

Instituto de Química de São Carlo - USP
SQM0415 – Análise Instrumental I

Alvaro José dos Santos Neto
Emanuel Carrilho

Espectrometria de Luminescência Molecular

Cap. 15

Princípios de Análise Instrumental – 5ª Ed.

Skoog, Holler, Nieman

Luminescência Molecular

- **Fluorescência Molecular**

- Absorção de fótons → emissão de fótons

- **Fosforescência**

- Absorção de fótons → emissão de fótons

- **Quimiluminescência**

- Excitação química → emissão de fótons

**Foto-
luminescência**

- **Aplicações Qualitativas**

- Espectros característicos

- **Aplicações Quantitativas**

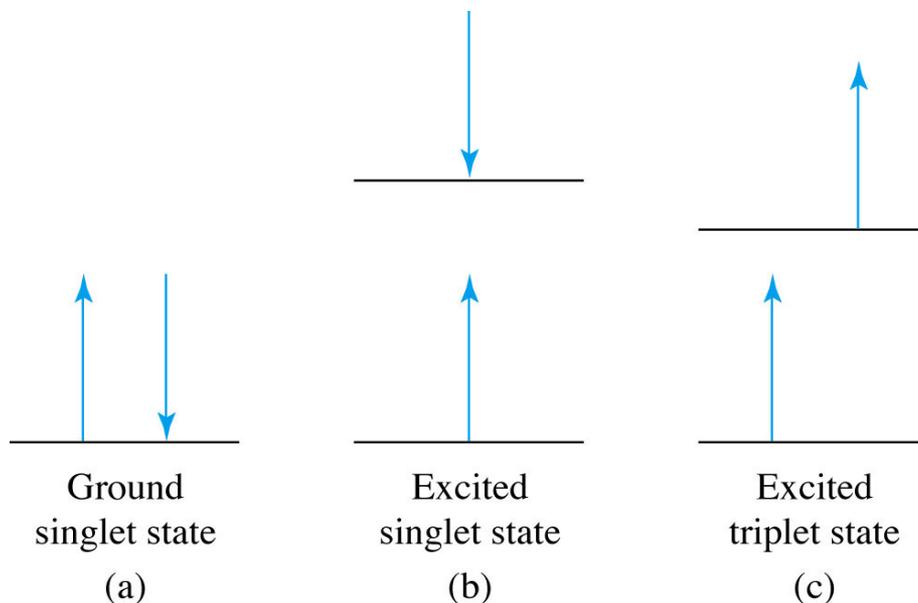
- Baixos valores de limites de detecção (**LOD** ~ ppb)

- Ampla linearidade

- Alta especificidade

Fluorescência x Fosforescência

- **Fluorescência atômica** – Sódio: $3s \rightarrow 3p \rightarrow 3s$
 - Absorve 589 nm \rightarrow emite 589 nm – *Fluorescência ressonante*
- **Fluorescência molecular** – fluoresceína: $n \rightarrow \pi^* \rightarrow n$
 - Absorve 490 nm \rightarrow emite 520 nm – *Deslocamento de Stokes*
- **Fosforescência** – antraceno: $\pi \rightarrow \pi^* \rightarrow \pi$
 - Absorve 280 nm \rightarrow emite 480 nm – *perda de energia?*
- **Spin Eletrônico**
 - elétrons emparelhados
- **Estados Excitados:**
 - Singlete:
 - emparelhados
 - Triplete:
 - desemparelhados



Orbitais Moleculares e Ligações

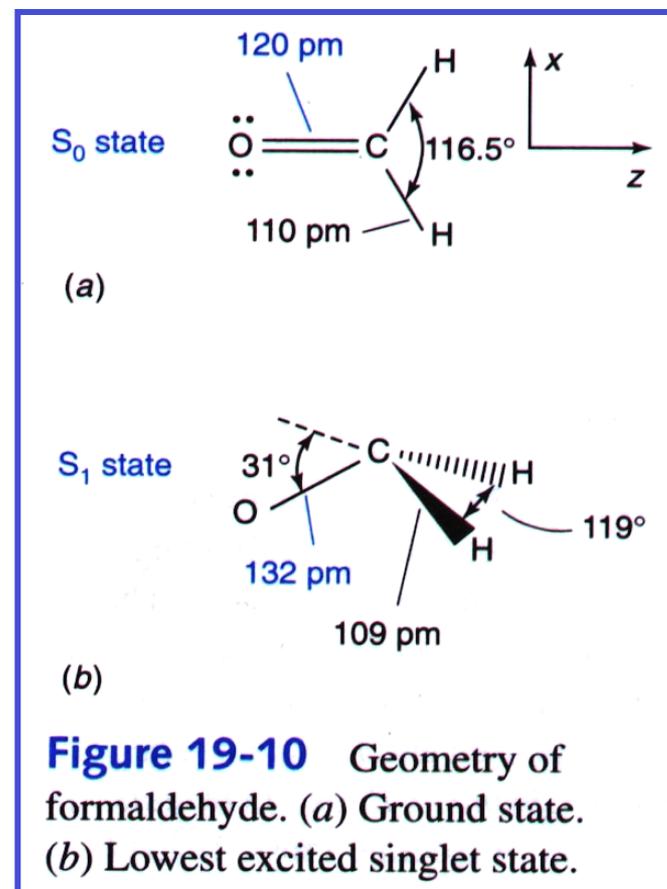
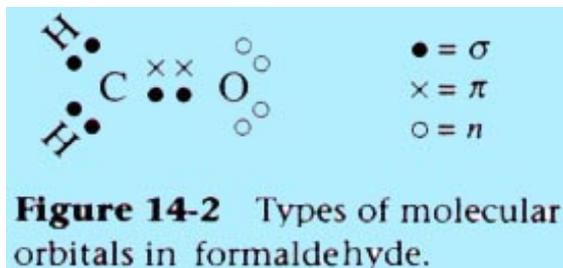
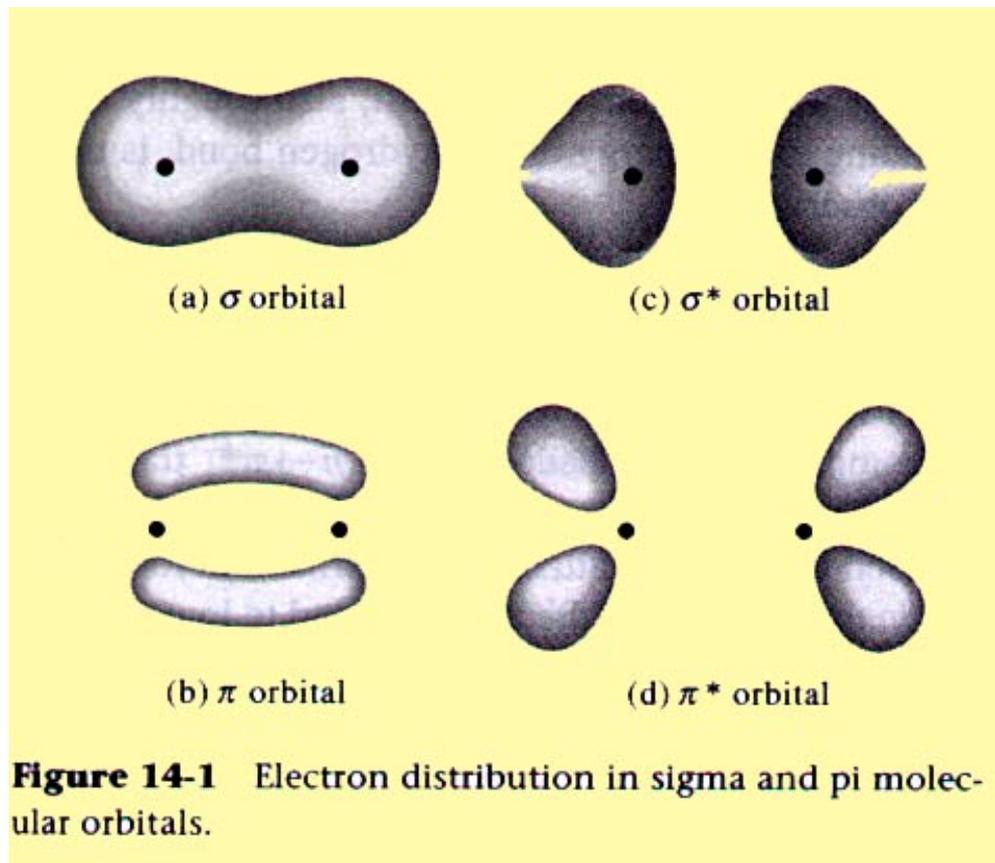
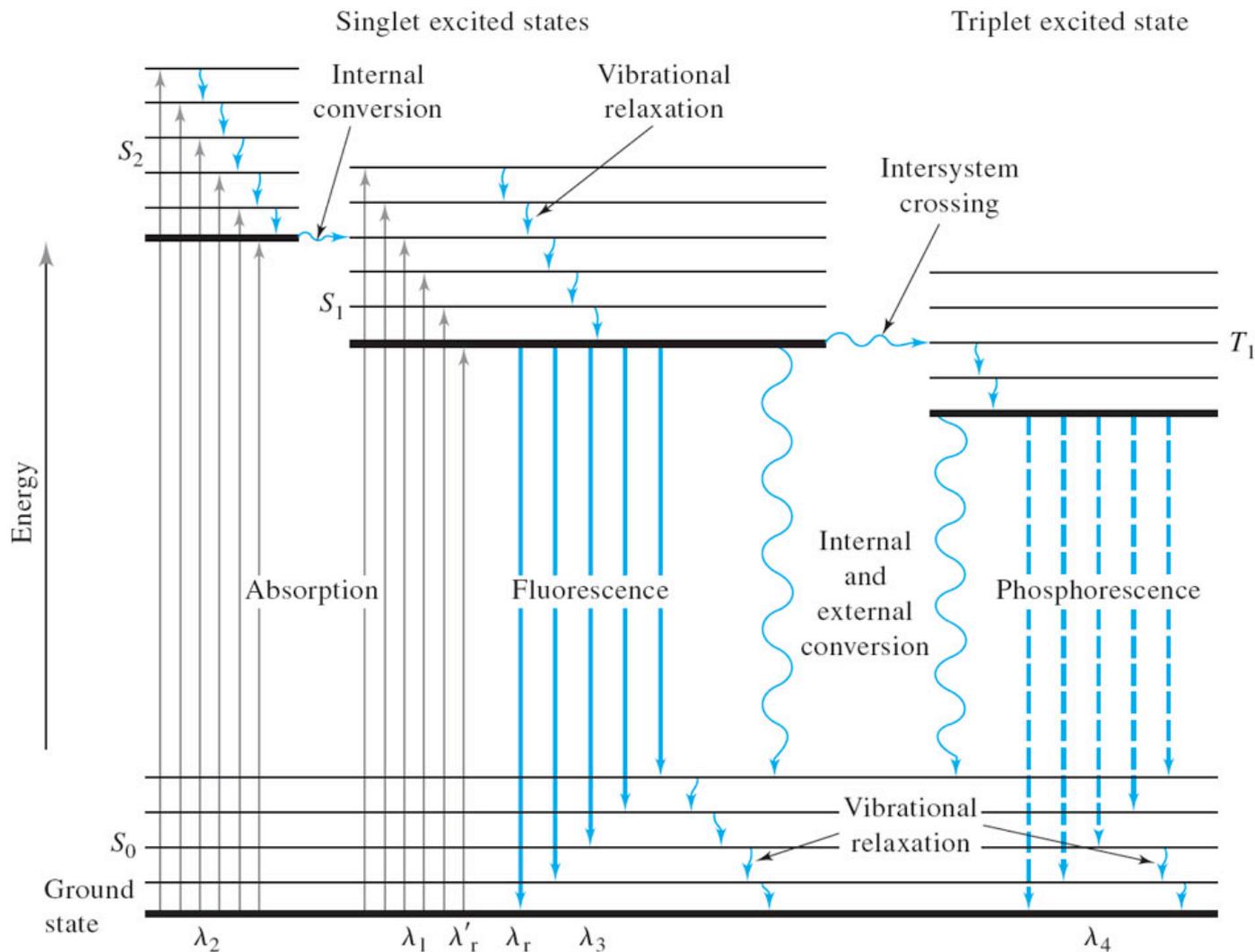


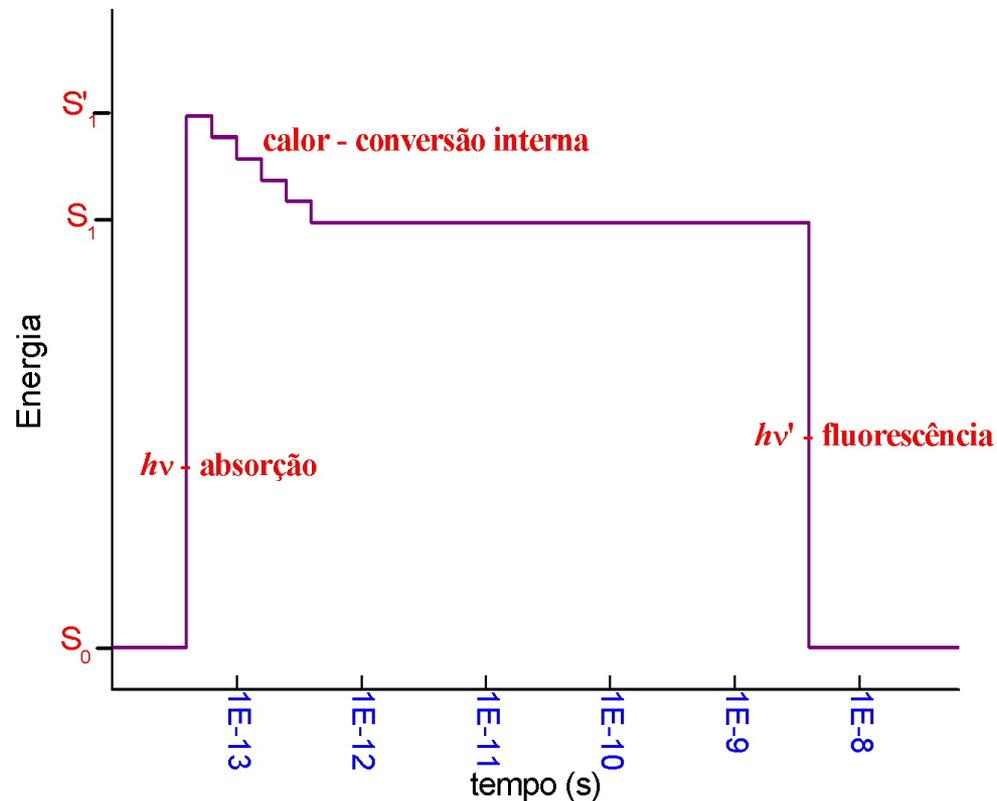
Diagrama de Níveis Energéticos de Moléculas Fotoluminescentes



Processos de Absorção e Emissão

- **Velocidades dos processos:**

- Absorção: 10^{-14} a 10^{-15} s
- Fluorescência: de 10^{-7} a 10^{-9} s ($\epsilon > 10^3$) até 10^{-5} a 10^{-6} s
- Fosforescência: de 10^{-4} a $10/+$ s



Processos de Desativação

A competição cinética entre processos radiativos (emissão de fótons) e não-radiativos determina a natureza do processo de desativação

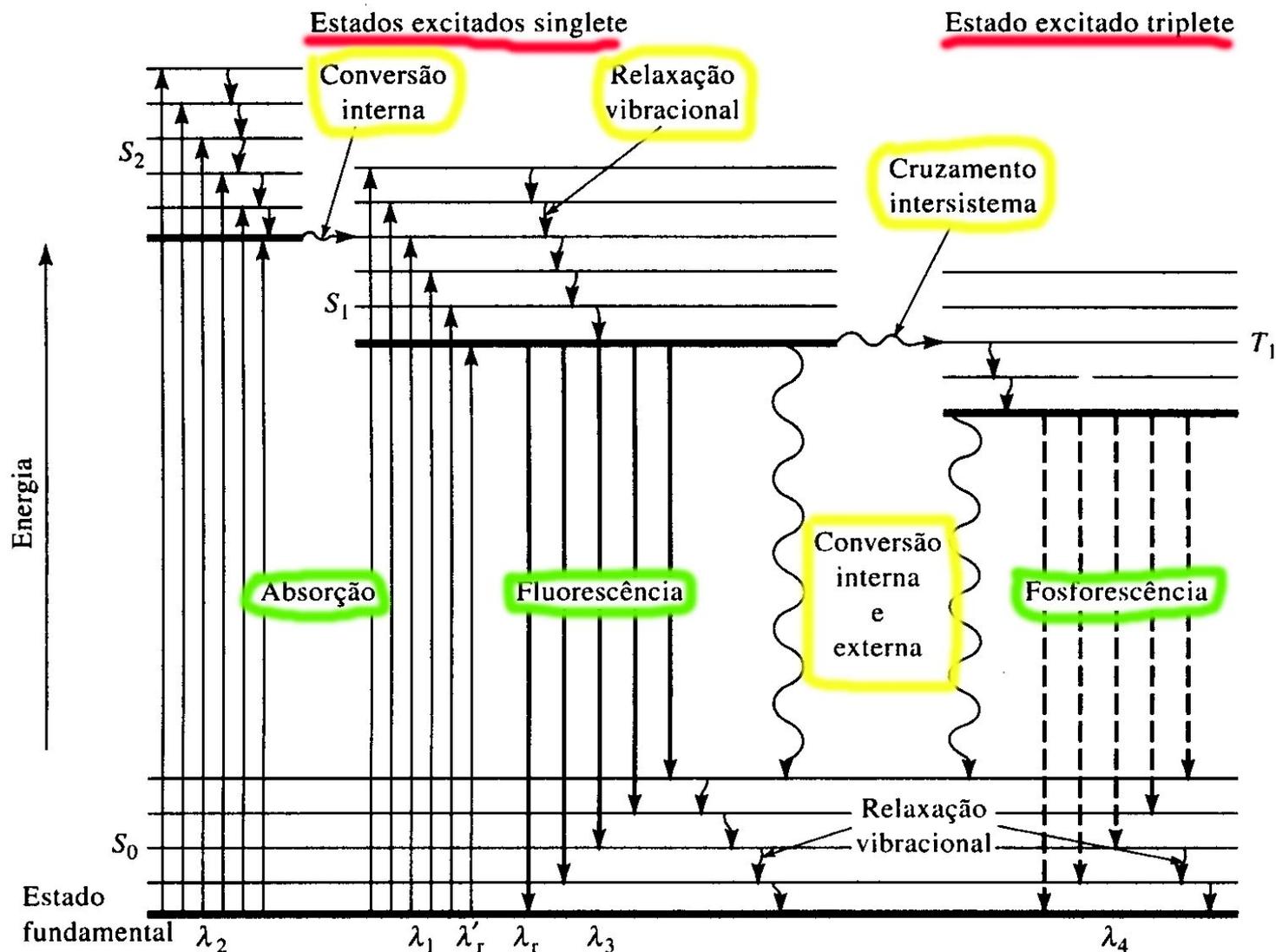
- **Relaxação vibracional**

- Imediata (10^{-12} s) dissipação por vibração
- Colisão com moléculas do solvente
- Aumento mínimo de temperatura do sistema
- Dissipação de energia = perda de energia \Rightarrow

Deslocamento de Stokes

- $\lambda_{emissão} > \lambda_{excitação} \therefore E_{emitida} < E_{absorvida}$

Diagrama de Níveis Energéticos de Moléculas Fotoluminescentes



Processos de Desativação

- **Conversão interna**

- Processo intramolecular
- Proximidade entre níveis eletrônicos excitado e níveis vibracionais de um estado eletrônico excitado de menor energia

(níveis superpostos)

- **Resultado prático:**
não importa qual λ_{exc}
fluorescência $\Rightarrow \lambda_{\text{em}}$

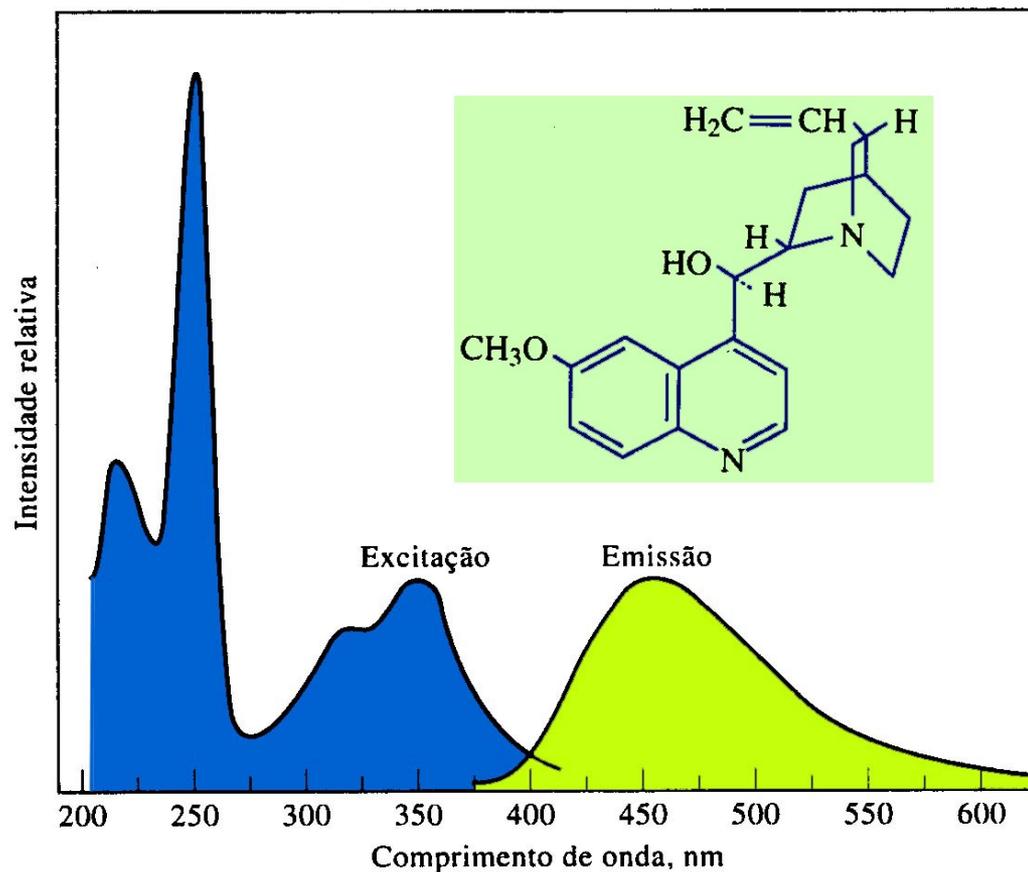
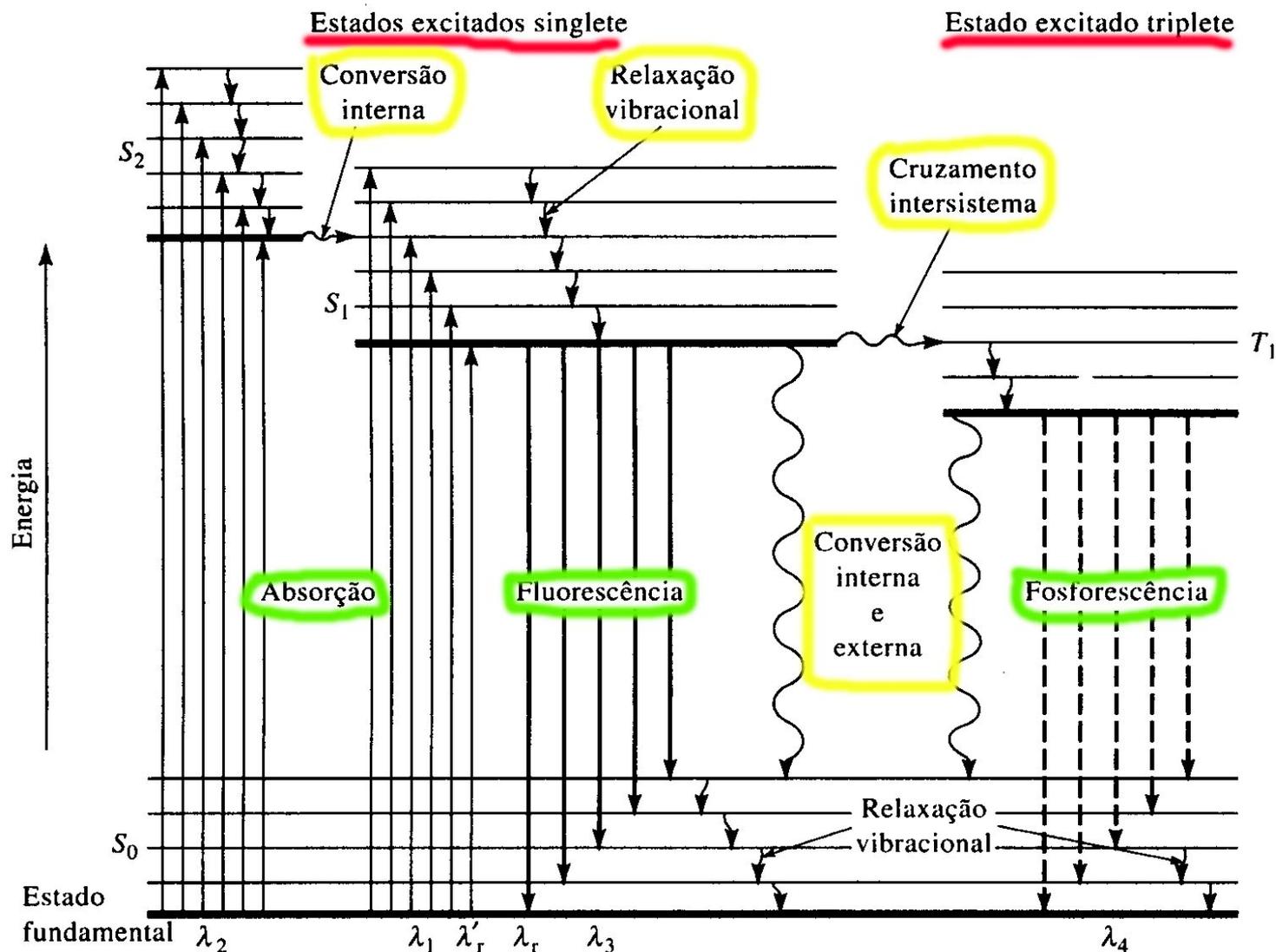


Diagrama de Níveis Energéticos de Moléculas Fotoluminescentes

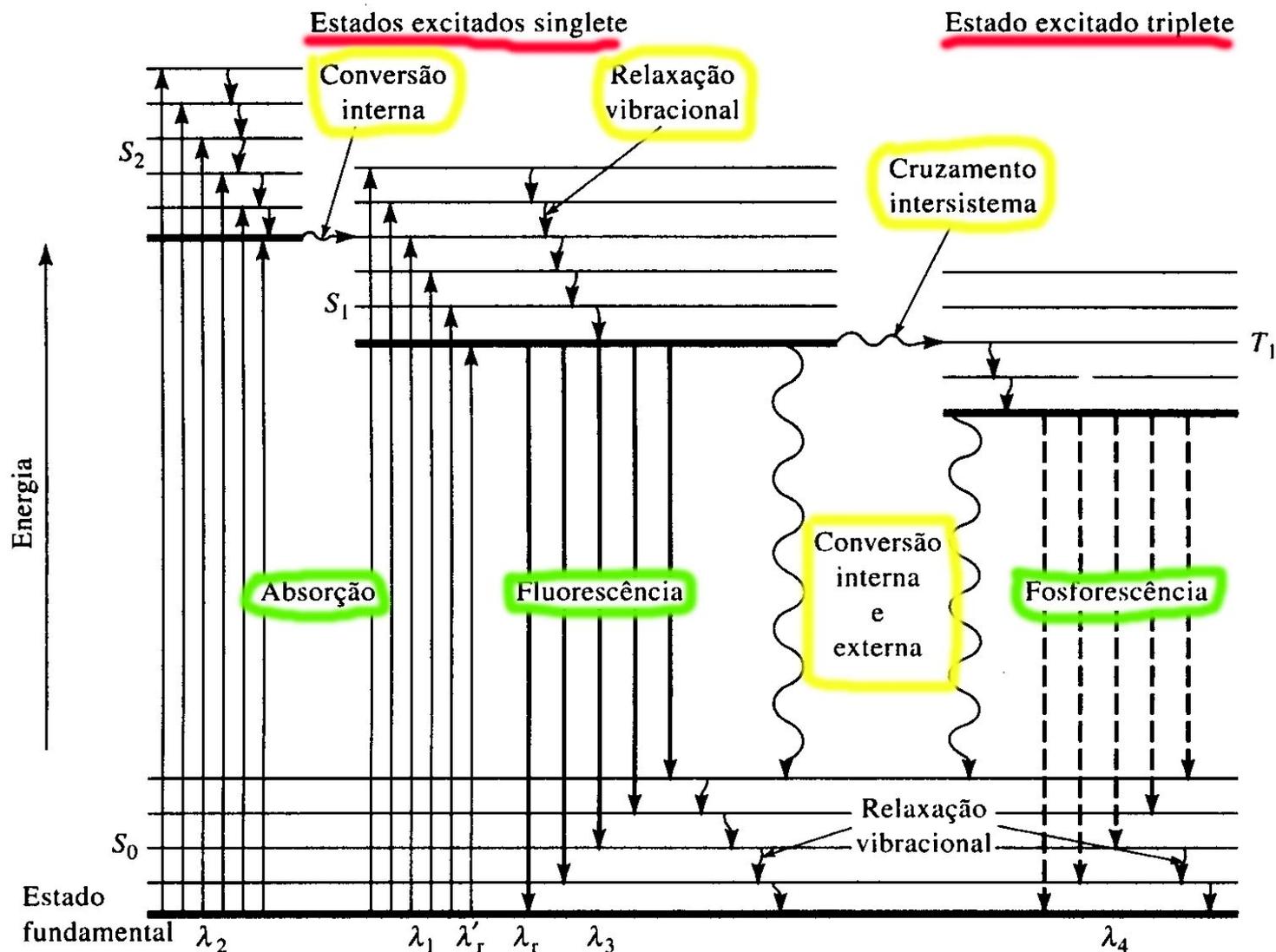


Processos de Desativação

- **Conversão externa**

- Processo intermolecular: envolve transferência de energia da molécula excitada para moléculas de solvente ⇒ ***supressão colisional***
- Obviamente depende de condições intrínsecas ao solvente e fatores que aumentem ou diminuam o número de colisões:
 - Tipo de solvente
 - Temperatura
 - Viscosidade
 - Presença de supressores

Diagrama de Níveis Energéticos de Moléculas Fotoluminescentes



Processos de Desativação

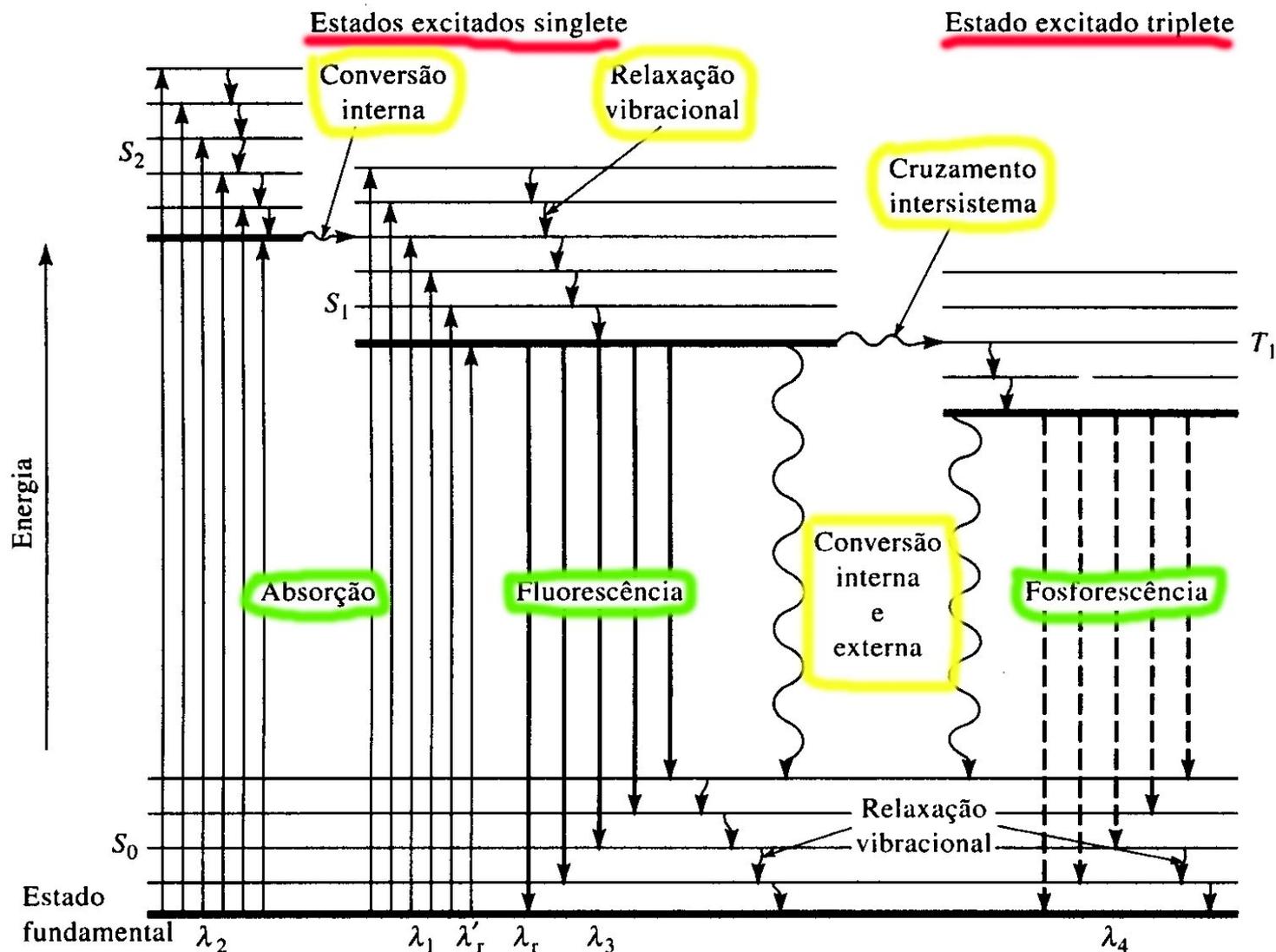
- **Cruzamento Intersistema**

- Ocorre com a inversão do spin de elétron excitado o que altera a multiplicidade da molécula
- A probabilidade desta transição depende da proximidade entre os níveis energéticos vibracionais

- **Fosforescência**

- Transição triplete \rightarrow singlete é menos provável que a transição singlete \rightarrow singlete
∴ tempo de vida médio é grande
- Evento raro: observado em baixas temperaturas, solventes viscosos ou mesmo em sólidos

Diagrama de Níveis Energéticos de Moléculas Fotoluminescentes



Variáveis que Afetam Luminescência

- **Rendimento ou Eficiência Quântica**

- É a razão entre o número de moléculas luminescentes e o número total de moléculas excitadas; ou seja:

$$\phi = \frac{\text{n}^\circ \text{ moléculas luminescentes}}{\text{n}^\circ \text{ total de moléculas excitadas}}$$

$$0 \leq \phi \leq 1$$

- Processo puramente cinético! Simplificando:

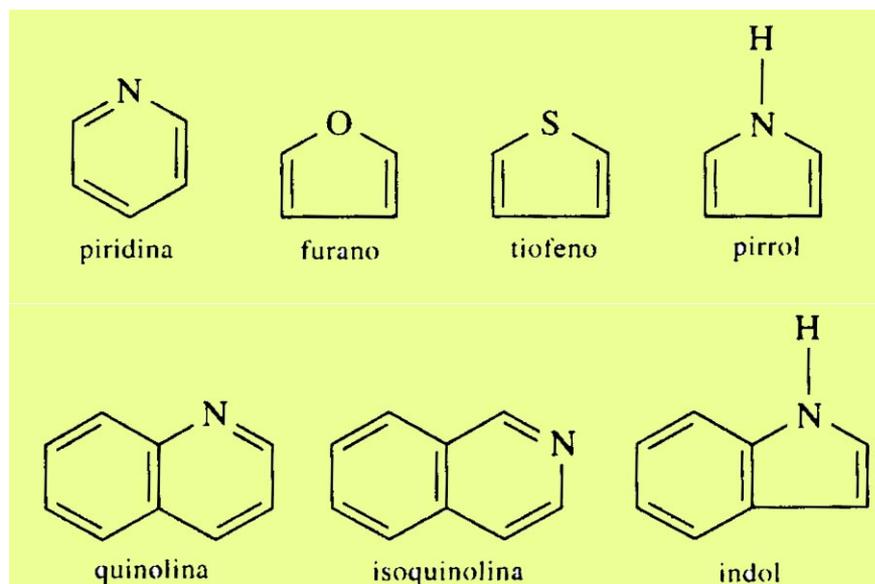
$$\varphi = \frac{k_f}{k_f + k_{in} + k_{ce} + k_{ci} + k_o}$$

- Tipo de transição: n ou $\pi \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi$ ou n
- $\phi > \pi^* \rightarrow \pi$ porque tempo vida é menor ($\sim 10^{-7} - 10^{-9}$)

Variáveis que Afetam Luminescência

- **Fluorescência e estrutura**

- Estruturas aromáticas condensadas e/ou com alto grau de conjugação apresentam alta eficiência quântica
- $\pi \rightarrow \pi^* \rightarrow \pi$
- Heterocíclicos: não fluorescem – $n \rightarrow \pi^* \rightarrow n$



- Heterocíclicos condensados fluorescem!

Variáveis que Afetam Luminescência

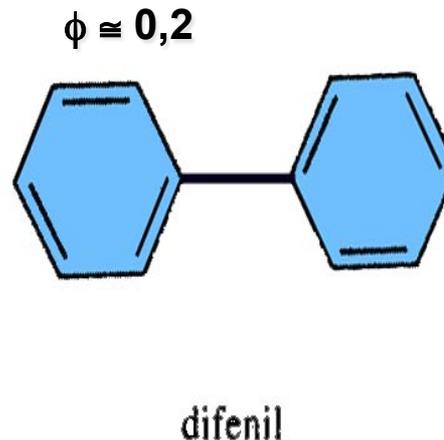
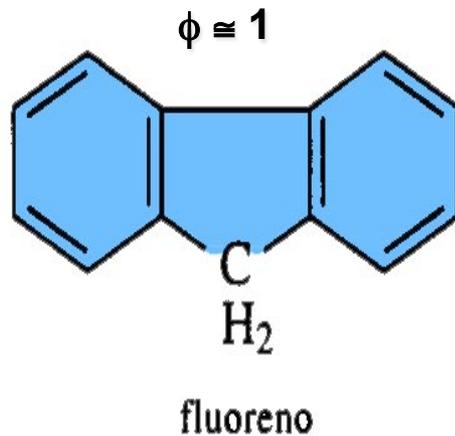
- **Fluorescência e estrutura**

- A substituição em anéis aromáticos afetam a intensidade relativa de fluorescência e os valores dos λ_{\max} de absorção/emissão

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

Variáveis que Afetam Luminescência

- **Fluorescência e estrutura – Rigidez estrutural**
 - Moléculas flexíveis tendem a relaxar por vibração
 - A flexibilidade causa aumento da constante de conversão interna (k_{ci}) o que leva a desativação não-radiativa



Variáveis que Afetam Luminescência

- **Solvente e Temperatura**

- Aumento de T ou diminuição de viscosidade do solvente levam a um aumento no número de colisões e portanto aumenta a probabilidade por conversão externa (*supressão colisional*) ** Vide tarefa no Moodle!

- **pH**

- A fluorescência de compostos aromáticos com funcionalidades ácidas ou básicas apresentam forte dependência com o pH
 - Ex.: anilina/anilínio e fenol/fenolato
 - Obs: pKa de substâncias no estado excitado podem variar de 3 a 4 unidades em relação ao estado fundamental

Variáveis que Afetam Luminescência

- **Oxigênio dissolvido**

- Oxigênio e outras espécies paramagnéticas tendem a diminuir a fluorescência pelo aumento do cruzamento intersistemas (fosforescência)
- Também é possível a oxidação da espécie fluorescente

- **Outras moléculas em solução**

- Moléculas com átomos pesados (tetrabrometo de carbono e iodeto de etila) aumentam a velocidade de inversão de spin.
- Acrilamida e proteínas

Intensidade de Fluorescência e Concentração

- **A potência da emissão de fluorescência (F) é proporcional à potência radiante do feixe de excitação absorvido pela molécula**

$$F = K'(P_0 - P)$$

P_0 : potência do feixe radiante

P : potência após atravessar uma distância b do meio

K' : constante dependente da eficiência quântica

- **Relacionando com a lei de Beer**

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc}$$

ϵ = absorptividade molar e ϵbc = absorvância

Intensidade de Fluorescência e Concentração

- Substituindo:

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

E expandindo como uma série de Maclaurin temos:

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

Para sistemas em baixa concentração, *i.e.*, $A < 0,05$, apenas o primeiro termo em parênteses é relevante

$$F = 2,3K' \epsilon bc P_0$$

ou simplesmente:

$$F = Kc$$

Intensidade de Fluorescência e Concentração

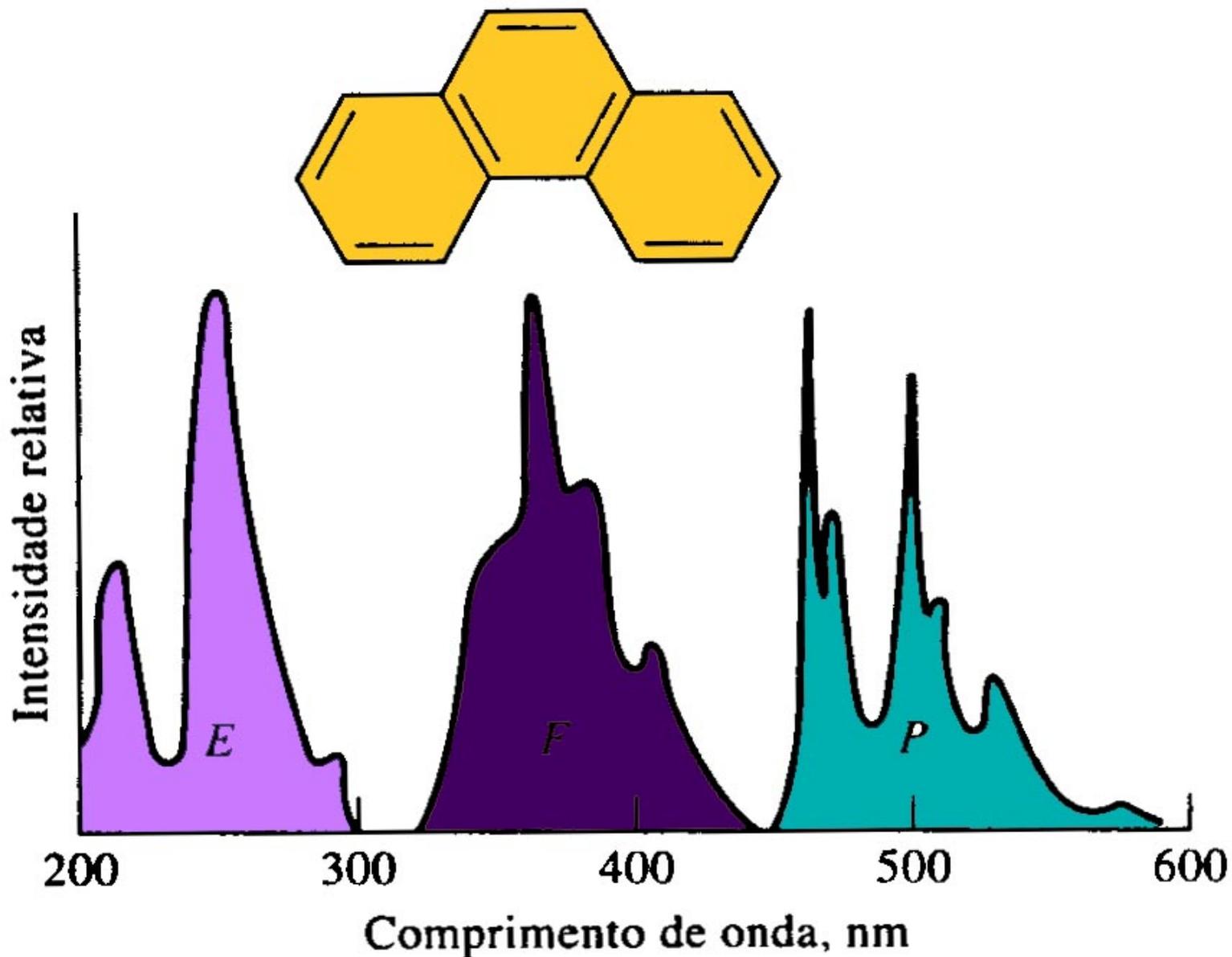
- Sendo

$$F = Kc$$

A fluorescência é diretamente proporcional a concentração da espécie fluorescente, desde que em baixas concentrações ($A < 0,05$)

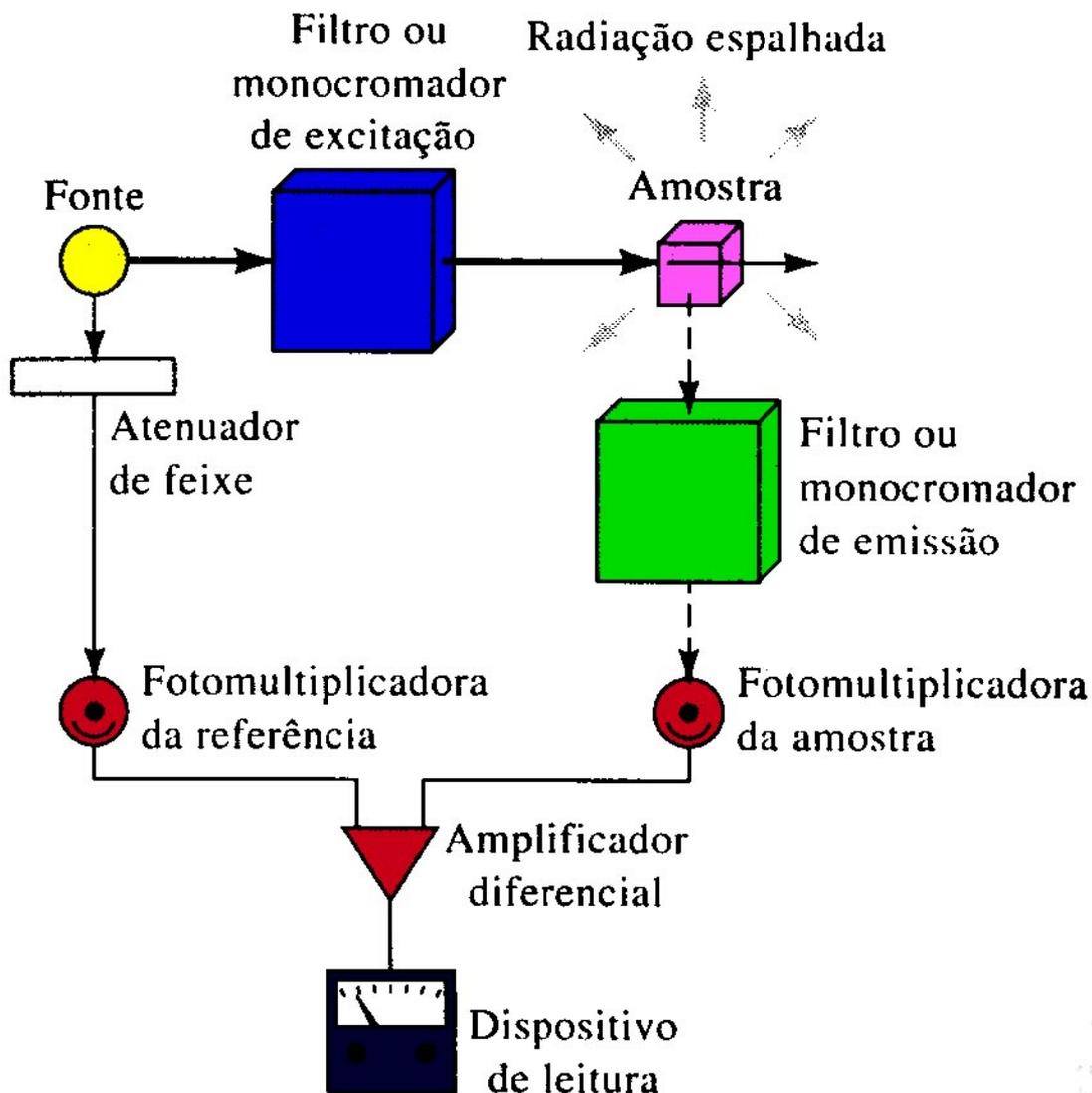
- **Desvios da linearidade:**
 - Altas concentrações
 - Auto-supressão
 - Auto-absorção

Espectros de Emissão e Excitação



Instrumentação

- Genericamente



Componentes da Instrumentação

- **Fontes de Radiação**

- Lâmpadas: (melhor custo)

- Lâmpada de vapor de mercúrio – várias linhas intensas para promover a excitação – uso de filtros de absorção ou de interferência
- Lâmpada de arco de xenônio a alta pressão – fonte contínua ~ radiação do corpo negro

- Lasers: (melhor sensibilidade)

- Lasers de corantes sintonizáveis bombeados por laser pulsado de N_2 ou laser Nd:YAG

- **Filtros e Monocromadores**

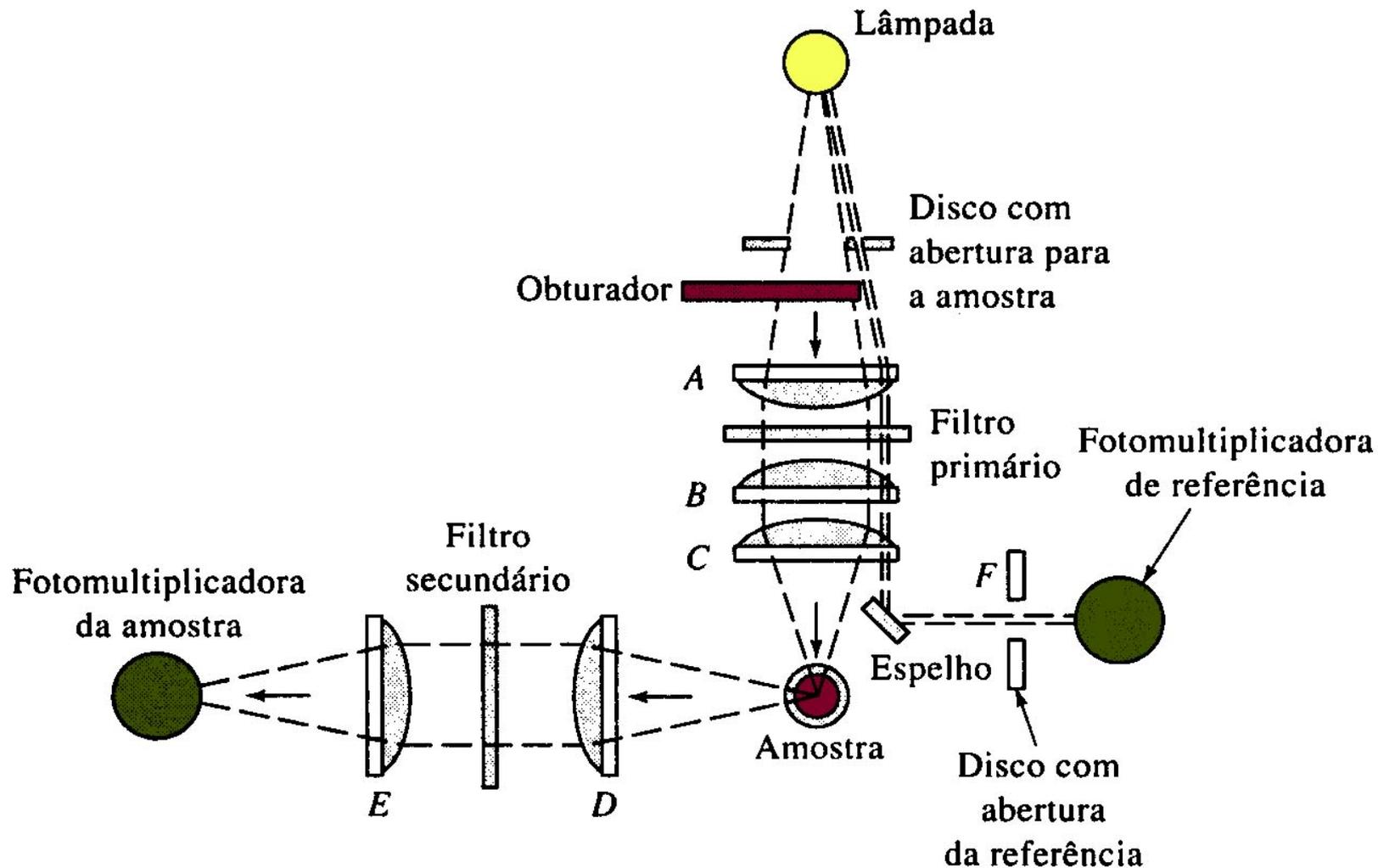
- Filtros são comuns em fluorímetros enquanto que monocromadores são essenciais em espectrofluorímetros

- **Transdutores (detectores)**

- Fotomultiplicadoras (PMT) ou contador de fótons
- Arranjo de diodos e dispositivos de carga acoplada (CCD)

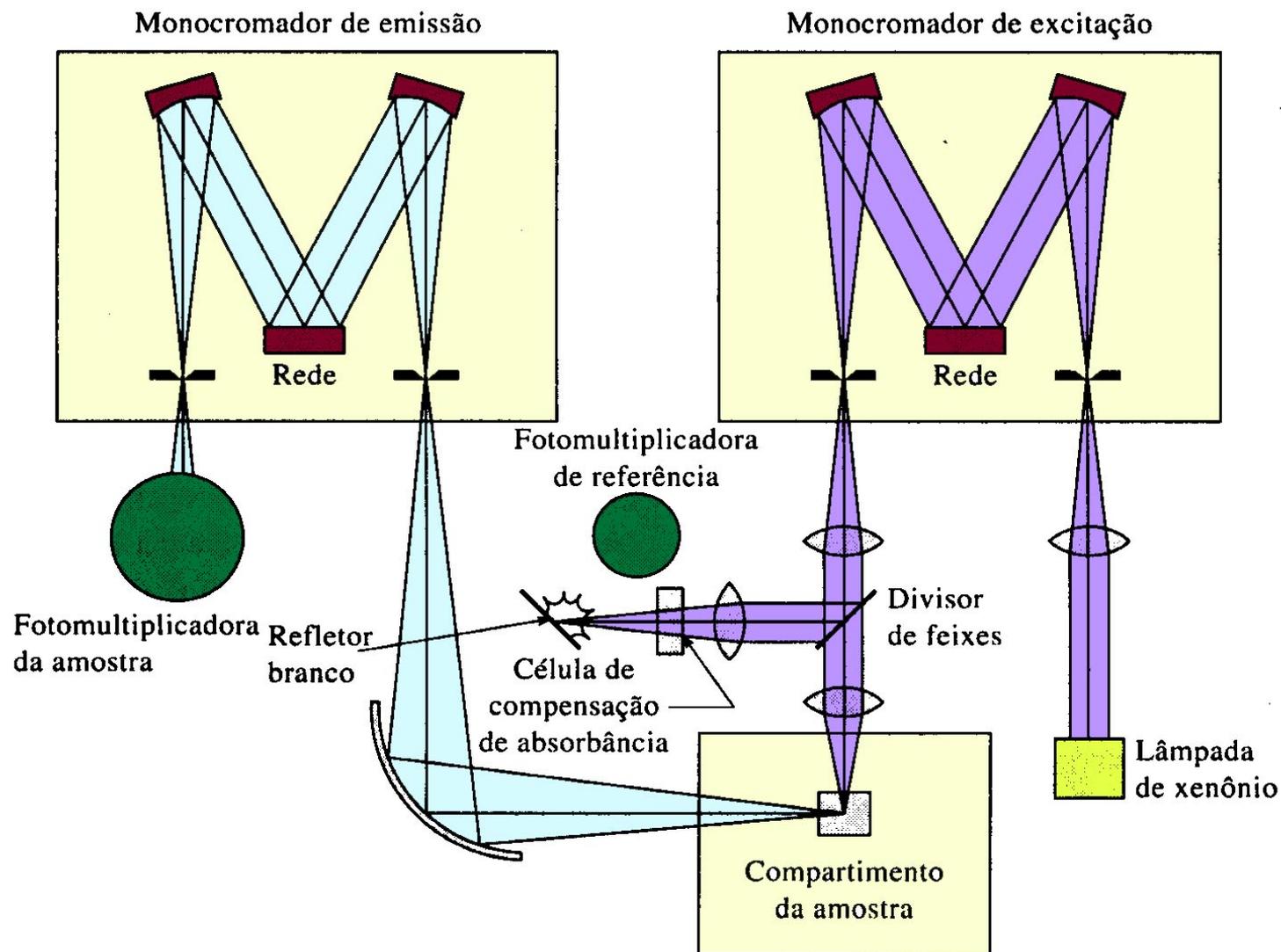
Instrumentação

- Fluorímetros



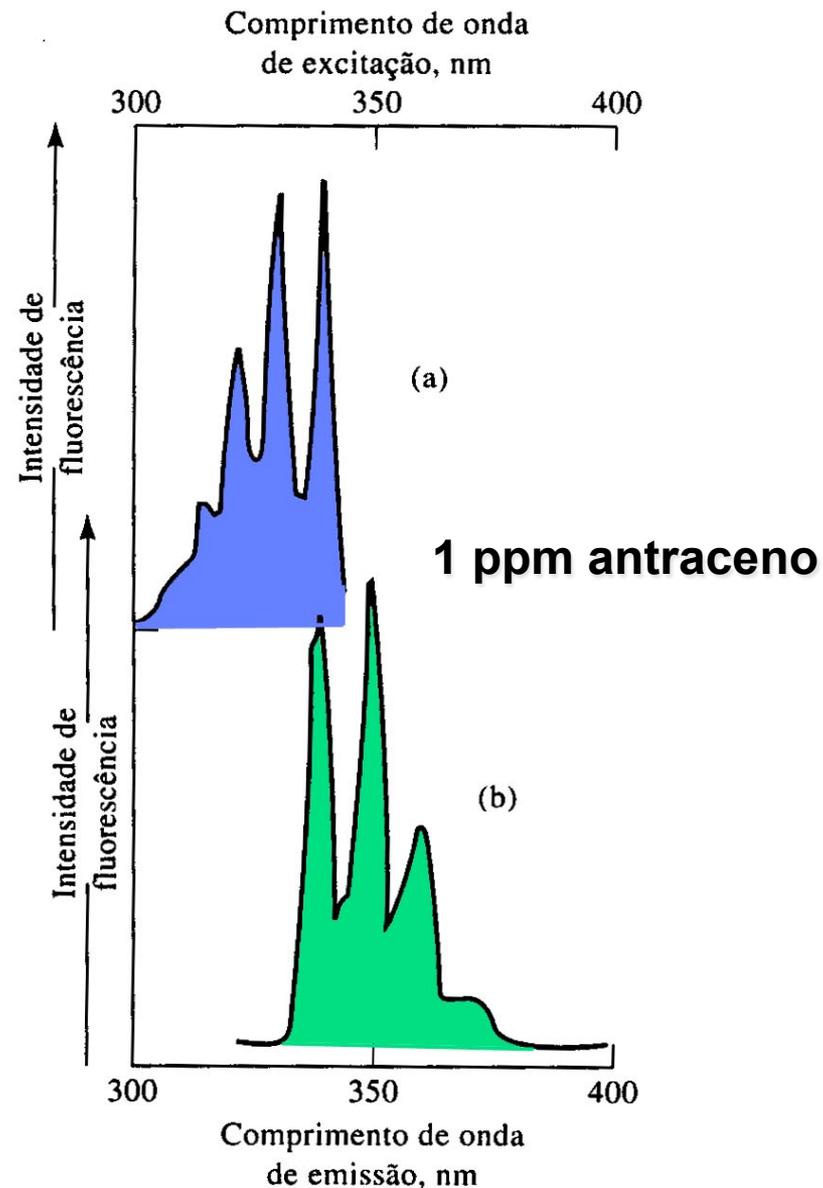
Instrumentação

- Espectrofluorímetros



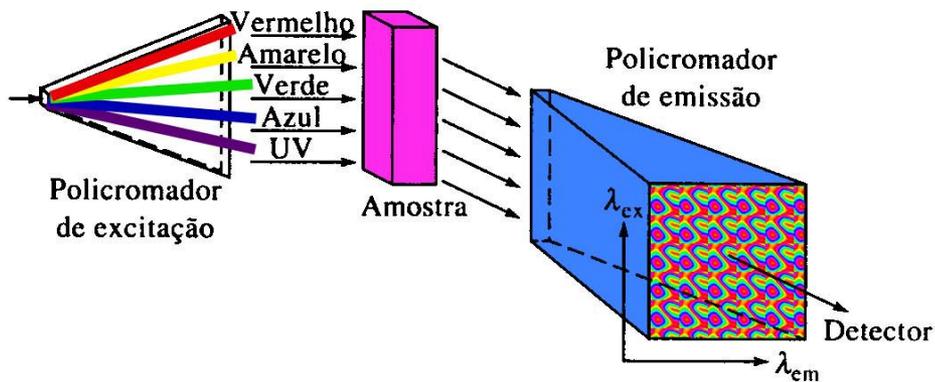
Dois Monocromadores É Essencial

- Espectros de excitação
- Espectros de emissão
- Máxima seletividade
- Máxima sensibilidade

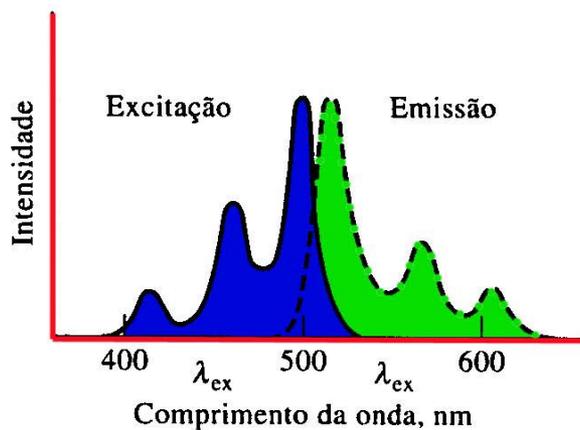


Instrumentação

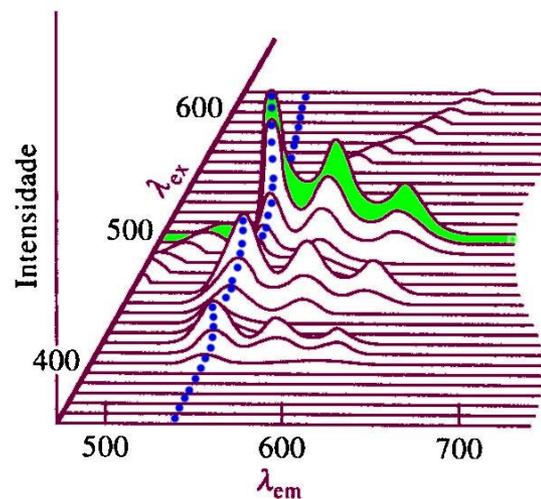
- Instrumentos baseados em arranjo de transdutores



(a)



(b)



(c)

Aplicações e Métodos de Fotoluminescência

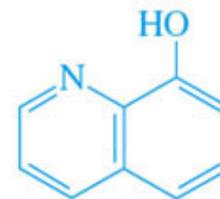
- Métodos mais sensíveis que os baseados em espectrofotometria de absorção – 1 a 3 ordens de grandeza melhores
- Independente de P_0
- **Espécies inorgânicas**
 - Métodos Diretos e Indiretos
 - Métodos diretos medem a fluorescência de quelatos luminescentes
 - Métodos indiretos medem a supressão de fluorescência causada pelo analito
 - Metais de transição:
 - 1) geralmente paramagnéticos e aumentam a velocidade de cruzamento intersistema ao estado tripleto
 - 2) elevado número de níveis de energia facilitam a desativação por conversão interna

Reagentes Fluorimétricos

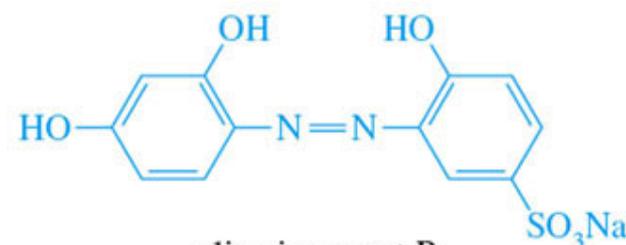
- Essencialmente cátions

Moléculas orgânicas

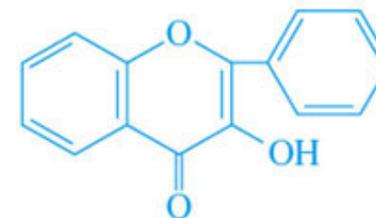
- Fluorescência nativa
- Agentes derivantes



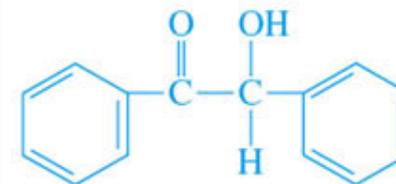
8-hydroxyquinoline
(reagent for Al, Be, and other metal ions)



alizarin garnet R
(reagent for Al, F⁻)



flavanol
(reagent for Zr and Sn)



benzoin
(reagent for B, Zn, Ge, and Si)

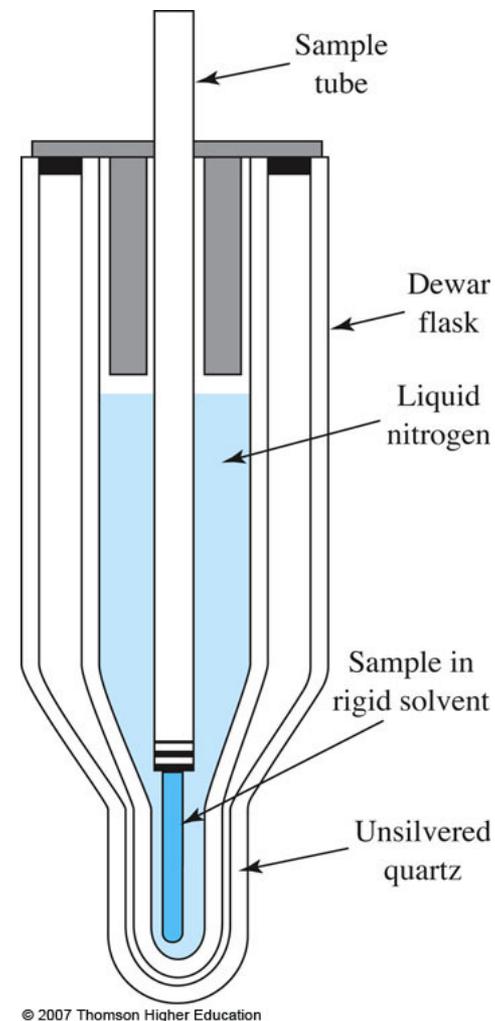
TABLE 15-2 Selected Fluorometric Methods for Inorganic Species

Ion	Reagent	Wavelength, nm		LOD, $\mu\text{g/mL}$	Interferences
		Absorption	Fluorescence		
Al ³⁺	Alizarin garnet R	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ni, PO ₄ ³⁻ , Th, Zr
F ⁻	Quenching of Al ³⁺ complex of alizarin garnet R	470	500	0.001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO ₄ ³⁻ , Th, Zr
B ₄ O ₇ ²⁻	Benzoin	370	450	0.04	Be, Sb
Cd ²⁺	2-(<i>o</i> -Hydroxyphenyl)-benzoxazole	365	Blue	2	NH ₃
Li ⁺	8-Hydroxyquinoline	370	580	0.2	Mg
Sn ⁴⁺	Flavanol	400	470	0.1	F ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Zr
Zn ²⁺	Benzoin	—	Green	10	B, Be, Sb, colored ions

Métodos Fosforimétricos

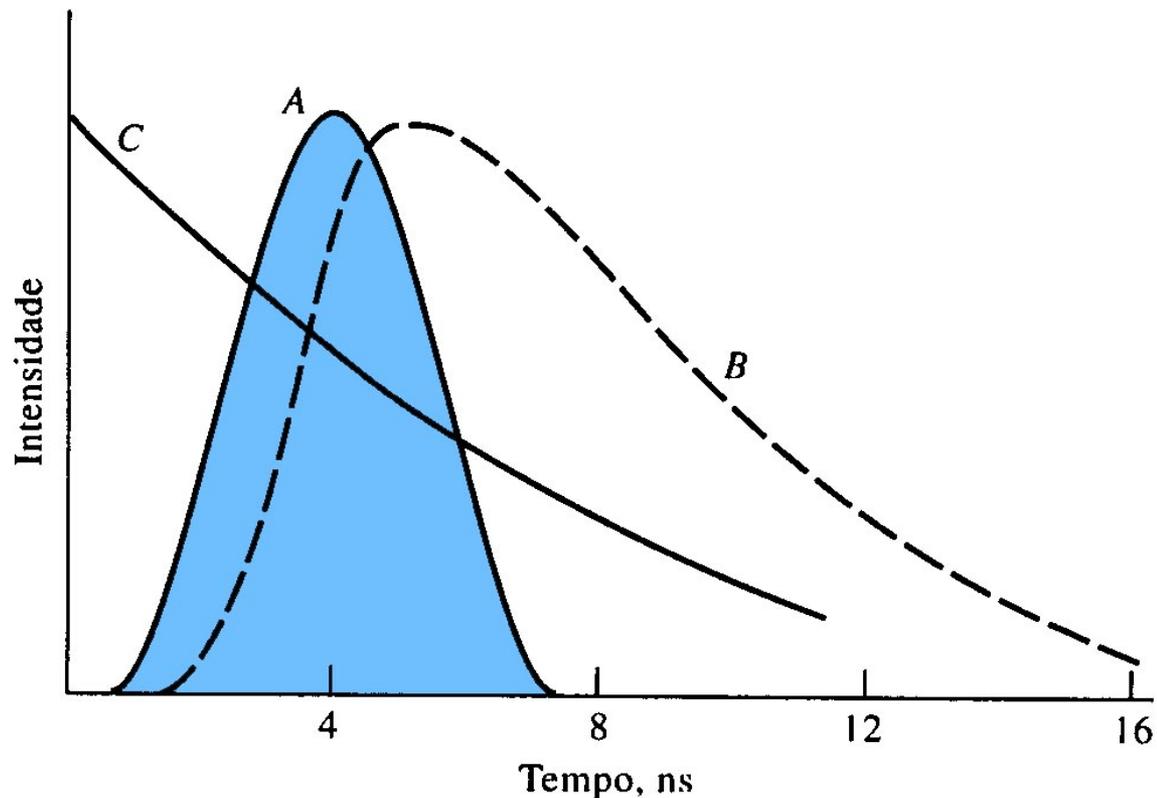
- Métodos complementares à fluorimetria
- Aplicações variadas – Grande seletividade
 - Bioquímica (ácidos nucleicos, proteínas, etc.)
 - Indústria do petróleo e poluentes ambientais (hidrocarbonetos poliaromáticos)

O uso da fosforimetria, menos difundido, pode estar relacionado às dificuldades experimentais como baixa temperatura e grande suscetibilidade à supressão colisional em meios líquidos – adsorção de analitos a uma matriz sólida (papel)

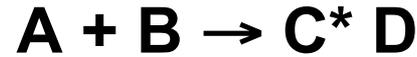


Fluorescência Resolvida no Tempo

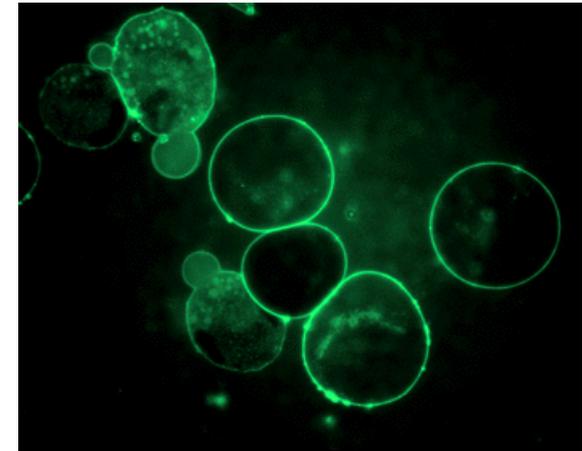
- Possibilita análise qualitativa
- Permite análise de mistura de moléculas fluorescentes (com espectros similares)
- Instrumentação mais sofisticada
 - Lasers
 - PMT de resposta rápida
 - Contadores de tempo de alta sincronização



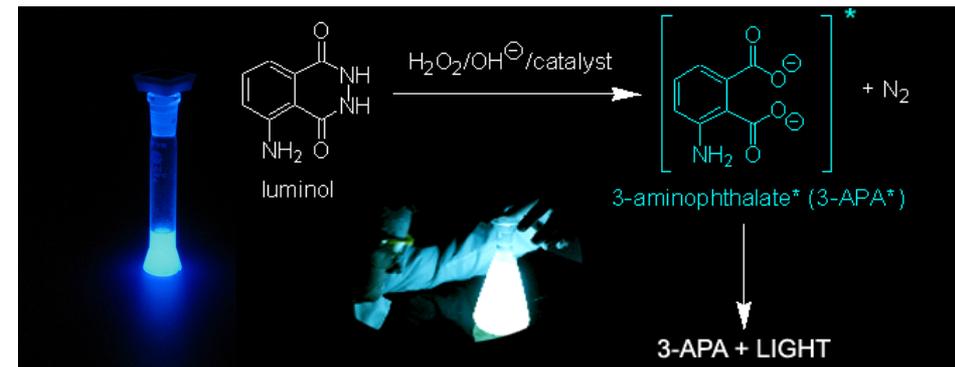
Quimiluminescência (eletroquimiluminescência)



- **Número limitado de reações** – maiores exemplos vêm dos sistemas biológicos – bioluminescência: vagalumes (luciferase), águas-vivas, crustáceos, etc. (altas profundezas)
- Elevada seletividade e simplicidade instrumental
- Atualmente apresenta grande importância biotecnológica – GFP – proteína fluorescente verde



**** Vide tarefa no Moodle!**



Espectrofluorimetria como Sistema de Detecção Analítica

- **Acoplamento com métodos de separação em fase líquida:**
 - HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
 - μ LC – cromatografia líquida capilar
 - CE – eletroforese capilar
 - LIF – fluorescência induzida a laser
- **Maiores níveis de sensibilidade**
 - 10^{-9} mol L⁻¹ a 10^{-12} mol L⁻¹
 - Detecção de uma única molécula
- **Seqüenciamento de DNA**
 - Resolução espectral + alta sensibilidade



Esquema 1 base - 1 cor - 4 faixas

ATCGGATGGA*

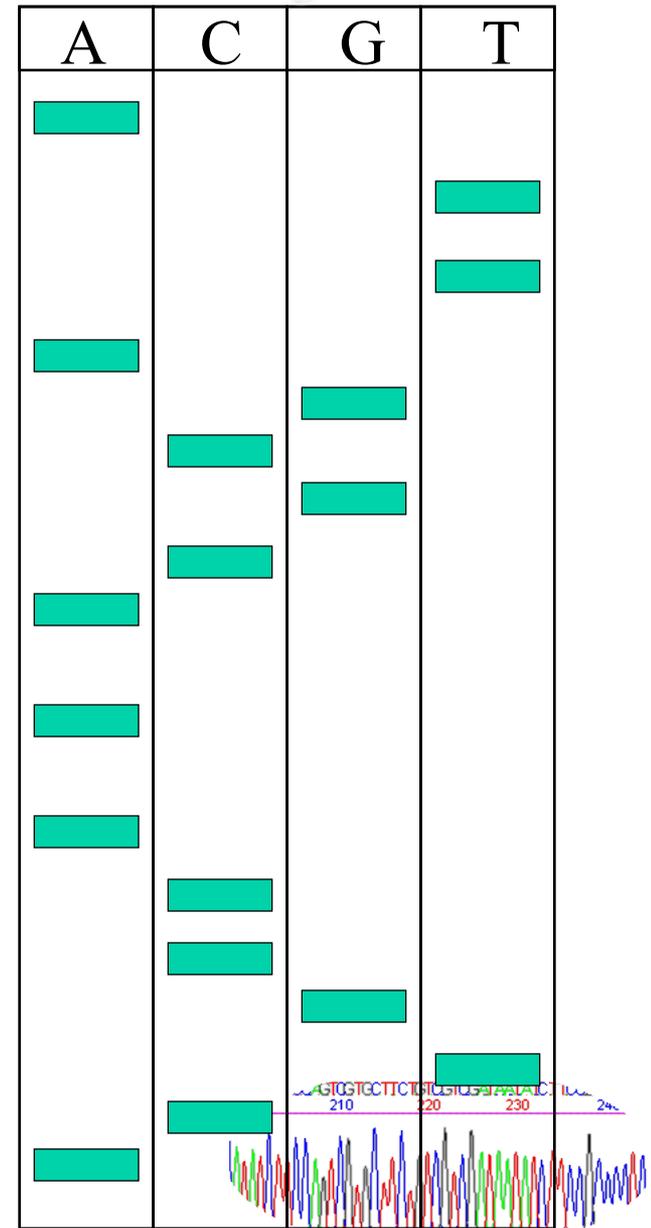
ATCGGATGGATTA*

ATCGGATGGATTAGCGCA*

ATCGGATGGATTAGCGCAA*

ATCGGATGGATTAGCGCAAA*

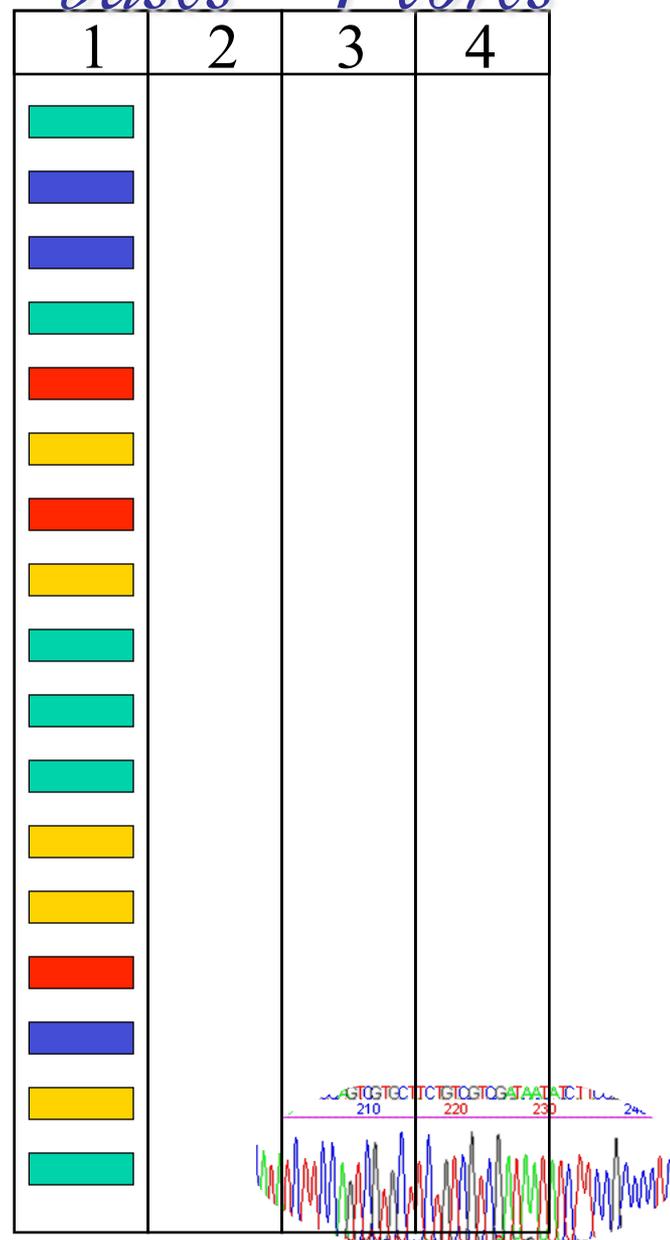
ATCGGATGGATTAGCGCCATCCGTCA*





Esquema 4 bases - 4 cores

ATCGGATGGA*
 ATCGGATGGAT*
 ATCGGATGGATT*
 ATCGGATGGATTA*
 ATCGGATGGATTAG*
 ATCGGATGGATTAGC*
 ATCGGATGGATTAGCG*
 ATCGGATGGATTAGCGC*
 ATCGGATGGATTAGCGCA*
 ATCGGATGGATTAGCGCAA*
 ATCGGATGGATTAGCGCAAA*
 ATCGGATGGATTAGCGCCATC*
 ATCGGATGGATTAGCGCCATCC*
 ATCGGATGGATTAGCGCCATCCG*
 ATCGGATGGATTAGCGCCATCCGT*
 ATCGGATGGATTAGCGCCATCCGTC*
 ATCGGATGGATTAGCGCCATCCGTCA*



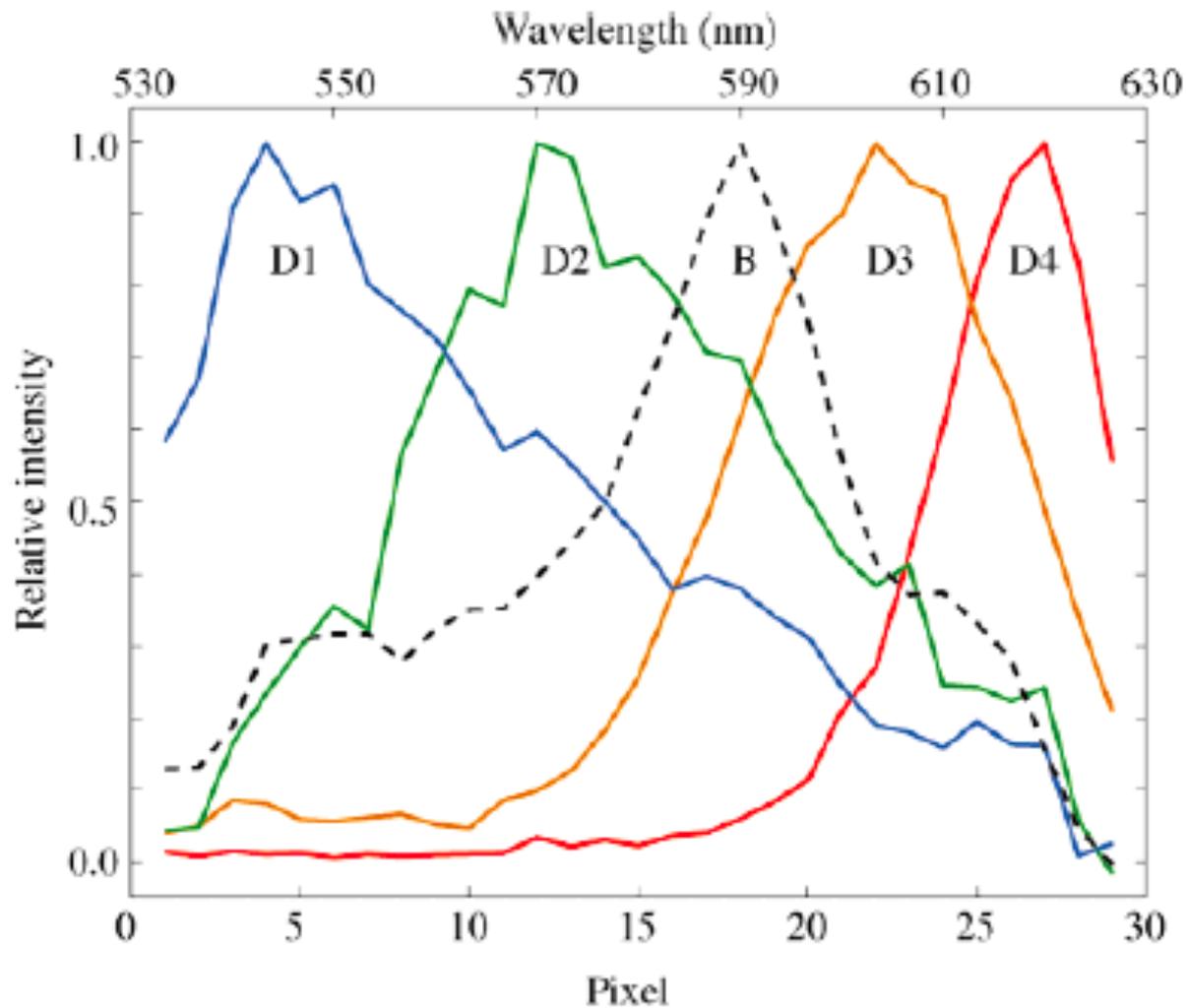
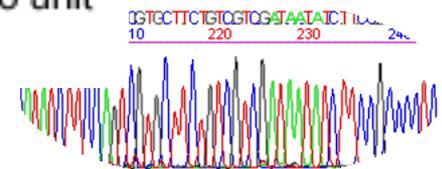
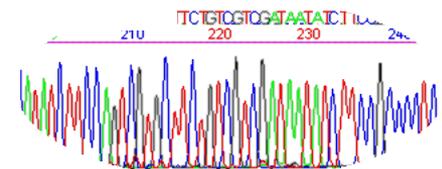
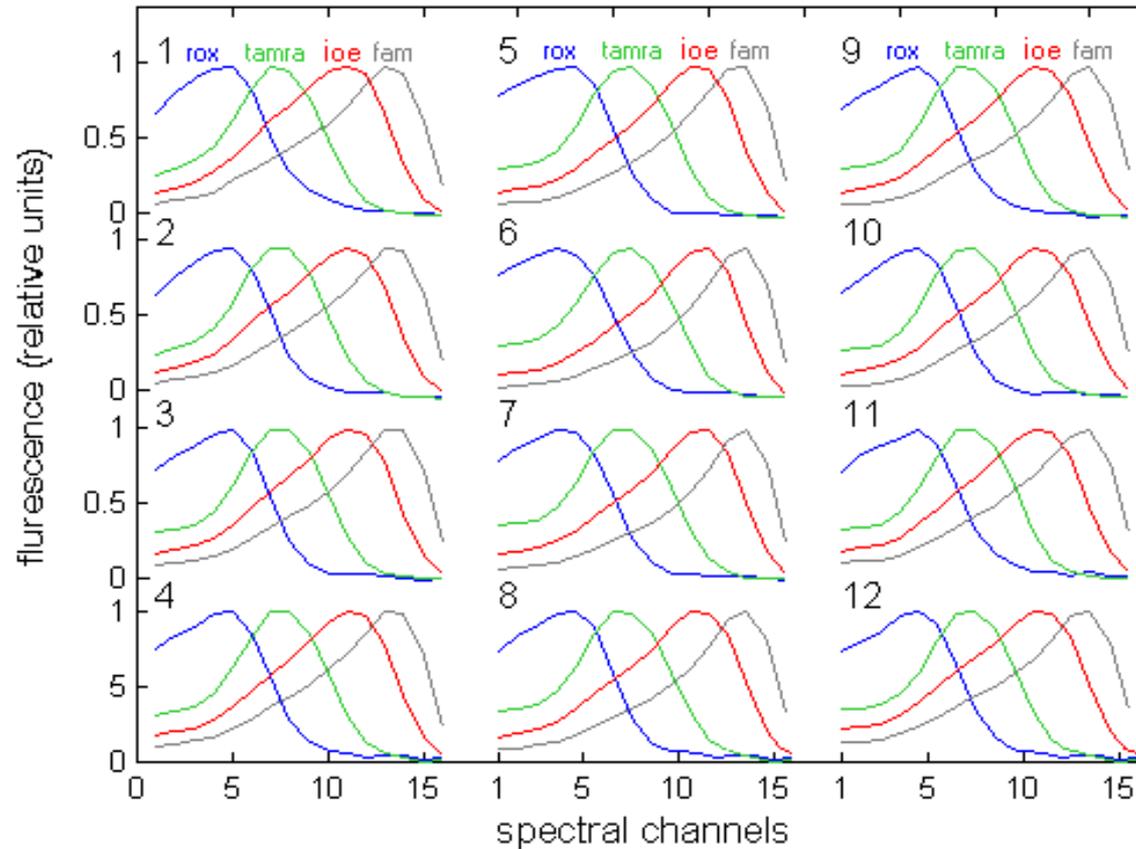


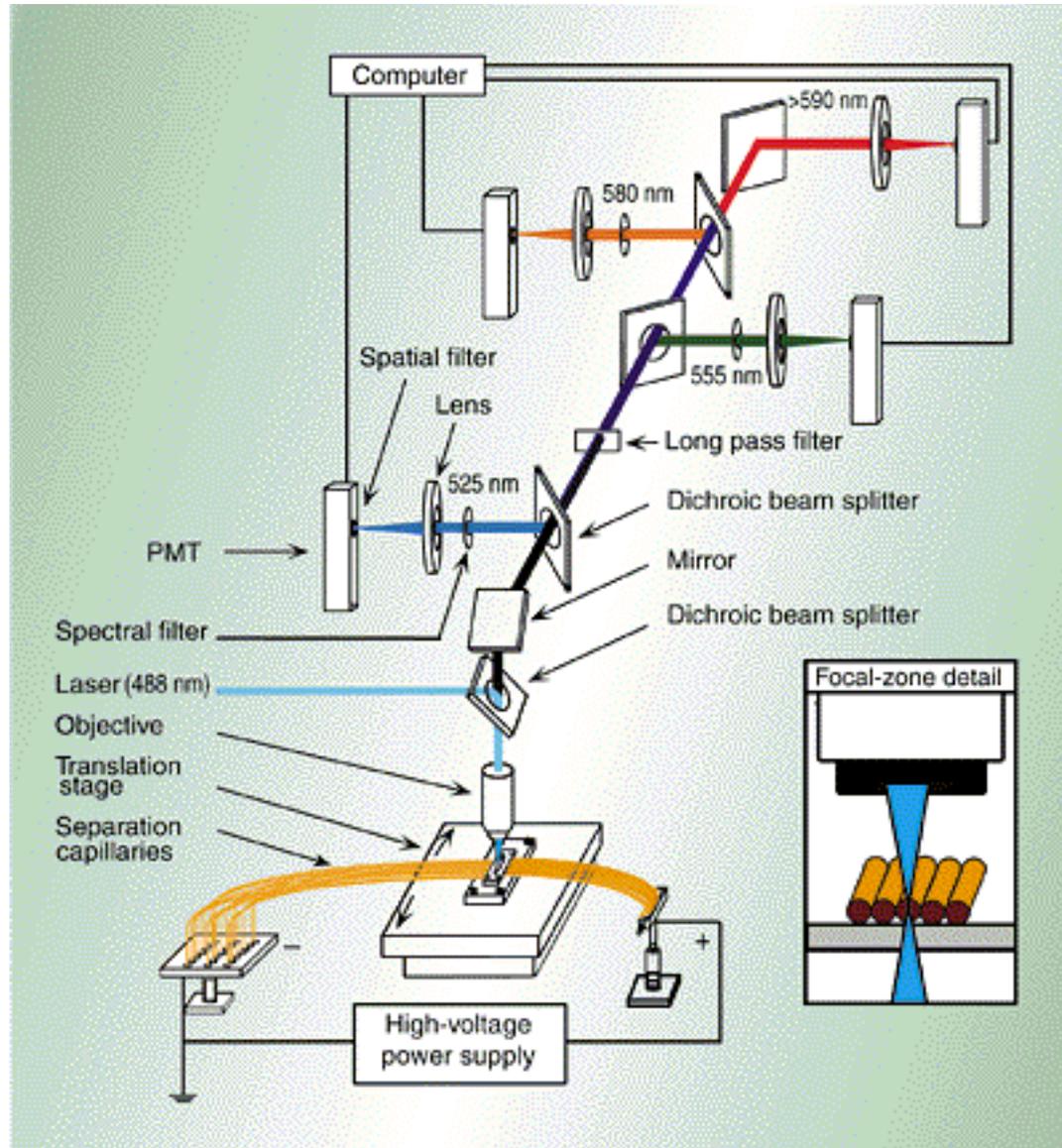
Figure 7. Spectra of four DNA sequencing dyes and the background signal due to Raman scatter. The data are normalized to unit height.



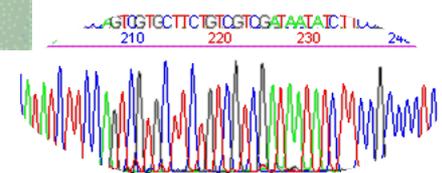


Conjunto de espectral de calibração



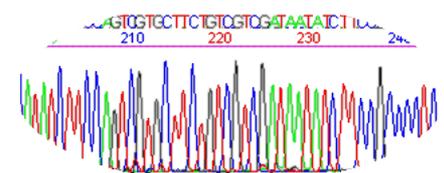
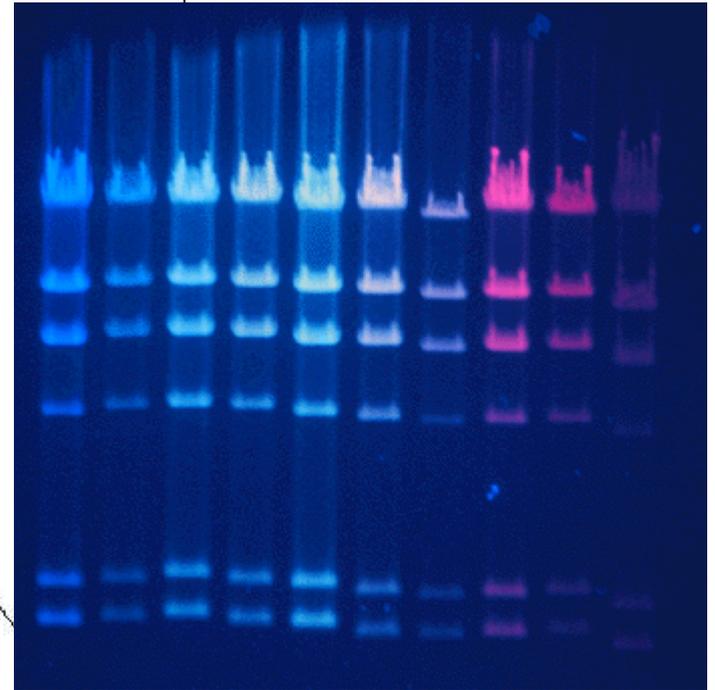
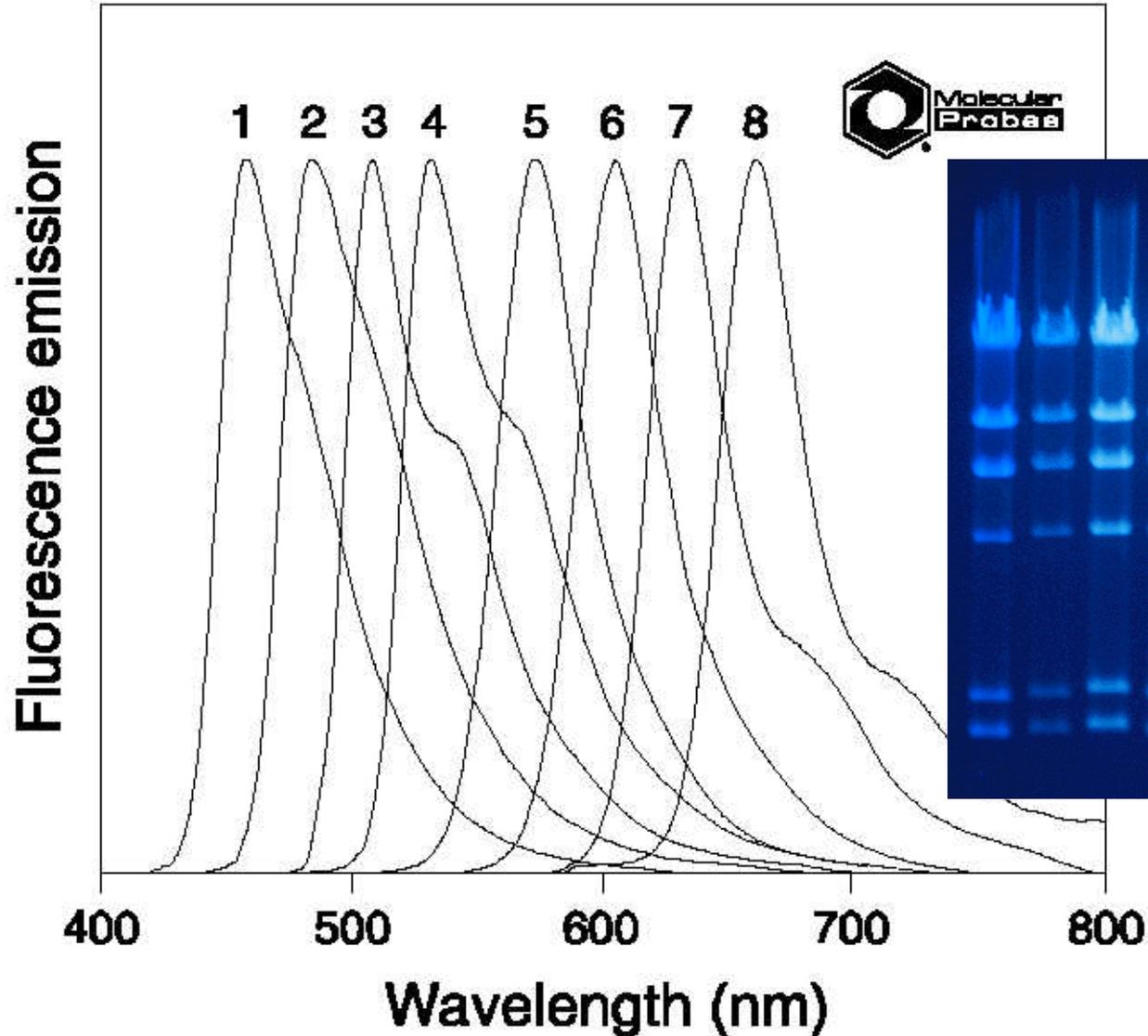


•Ketherpal & Mathies, Anal. Chem. (1999) 71, 31A-37A





Intercaladores de DNA





Espectros de absorção em

CE-DAD

