

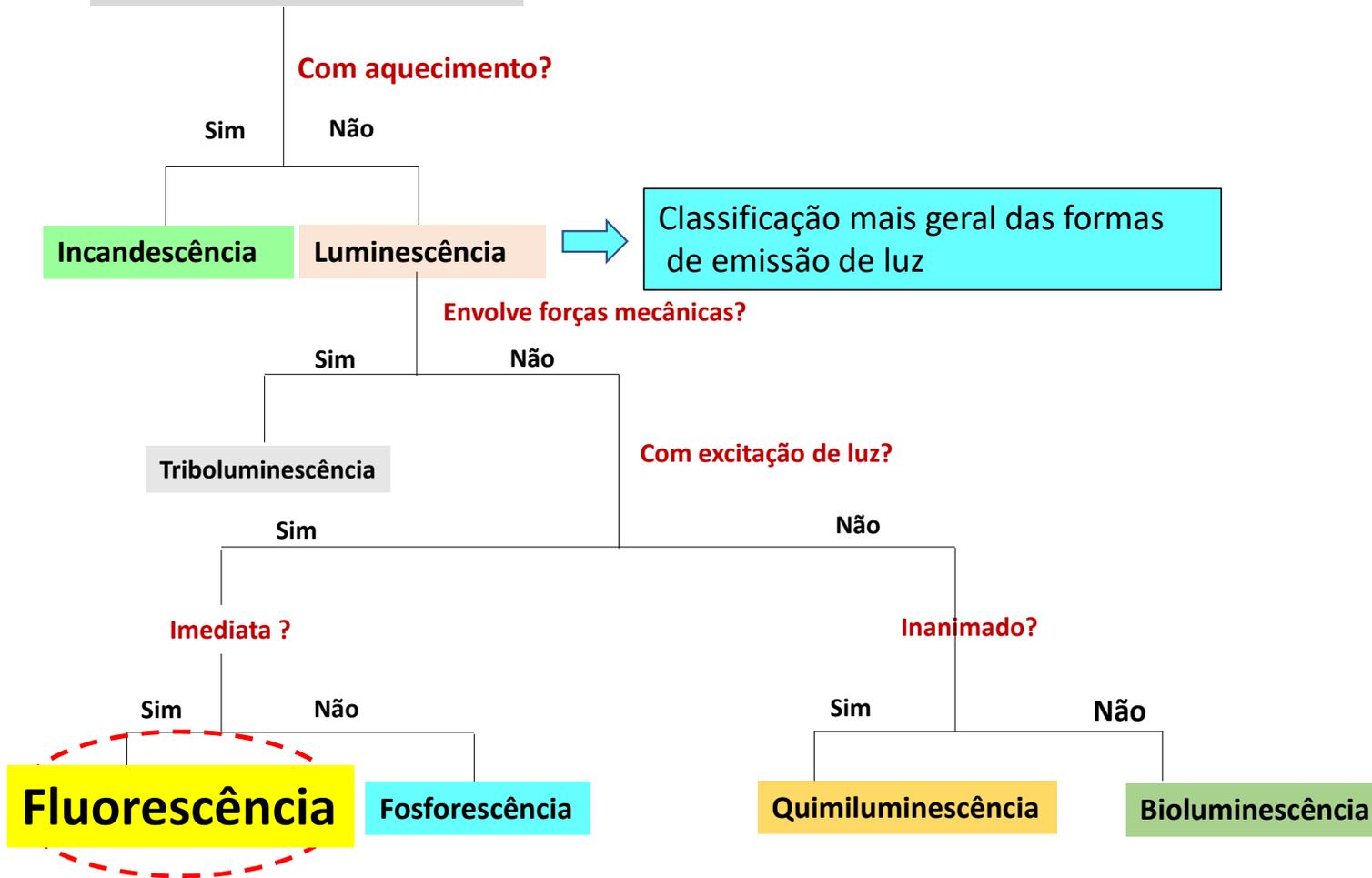
QUÍMICA ESTRUTURAL

- FLUORESCÊNCIA

Rose Mary Zumstein Georgetto Naal

Emissão de luz

CAMINHOS DA LUZ!



Exemplos de emissão de luz (Luminescência)

Incandescência



Lâmpadas incandescentes: Filamento de tungstênio que ilumina com a passagem de corrente elétrica.

Fluorescência



Lâmpadas fluorescentes: Vapor de mercúrio que atingido por corrente elétrica emite raios UV que são invisíveis aos nossos olhos. Mas ao serem absorvidos pelo fósforo na parede do vidro, geram luminosidade.

Incandescência + fluorescência



Fogos de artifício: Contém a pólvora (carvão com perclorato de potássio + mistura de enxofre + KNO_3). A pólvora explode com o aquecimento fornecendo a energia para a emissão de luz de diferentes cores.

Sódio: luz amarela

Estrôncio e lítio: luz vermelha

Bário: luz verde

Cobre: luz azul

Cálcio: luz laranja

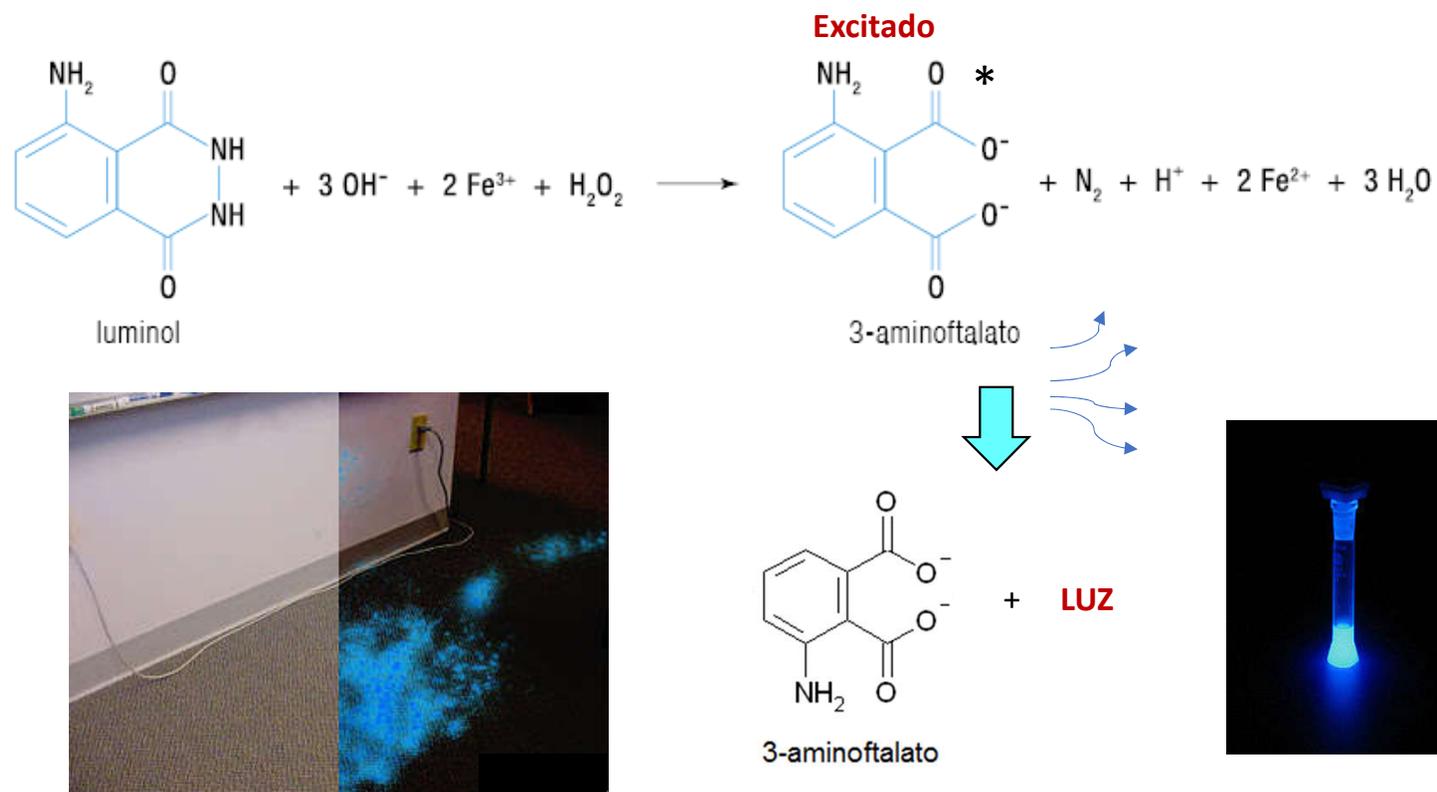


Quimiluminescência

Pulseiras de Neon: Formada por um bastão de vidro contendo peróxido de hidrogênio (água oxigenada) em seu interior que ao ser quebrado, mistura com um corante (derivados de oxalato) que é oxidado produzindo luz colorida. Esse vidro é revestido por plástico

QUIMILUMINESCÊNCIA: Reação quimiluminescente do luminol

Reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino na presença de ferro e água oxigenada (H_2O_2) forma o 3-aminofalato no estado excitado que libera energia na forma de luz.



LUMINESCÊNCIA DO LUMINOL





Água viva



Vagalume

bioluminescência

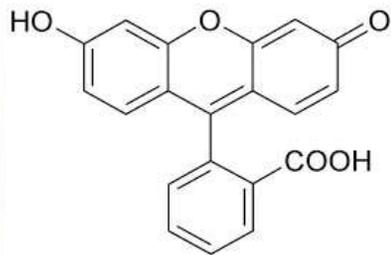
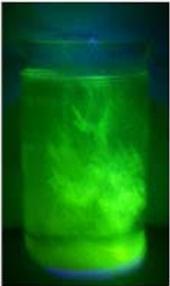
Emissão de sinais luminosos por certas espécies animais, utilizada na captura de presas ou no encontro dos sexos. (Insetos como o vagalume, moluscos (...))

[] Dicio.com.br



Lulas luminescentes

Fluorescência

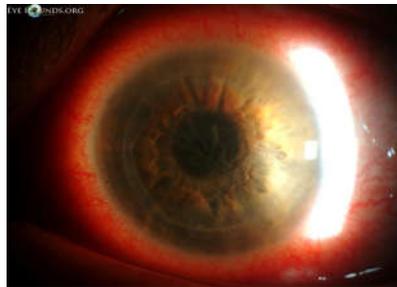


- Usada para marcar proteínas, anticorpos e outras moléculas para monitorar células por microscopia de fluorescência
- Marcador biológico nas análises clínicas e toxicológicas.

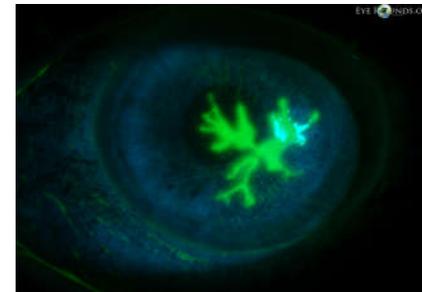


Fluoresceína

- Usado como ferramenta na área de oftalmologia como colírio.

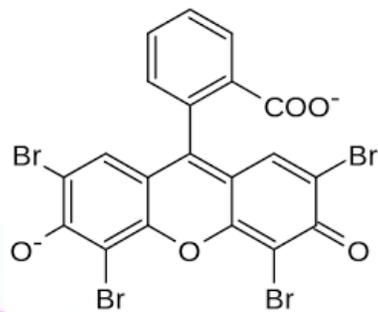
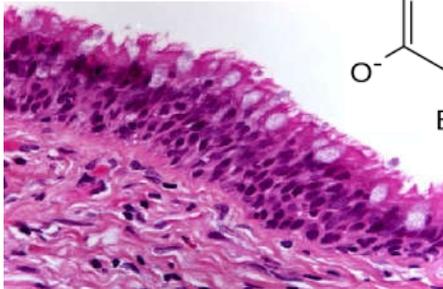


Olho saudável

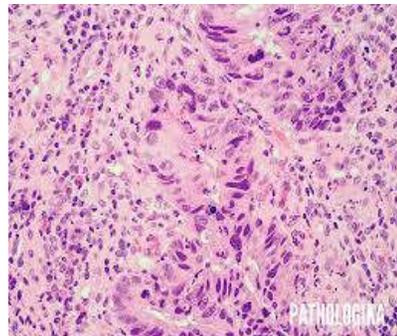


Olho lesionado

EOSINA - DERIVADO DA FLUORESCEÍNA



Eosina

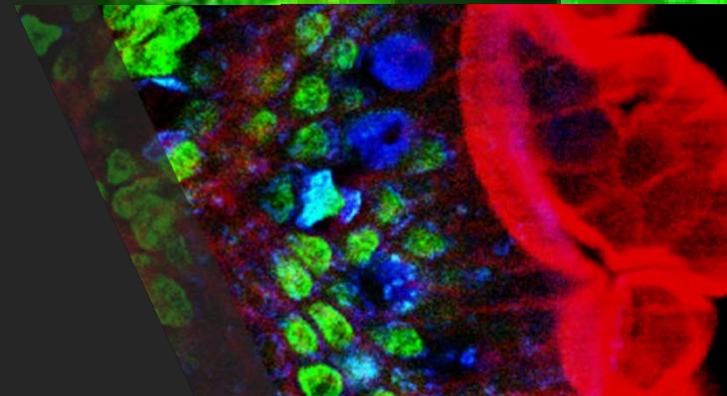
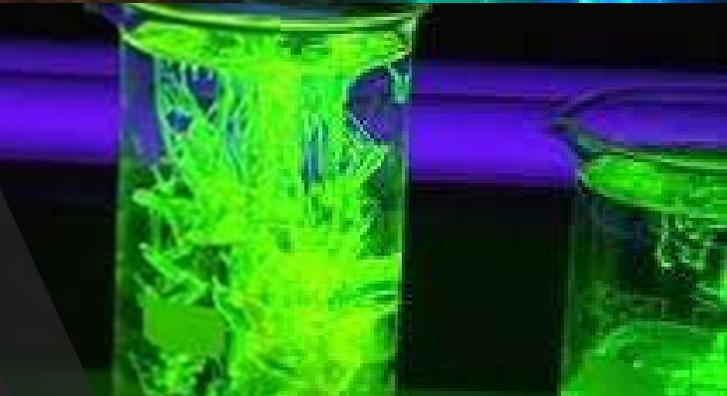


- 1) Usado como corante em cosméticos, tintas e papéis.
- 2) Análises clínicas - Corante de leucócitos no sangue.



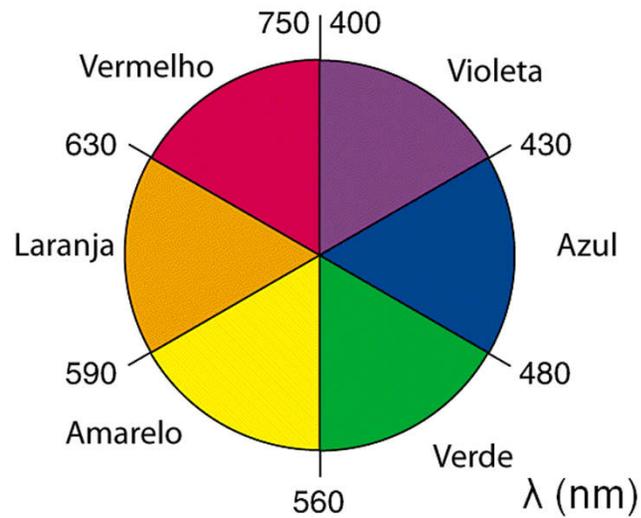
• FLUORESCÊNCIA

- O QUE É?
- COMO OCORRE
- QUAL SUA IMPORTÂNCIA PARA A CIÊNCIA ?



Antes de falarmos de fluorescência:

Vamos recordar *cores* (luz visível)



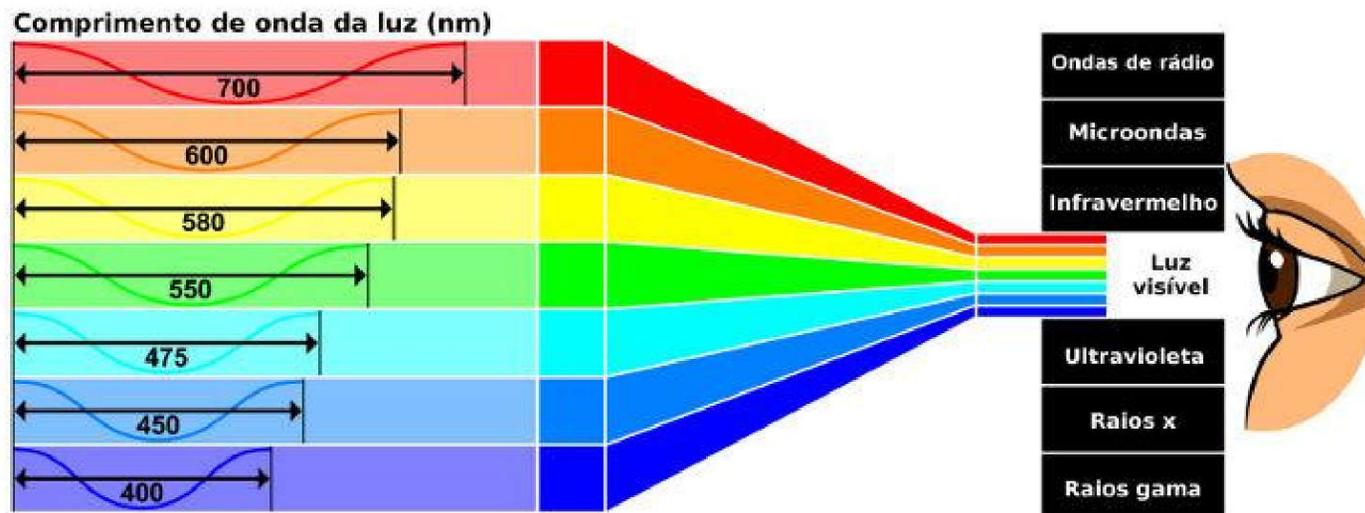
Região do azul
< λ , > Energia

$$E = hc / \lambda$$

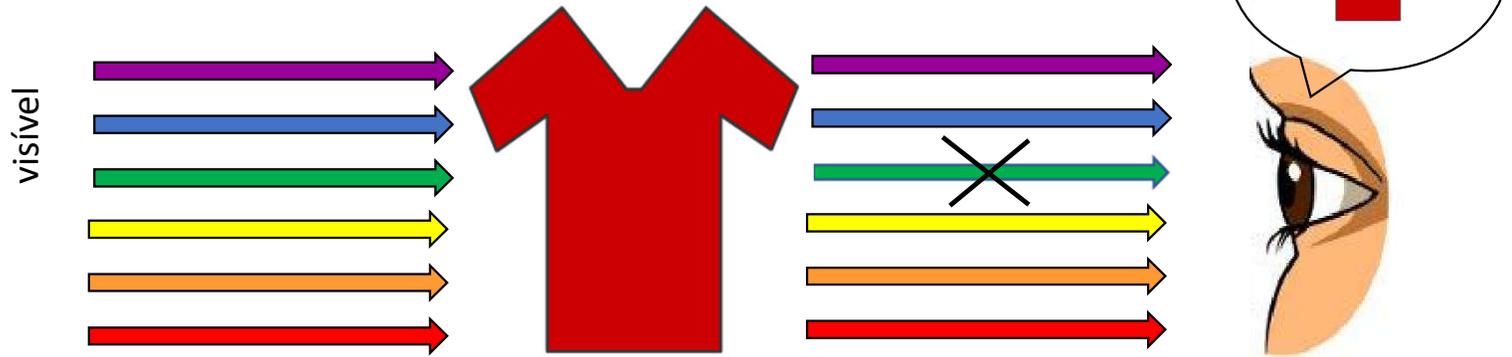
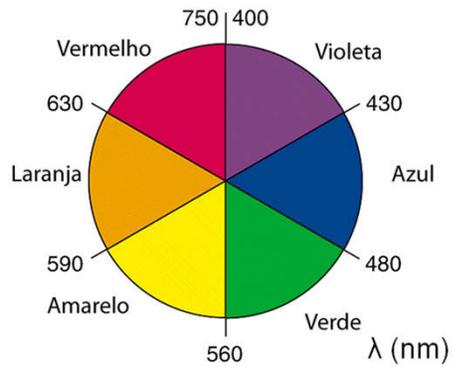
Região do vermelho
> λ , < Energia

QUAL COR ENXERGAMOS?

Absorção de luz no espectro do visível

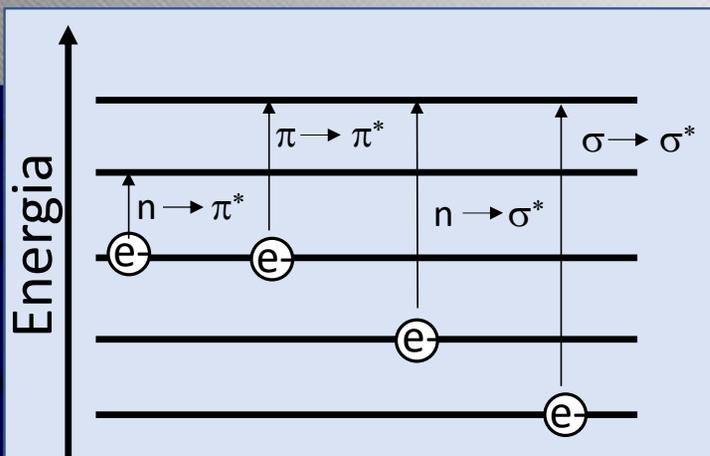
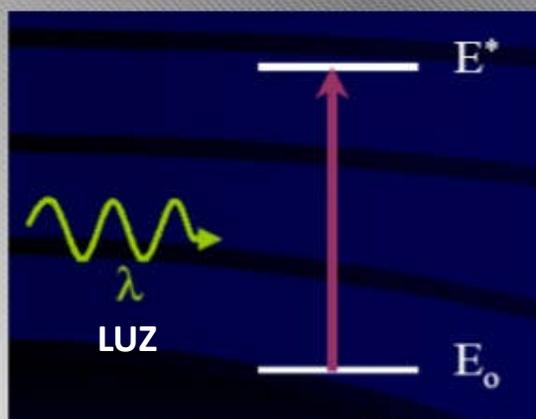


PORQUE ENXERGAMOS COR DE OBJETOS?



COMO OCORRE A ABSORÇÃO DE LUZ?

Transições Eletrônicas



Antiligante σ^*
Antiligante π^*
Não ligante n
Ligante π
Ligante σ

$\sigma \rightarrow \sigma^*$: requer alta energia, em $\lambda < 200$ nm. Ex. Metanol

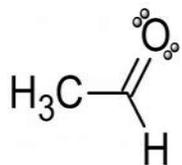
$n \rightarrow \sigma^*$: λ entre 150 e 200 nm. Ex. água e metanol

$n \rightarrow \pi^*$
 $\pi \rightarrow \pi^*$ } Maioria das aplicações em absorciometria uma vez que as transições eletrônicas requerem energia que caem na faixa do **UV-VIS**, entre 200 e 700 nm.

$\pi \rightarrow \pi^*$
 $n \rightarrow \pi^*$ } Menos energéticos

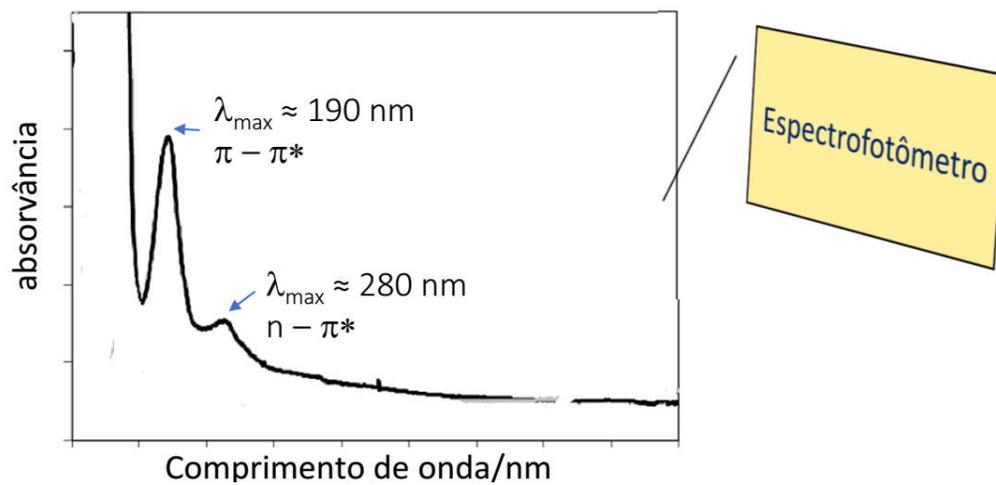
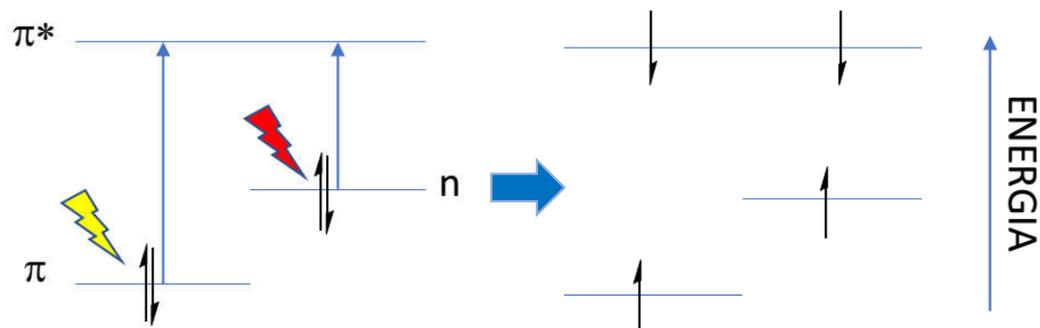
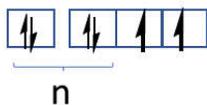


A ABSORÇÃO DE LUZ

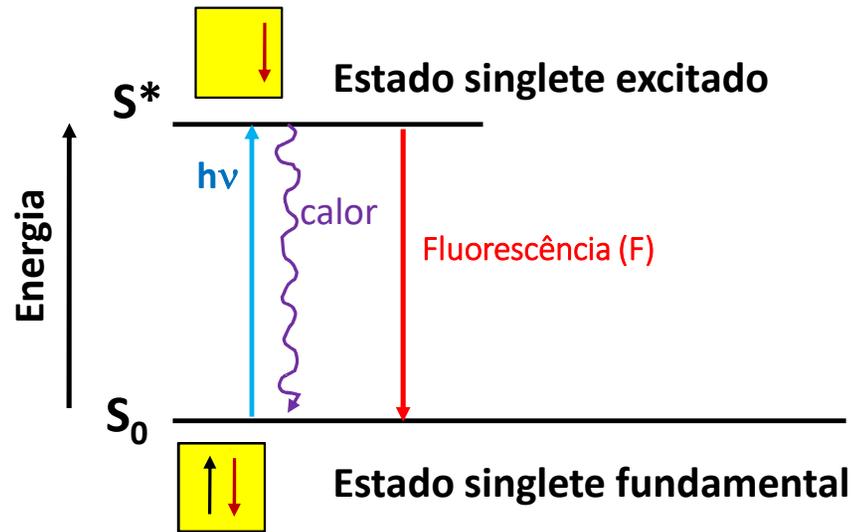
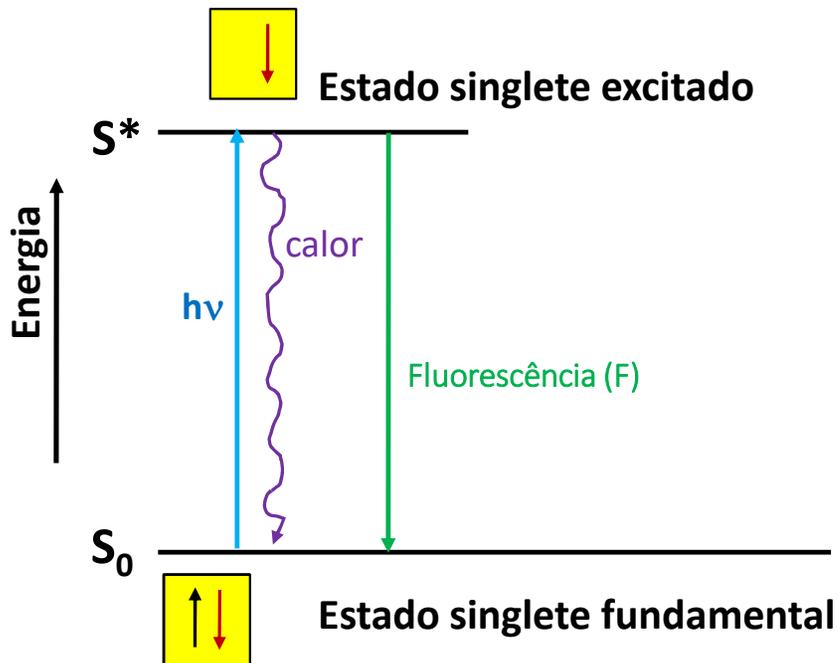


Etanal ou acetaldeído

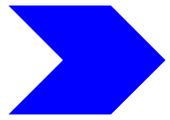
O: $1s^2 2s^2 2p^4$



ABSORÇÃO DE LUZ LEVA A MOLÉCULA PARA UM NÍVEL DE ENERGIA MAIS ALTO ➡ ESTADO EXCITADO



→ Fluorescência vermelha tem menor energia do que a verde



Fluorescência rodamina, quinino e fluoresceína

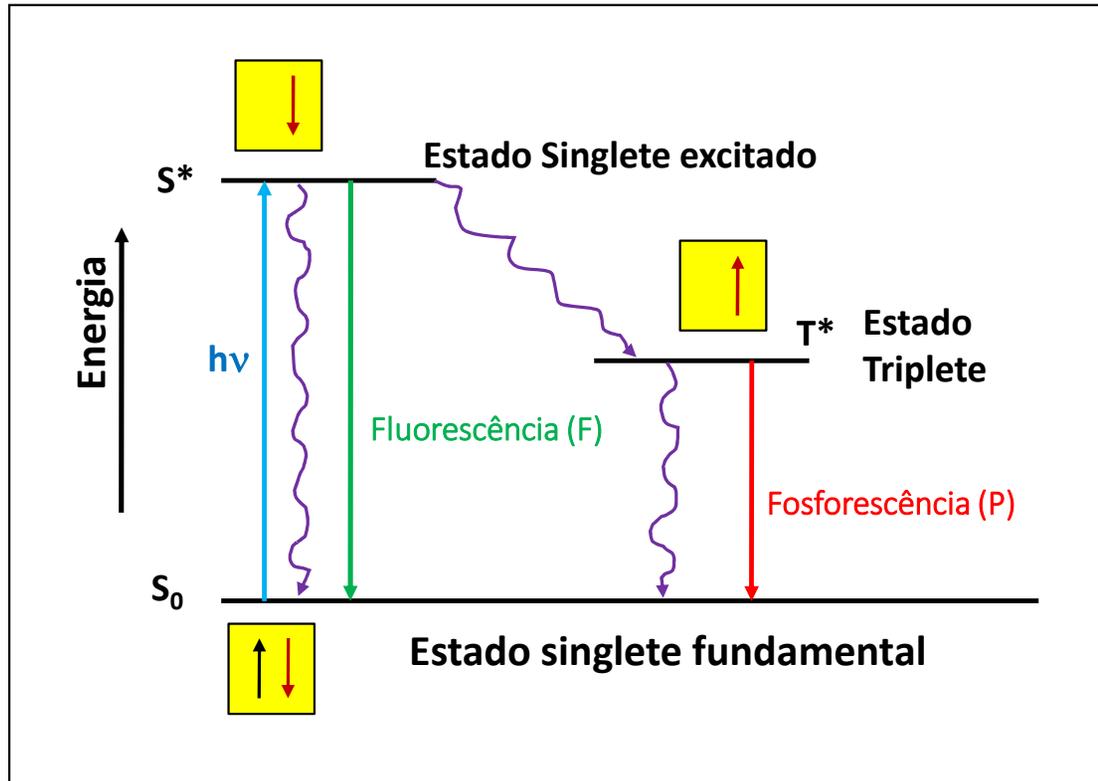
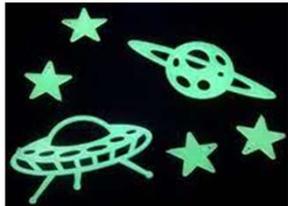




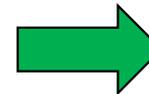
- Mas é só emissão de fluorescência que pode acontecer?
- Qual a diferença de fluorescência e fosforescência?

VAMOS ENTENDER?

➔ Fluorescência x fosforescência



Absorção ($h\nu$):	10^{-15} a 10^{-14} s
Fluorescência :	10^{-9} a 10^{-7} s
Fosforescência :	10^{-4} a 100 s



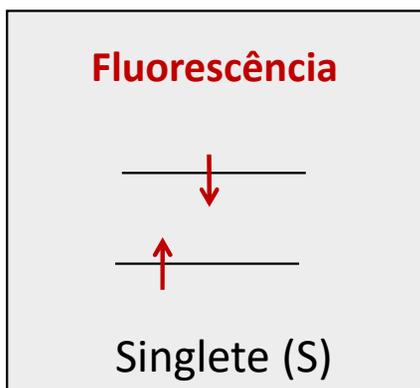
Fluorescência é a que tem maior aplicabilidade

Singlete e triplete:

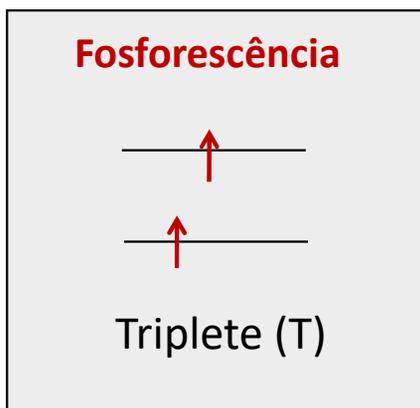
Indica a multiplicidade de cada um dos estados excitados

$$\text{Multiplicidade (M)} = 2S + 1,$$

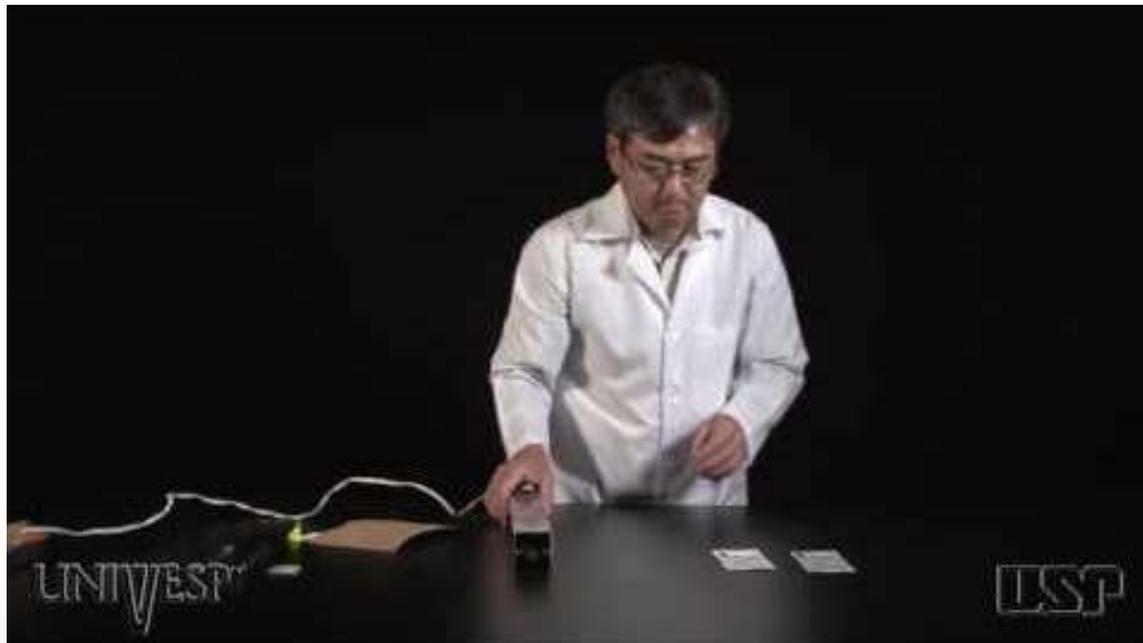
onde S é a soma do spin de cada um dos elétrons



$$\text{Singlete: } M = 2 \left(-\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \right) + 1 = \mathbf{1}$$

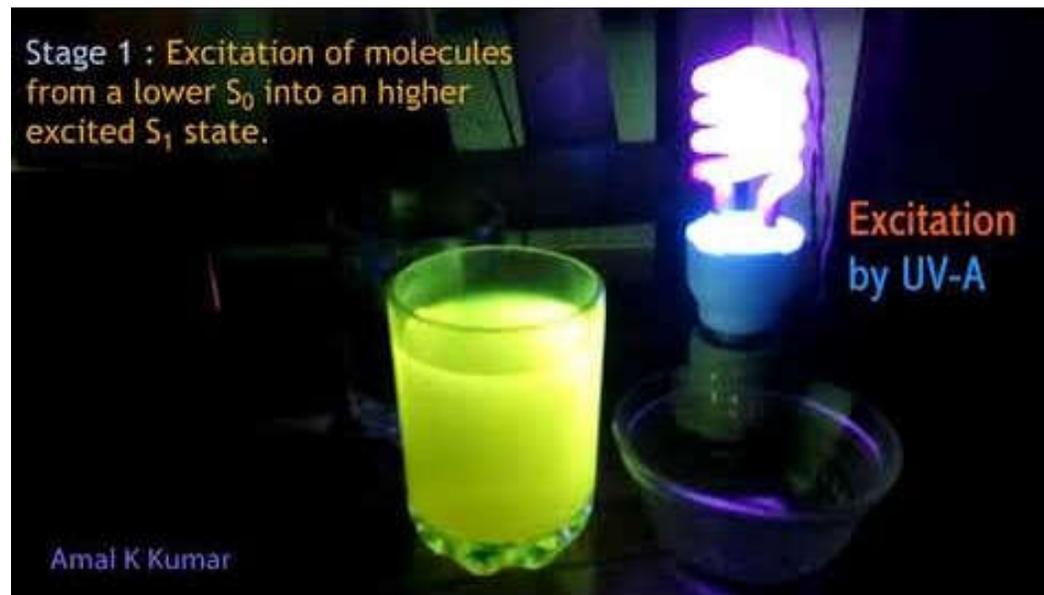


$$\text{Triplete: } M = 2 \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \right) + 1 = \mathbf{3}$$



Fluorescência
versus
fosforescência
-visualizando-

Fluorescência da vitamina B2 (riboflavina)



- <https://www.youtube.com/watch?v=wK3U0Z0wdec>

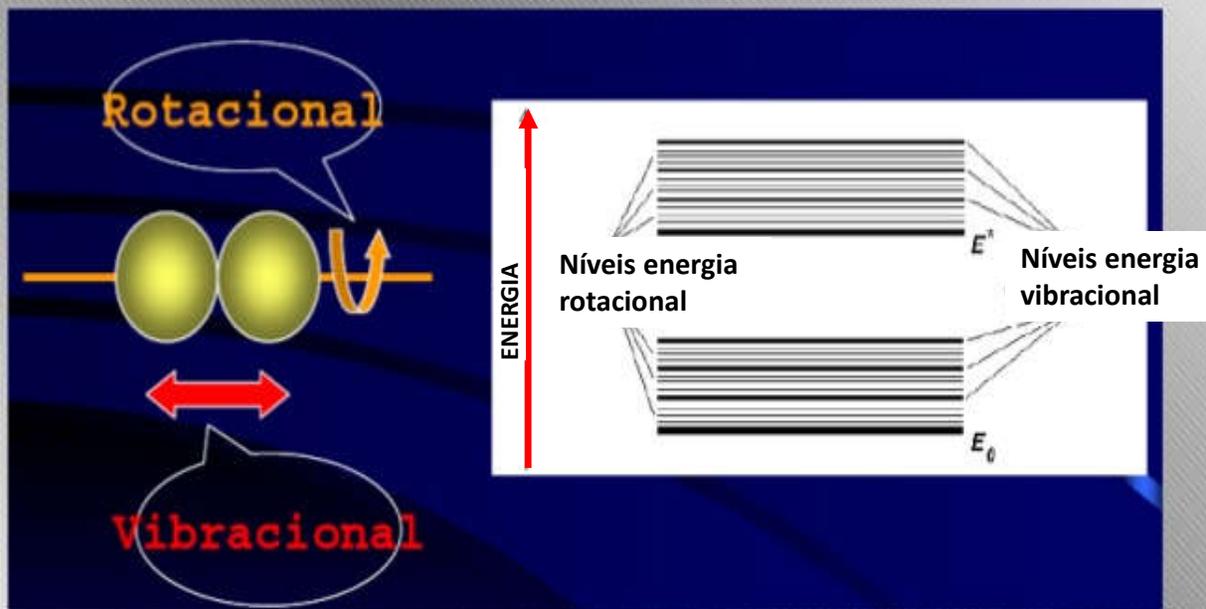
VAMOS
COMPLICAR
MAIS UM
POQUINHO?



Energia Rotacional e Vibracional

Energia vibracional: comprimento de onda na região do infravermelho

Energia rotacional: comprimento de onda na região do microondas



$$E = E_{El} + E_{Vibr} + E_{Rot}$$

ALEXANDER JABLONSKI



Figure 1.4. Professor Alexander Jablonski (1898–1980), circa 1935.
Courtesy of his daughter, Professor Danuta Frackowiak.

Diagrama de Jablonski

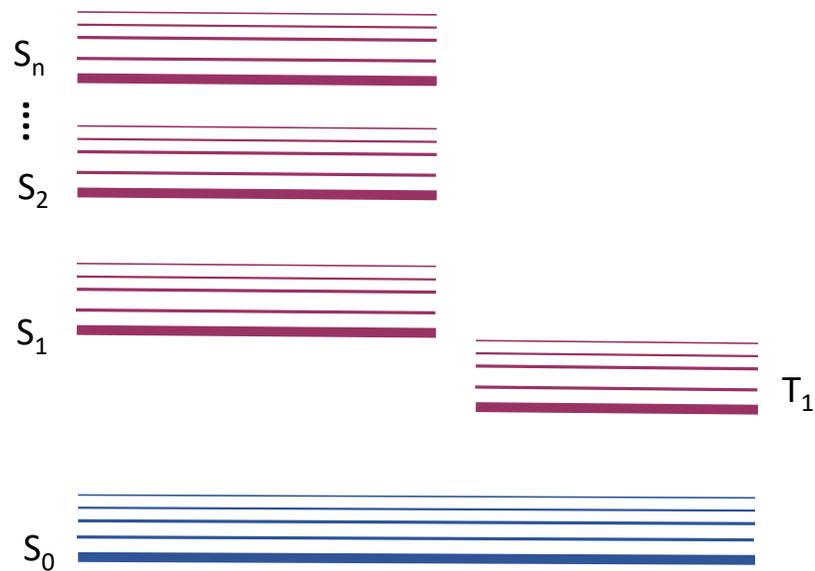


DIAGRAMA DE JABLONSKI: Estados energéticos de uma molécula e suas transições

A= Absorbância (Exc)

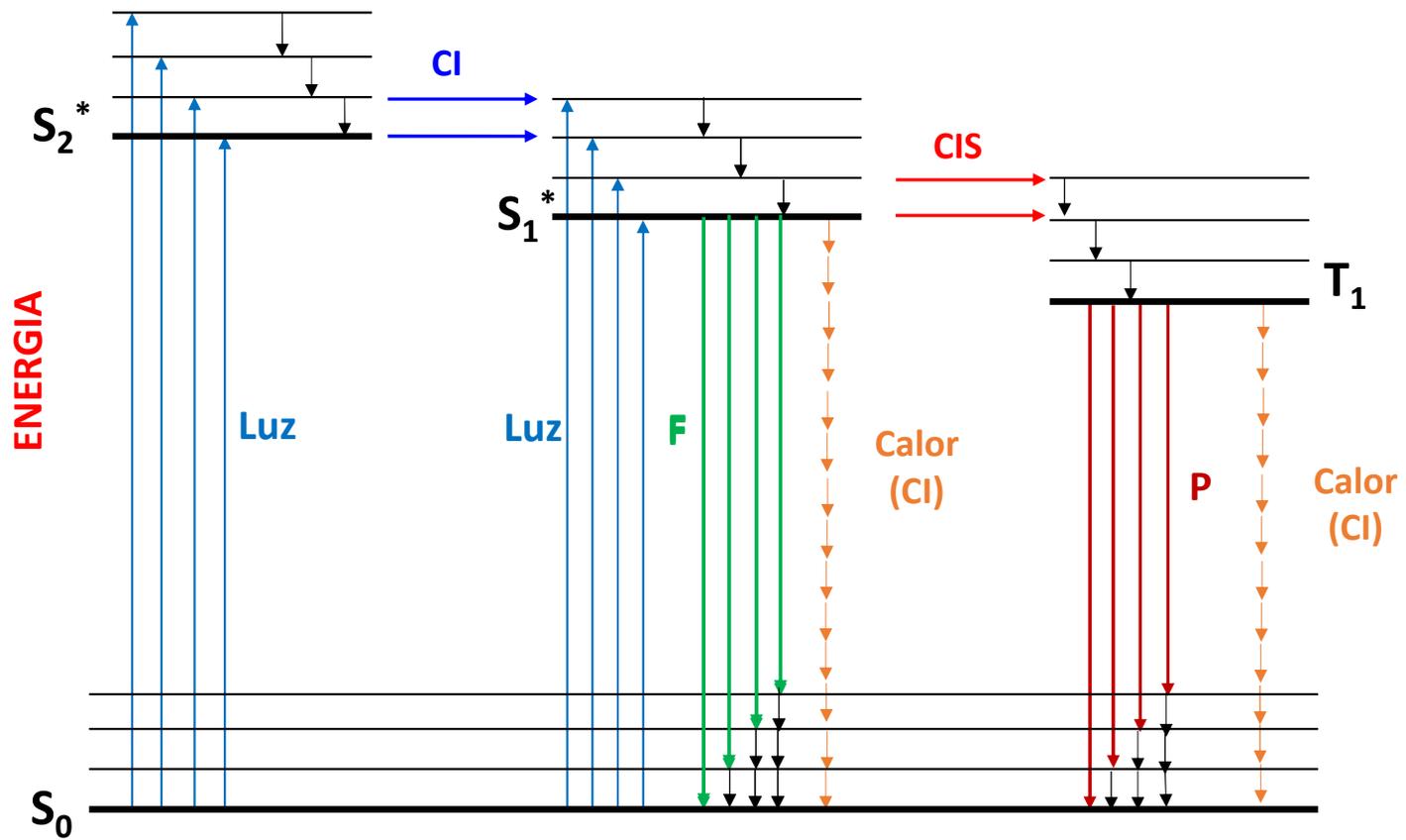
F= Fluorescência

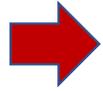
P= Fosforescência

CI= Conversão interna

CIS= Cruzamento Intersistema

$$E = hc/\lambda$$





A molécula pode voltar para o estado fundamental por meio de uma combinação de vários processos de desativação:

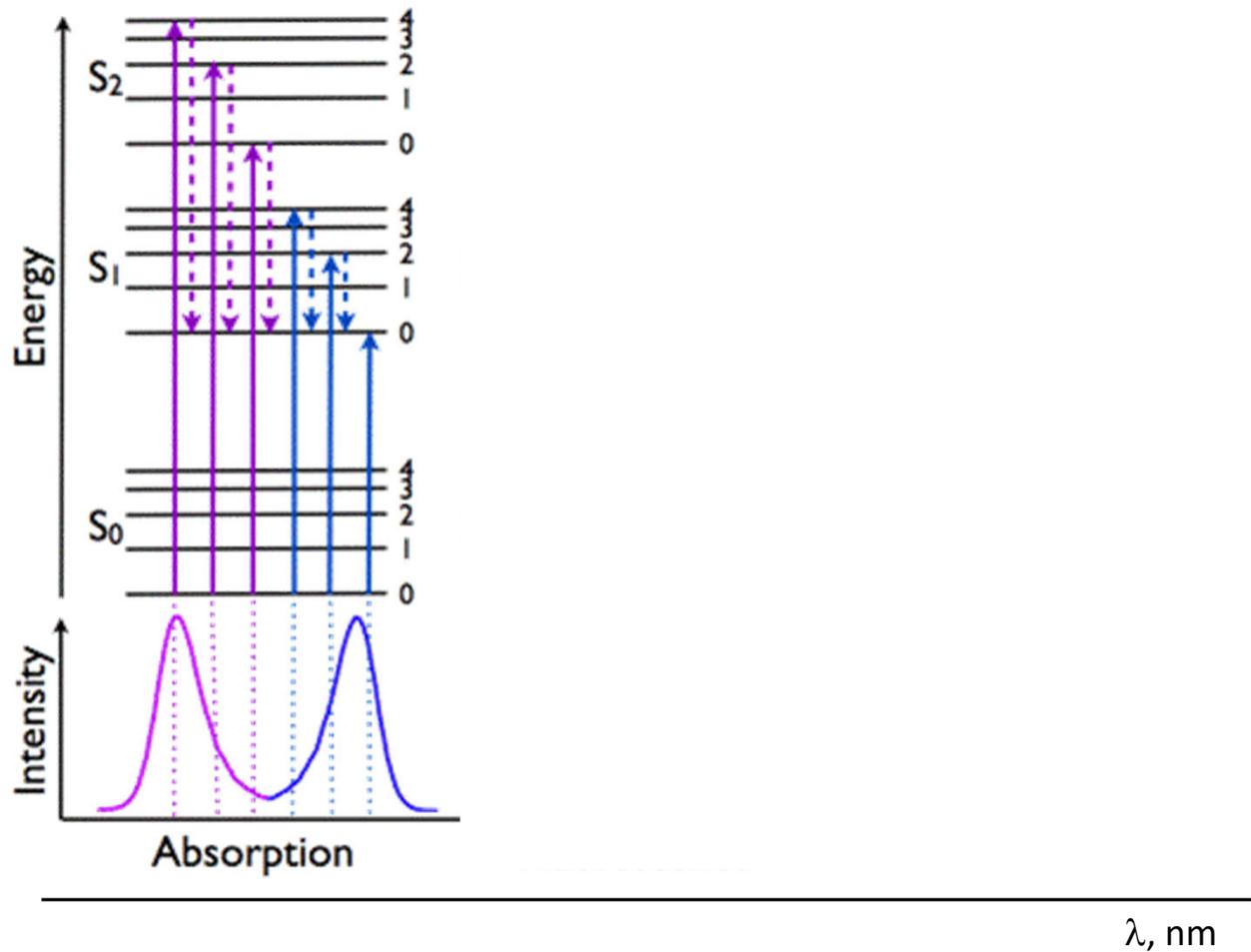
Processos radiativos:

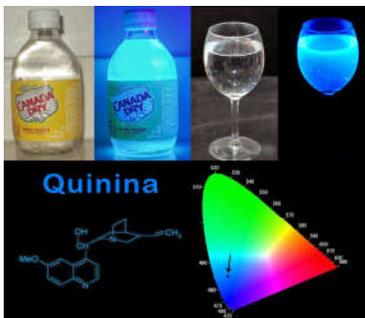
- Fluorescência
 - Fosforescência
- Aplicações biológicas e importância em análises (sangue, fármacos, alimentos) e outras

Processos não-radiativos:

- Relaxação vibracional
- Conversão interna
- Cruzamento intersistema

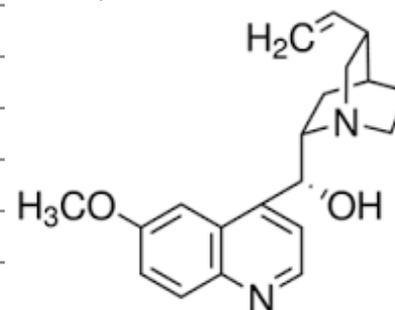
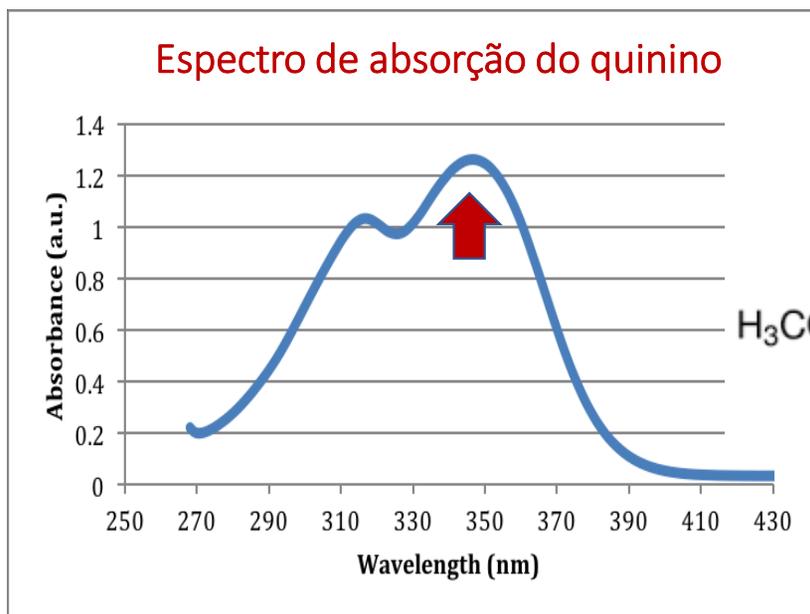
Associando transições eletrônicas espectros de absorção e emissão





ESCOLHENDO O $\lambda_{\text{EXCITAÇÃO}}$

1) Fazer a varredura de um espectro de absorção

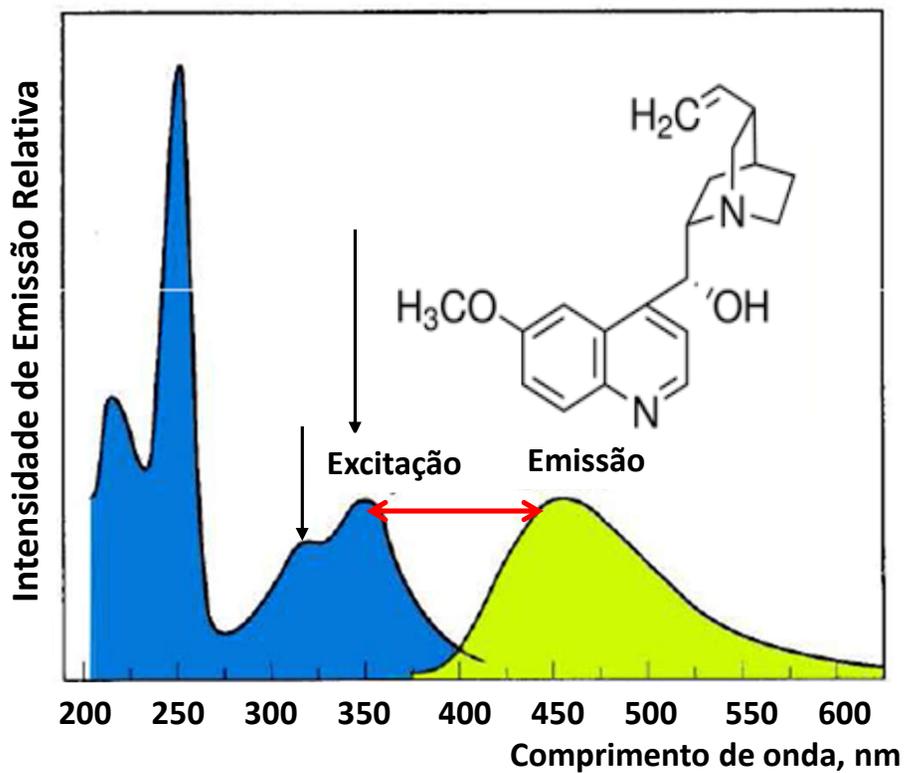


Comprimento de onda máximo de absorção = 350 nm



USADO NA EXCITAÇÃO DESTA MOLÉCULA

Espectros de excitação e emissão do quinino

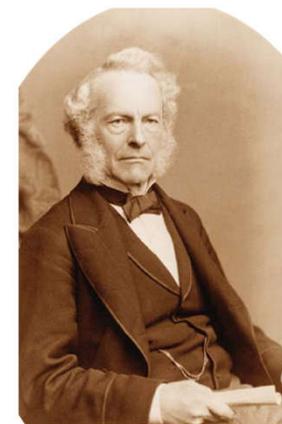


$$\lambda_{exc} = 320 \text{ nm ou } 350 \text{ nm}$$

$$\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$$

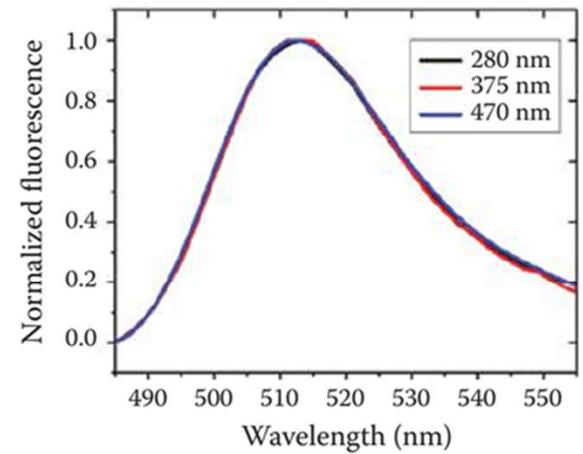
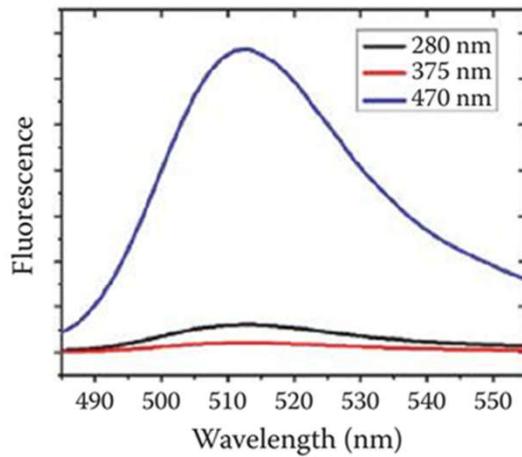
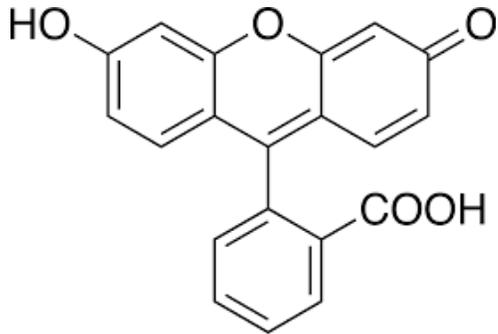
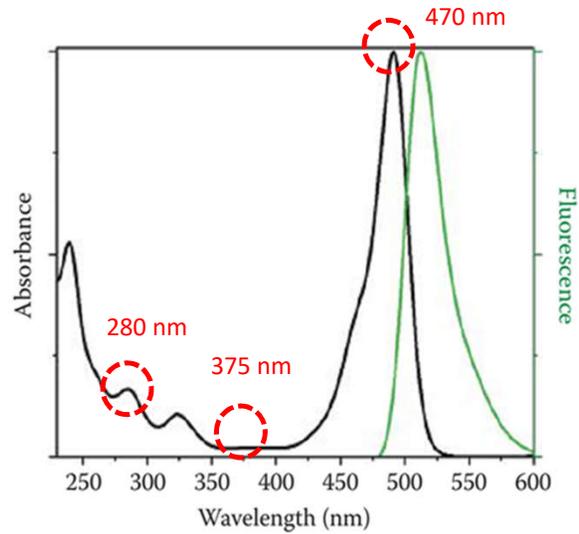


Independente do λ_{exc} , a emissão ocorrerá no mesmo λ_{em}

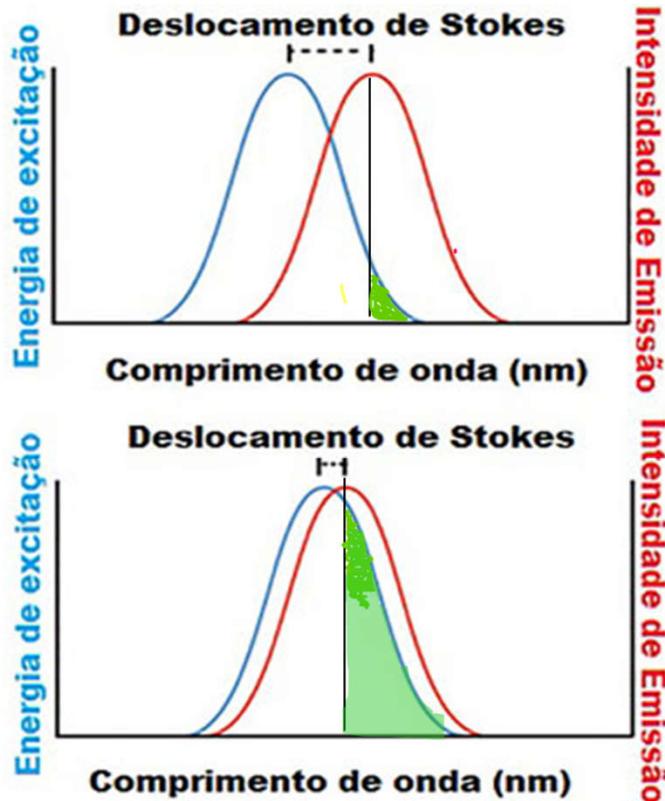


Sir George Gabriel Stokes, 1819–1903, Cambridge. Reproduced courtesy of the Royal Society of Chemistry.

Comparação do espectros de emissão da **fluoresceína** excitada em: 280, 375 e 470 nm



Deslocamento de Stokes: Distância entre o comprimento de onda de excitação e emissão



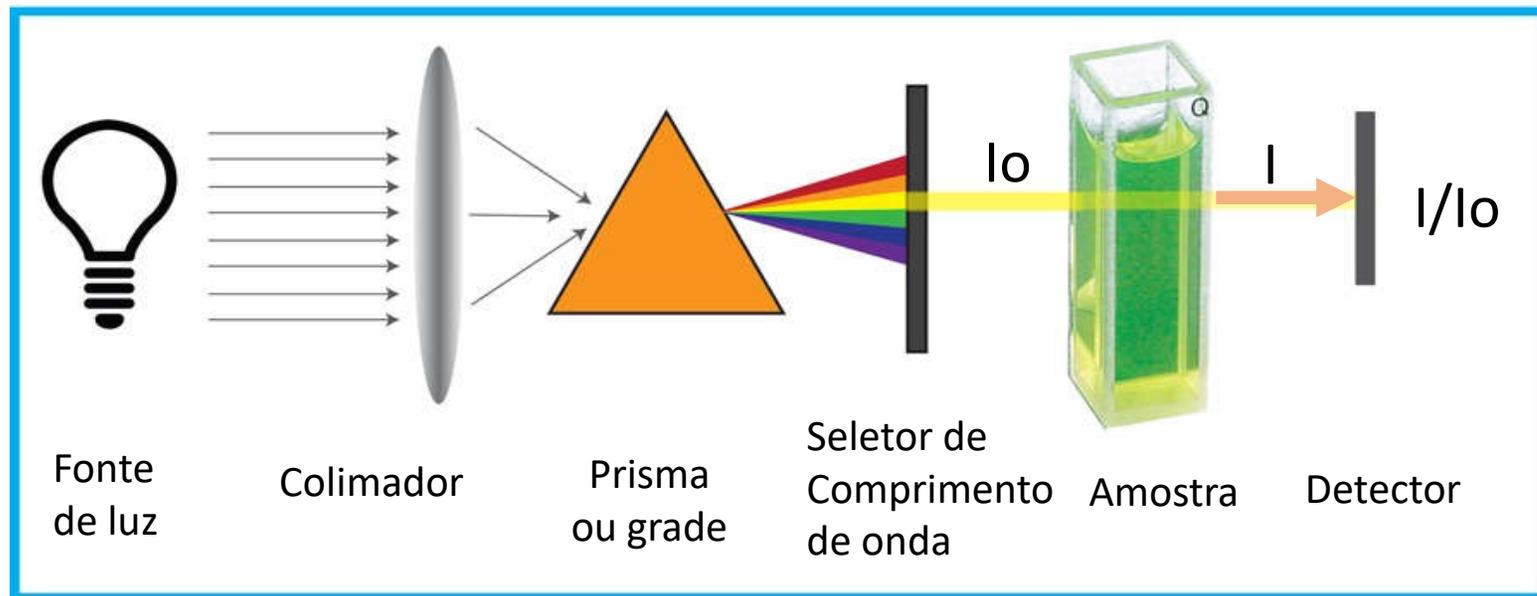
Grande deslocamento de Stokes:
moléculas com fluorescência
facilmente detectável



Pequeno deslocamento de Stokes:
moléculas com fluorescência de difícil
detecção

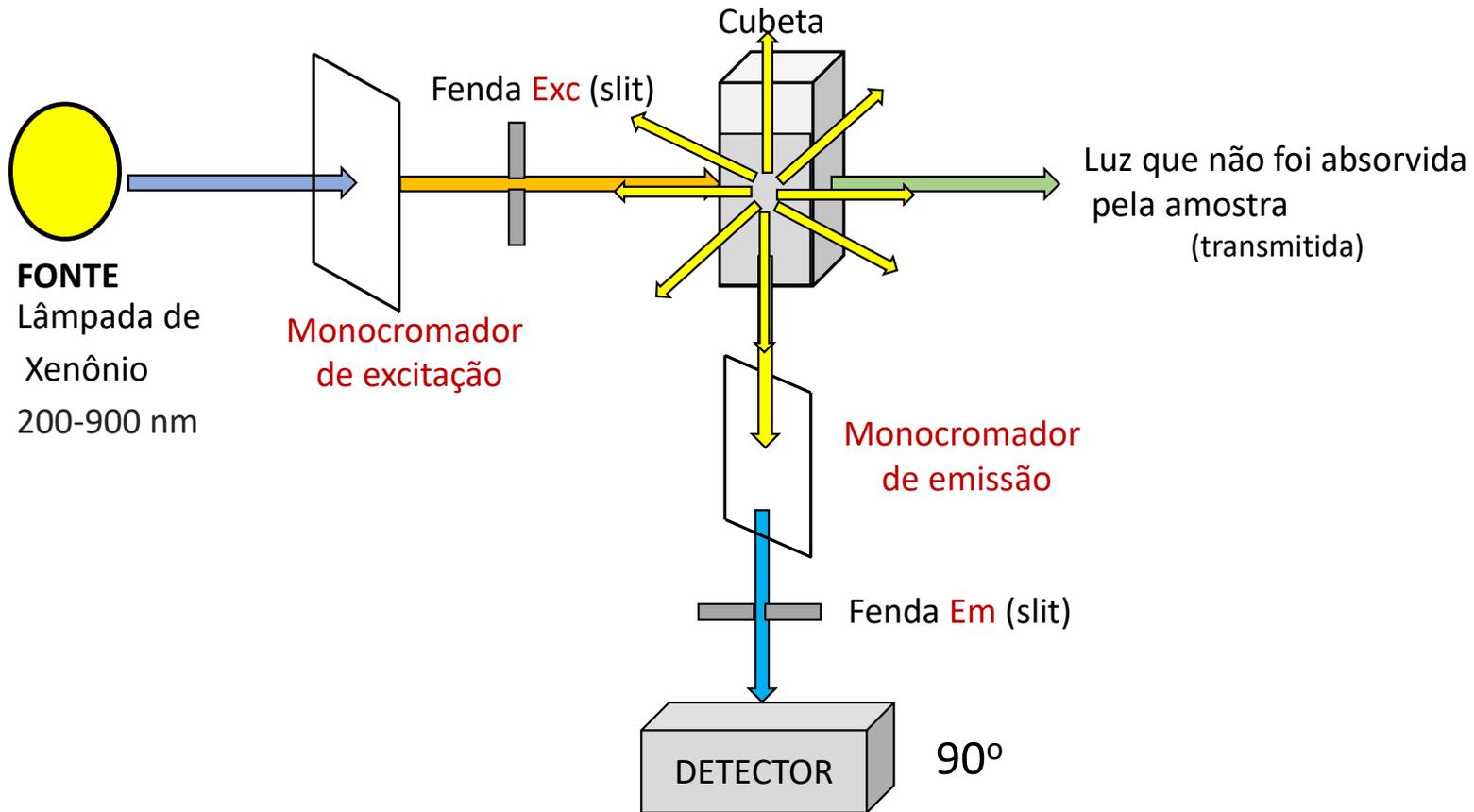
Deslocamento de Stokes= mínimo de 30 nm

RECORDANDO: COMO É MEDIDA A
ABSORÇÃO DE LUZ



ESPECTROFOTÔMETRO

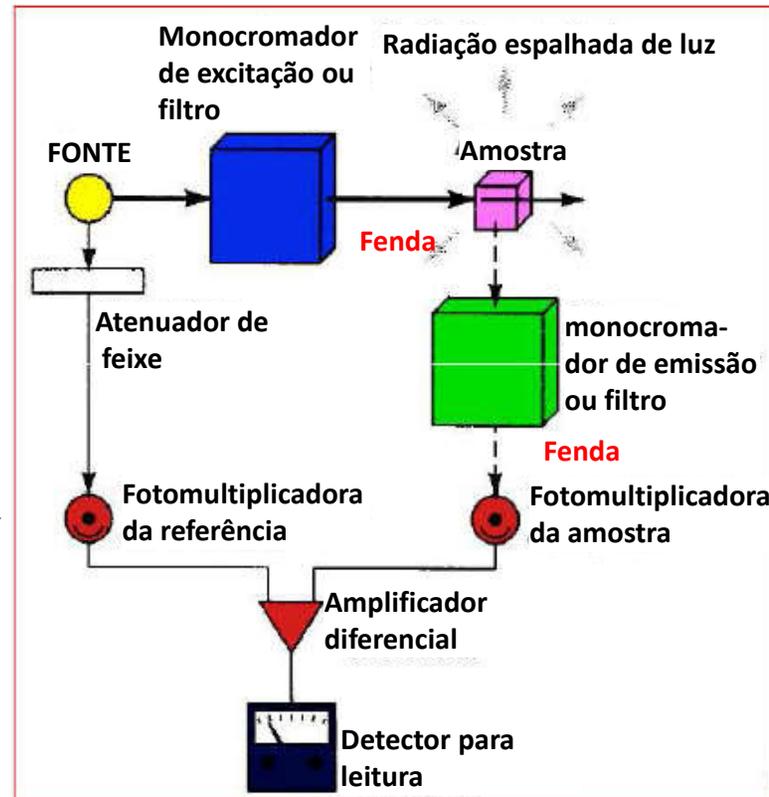
FLUORÍMETRO



ESQUEMA DO ESPECTROFLUORÍMETRO CORRIGIDO

Atenua a luz para cair na faixa de luz emitida

Controla as flutuações da fonte



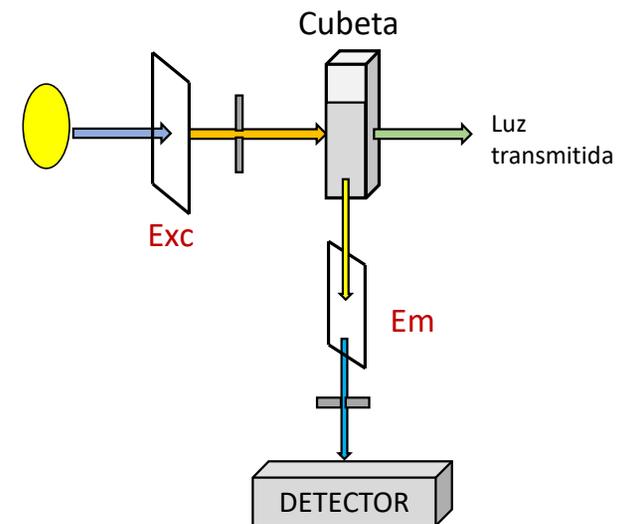
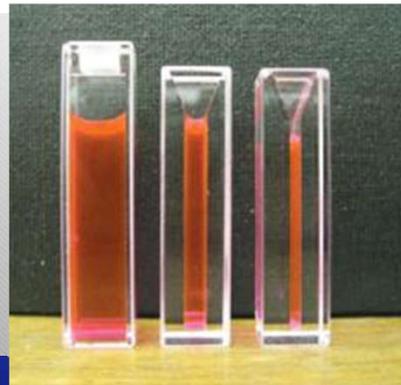
- Componentes similares a um UV-Vis
- “Detector” a 90° em relação ao feixe incidente
- Observa-se ambos os espectros de excitação e emissão

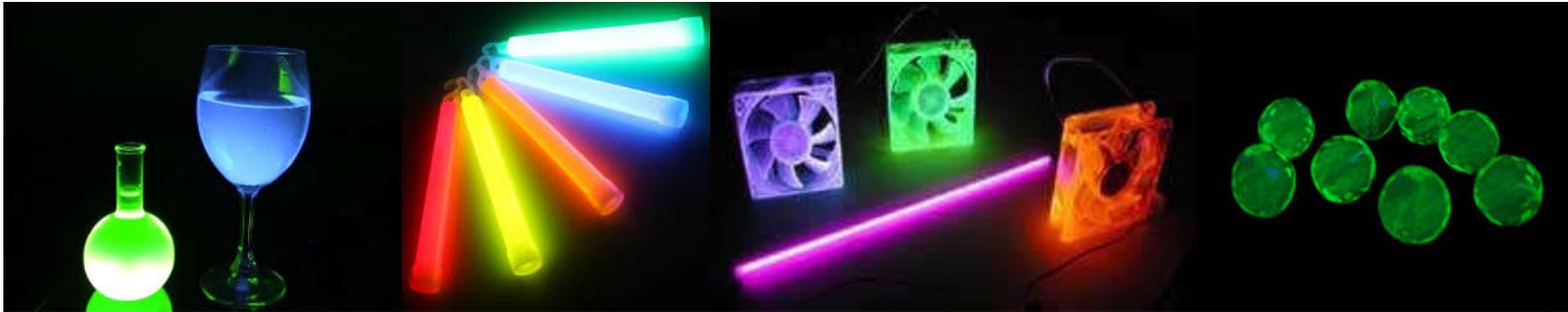
FLUORÍMETRO: Controla a luz absorvida e emitida através de filtros com comprimentos de onda selecionados
ESPECTROFLUORÍMETRO: Controla a luz absorvida e emitida através de monocromadores

CUBETAS DE FLUORESCÊNCIA

Celas de Medida

material	transparência	aplicabilidade
quartzo	150-3000 nm	UV, visível
vidro	375-2000 nm	visível
plástico	380-800 nm	visível



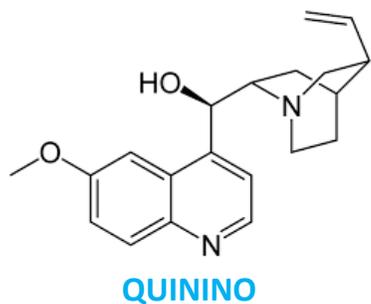
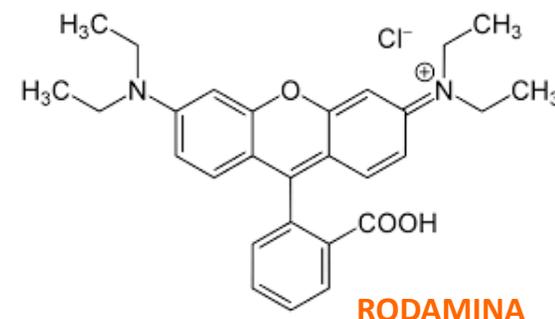
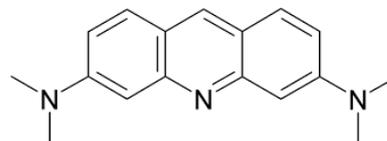
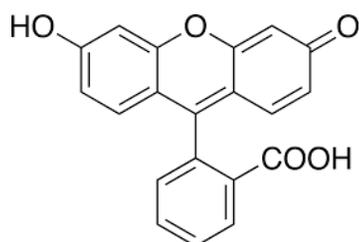
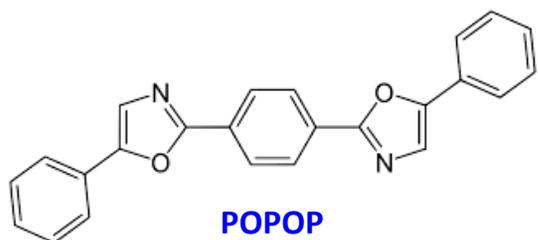


QUAIS MOLÉCULAS TÊM A PROPRIEDADE DE EMITIR LUZ NA FORMA DE FUORESCÊNCIA?

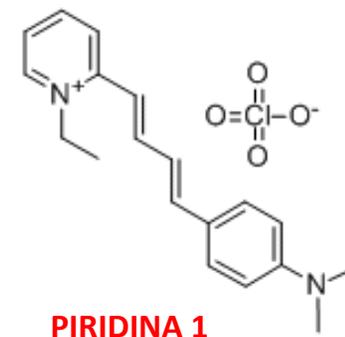


ESTRUTURA QUÍMICA E FLUORESCÊNCIA

- Absorção e emissão de luz em λ diferentes no UV-Vis



- Fluorescência advém principalmente de transições $\pi - \pi^*$
- Moléculas planares aumentam a conjugação entre o sistema de elétrons π
- Moléculas com estruturas rígidas com menor liberdade vibracional- tem menor cruzamento intersistema e maior fluorescência



Como avaliar a capacidade de uma molécula emitir luz?

Rendimento quântico, ou **eficiência quântica**, para fluorescência: é a razão do número de moléculas que emitem luz pelo número total de moléculas excitadas.

$$\text{Rendimento quântico } (\Phi_F) = \frac{\text{Número de fótons emitidos}}{\text{Número de fótons absorvidos}}$$



$$0 \leq \Phi \leq 1$$

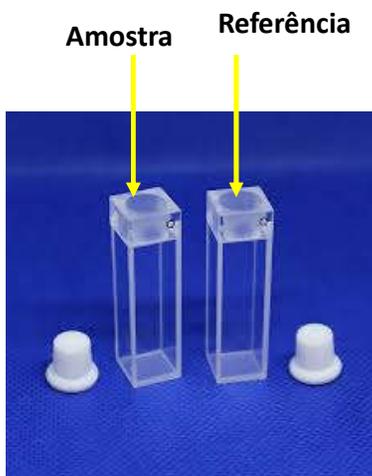


Quanto maior a fluorescência de uma molécula, mais próximo de 1 é o valor de Φ_F .

Ex. Se 100 moléculas vão para o estado excitado, mas apenas 20 voltam para o fundamental emitindo fluorescência, $\Phi = 0,2$



Como determinar o rendimento quântico na prática?



$$\Phi_F = \Phi_R \frac{I_F AR}{I_R AF}$$



Φ_F = Rendimento quântico de fluorescência da amostra

Φ_R = Rendimento quântico de fluorescência da referência

I_F = Intensidade de fluorescência da amostra

I_R = Intensidade de fluorescência da referência

A_F = Absorbância da amostra

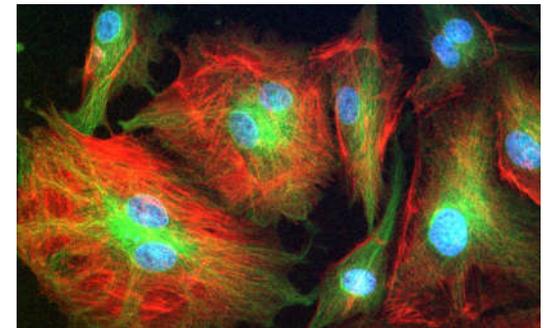
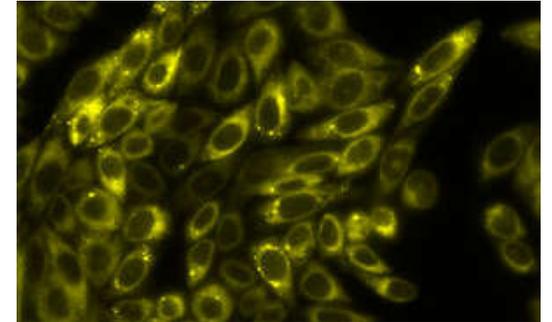
A_R = Absorbância da referência

Padrão	λ_{exc} , nm	Φ_F
Sulfato de quinino	350	0,58
Fluoresceína	490	0,98
POPOP	365	0,97
Rodamina 101	470	1,00

* Valores dependem do solvente

ALGUMAS APLICAÇÕES DA FLUORESCÊNCIA

- Ensaio bioquímico em laboratórios de análises clínicas (diagnóstico)
- Ciências forenses
- Análise de alimentos, fármacos e produtos naturais – controle de qualidade
- Localização subcelular de fármacos, proteínas, etc- mecanismos
- Sítios de ligação de proteínas – sinalização celular
- Interações moleculares com membranas biológicas
- Atividade enzimática



Algumas Vantagens da Fluorescência

- 1) Sensibilidade: Frequentemente de uma a três ordens de grandeza mais sensível do que aquela apresentada pela absorbância.
- 2) Seletividade dos procedimentos de fluorescência é maior do que aqueles apresentados pelo método de absorção.
- 3) Número limitado de sistemas químicos produzem a fluorescência



LINKS SOBRE FLUORESCÊNCIA E FOSFORESCÊNCIA

- https://www.youtube.com/watch?v=62pwykA_huU

Fluorescência rodamina, fluoresceína

- https://www.youtube.com/watch?v=XFmau62_IgU

Fluorescência materiais domésticos (curiosidades)

- <https://www.youtube.com/watch?v=-ZKef9nyLA>

Fluorescência quinino, fluoresceína, rodamina e eosina.

- <https://www.youtube.com/watch?v=FZ9E5hZMbCA>

Curiosidades