é significativamente maior que as encontradas em métodos de absorção. Devido à sua alta sensibilidade, os métodos de luminescência quantitativos estão sujeitos a efeitos de interferência sérios das matrizes das amostras. Por essa razão, as medições de luminescência são freqüentemente combinadas com técnicas esplêndidas de separação da cromatografia e da eletroforese. Detectores de fluorescência são valiosos como detectores para cromatografia líquida (Capítulo 28) e eletroforese capilar (Capítulo 30) devido à sua sensibilidade incomum.

Geralmente os métodos de luminescência apresentam aplicação menos ampla para análise quantitativa que os métodos de absorção, porque um número muito maior de espécies absorve radiação ultravioleta/visível do que exibe fotoluminescência sob absorção de radiação nessa região do espectro.<sup>1</sup>

## 15A TEORIA DA FLUORESCÊNCIA E FOSFORESCÊNCIA

A fluorescência ocorre em sistemas químicos gasosos, líquidos e sólidos simples, bem como em sistemas complexos. A espécie mais simples de fluorescência é aquela apresentada por vapores atômicos diluídos, descrita no Capítulo 9. Por exemplo, os elétrons  $3s$  de átomos de vapor de sódio podem ser excitados ao estado  $3p$  por absorção de radiação de comprimentos de onda de 5.896 e 5.890 Å. Após  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  s, os elétrons voltam ao estado fundamental e, ao fazer isso, emitem radiação dos mesmos dois comprimentos de onda em todas as direções. Esse tipo de fluorescência, em que a radiação absorvida é reemitida sem mudança de frequência, é conhecida como *radiação de ressonância* ou *fluorescência de ressonância*.

Muitas espécies moleculares também exibem fluorescência de ressonância. Muito mais freqüentemente, no entanto, as bandas de fluorescência molecular (ou fosforescência) são encontradas centradas em comprimentos de onda que são maiores que a linha de ressonância. Esse deslocamento para comprimentos de onda maiores é denominado *deslocamento Stokes*.

### 15A-1 Estados Excitados que Produzem Fluorescência e Fosforescência

As características dos espectros de fluorescência e fosforescência podem ser racionalizadas pelas considerações simples de orbitais moleculares descritas na Seção 14B-1. No entanto, um entendimento da diferença entre os dois fenômenos fotoluminescentes requer uma revisão sobre *spin eletrônico* e estados *excitados singletes/tripletes*.

#### Spin Eletrônico

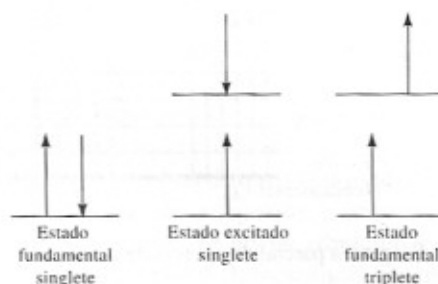
O princípio de exclusão de Pauli diz que quaisquer dois elétrons em um átomo não podem ter os mesmos valores dos quatro números quânticos. Essa restrição exige que não mais de dois elétrons possam ocupar um orbital e, mais ainda, os dois devem ter estados de spin opostos. Nessa circunstância, diz-se que os spins estão emparelhados. Assim, a maioria das moléculas não apresenta campo magnético intrínseco sendo denominada *diamagnética*, isto é, não é atraída nem repelida por campos magnéticos estáticos. Em contraste, os radicais livres, que contêm elétrons desemparelhados, têm momento magnético e conseqüentemente são atraídos por um campo magnético; radicais livres são, então, *paramagnéticos*.

<sup>1</sup> Para discussão suplementar sobre teoria e aplicações de fluorescência, fosforescência e luminescência, veja *Molecular Luminescence Spectroscopy*, S. Schulman, Ed. New York: Wiley, Part 1, 1985; Part 2, 1988, Part 3, 1993; E. L. Wehry, in *Physical Methods of Chemistry*, 2nd ed., Volume VIII, Chapter 3, B. W. Rossiter and R. C. Baetzold, Eds. New York: Wiley, 1993; J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983; G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1990.

### Estados Excitados Singlete/Triplete

Um estado *eletrônico* molecular no qual todos os spins eletrônicos estão emparelhados é chamado estado *singlete* e nenhuma separação de níveis de energia ocorre quando a molécula é exposta a um campo magnético. O estado fundamental para um radical livre, por outro lado, é um estado *dublete*, porque o elétron isolado pode ter duas orientações em um campo magnético, o que dá energias diferentes ao sistema.

Quando um elétron de um par em uma molécula é excitado a um nível mais alto de energia, forma-se um estado *singlete* ou um *triplete*. No estado excitado *singlete*, o spin do elétron promovido ainda está emparelhado com o elétron no estado fundamental; no estado *triplete*, entretanto, os spins dos dois elétrons ficaram desemparelhados e são, desta forma, paralelos. Esses estados podem ser representados como se segue, com as setas representando as direções de spin:



A nomenclatura *singlete*, *dublete* e *triplete* vem de considerações espectroscópicas de *multiplicidade*, com as quais não precisamos nos preocupar aqui. Observe que o estado excitado *triplete* tem energia menor que o estado *singlete* correspondente.

As propriedades de uma molécula no estado excitado *triplete* diferem muito daquelas do estado excitado *singlete*. Por exemplo, uma molécula é *paramagnética* no estado *triplete* e *diamagnética* no *singlete*. Mais importante é, no entanto, o fato que uma transição *singlete/triplete* (ou o oposto), que também envolve uma mudança de estado eletrônico, é um evento significativamente menos provável que a transição *singlete/singlete* correspondente. Como conseqüência, o tempo de vida médio de um estado excitado *triplete* pode variar de  $10^{-4}$  a vários segundos, em comparação com o tempo de vida médio de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  s para um estado excitado *singlete*. Mais ainda, a excitação induzida por radiação de uma molécula no estado fundamental a um estado excitado *triplete* tem pouca probabilidade de ocorrer e os picos de absorção decorrentes desse processo são ordens de magnitude menores que as transições *singlete/singlete* análogas. Veremos, no entanto, que um estado excitado *triplete* pode ser povoado a partir de um estado *excitado* *singlete* em certas moléculas; a conseqüência final desse processo é, freqüentemente, a *fosforescência*.

### Diagrama de Níveis de Energia de Moléculas Fotoluminescentes

A Figura 15-1 mostra um diagrama parcial de níveis de energia de uma molécula fotoluminescente típica. A linha horizontal grossa mais inferior representa a energia do estado fundamental da molécula, que é normalmente um estado *singlete* e é designa-

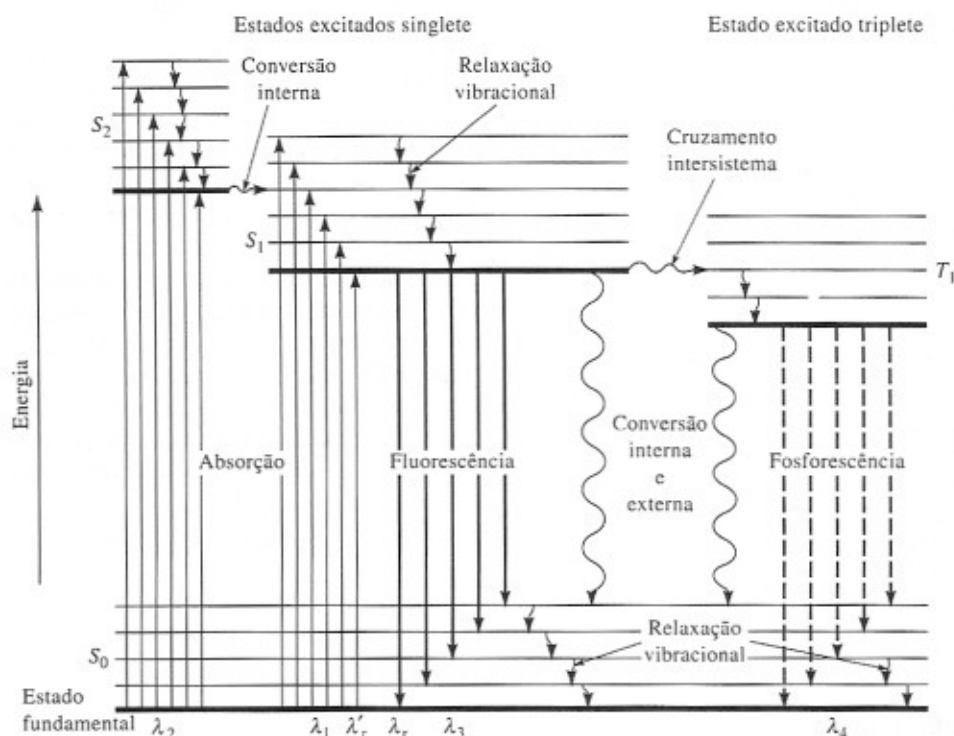


Figura 15-1 Diagrama parcial de energia de um sistema fotoluminescente.

do  $S_0$ . À temperatura ambiente, esse estado representa as energias de essencialmente todas as moléculas em uma solução.

As linhas grossas superiores são os níveis de energia para os estados fundamentais vibracionais de três estados eletrônicos excitados. As duas linhas à esquerda representam o primeiro ( $S_1$ ) e segundo ( $S_2$ ) estados eletrônicos excitados *singletes*. A da direita ( $T_1$ ) representa a energia do primeiro estado eletrônico *tripleto*. Como é normalmente o caso, a energia do primeiro estado excitado tripleto é menor que a energia do estado singleto correspondente.

Numerosos níveis de energia vibracionais estão associados a cada um dos quatro estados eletrônicos, conforme sugerido pelas linhas horizontais mais finas.

Conforme mostrado na Figura 15-1, a excitação dessa molécula pode ser conseguida pela absorção de duas bandas de radiação, uma centrada no comprimento de onda  $\lambda_1$  ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) e a segunda no comprimento de onda menor  $\lambda_2$  ( $S_0 \rightarrow S_2$ ). Observe que o processo de excitação resulta na conversão da molécula em qualquer dos estados excitados vibracionais. Note ainda que a excitação direta ao estado tripleto não está mostrada porque essa transição não ocorre de modo significativo, uma vez que esse processo envolve mudança de multiplicidade, um evento que, conforme mencionamos, tem probabilidade de ocorrência baixa (uma transição de baixa probabilidade desse tipo é chamada *proibida*).

### 15A-2 Velocidades de Absorção e Emissão

A velocidade com a qual um fóton é absorvido é altíssima; o processo requer de  $10^{-14}$  a  $10^{-15}$  s. A emissão de fluorescência, por

outro lado, ocorre a uma velocidade significativamente menor. Aqui, o tempo de vida do estado excitado está inversamente relacionado à absorvidade molar do pico de absorção correspondente ao processo de excitação. Assim, para absorvidades molares no intervalo de  $10^3$  a  $10^5$ , os tempos de vida dos estados excitados são de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  s. Em sistemas fracamente absorventes, nos quais a probabilidade do processo de transição é menor, os tempos de vida podem ser longos como  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  s. Conforme notamos, a velocidade média de uma transição de tripleto para singleto é menor que a de uma transição de singleto para singleto correspondente. Assim, a emissão de fosforescência requer tempos na faixa de  $10^{-4}$  a 10 s ou mais.

### 15A-3 Processos de Desativação

Uma molécula excitada pode voltar ao seu estado fundamental por uma combinação de várias etapas mecânicas. Conforme mostrado pelas flechas retas verticais na Figura 15-1, duas dessas etapas, fluorescência e fosforescência, envolvem a emissão de um fóton de radiação. As outras etapas de desativação, indicadas por flechas sinuosas, são processos não-radiativos. A trajetória favorecida para o estado fundamental é aquela que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Assim, se a desativação por fluorescência é rápida em relação aos processos sem radiação, tal emissão é observada. Por outro lado, se uma trajetória não-radiativa tem uma constante de velocidade mais favorável, ou não há fluorescência ou é pouco intensa.

A fotoluminescência está limitada a um número relativamente pequeno de sistemas que incorporam características estruturais e ambientais que provocam uma desaceleração dos processos de

relaxação ou desativação não-radiativos a tal ponto que a emissão pode competir cineticamente. O conhecimento a respeito dos processos de emissão é completo o suficiente para permitir que considerações quantitativas das suas velocidades sejam feitas. No entanto, a compreensão dos outros caminhos de desativação é, na melhor das hipóteses, rudimentar; para esses processos, apenas regras qualitativas ou especulações sobre velocidades e mecanismos podem ser propostos. Apesar disso, a interpretação da fotoluminescência necessita considerações destas outras rotas.

### Relaxação Vibracional

Conforme mostrado na Figura 15-1, uma molécula pode ser levada a qualquer um de vários níveis vibracionais durante o processo de excitação eletrônica. Em solução, no entanto, a energia vibracional em excesso é perdida imediatamente, como consequência de colisões entre as moléculas da espécie excitada e as do solvente; o resultado é uma transferência de energia e um aumento minúsculo da temperatura do solvente. Esse processo de relaxação é tão eficiente que o tempo de vida médio de uma molécula excitada *vibracionalmente* é  $10^{-12}$  s ou menos, um período significativamente menor que o tempo de vida médio de um estado excitado *eletronicamente*. Como consequência, a fluorescência de uma solução, quando ocorre, envolve uma transição *a partir do nível vibracional mais baixo de um estado eletrônico excitado*. Vários picos proximamente espaçados são produzidos, no entanto, uma vez que a molécula pode retornar para *qualquer um dos níveis vibracionais do estado fundamental* (Figura 15-1), de onde ela cairá rapidamente ao nível vibracional mais baixo do estado eletrônico fundamental por relaxação vibracional subsequente.

Uma consequência da eficiência da relaxação vibracional é que a banda de fluorescência para uma dada transição eletrônica está deslocada para frequências mais baixas ou comprimentos de onda maiores em relação à banda de absorção (deslocamento Stokes); a superposição ocorre para o pico de ressonância envolvendo transições entre o nível vibracional mais baixo do estado fundamental e o nível correspondente de um estado excitado. Na Figura 15-1, o comprimento de onda da radiação absorvida que produz o pico de ressonância  $\lambda_r$  é designado  $\lambda_r'$ .

### Conversão Interna

O termo *conversão interna* descreve processos intermoleculares pelos quais uma molécula passa para um estado *eletrônico* de energia menor sem emissão de radiação. Esses processos não são bem-definidos nem bem-compreendidos, mas é evidente que são altamente eficientes, porque relativamente poucos compostos exibem fluorescência.

A conversão interna parece ser particularmente eficiente quando dois níveis eletrônicos de energia estão próximos o suficiente para que haja uma superposição de níveis de energia vibracionais. Essa situação está representada para os dois estados excitados singletes na Figura 15-1. Nas superposições mostradas, as energias potenciais dos dois estados excitados são idênticas; essa igualdade aparentemente permite uma transição eficiente. A conversão interna através de níveis vibracionais superpostos é geralmente mais provável que a perda de energia por fluorescência a partir de um estado excitado mais alto. Assim, re-

ferindo-nos ainda à Figura 15-1, a excitação pela banda de radiação designada  $\lambda_2$  normalmente produz uma banda de fluorescência centrada em  $\lambda_3$ , excluindo uma banda que poderia resultar de uma transição entre  $S_2$  e  $S_0$ . Aqui, a molécula excitada passa do estado eletrônico mais alto ao nível de energia vibracional mais baixo do estado eletrônico excitado inferior por meio de uma série de relaxações vibracionais, uma conversão interna e depois relaxações subsequentes. Nessas circunstâncias, a fluorescência ocorre *somente* em  $\lambda_3$ , não importando qual radiação de comprimento de onda  $\lambda_1$  ou  $\lambda_2$  foi a responsável pela excitação. O quiniño fornece um exemplo clássico desse tipo de comportamento (ver Problema 15-11); essa substância de ocorrência natural tem duas bandas de excitação analiticamente úteis, uma centrada em 250 nm e a outra em 350 nm. Independentemente de qual comprimento de onda seja usado para excitar a molécula, o comprimento de onda de máxima emissão é 450 nm (Figura 15-2).

Os mecanismos do processo de conversão interna  $S_1 \rightarrow S_0$  mostrado na Figura 15-1 não são bem compreendidos. Os níveis vibracionais do estado fundamental podem se superpor aos do primeiro estado eletrônico excitado; nessas circunstâncias, a desativação ocorrerá rapidamente pelo mecanismo que acabamos de descrever. Essa situação prevalece em compostos alifáticos, por exemplo, e explica o fato de que essas espécies quase nunca fluorescem; nessa classe de compostos, a desativação por transferência de energia através de níveis vibracionais superpostos ocorre tão rapidamente que a fluorescência não tem tempo de acontecer.

A conversão interna pode ainda resultar no fenômeno da *pré-dissociação*. Aqui, a molécula vai de um nível eletrônico superior para um nível vibracional superior de um estado eletrônico mais baixo, no qual a energia vibracional é grande o suficiente para causar ruptura de uma ligação. Em uma molécula grande, há uma probabilidade apreciável da existência de ligações com força menor que a energia de excitação eletrônica dos cromóforos. A ruptura dessas ligações pode ocorrer como consequência da absorção pelo cromóforo, seguida por conversão interna da energia eletrônica para a energia vibracional associada à ligação fraca.

A pré-dissociação deve ser diferenciada da *dissociação*, na qual a energia absorvida excita um cromóforo diretamente a um nível vibracional alto o suficiente para causar uma ruptura da ligação cromofórica; a conversão interna não está envolvida. Os processos de dissociação também competem com o processo de fluorescência.

### Conversão Externa

A desativação de um estado eletrônico excitado pode envolver interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos. Esses processos são chamados coletivamente *conversão externa*, ou *supressão (ou extinção) por colisão (collisional quenching, em inglês)*. A evidência para a conversão externa inclui o efeito marcante exercido pelo solvente sobre a intensidade de fluorescência; mais ainda, condições que tendem a reduzir o número de colisões entre partículas (baixa temperatura e alta viscosidade) geralmente aumentam a fluorescência. Os detalhes dos processos de conversão externa não são bem-compreendidos.

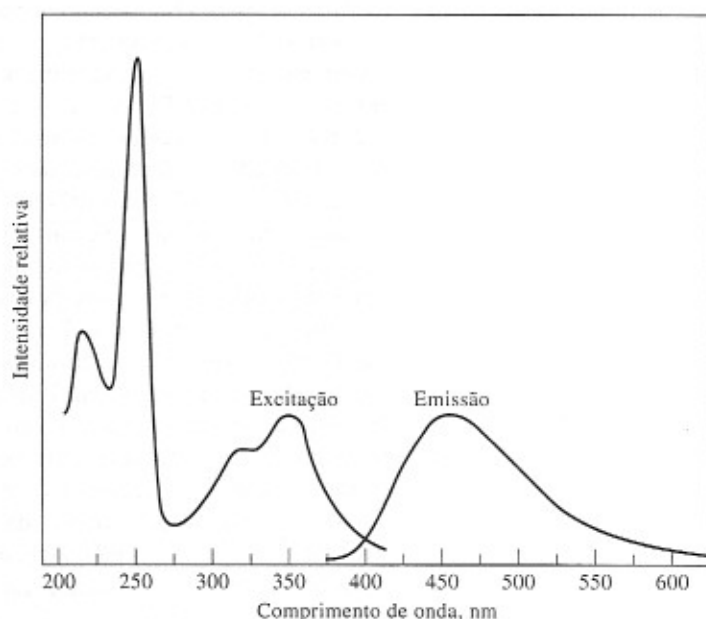


Figura 15-2 Espectros de excitação e emissão de fluorescência de uma solução de quinino.

As transições não-radiativas para o estado fundamental a partir dos estados excitados singlete e triplete mais baixos (Figura 15-1) provavelmente envolvem conversões externas e internas.

#### Cruzamento Intersistema

O cruzamento intersistema é um processo no qual o spin de um elétron excitado é invertido resultando uma mudança na multiplicidade da molécula. Do mesmo modo que na conversão interna, a probabilidade dessa transição é aumentada se os níveis vibracionais dos dois estados se interpenetram. A transição singlete/triplete mostrada na Figura 15-1 é um exemplo: o estado vibracional inferior do singlete se superpõe a um dos níveis vibracionais superiores do triplete e uma mudança no estado do spin é mais provável.

O cruzamento intersistema é mais comum em moléculas que contêm átomos pesados, como iodo ou bromo (*efeito do átomo pesado*). As interações spin-órbita se tornam maiores na presença de tais átomos e, assim, uma mudança de spin é mais favorável. A presença de espécies paramagnéticas, tal como oxigênio molecular, na solução também facilita o cruzamento intersistema e um conseqüente decréscimo na fluorescência.

#### Fosforescência

A desativação de estados eletrônicos excitados pode também envolver a fosforescência. Depois do cruzamento intersistema para um estado triplete, uma desativação subsequente pode ocorrer, seja por conversão interna ou externa, seja por fosforescência. Uma transição triplete  $\rightarrow$  singlete é muito menos provável que uma conversão singlete/singlete; assim, como já foi mencionado, o tempo de vida médio do estado excitado triplete em relação à emissão varia de  $10^{-4}$  a 10 s ou mais. Então, a emissão a partir de

tal transição pode persistir por algum tempo após a irradiação ter sido interrompida.

As conversões externa e interna competem de modo tão bem-sucedido com a fosforescência que esse tipo de emissão é normalmente observado apenas a baixas temperaturas, em meios altamente viscosos, ou em moléculas que estão adsorvidas em superfícies sólidas.

#### 15A-4 Variáveis que Afetam a Fluorescência e a Fosforescência

A estrutura molecular, assim como o ambiente químico, influenciam a ocorrência ou não da luminescência de uma molécula; esses fatores também determinam a intensidade da emissão, quando esta ocorre. Os efeitos de algumas dessas variáveis serão considerados brevemente nesta seção.

#### Rendimento Quântico

O rendimento quântico, ou *eficiência quântica*, para fluorescência ou fosforescência é simplesmente a razão do número de moléculas que luminescem pelo número total de moléculas excitadas. Para uma molécula altamente fluorescente, como fluoresceína, a eficiência quântica em algumas condições se aproxima da unidade. Espécies químicas que não fluorescem apreciavelmente têm eficiências quânticas que se aproximam de zero.

A Figura 15-1 e a nossa discussão, sobre os processos de desativação sugerem que o rendimento quântico de fluorescência  $\phi$  de um composto é determinado pelas constantes de velocidades relativas  $k_x$  dos processos pelos quais o estado excitado singlete mais baixo é desativado – a saber, fluorescência ( $k_f$ ), cruzamento intersistema ( $k_i$ ), conversão externa ( $k_{ce}$ ), conversão interna

( $k_{ci}$ ), pré-dissociação ( $k_{pd}$ ) e dissociação ( $k_d$ ). Podemos expressar essas relações pela equação

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ce} + k_{ci} + k_{pd} + k_d} \quad (15-1)$$

onde os termos  $k$  são as constantes de velocidades respectivas para os vários processos mencionados acima.

A Equação 15-1 permite uma interpretação qualitativa de muitos dos fatores estruturais e ambientais que influenciam a intensidade da fluorescência. As variáveis que conduzem a valores altos da constante de velocidade de fluorescência  $k_f$  e valores baixos para os outros termos em  $k$  aumentam a fluorescência. A magnitude de  $k_f$ , a constante de velocidade de pré-dissociação  $k_{pd}$  e a constante de velocidade de dissociação  $k_d$  são dependentes principalmente da estrutura química; as constantes restantes são fortemente influenciadas pelo ambiente e em menor grau pela estrutura.

### Tipos de Transições na Fluorescência

É importante observar que a fluorescência dificilmente resulta da absorção de radiação ultravioleta de comprimentos de onda menores que 250 nm, porque tal radiação é suficientemente energética para causar desativação dos estados excitados por pré-dissociação ou dissociação. Por exemplo, a radiação de 200 nm corresponde a aproximadamente 140 kcal/mol; a maior parte das moléculas orgânicas tem pelo menos algumas ligações que podem ser rompidas por energias dessa magnitude. Como consequência, a fluorescência devido a transições  $\sigma^* \rightarrow \sigma$  dificilmente é observada; em vez disso, essa emissão fica restrita aos processos menos energéticos  $\pi^* \rightarrow \pi$  e  $\pi^* \rightarrow n$  (ver Figura 14-3 para observar as energias relativas associadas a essas transições).

Como já notamos, normalmente uma molécula excitada eletronicamente volta ao seu estado *excitado mais baixo* por uma série de relaxações vibracionais rápidas e conversões internas que não produzem emissão de radiação. Assim, a fluorescência comumente se origina de uma transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado eletrônico excitado para um dos níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental. Para a maior parte dos compostos fluorescentes, então, a radiação é produzida por uma transição  $n \rightarrow \pi^*$  ou  $\pi \rightarrow \pi^*$ , dependendo de qual das duas é a menos energética.

### Eficiência Quântica e Tipo de Transição

Observa-se empiricamente que a fluorescência é mais comumente encontrada em compostos nos quais as transições de menor energia são do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  que em compostos nos quais a transição de menor energia é do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , isto é, a eficiência quântica é maior para transições  $\pi^* \rightarrow \pi$ .

A eficiência quântica maior associada ao processo  $\pi \rightarrow \pi^*$  pode ser racionalizada de dois modos. Em primeiro lugar, a absorvidade molar de uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  é normalmente 100 a 1.000 vezes maior que para um processo  $n \rightarrow \pi^*$  e essa grandeza representa uma medida da probabilidade de transição em qualquer direção. Assim, o tempo de vida intrínseco associado a uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  é menor ( $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  s em comparação

com  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  s para uma transição  $n \rightarrow \pi^*$ ) e  $k_f$  na Equação 15-1 é maior.

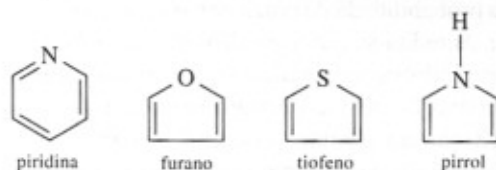
Considerações termodinâmicas sugerem que a velocidade de cruzamento intersistema  $k_i$  é menor para estados excitados  $\pi \rightarrow \pi^*$  porque a diferença de energia entre os estados singlete e tripleto é maior; isto é, mais energia é necessária para desemparelhar os elétrons do estado excitado  $\pi^*$ . Como consequência, a superposição dos níveis vibracionais do tripleto com os do singlete é menor, bem como a probabilidade de um cruzamento intersistema.

Em resumo, a fluorescência está mais comumente associada a transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  porque apresentam tempos de vida médios menores ( $k_f$  é maior) e porque os processos de desativação que competem com a fluorescência são de ocorrência menos provável.

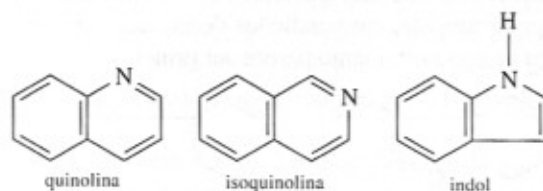
### Fluorescência e Estrutura

A fluorescência mais intensa e mais útil é encontrada em compostos contendo grupos funcionais aromáticos com níveis de transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  de baixa energia. Compostos contendo estruturas alifáticas, alicíclicas carbonílicas ou estruturas de ligações duplas altamente conjugadas também podem apresentar fluorescência, mas em menor número se comparado ao dos sistemas aromáticos.

A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos não-substituídos fluoresce em solução e a eficiência quântica aumenta com o número de anéis e seu grau de condensação. Os heterocíclicos simples, como piridina, furano, tiofeno e pirrol,



não apresentam fluorescência; por outro lado, estruturas com anéis condensados apresentam. Acredita-se que, em compostos heterocíclicos nitrogenados, a transição eletrônica de nível mais baixo seja um processo  $n \rightarrow \pi^*$  que rapidamente se converte em um estado tripleto e previne a fluorescência. A condensação de anéis benzênicos a núcleos heterocíclicos, no entanto, resulta em um aumento da absorvidade molar do pico de absorção. O tempo de vida de um estado excitado é menor em tais estruturas; a fluorescência é então observada em compostos como quinolina, isoquinolina e indol.



A substituição no anel benzênico causa deslocamentos nos comprimentos de onda dos máximos de absorção e mudanças correspondentes nos picos de fluorescência. Adicionalmente, a substituição afeta, com frequência, a eficiência de fluorescência; alguns desses efeitos estão ilustrados nos dados para derivados do benzeno na Tabela 15-1.

TABELA 15-1 Efeito da Substituição na Fluorescência do Benzeno<sup>a</sup>

Composto	Fórmula	Comprimento de Onda da Fluorescência, nm	Intensidade Relativa da Fluorescência
Benzeno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	270-310	10
Tolueno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	270-320	17
Propilbenzeno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	270-320	17
Fluorobenzeno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> F	270-320	10
Clorobenzeno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	275-345	7
Bromobenzeno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Br	290-380	5
Iodobenzeno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> I	-	0
Fenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	285-365	18
Íon fenolato	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sup>-</sup>	310-400	10
Anisol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>3</sub>	285-345	20
Anilina	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	310-405	20
Íon anilíneo	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-	0
Ácido benzóico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COOH	310-390	3
Benzonitrila	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CN	280-360	20
Nitrobenzeno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	-	0

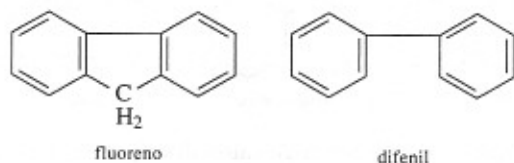
<sup>a</sup>Em solução etanólica.

A influência de substituição por halogênios é notável: o decréscimo na fluorescência ao se aumentar o número atômico do halogênio é atribuído em parte ao efeito de átomo pesado, que aumenta a probabilidade de cruzamento intersistema para o estado triplete. Acredita-se que a pré-dissociação tenha um papel importante em iodobenzeno e nitroderivados também; esses compostos têm ligações de fácil ruptura que podem absorver a energia de excitação em seguida à conversão interna.

A substituição de um grupo carboxílico ou carbonílico em um anel aromático geralmente inibe a fluorescência. Nesses compostos, a energia da transição  $n \rightarrow \pi^*$  é menor que na transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ ; como já mencionamos anteriormente, o rendimento de fluorescência do primeiro tipo de sistema é normalmente baixo.

### Efeito da Rigidez Estrutural

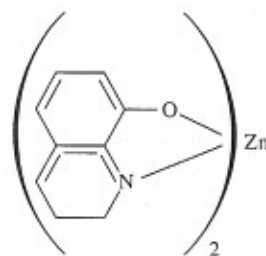
Sabe-se empiricamente que a fluorescência é favorecida em moléculas que possuem estruturas rígidas. Por exemplo, as eficiências quânticas de fluoreno e difenil são aproximadamente 1,0 e 0,2, respectivamente, em condições de medida semelhantes. A diferença de comportamento parece ser principalmente



um resultado do aumento da rigidez causado pelo grupo metileno no fluoreno. Muitos exemplos similares podem ser citados.

A influência da rigidez tem sido também lembrada para explicar o aumento na fluorescência de determinados agentes que-

lantes orgânicos quando eles estão complexados com um íon metálico. Por exemplo, a intensidade de fluorescência da 8-hidroxi-quinolina é muito menor que a do complexo de zinco:



A falta de rigidez em uma molécula causa, provavelmente, um aumento na constante de conversão interna ( $k_{ci}$  na Equação 15-1) e um conseqüente aumento na facilidade de desativação não-radiativa. Uma parte de uma molécula não-rígida pode executar vibrações de frequência baixa em relação às outras partes; esses movimentos indubitavelmente explicam alguma perda de energia.

### Efeitos do Solvente e da Temperatura

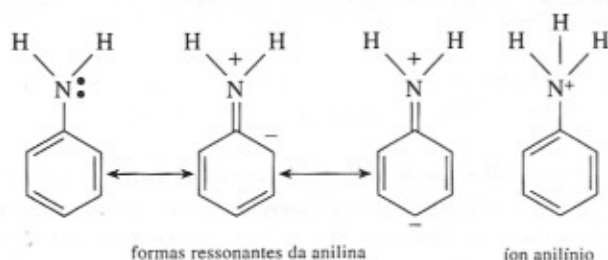
A eficiência quântica de fluorescência, na maioria das moléculas, decresce com o aumento na temperatura, porque um aumento na frequência das colisões em temperaturas elevadas aumenta a probabilidade de desativação por conversão externa. Um decréscimo na viscosidade do solvente também aumenta a facilidade de conversão externa e leva ao mesmo resultado.

A fluorescência de uma molécula é diminuída por solventes contendo átomos pesados ou outros solutos com tais átomos em suas estruturas; o tetrabrometo de carbono e iodeto de etila são exemplos. O efeito é semelhante ao que ocorre quando compos-

tos fluorescentes são substituídos com átomos pesados; interações spin-órbita causam um aumento na velocidade da formação de tripleto e um correspondente decréscimo na fluorescência. Compostos contendo átomos pesados são frequentemente incorporados em solventes quando deseja-se uma maior fosforescência.

### Efeito do pH na Fluorescência

A fluorescência de um composto aromático com substituintes ácidos ou básicos no anel é normalmente dependente do pH. Tanto o comprimento de onda como a intensidade de emissão possivelmente serão diferentes para as formas ionizada e não-ionizada do composto. Os dados para fenol e anilina mostrados na Tabela 15-1 ilustram esse efeito. As mudanças na emissão de compostos desse tipo surgem do número diferente de espécies ressonantes associadas às formas básica e ácida das moléculas. Por exemplo, a anilina tem várias formas ressonantes, enquanto que o íon anilínio tem apenas uma, isto é,



As formas ressonantes adicionais tornam o primeiro estado excitado mais estável; consequência é a fluorescência na região ultravioleta.

A fluorescência de certos compostos em função do pH tem sido utilizada para a detecção de pontos finais em titulações ácido/base. Por exemplo, a fluorescência da forma fenólica do ácido 1-naftol-4-sulfônico não é detectável visualmente, uma vez que ocorre na região ultravioleta. Quando o composto é convertido ao íon fenolato por adição de base, no entanto, o pico de emissão se desloca para comprimentos de onda no visível, onde ele pode facilmente ser visto. É interessante que essa variação ocorre em um pH que é diferente do que seria previsto a partir da constante de dissociação ácida do composto. A explicação para essa discrepância é que a constante de dissociação ácida da molécula *excitada* é diferente daquela da mesma espécie no estado fundamental. Variações nas constantes de dissociação básica ou ácida com a excitação são comuns e são ocasionalmente grandes, da ordem de quatro ou cinco ordens de magnitude.

Essas observações sugerem que procedimentos analíticos baseados na fluorescência frequentemente requerem um controle rigoroso do pH.

### Efeito do Oxigênio Dissolvido

A presença de oxigênio dissolvido frequentemente reduz a intensidade de fluorescência de uma solução. Esse efeito pode ser o resultado de uma oxidação da espécie fluorescente, induzida fotoquimicamente. Mais comumente, no entanto, a supressão acontece como consequência das propriedades paramagnéticas

do oxigênio molecular, que promove cruzamento intersistema e conversão das moléculas excitadas ao estado tripleto. Outras espécies paramagnéticas também tendem a suprimir a fluorescência.

### Efeito da Concentração na Intensidade de Fluorescência

A potência de emissão de fluorescência  $F$  é proporcional à potência radiante do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema, isto é,

$$F = K'(P_0 - P) \quad (15-2)$$

onde  $P_0$  é a potência do feixe que incide na solução e  $P$  é a potência após atravessar uma distância  $b$  do meio. A constante  $K'$  depende da eficiência quântica do processo de fluorescência. Para relacionarmos  $F$  com a concentração da espécie fluorescente  $c$ , escrevemos a lei de Beer na forma

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc} \quad (15-3)$$

onde  $\epsilon$  é a absorvidade molar das moléculas fluorescentes e  $\epsilon bc$  é a absorvância  $A$ . Substituindo a Equação 15-3 na Equação 15-2, obtemos

$$F = K'P_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (15-4)$$

O termo exponencial na Equação 15-4 pode ser expandido em série de Maclaurin:

$$F = K'P_0 \left[ 2,303\epsilon bc - \frac{(2,303\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303\epsilon bc)^3}{3!} \dots \right] \quad (15-5)$$

Uma vez que  $2,303 \epsilon bc = A < 0,05$ , todos os termos subsequentes entre parênteses são pequenos em relação ao primeiro; nestas condições, o erro relativo máximo causado por se desprezar estes termos, exceto o primeiro, é 0,13%. Assim, podemos escrever

$$F = 2,3 K' \epsilon bc P_0 \quad (15-6)$$

ou, com  $P_0$  constante,

$$F = Kc \quad (15-7)$$

Assim, um gráfico da potência de fluorescência de uma solução em função da concentração da espécie emissora deveria ser linear para concentrações baixas. Quando  $c$  se torna grande o suficiente para que a absorvância seja maior que 0,05, os termos de ordem maior na Equação 15-5 tornam-se importantes e a linearidade é perdida;  $F$ , então, situa-se abaixo de uma extrapolação da parte linear.

Dois outros fatores, também responsáveis por desvios negativos da linearidade em concentrações altas, são a *auto-supressão* e a *auto-absorção*. A primeira é resultado de colisões entre moléculas excitadas. Ocorre uma transferência de energia não-radiativa, talvez de modo semelhante à transferência para moléculas do solvente na conversão externa. Espera-se que a *auto-supressão* aumente com a concentração pela maior probabilidade da ocorrência de colisões.