

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**

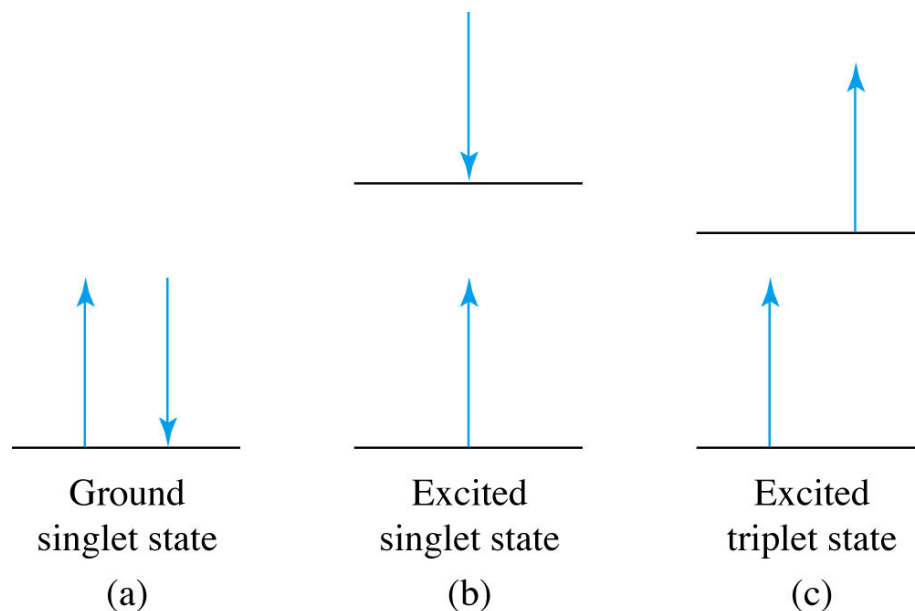
- Baixos valores de limites de detecção (**LOD** ~ ppb)

- Ampla linearidade

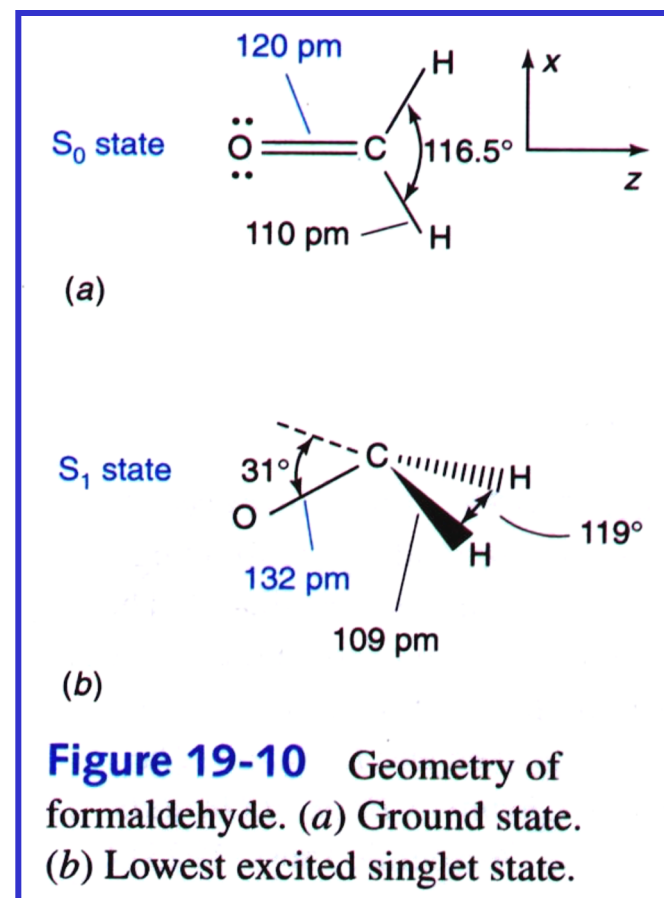
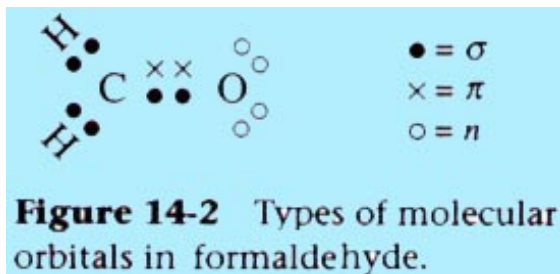
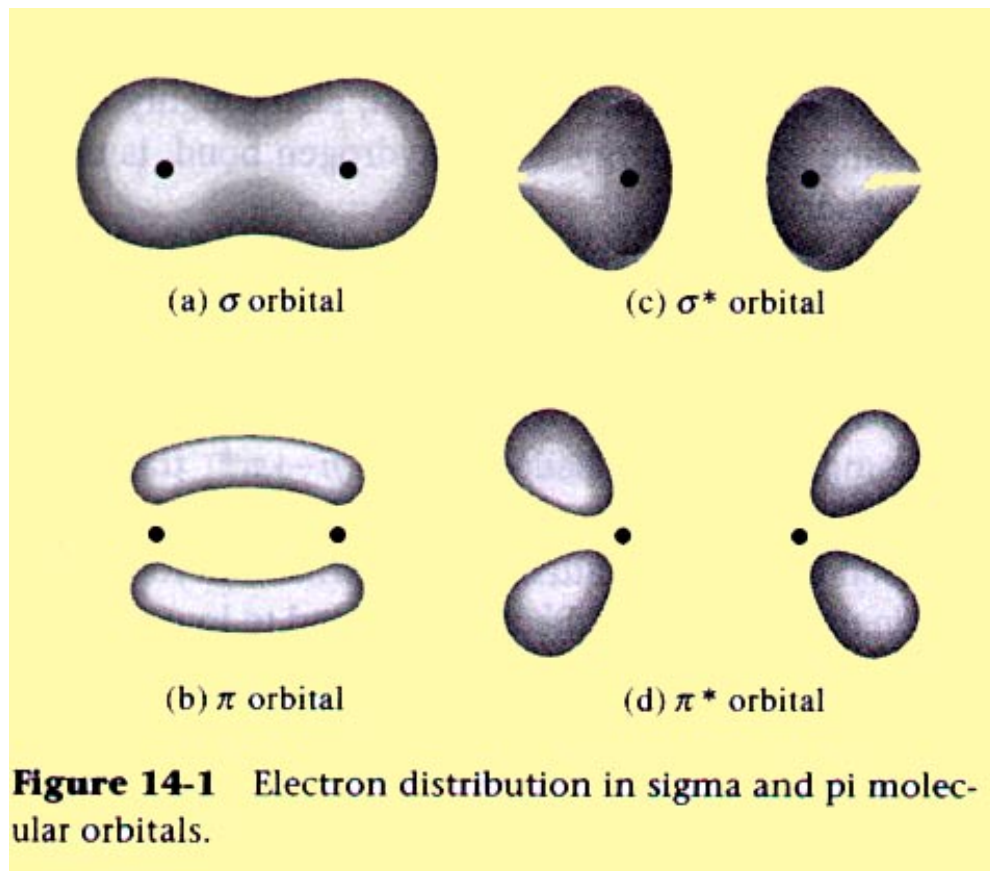
- Alta especificidade

# Fluorescência x Fosforescência

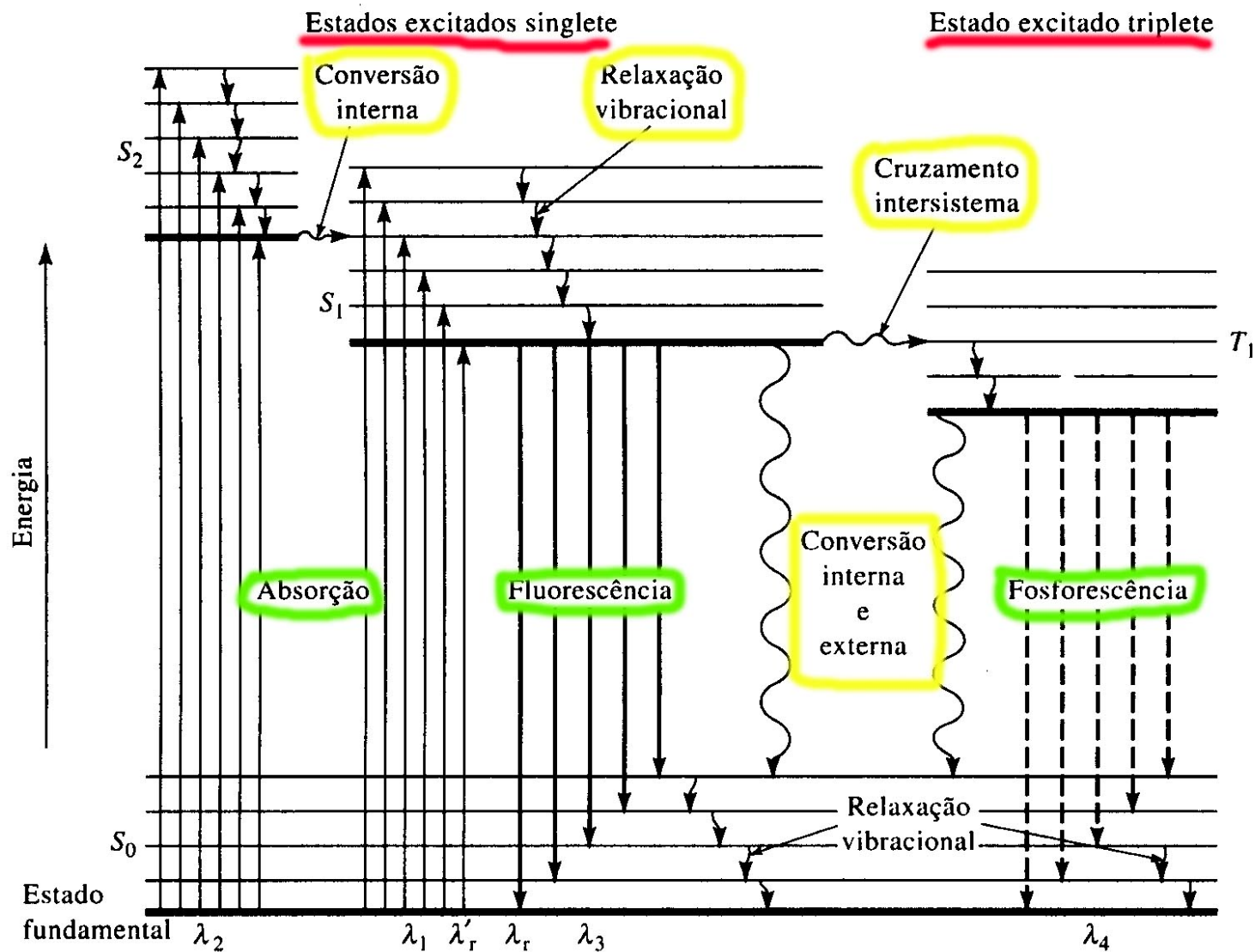
- **Fluorescência atômica** – Sódio:  $3s \rightarrow 3p \rightarrow 3s$ 
  - Absorve 589 nm  $\rightarrow$  emite 589 nm – *Fluorescência ressonante*
- **Fluorescência molecular** – fluoresceína:  $n \rightarrow \pi^* \rightarrow n$ 
  - Absorve 490 nm  $\rightarrow$  emite 520 nm – *Deslocamento de 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

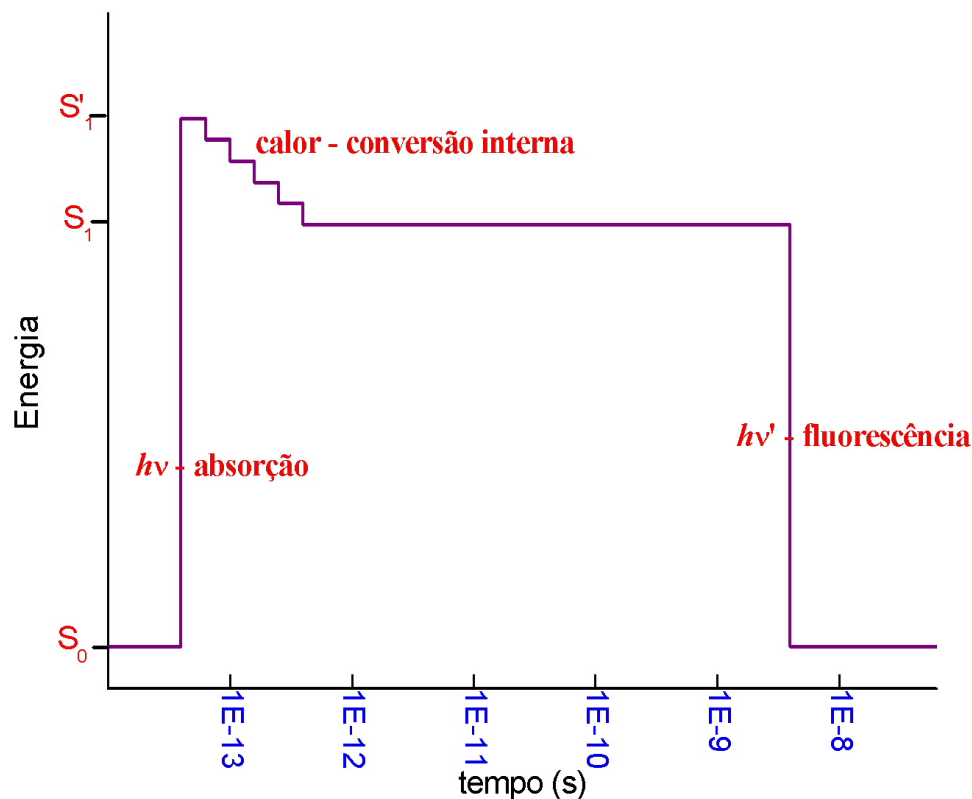


# Diagrama de Níveis Energéticos de Moléculas Fotoluminescentes



# Processos de Absorção e Emissão

- Processos cinéticos competitivos
- 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

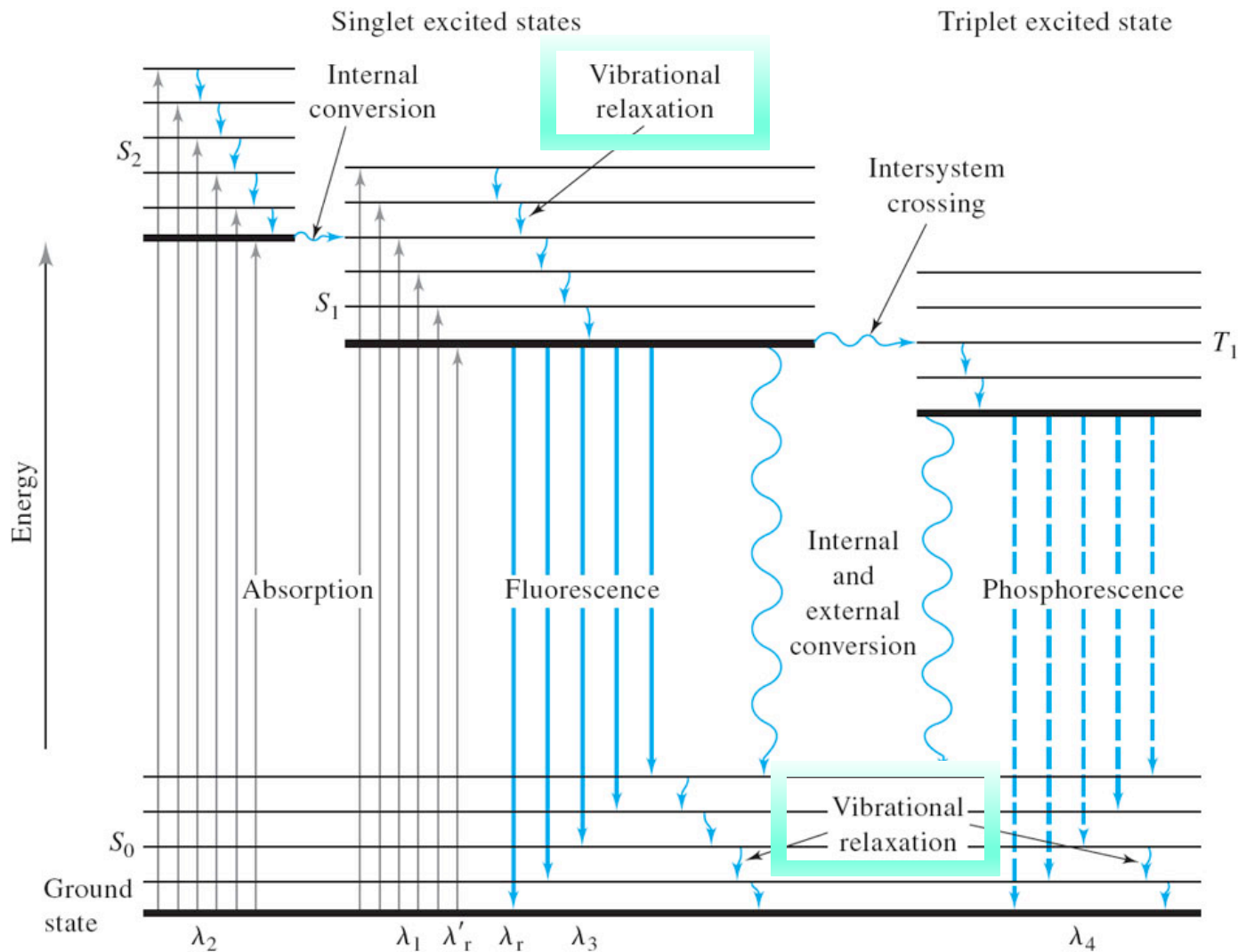
- **Relaxação vibracional**

- 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





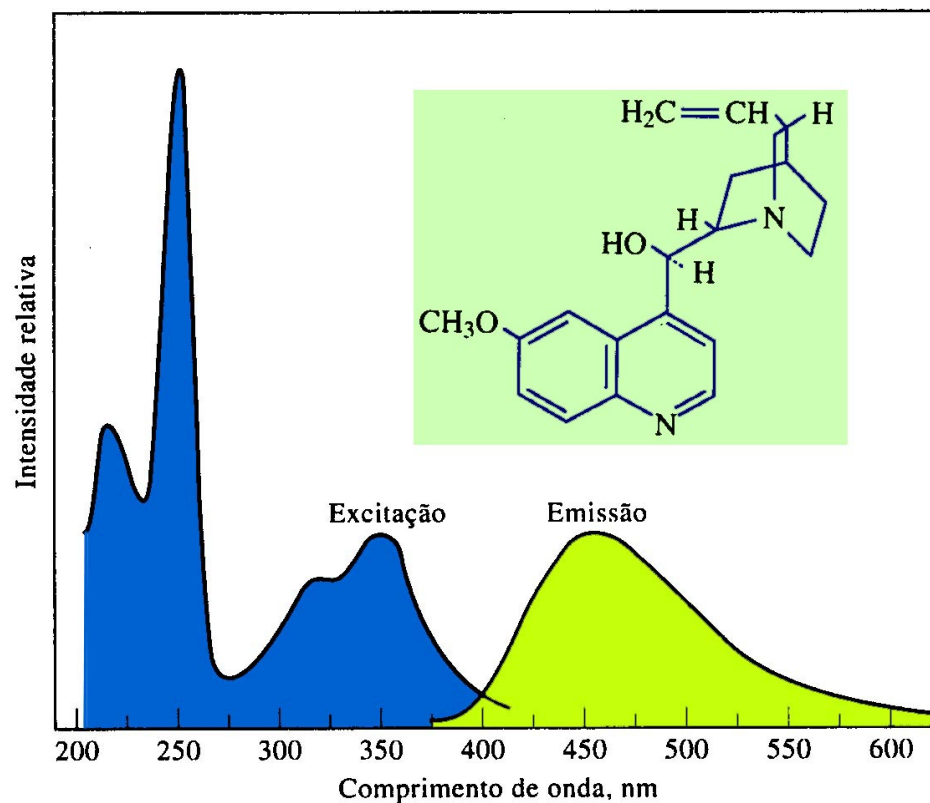
# Processos de Desativação

- **Conversão interna**

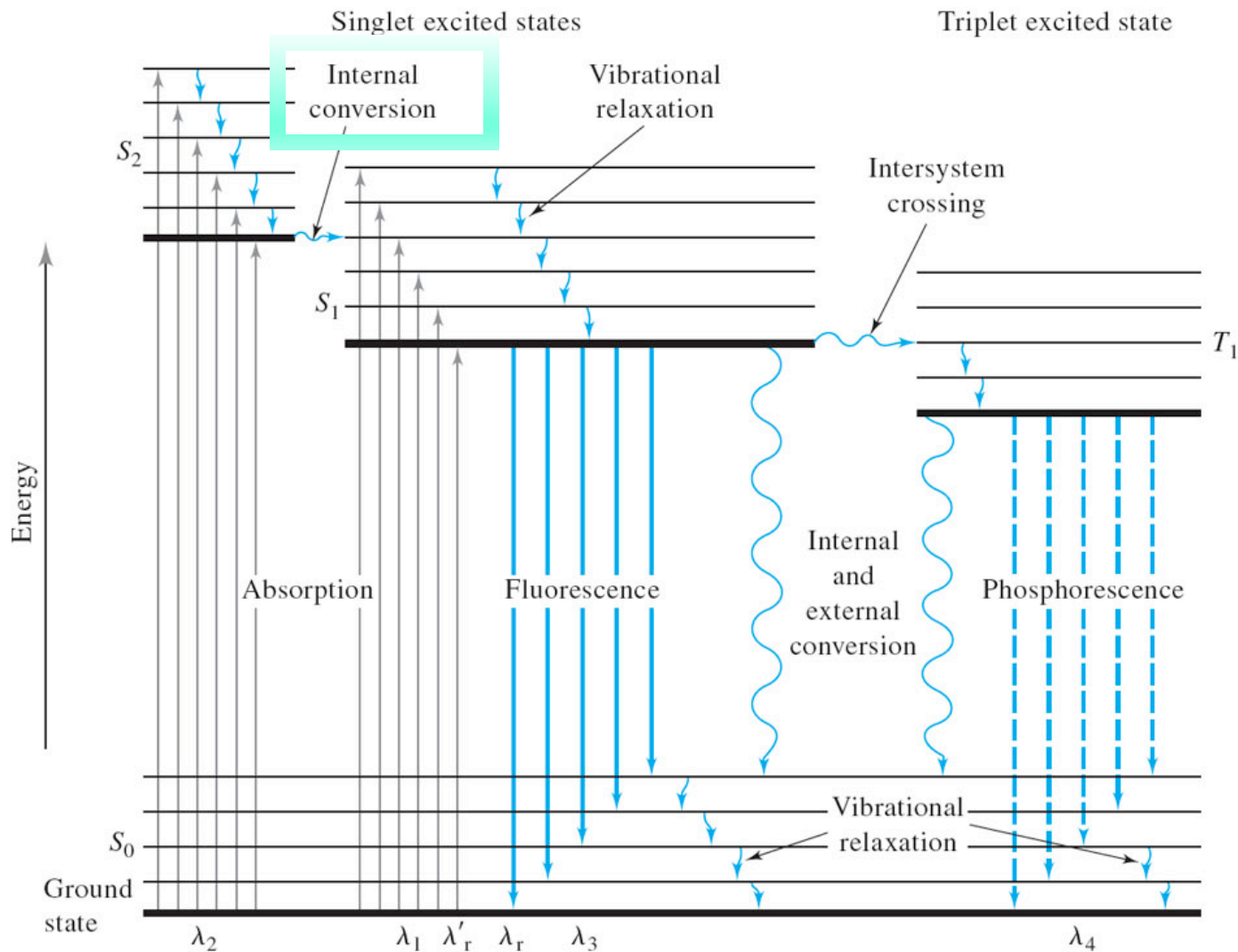
- Processo intramolecular
- Proximidade entre níveis eletrônicos excitado e níveis vibracionais de um estado eletrônico excitado de menor energia (*níveis superpostos*)

- **Resultado prático:**

não importa qual  $\lambda_{exc}$   
fluorescência  $\Rightarrow \lambda_{em}$



# Diagrama de Níveis Energéticos de Moléculas Fotoluminescentes

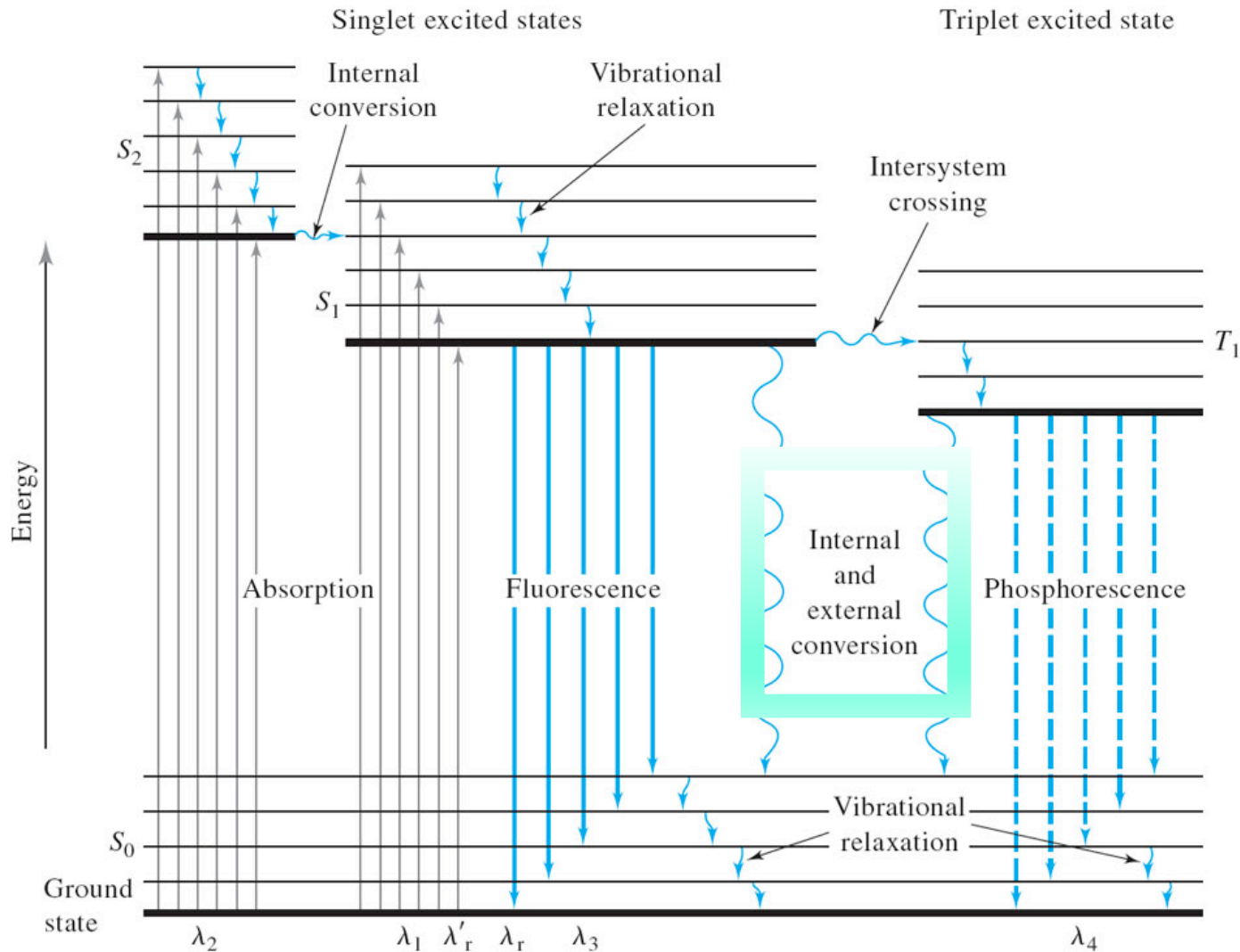


# Processos de Desativação

- **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

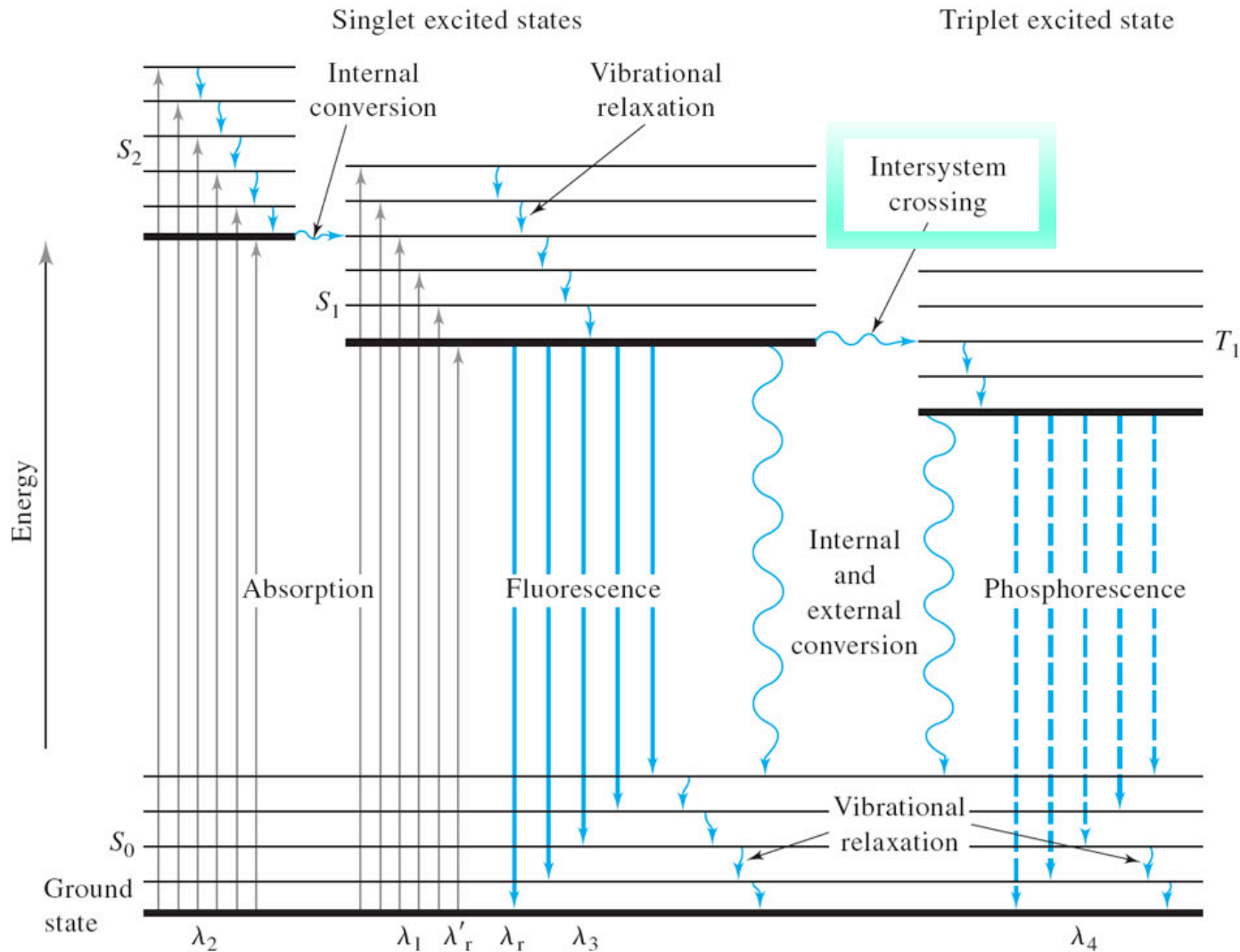
- **Cruzamento Intersistema**

- 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 → singlete é menos provável que a transição singlete → 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 😊

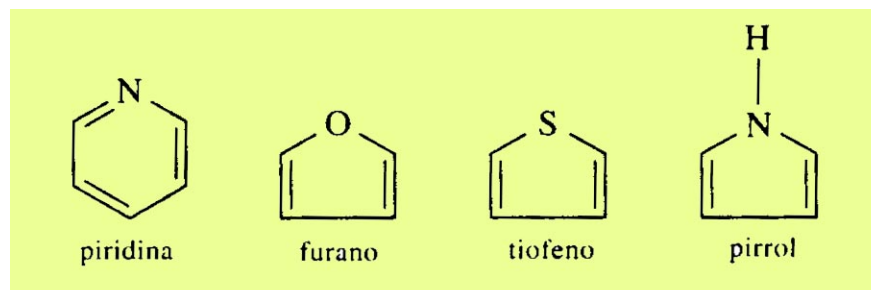
$$\varphi = \frac{k_f}{k_f + k_{in} + k_{ce} + k_{ci} + k_o}$$

- 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

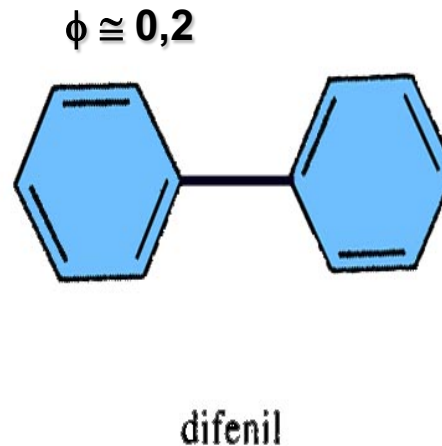
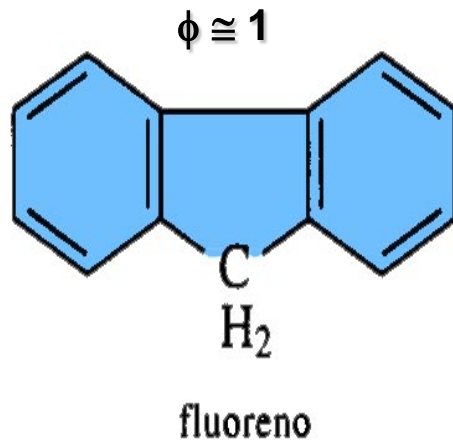
- **Fluorescência e estrutura**

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

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 anilínio	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

# 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**

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

$\epsilon$  = absorvidade molar e  $\epsilon bc$  = absorvância

# Intensidade de Fluorescência e Concentração

- Substituindo:

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

E expandindo como uma série de Maclaurin temos:

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

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

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

ou simplesmente:

$$F = Kc$$

# ***Intensidade de Fluorescência e Concentração***

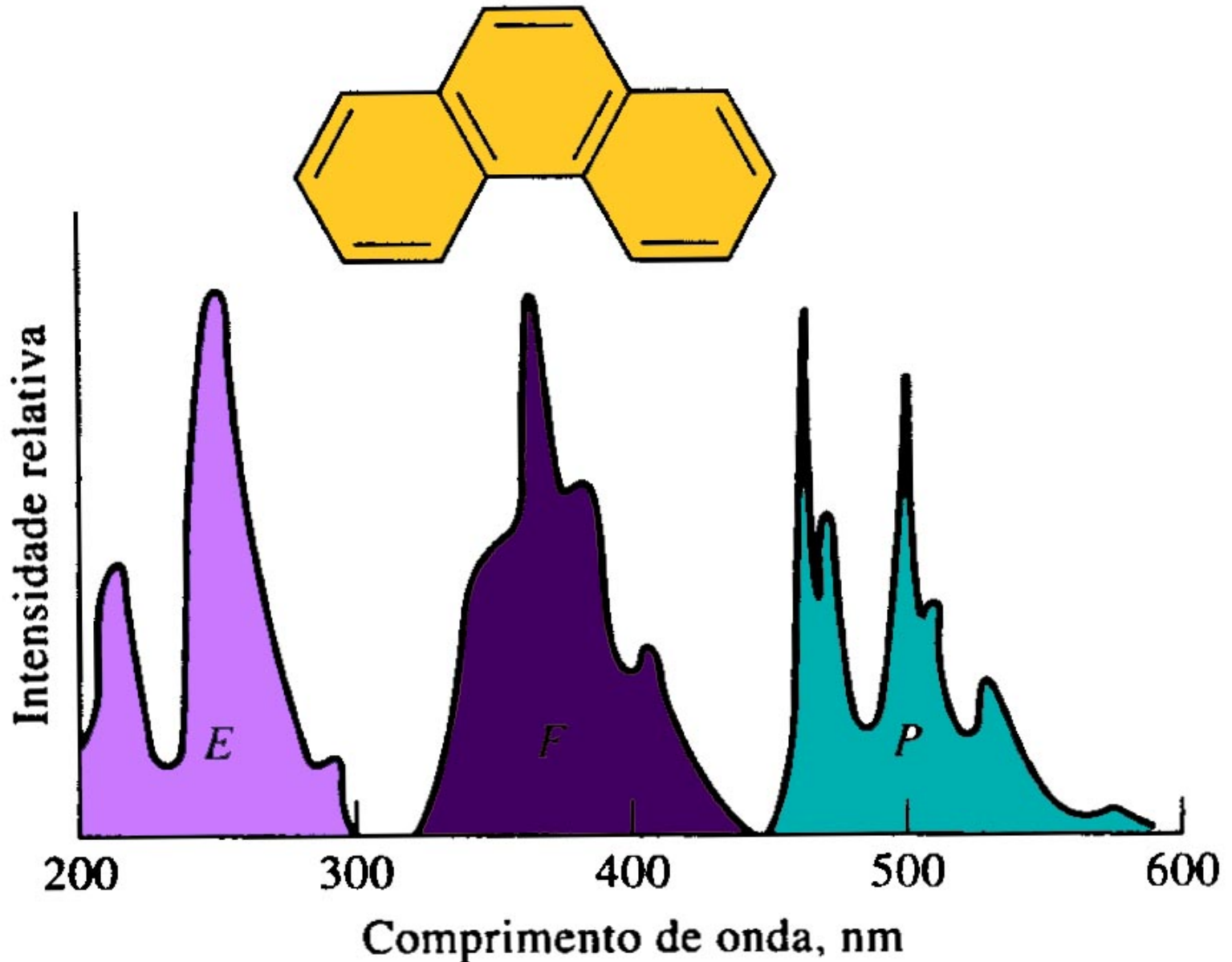
- Sendo

$$F = Kc$$

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

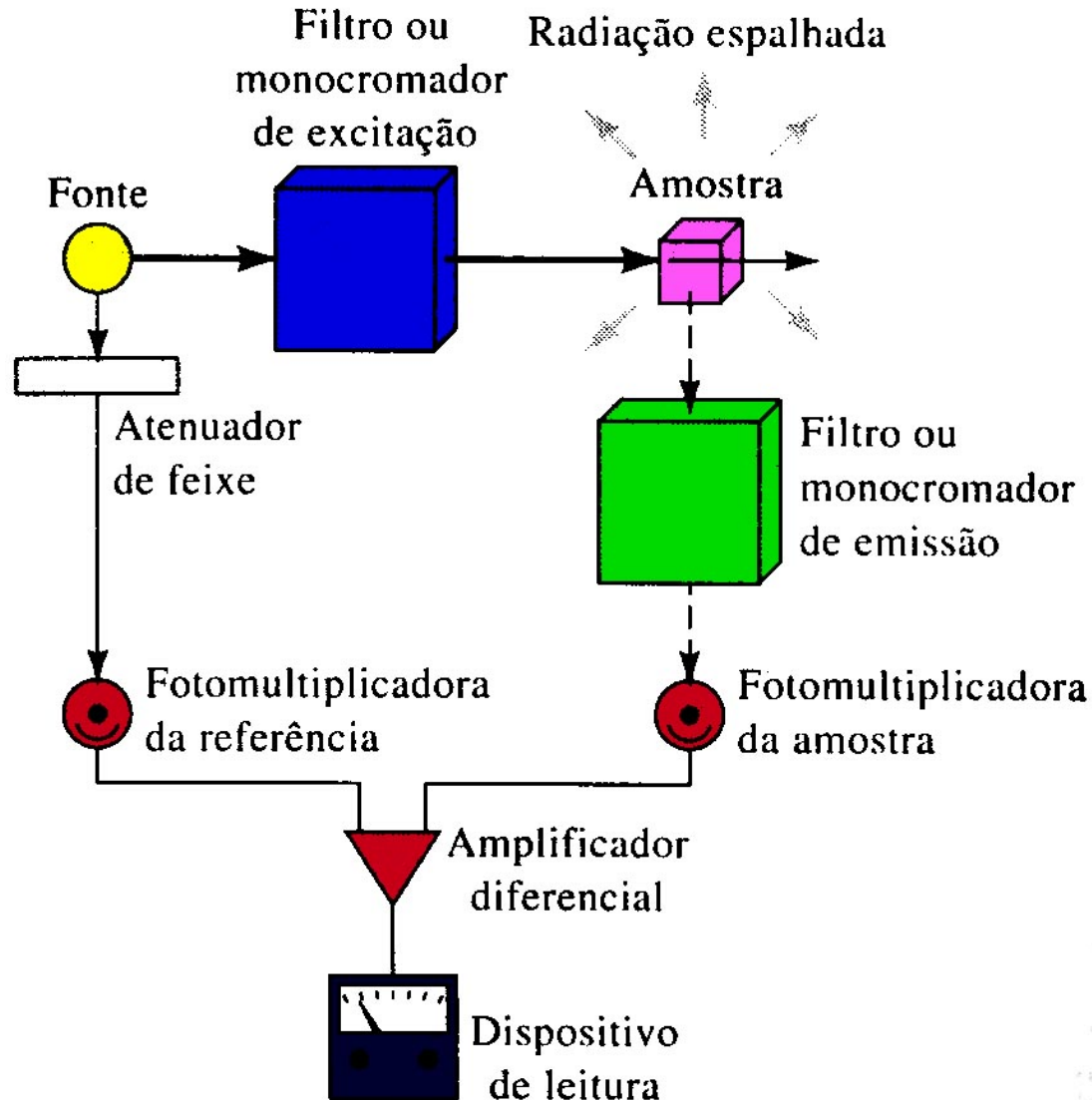
# Espectros de Emissão e Excitação





# 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<sub>2</sub> ou laser Nd:YAG

- **Filtros e Monocromadores**

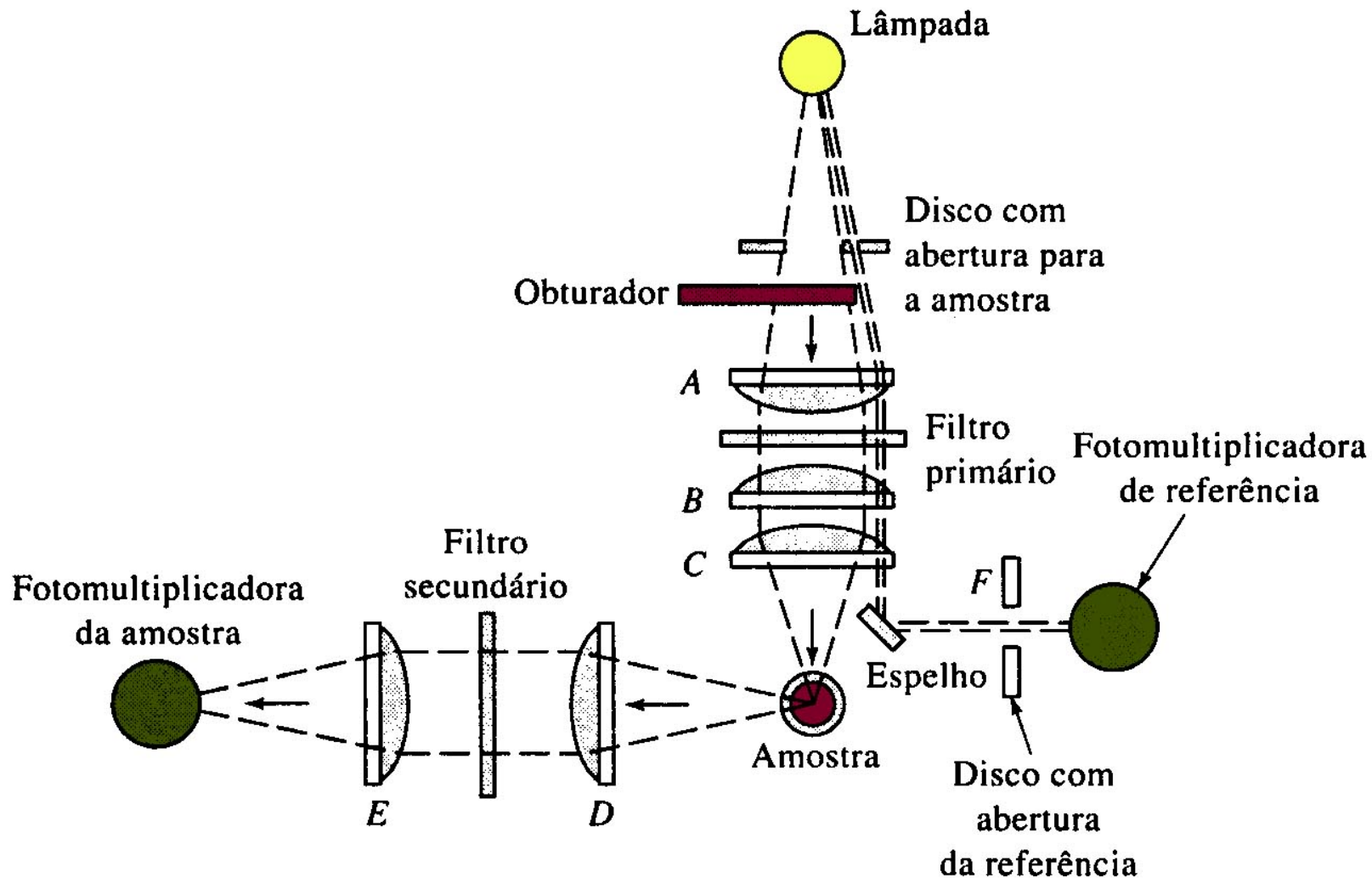
- Filtros são comuns em fluorímetros enquanto que monocromadores são essenciais em espectrofluorímetros

- **Transdutores (detectores)**

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

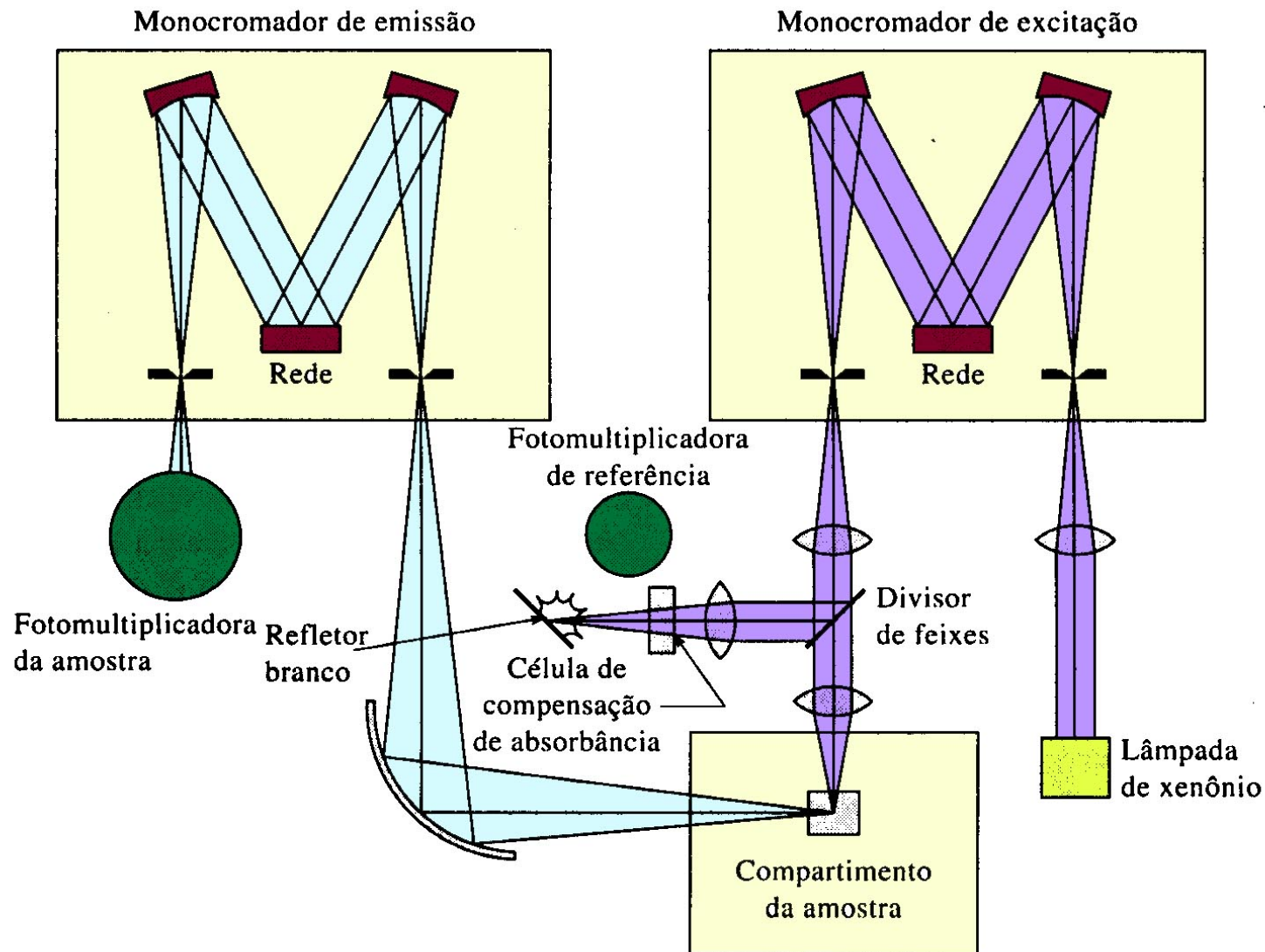
# Instrumentação

- Fluorímetros



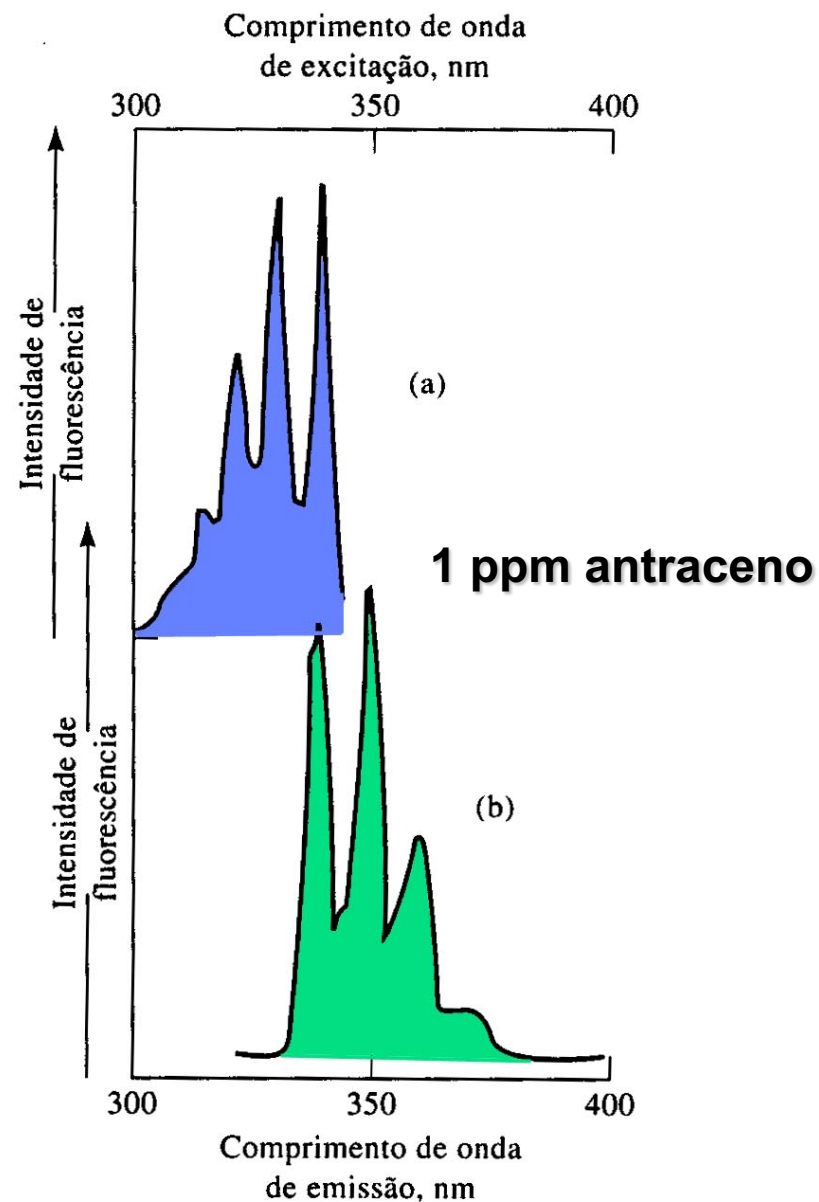
# Instrumentação

- Espectrofluorímetros



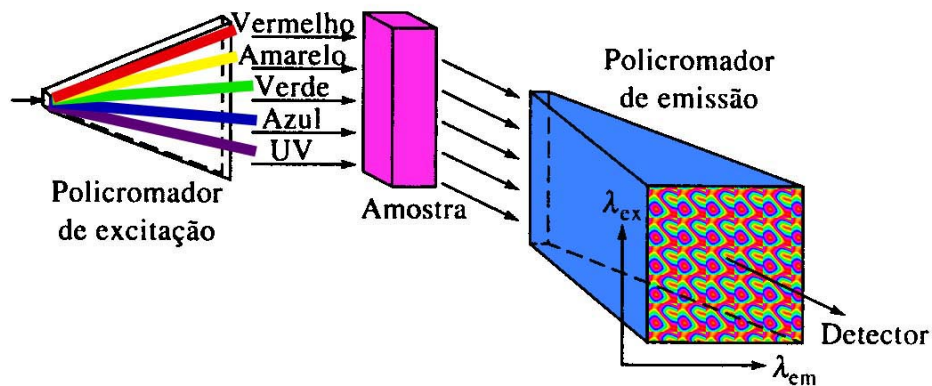
# Dois Monocromadores É Essencial

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

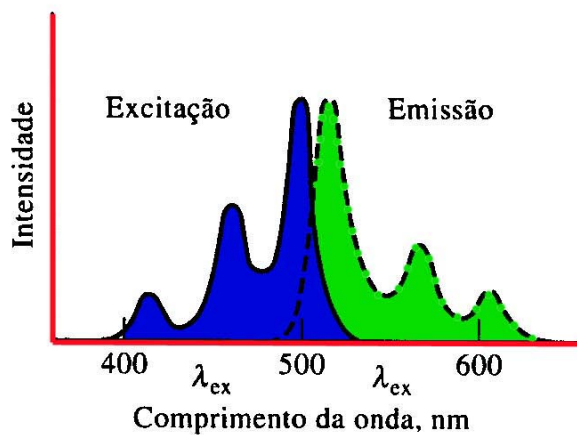


# Instrumentação

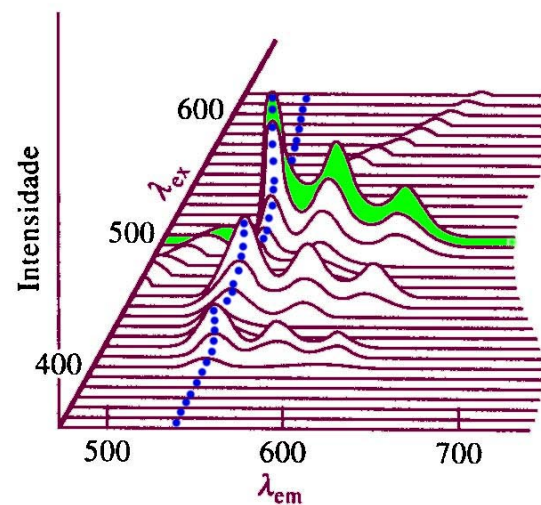
- Instrumentos baseados em arranjo de transdutores



(a)



(b)



(c)

# Aplicações e Métodos de Fotoluminescência

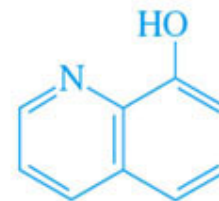
- Métodos mais sensíveis que os baseados em espectrofotometria de absorção – 1 a 3 ordens de grandeza melhores
- Independente de  $P_0$
- **Espécies inorgânicas**
  - Métodos Diretos e Indiretos
    - Métodos diretos medem a fluorescência de quelatos luminescentes
    - Métodos indiretos medem a supressão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

# Reagentes Fluorimétricos

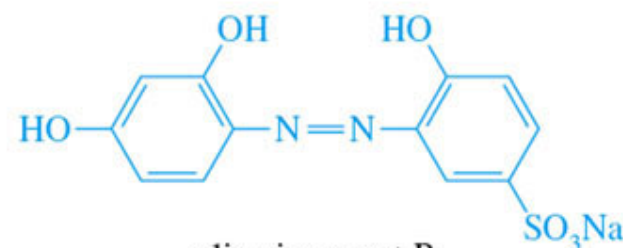
- Essencialmente cátions

## Moléculas orgânicas

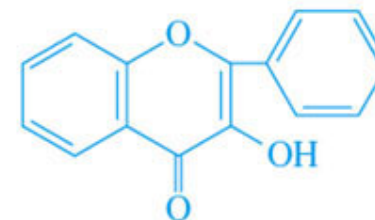
- Fluorescência nativa
- Agentes derivantes



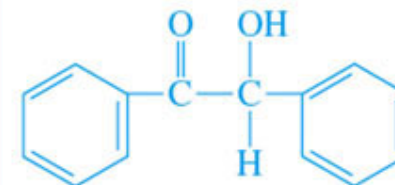
8-hydroxyquinoline  
(reagent for Al, Be, and other metal ions)



alizarin garnet R  
(reagent for Al, F<sup>-</sup>)



flavanol  
(reagent for Zr and Sn)



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

TABLE 15-2 Selected Fluorometric Methods for Inorganic Species

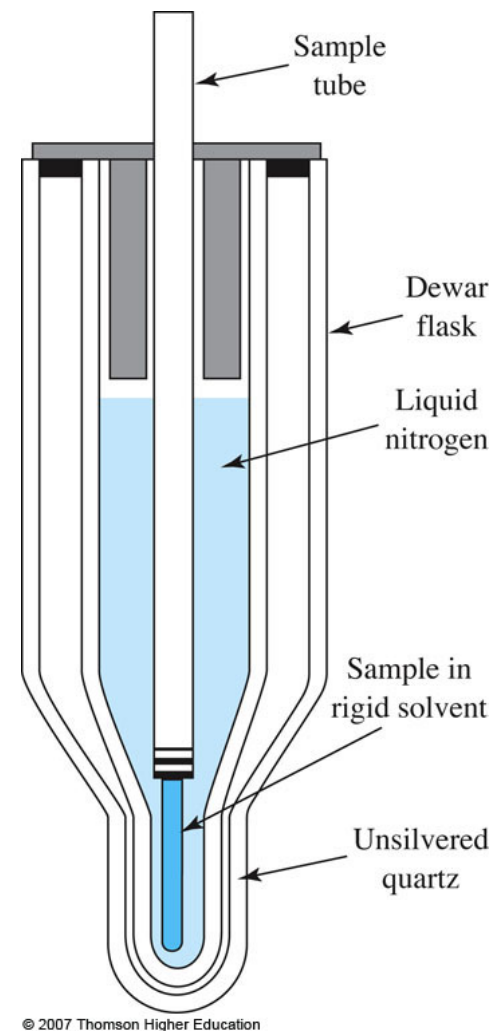
Ion	Reagent	Wavelength, nm		LOD, $\mu\text{g/mL}$	Interferences
		Absorption	Fluorescence		
Al <sup>3+</sup>	Alizarin garnet R	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Ni, PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Th, Zr
F <sup>-</sup>	Quenching of Al <sup>3+</sup> complex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



# Métodos Fosforimétricos

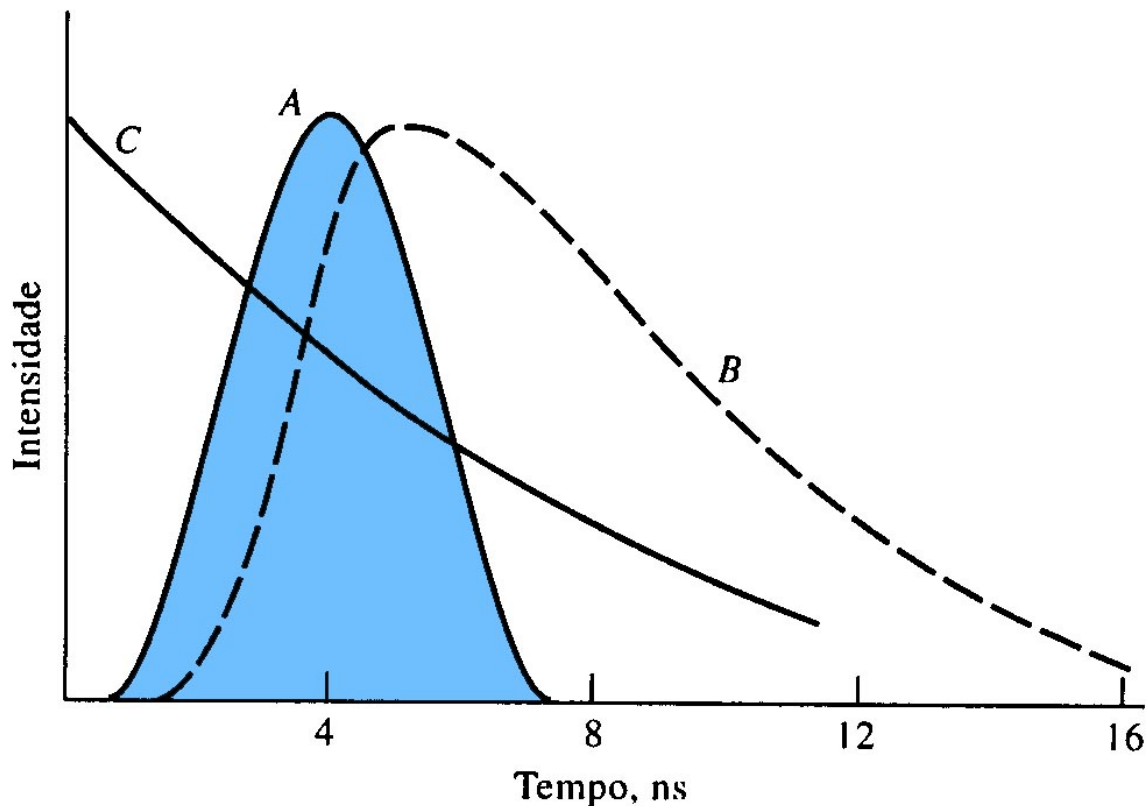
- Métodos complementares à fluorimetria
- Aplicações variadas – Grande seletividade
  - Bioquímica (ácidos nucleicos, proteínas, etc.)
  - Indústria do petróleo e poluentes ambientais (hidrocarbonetos poliaromáticos)

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)

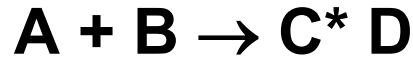


# Fluorescência Resolvida no Tempo

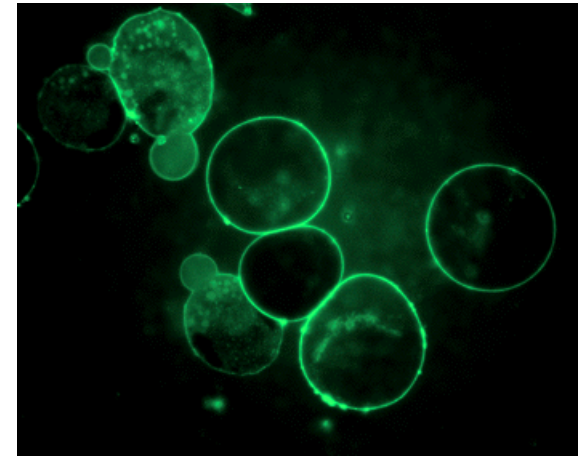
- Possibilita análise qualitativa
- Permite análise de mistura de moléculas fluorescentes (com espectros similares)
- Instrumentação mais sofisticada
  - Lasers
  - PMT de resposta rápida
  - Contadores de tempo de alta sincronização



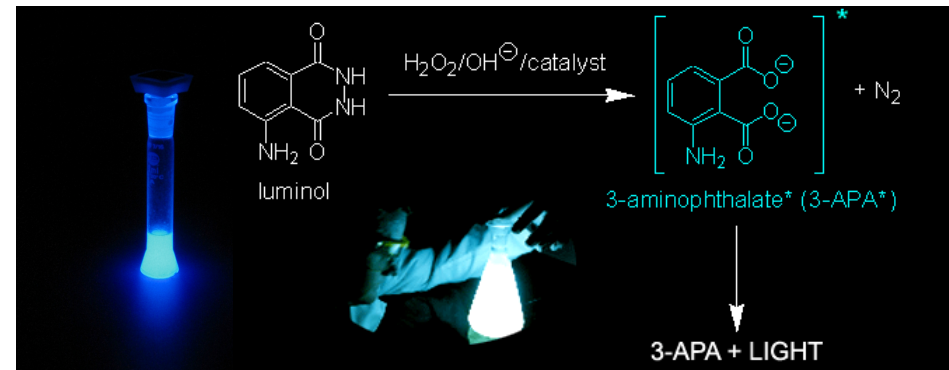
# Quimiluminescência (eletroquimiluminescência)



- **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

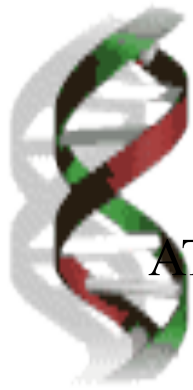


**\*\* Vide tarefa no Moodle!**



# ***Espectrofluorimetria como Sistema de Detecção Analítica***

- **Acoplamento com métodos de separação em fase líquida:**
  - HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
  - $\mu$ LC – cromatografia líquida capilar
  - CE – eletroforese capilar
  - LIF – fluorescência induzida a laser
- **Maiores níveis de sensibilidade**
  - $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> a  $10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>
  - Detecção de uma única molécula
- **Análises genéticas e sequenciamento de DNA**
  - Resolução espectral + alta sensibilidade



# Esquema 1 base - 1 cor - 4 faixas

ATCGGATGGA\*

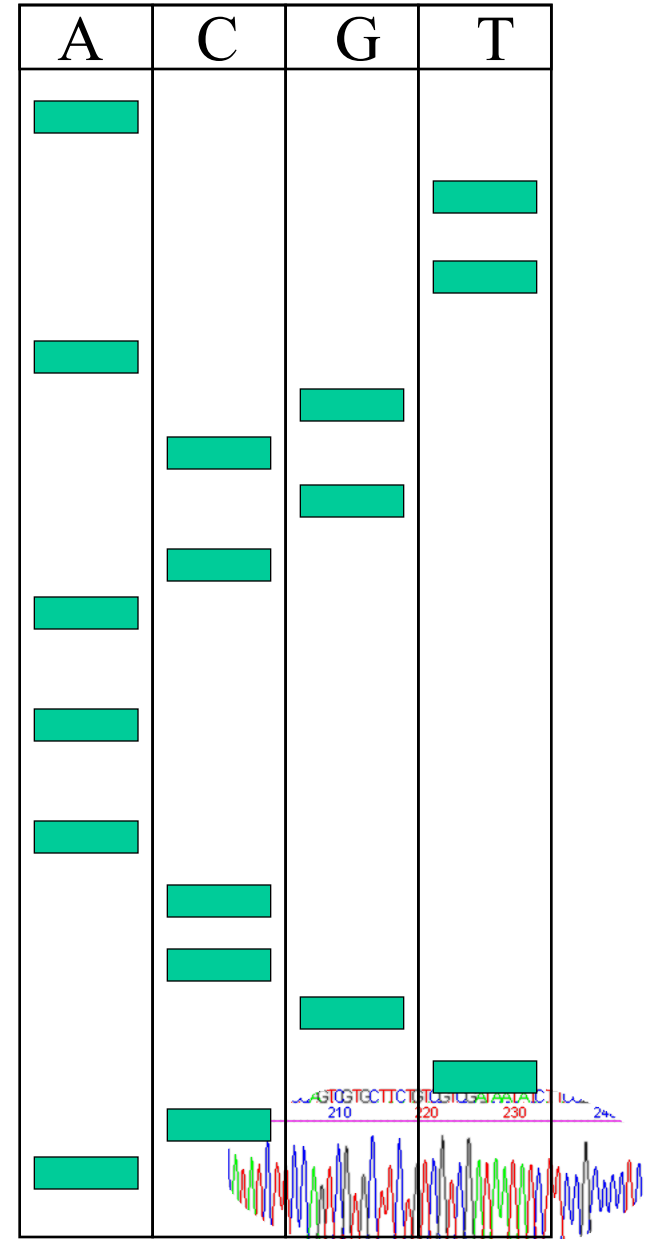
ATCGGATGGATTA\*

ATCGGATGGATTAGCGCA\*

ATCGGATGGATTAGCGCAA\*

ATCGGATGGATTAGCGCAAA\*

ATCGGATGGATTAGCGCCATCCGTCA\*

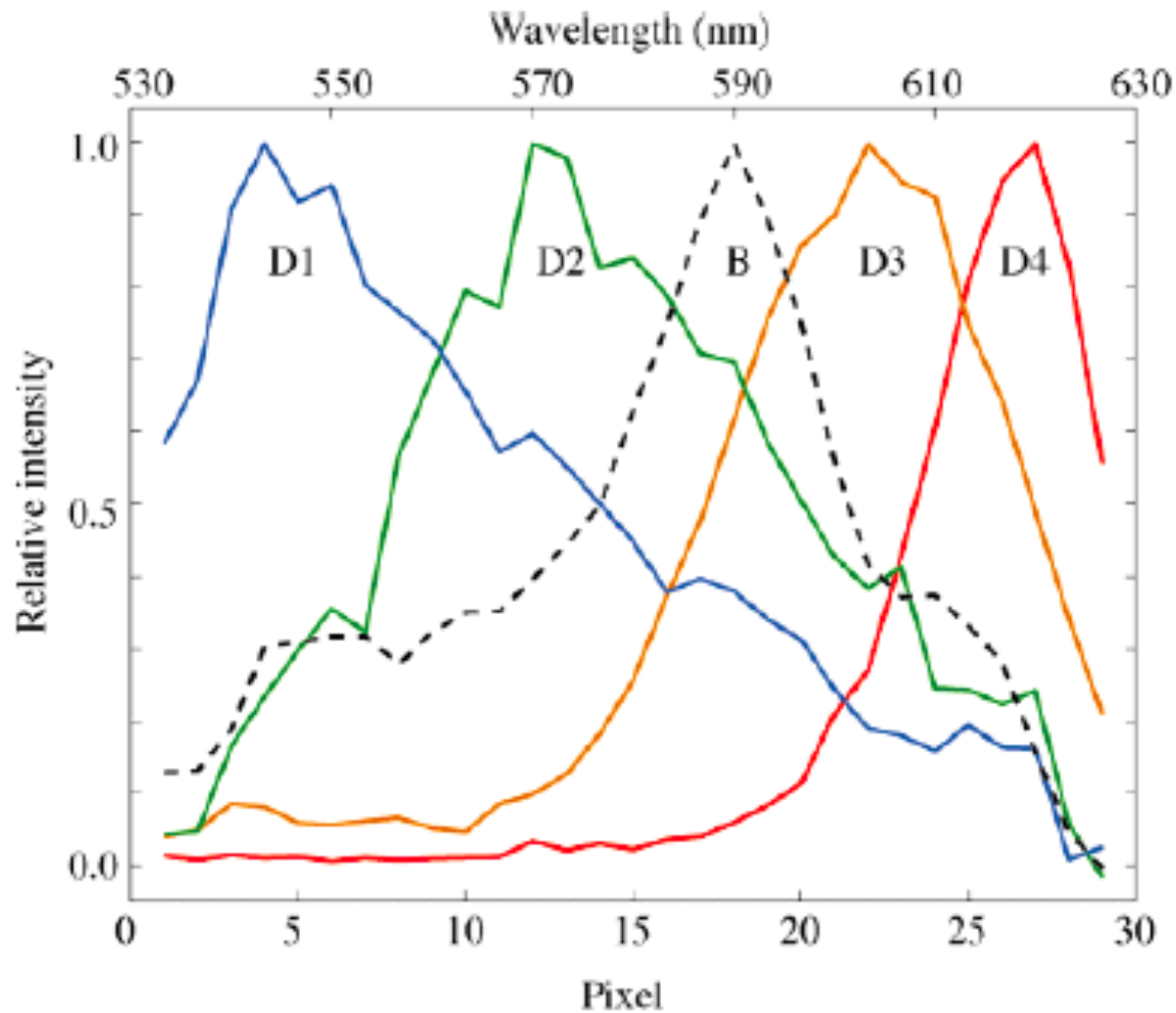




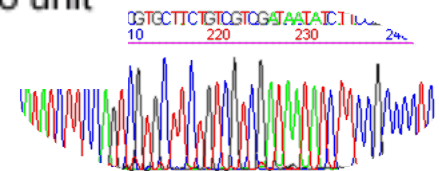
# Esquema 4 bases - 4 cores

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.

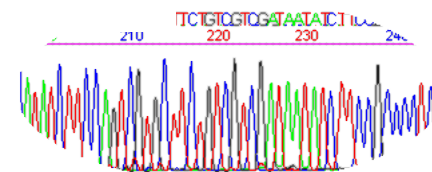
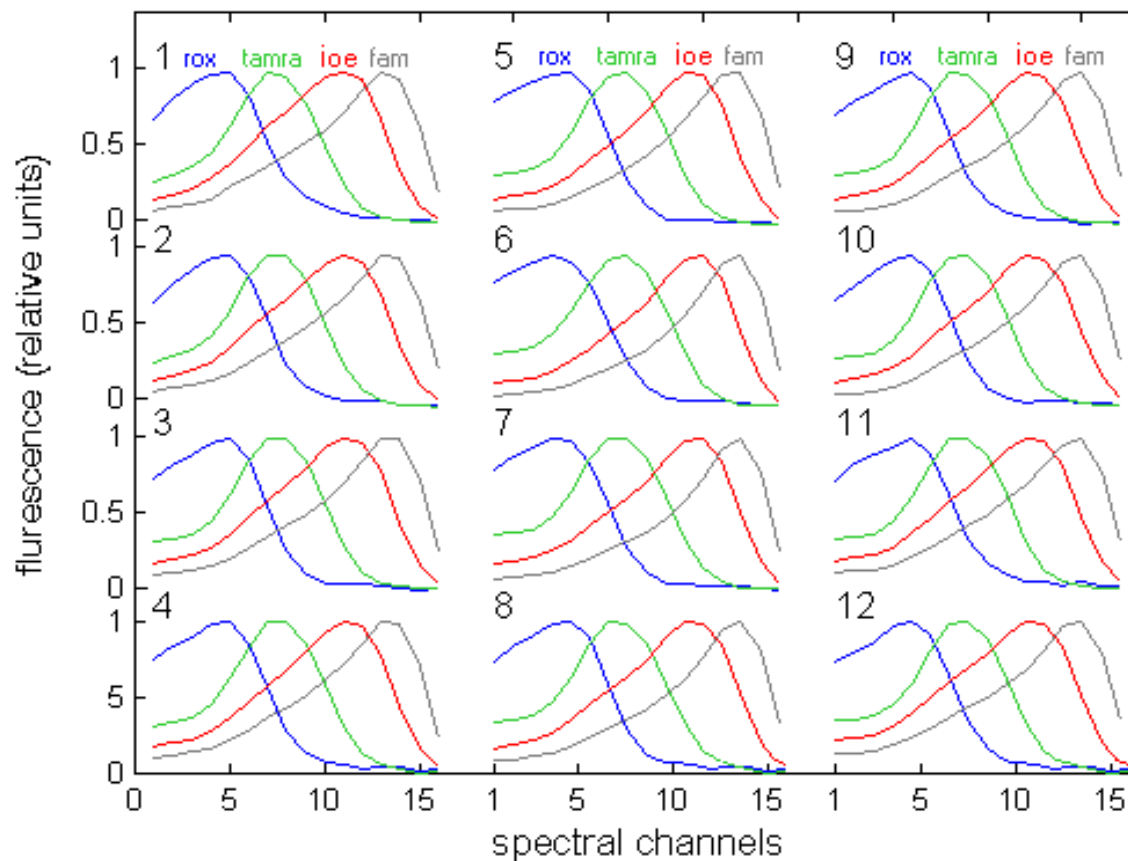


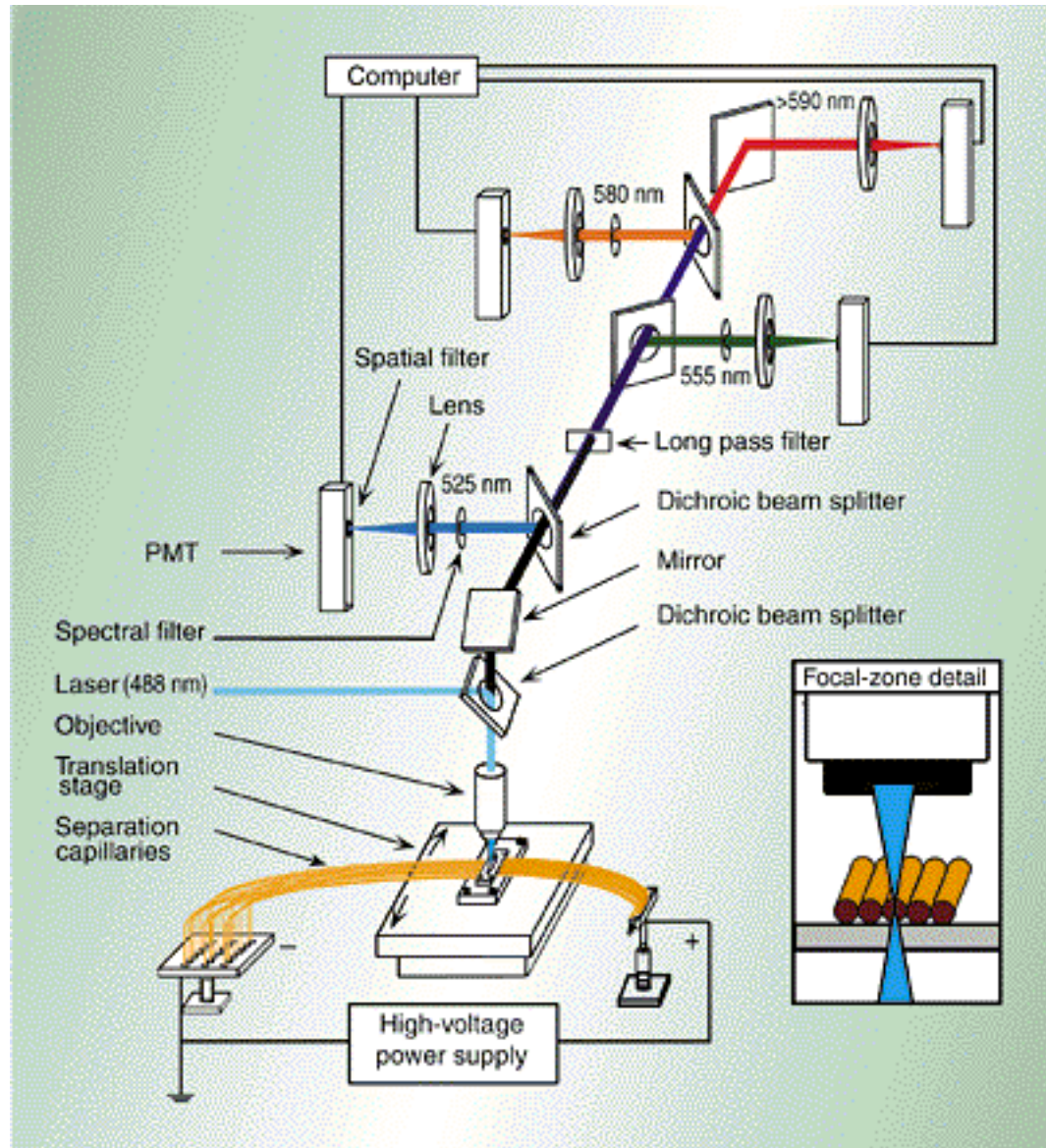




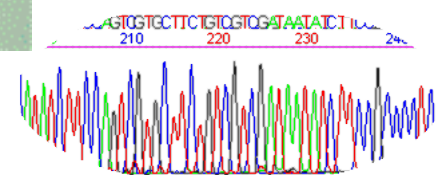


# Conjunto de espectral de calibração



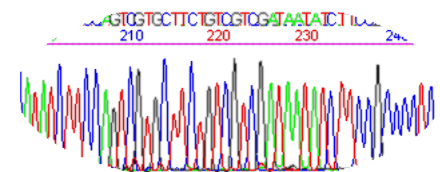
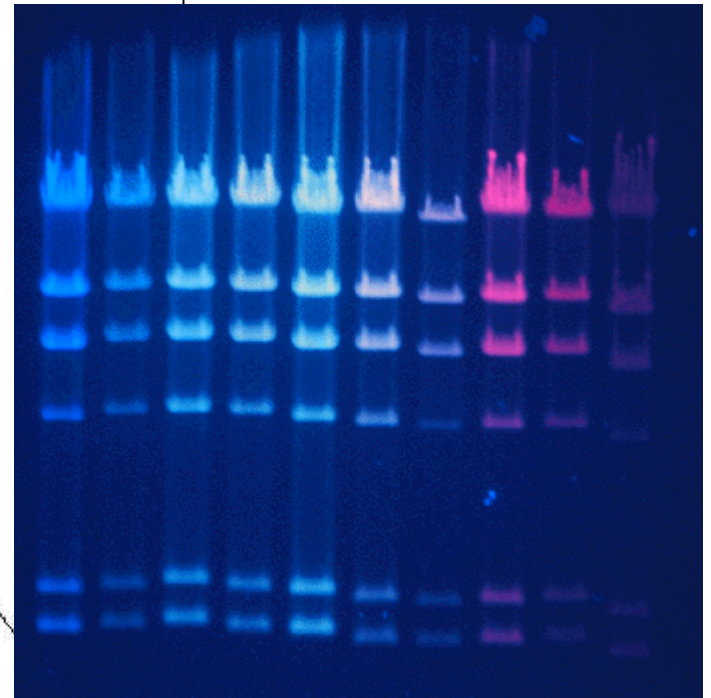
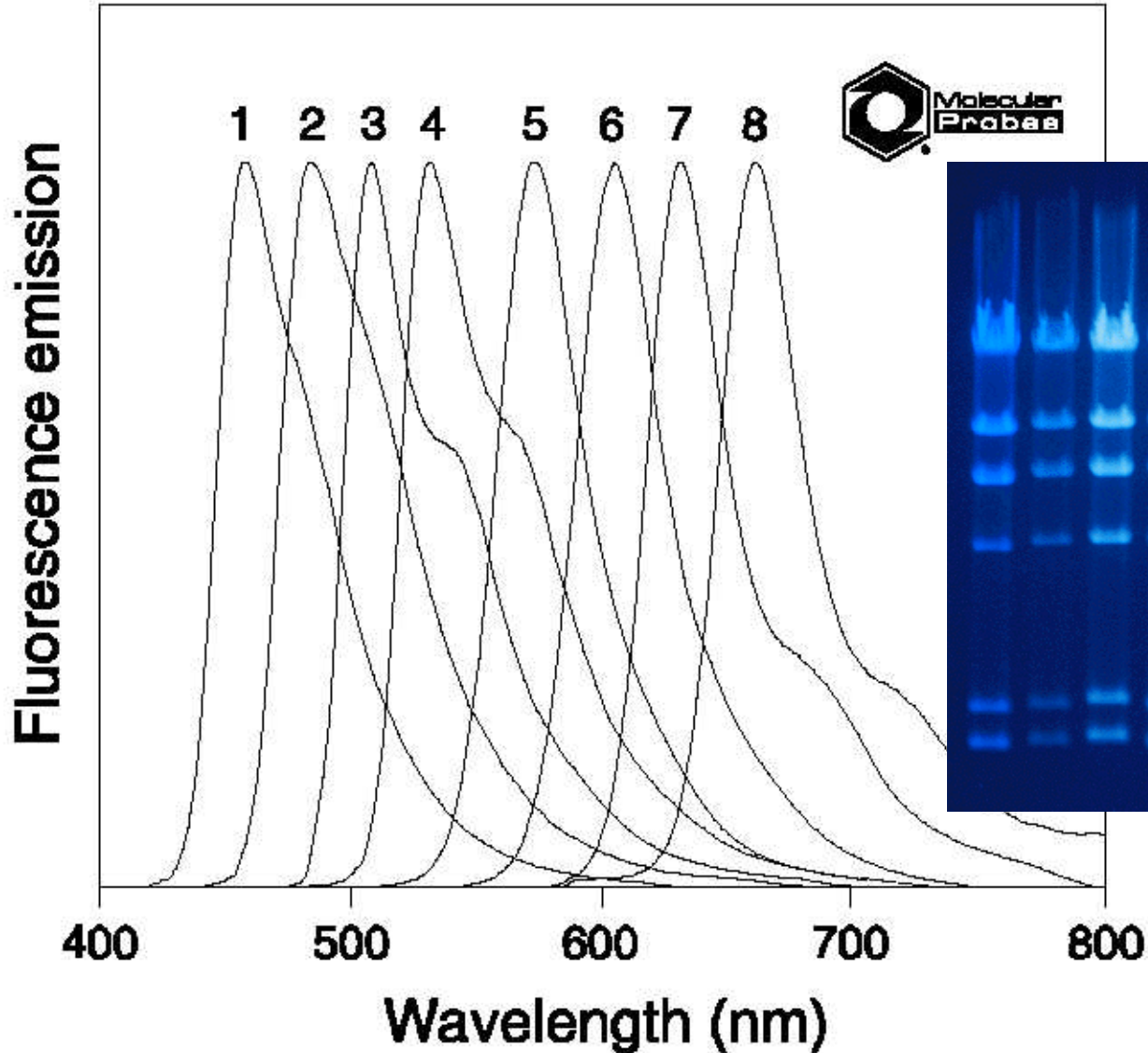


•Ketherpal & Mathies, Anal. Chem. (1999) 71, 31A-37A





# *Intercaladores de DNA*





# *Espectros de absorção em CE-DAD*

