# Espectrofluorimetria*

FERNANDO PINA**

## O FENÓMENO DA ABSORÇÃO E EMISSÃO DE LUZ PELAS MOLÉCULAS

**A cor e a absorção.** Muitos compostos exibem cor. Esta propriedade resulta do facto das moléculas não absorverem de igual modo a todos os comprimentos de onda que constituem o espectro da luz visível.

Fig. 1 - Espectro de absorção de uma antocianina, no caso a malvina, corante natural da *Malva Sylvestris*, donde lhe provém o nome, mas igualmente abundante noutras flores e frutos. É um dos corantes dos vinhos novos.

Por exemplo a malvina, um abundante corante natural, absorve eficazmente a luz visível numa banda estreita de comprimentos de onda centrada a 520 nm. isto é a luz verde do espectro. É por essa razão que a Malvina é vermelha. A cor dos compostos é a complementar da luz que absorvem. Um composto que absorva no azul é amarelo e vice versa. Uma solução que absorva a todos os comprimentos de onda é preta, e os compostos que não absorvem no visível são brancos. Ser branco não significa necessariamente que não absorva luz. A gama do ultravioleta (U.V.) é também luz, e temos acesso instrumental fácil à zona do U.V. entre os 200 nm e cerca de 380 nm (a 380 nm começa o azul). Se a nossa visão fosse sensível ao ultravioleta, os compostos que vemos brancos surgir-nos-iam com cores diversas. É que do ponto de vista físico-químico não há distinção qualitativa entre luz visível e luz U.V. Aliás a maior parte dos compostos (incluindo os de cor branca) absorvem no U.V..

**A lei de Lambert-Beer.** Para caracterizar o modo como a luz é absorvida pelas moléculas, utiliza-se o chamado espectro de absorção, que consiste na medição da absorvência em função do comprimento de onda, como se mostrou previamente na fig.1. Geralmente dissolve-se o composto num solvente que seja bastante transparente. A água é um bom exemplo destes solventes; o etanol outro. No espectro representa-se a absorvência em função do comprimento de onda (ou de outra unidade) da radiação. De acordo com a lei de Lambert-Beer

$$A = \varepsilon\, b\, C \qquad (1)$$

onde $A$ é a absorvância (ou absorvência), $b$ o percurso óptico, $C$ a concentração da espécie em solução, e $\varepsilon$ o coeficiente de absorção molar. A absorvência por seu lado é igual

$$A = -\log_{10} T \qquad (2)$$

sendo $T$ a transmitância. igual à razão $I/I_0$ onde $I$ é a intensidade da luz que emerge (a que não é absorvida) e $I_0$ a intensidade da luz incidente. A absorvência é por isso uma medida da quantidade de luz absorvida. Uma absorvência de 1 significa que a solução absorve 90%, da luz e para uma absorvência de 2 essa percentagem é 99%. de acordo com a expressão

$$I_{abs} = I_0 - I = I_0 - I_0\, T = I_0\, (1\text{-}10^{-A}) \qquad (3)$$

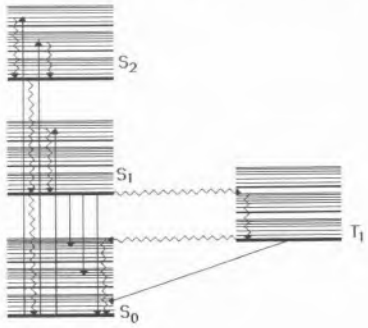
onde $I_{abs}$ é a intensidade da luz absorvida, ou seja a diferença entre a intensidade da luz incidente, $I_0$ e a luz emergente, $I$.

**Sobre a energia absorvida pelas moléculas.** A absorção de energia tem uma particularidade: é feita por quanta. por quantidades discretas (fotões). Uma molécula em equilíbrio com o meio ambiente, antes da absorção de qualquer fotão, está no *estado fundamental:* após a absorção de um fotão passa a um *estado excitado.*

É muito útil separar a energia absorvida por uma molécula em três componentes: Electrónica, Vibracional- Rotacional e de Spin. A energia electrónica corresponde à maior fatia da energia total absorvida. Quando por exemplo a malvina absorve a radiação de 520 nm, um electrão é promovido de uma orbital molecular de mais baixa energia para uma orbital molecular de energia mais elevada, mais propriamente do estado electrónico fundamental denominado $S_0$, para um estado excitado designado $S_1$. A diferença de energia entre os níveis vibracionais (v=0) de ambos os estados. corresponde aproximadamente à energia electrónica. Outra componente da energia absorvida é a energia vibracional e rotacional. Trata-se de quantidades de energia muito mais pequenas do que a energia electrónica, no domínio do infra-vermelho, energia associada ao movimento vibracional e rotacional. Esta energia resulta do facto de na maioria das moléculas a transição ser feita entre (v=0) de $S_0$ e estados vibracionais de maior ordem dos singuletos excitados. Finalmente a energia de spin. Nos estados singuleto (símbolo S) os electrões estão todos emparelhados, e o valor do spin é 0. Nos tripletos (símbolo T) existem dois electrões desemparelhados e o valor do spin é 1. Como emparelhar electrões custa energia, por exemplo o estado tripleto $T_1$ (tripleto de menor energia) possui menos energia do que o equivalente singuleto $S_1$ (singuleto excitado de menor energia). Todavia há que ter em conta uma característica muito importante da absorção de energia, que é o facto da eficiência da absorção entre estados com spin diferente ser muito pequena. Como a maioria das moléculas possui um estado fundamental de singuleto $S_0$. a população de um estado tripleto não se pode fazer por absorção directa de luz a partir do estado fundamental. A diferença de energia entre um singuleto e um tripleto é menor do que a energia electrónica posta em jogo na "absorção electrónica", mas mesmo assim da sua ordem de grandeza.

**Modelos de representação dos estados electrónicos de uma molécula.** os modelos são abstracções teóricas usadas para compreender os factos experimentais. Não devemos tomar os modelos pela realidade que é sempre mais complexa. Feito este alerta, e tendo em conta o que foi afirmado no parágrafo precedente, representa-se na fig.2 o diagrama de Jablonski para uma molécula. As três componentes da energia ficam bem ilustradas na figura. Cada estado de energia electrónico, possui diversos níveis vibracionais e estes por seu lado ainda apresentam níveis rotacionais. Os singuletos representam-se à esquerda e os tripletos à direita (neste caso representou-se um só estado de tripleto para não complicar a representação).

Fig. 2 - Diagrama de Jablonski para uma molécula.



No estado fundamental ($S_0$) à temperatura ambiente, as moléculas estão no nível vibracional zero. É daí que "partem" os electrões que vão popular os diversos estados electrónicos excitados. Porém populam diversos vibracionais e rotacionais. Note-se que na figura só foram mostradas algumas dessas possibilidades. Isto significa que a transição electrónica em vez de ser constituida por uma risca, como as transições atómicas, é o somatório de diversas riscas muito próximas, e a envolvente assume a forma de uma curva. Com excepção de raríssimos casos, toda a energia absorvida vem porém parar ao nível vibracional zero de $S_1$, através de um processo de desactivação vibracional. É deste nível que parte da energia pode ser perdida para os diversos vibracionais e rotacionais do estado fundamental, por emissão de um fotão, fenómeno que se designa por fluorescência (traço direito) ou por desactivação não radiativa (traço quebrado). A energia pode ainda ser transferida não radiativamente para o tripleto, o chamado cruzamento entre sistemas. O nível emissivo do tripleto é também o vibracional zero. No caso de haver emissão de um fotão para o estado fundamental estamos perante uma fosforescência. O tripleto pode ainda perder a sua energia para o estado fundamental por um processo não radiativo

O diagrama de Jablonski é um modelo para explicar a absorção de luz (e também a emissão). Mas não é o único modelo. Um outro modelo muito útil é a representação da energia potencial em função de uma coordenada nuclear relevante. Este modelo é apresentado a duas dimensões. No entanto uma descrição mais completa da molécula exigiria um modelo n-dimensional. Este porém seria um modelo que perderia a sua capacidade de visualização. É por esta razão que se usa o modelo bidimensional. O que se perde em rigor ganha-se em facilidade de compreensão. Na Fig. 3 está representada a curva de energia potencial do estado fundamental e do primeiro singuleto excitado de menor energia. Cada curva representa um estado electrónico. Cada estado electrónico possui diversos níveis vibracionais, e estes rotacionais, que foram excluídos da figura para não a complicar. Como modelo mais geral que é, este reduz-se ao diagrama de Jablonski se considerarmos a molécula fixa na coordenada nuclear de equilíbrio.

**Princípio de Franck-Condon.** O modelo das curvas de potencial permitenos introduzir o princípio de Franck-Condon. Para visualizar este princípio consideremos a tal coordenada nuclear relevante, por exemplo uma ligação metal ligando num complexo ou a distância internuclear uma molécula diatómica. Os átomos da molécula diatómica, por exemplo, estão em movimento de extensão e compressão (afastam-se e aproximam-se) com um período de oscilação temporal da ordem dos $10^{-12}$ s. A absorção de luz é um fenómeno que ocorre num tempo muito mais curto da ordem dos $10^{-15}$ s. Esta diferença de tempos, 3 ordens de grandeza, é enorme. Para a comparar tomemos o tempo de vida médio do homem, qualquer coisa como $10^9$ s, e o aparecimento do homem na terra $10^{12}$s, ou a idade do Universo $10^{15}$ s. Três ordens de grandeza de diferença é de facto muito! Isto significa que quando da absorção de luz, entre o início e o fim do fenómeno, entre o electrão passar de uma orbital do estado fundamental para outra do estado excitado, os núcleos da molécula não têm tempo de se mover. Como consequência deste facto o estado excitado é obtido com uma geometria idêntica à do estado fundamental. Mas esta geometria não é geralmente a mais estável para o estado excitado, pelo que este se rearranja até encontrar a sua geometria de equilíbrio; e esta geometria é muitas vezes completamente diferente da do estado fundamental, como teremos ocasião de referir mais em pormenor. O modelo das curvas de potencial é muito útil para descrever o princípio de Franck-Condon. Se a abcissa não se move, então a transição deverá ser vertical. Para saber qual o estado vibracional que vai ser populado preferencialmente, (o de partida é como foi dito o vibracional zero), faz-se a sobreposição da função de onda vibracional v=0 de $S_0$ com as diversas funções de onda vibracionais de $S_1$. Ao maior valor (maior integral de sobreposição) corresponderá a banda vibracional mais intensa, ver fig.3. Na maioria dos casos, a banda mais intensa não corresponde ao v=0 do estado excitado. Significa que se produz um estado "quente", (recordemos que a aborção de energia vibracional e rotacional é na gama dos infra-vermelhos). Este estado excitado "quente", arrefece *i.e.* desactiva até ao vibracional v=0 do estado excitado, num tempo da ordem dos $10^{-12}$ s. Como já foi afirmado é deste nível vibracional que "parte" o electrão responsável pela emissão.

Seja no modelo de Jablonski seja no de curvas de energia potencial, a diferença entre os níveis (ilustrada pelas setas direitas), tanto no espectro de absorção como no de emissão, está relacionada com a energia das bandas representadas no espectro. Essa relação é vísivel na Fig.3.

**Emissão de luz. Fluorescência e fosforescência.** A emissão de fluorescência (ou de fosforescência) pode ser seguida com um espectrofluorímetro. Neste caso escolhe-se um comprimento de onda de excitação, necessariamente onde a molécula absorva e recolhe-se a luz emitida aos diversos comprimentos de onda. No final representa-se a intensidade de emissão em função do comprimento de onda e obtém-se um espectro que se designa por espectro de emissão,

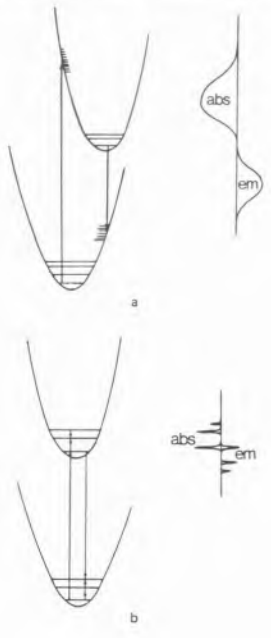



Fig. 3 - Diagrama de curvas de potencial. Em a o espectro de absorção possui o máximo da banda de absorção a comprimentos de onda menores (maior energia) do que o respectivo espectro de emissão. Em b devido ao facto do estado excitado não estar distorcido em relação ao estado fundamental, as curvas têm coordenadas nucleares médias semelhantes e a absorção $0 \leftarrow 0$ é praticamente coincidente com a emissão $0 \rightarrow 0$.

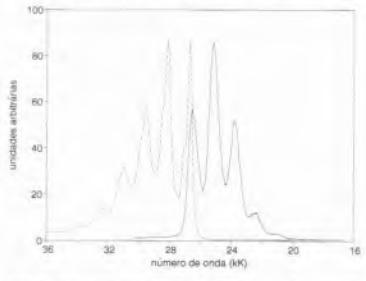



Fig. 4 - Espectro de absorção do antraceno à esquerda e respectivo espectro de emissão à direita. As unidades são kilo Kaiser (1kK=1000 $cm^{-1}$).

Fig.4. Sobrepondo o espectro de absorção com o espectro de emissão, verifica-se algumas vezes que são a imagem no espelho um do outro. Tal facto resulta dos níveis vibracionais estarem espaçados de um modo idêntico no estado fundamental e no estado excitado.

**Desvio de Stokes.** Uma informação muito importante sobre a natureza do estado excitado é a diferença energética das transições entre os vibracionais zero, nos espectros de absorção e de emissão. Quanto maior for essa diferença mais deslocado tem de estar o estado excitado, isto é, a sua coordenada nuclear média deve ser maior, o que implica uma maior distorção na sua geometria, ou seja, no modelo de curvas de energia potencial, a curva de $S_1$ tem de estar deslocada para a direita em relação a $S_0$. Esta distorção não é surpreendente, já que o estado excitado possui geralmente electrões em orbitais antiligantes, o que faz aumentar as distâncias internucleares. Voltando à fig.3 a podemos observar um elevado desvio de Stokes, enquanto na fig.3b se observa um pequeno desvio.

**Molécula no Estado Excitado. Uma Nova Espécie Química.** Consideremos uma molécula simples tal como o formaldeido. O seu estado excitado possui propriedades físico-químicas completamente diferentes, como podemos avaliar da leitura da tabela 1.

**TABELA 1:**
**COMPARAÇÃO DOS ESTADOS FUNDAMENTAL E EXCITADO DA MOLÉCULA DE FORMALDEÍDO**

| | Estado fundamental | Estado excitado |
|---|---|---|
| energia | 0 | + 76 kcal/mol |
| geometria | planar | piramidal |
| magnetismo | diamagnético | paramagnético |
| momento dipolar | 2,3 D | 1,3 D |
| distância CO | 1,22 Å | 1,31 Å |
| frequência de vibração CO | 1745 $cm^{-1}$ | 1180 $cm^{-1}$ |
| tempo de vida | $\infty$ | $< 10^{-3}$ s |

Àparte a maior energia e o curto tempo de vida (resultado da emissão ser espontânea) o formaldeído, a exemplo de tantas outras moléculas, é uma nova espécie no estado excitado. Senão vejamos: contrariamente ao que se passa no estado fundamental a geometria é piramidal; o espectro de absorção U.V. Vis. e o infra vermelho completamente diferentes, a distância internuclear CO distinta... etc.

Outras propriedades das moléculas mudam completamente no estado excitado. Por exemplo o $pK_a$ do fenol que é de 9,9 no estado fundamental, passa a ser cerca de 4 no estado excitado. O fenol é mais ácido no estado excitado. Este comportamento é facilmente entendido quando se analisa o espectro de absorção desta molécula. No fenol o electrão é promovido de uma orbital não ligante situada no oxigénio, para uma orbital $\pi^*$ (antiligante) localizada no anel. O oxigénio do átomo de fenol no estado excitado é por essa razão mais positivo e daí resulta a sua maior acidez.

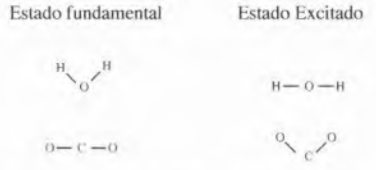



Fig. 5 - Comparação de geometrias entre o estado fundamental e o estado excitado.

Na figura 5 pode o leitor encontrar dois exemplos de diferenças de geometria entre o estado fundamental e o estado excitado. A fotoquímica é de facto uma *nova dimensão da química.*

**Fluorescência e fosforescência. Da teoria à prática.** Para obter experimentalmente um espectro de fluorescência ou de fosforescência utiliza-se um espectrofluorímetro cujo diagrama se inclui na fig. 6

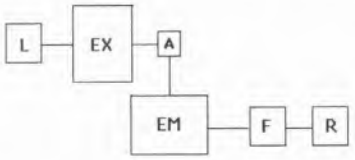



Fig. 6- Esquema de um espectrofotómetro: L-lâmpada; EX-monocromador de excitação; A-porta-amostra; EM- monocromador de emissão; F-fotomultiplicador; R-registador

O espectrofluorímetro é constituído por uma lâmpada que pode ser de espectro contínuo, por exemplo de Xenon ou de espectro de riscas, por exemplo de mercúrio de média pressão. Em qualquer dos casos ter-se-à de selecionar uma energia de excitação, (geralmente corresponde a seleccionar um dado comprimento de onda), que habitualmente é feito através de um monocromador, designado monocromador de excitação. Escolhida a energia de excitação, (obviamente o primeiro critério de escolha, é que essa energia seja absorvida pelo composto e daqui a necessidade de conhecer previamente o espectro de absorção), o feixe de luz incide numa célula contendo uma solução do composto emissivo. Podem utilizar-se outras técnicas para obtenção de espectros de emissão de fluorescência, que não seja a dissolução do composto num solvente que não absorva ao comprimento de onda de excitação, mas esta é sem dúvida a mais comum. Ao ser excitada a solução emite. No entanto é preciso analisar com detalhe as características dessa emissão. Com já foi referido, a emissão é, salvo raríssimas excepções, feita a partir do nível vibracional zero de $S_1$ ou $T_1$. E do mesmo modo que na absorção, a transição é vertical, e diversos níveis vibracionais e rotacionais de $S_0$ podem ser populados. Isto é, obtemos novamente um espectro de bandas. Esta característica da emissão obriga a que a luz emitida seja canalizada para um segundo monocromador designado por monocromador de emissão, que selecciona as diversas energias (em unidades de comprimento de onda). A recolha da luz para o fotomultiplicador de emissão é geralmente feita a 90°. Resta converter essa luz, já separada em energias, num sinal, o que é feito através de um fotomultiplicador. O fotomultiplicador dá origem a um sinal (a cada comprimento de onda) que é proporcional ao número de fotões emitido. A última etapa é representar graficamente a intensidade do sinal em função do comprimento de onda.

**Rendimento quântico.** No fenómeno de absorção a "aptidão" que uma molécula tem para absorver luz, mede-se pelo já referido coeficiente de absorção molar ($\varepsilon$ ). Na emissão a "aptidão" para emitir é medida de um modo formalmente muito simples, através do chamado rendimento quântico.Este é a razão entre o número de fotões emitidos, $N_{em}$, e o número de fotões absorvidos, $N_{abs}$. Se considerarmos o número de fotões emitidos no intervalo de tempo $\Delta t$, *i.e.* a intensidade de emissão $I_{em}$, dividido pelo número de fotões absorvidos no mesmo intervalo, *i.e.* a intensidade de absorção $I_{abs}$, podemos escrever

$$\phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}} = \frac{\frac{N_{em}}{\Delta t}}{\frac{N_{abs}}{\Delta t}} = \frac{I_{em}}{I_{abs}} \qquad (5)$$

O parametro $I_{abs}$ eq.(3), já é nosso conhecido dos parágrafos anteriores. Mas justamente aqui começa a primeira dificuldade. Para determinar $I_{abs}$ não só se deve conhecer a absorvência A, que é fácil de determinar através do espectro de absorção, mas também $I_0$, cujo cálculo é razoavelmente complicado. A juntar

a esta dificuldade experimental, o cálculo de $I_{em}$ também não é simples. Independentemente do ângulo utilizado para conduzir a luz de emissão para o fotomultiplicador de emissão, nunca se pode recolhê-la toda. A amostra é excitada e emite em todas as direcções, e só parte vai ser conduzida para o monocromador. Esta limitação é responsável pela introdução de um parâmetro de geometria nos espectros de emissão, e ainda pelo facto destes espectros serem representados em unidades arbitrárias.

A solução deste problema não é complicada. Basta utilizar um outro composto do qual se conheçe com rigor o rendimento quântico, que vai servir de padrão. Porém este cálculo obriga a ultrapassar uma outra dificuldade. O fotomultiplicador não tem uma resposta igual a todos os comprimentos de onda e o espectro de emissão precisa de ser corrigido. Não vamos entrar em detalhes sobre os métodos de correcção dos espectros de emissão, em cuja bibliografia o leitor poderá encontrar as indicações necessárias. Nos espectrofluorímetros modernos, vem incluído um ficheiro de correcção que permite obter de um modo simples o espectro corrigido. Isto é o espectro que seria obtido se o monocromador de emissão respondesse de igual modo a todos os comprimentos de onda.

Vencido o último obstáculo podemos agora calcular o rendimento quântico de emissão de um composto usando para o efeito um padrão. Para tal prepara-se uma solução do composto e outra do padrão de modo a que absorvam de igual modo ao comprimento de onda de excitação. Traçam-se os espectros de emissão corrigidos de ambos os compostos, que se integram de modo a obter todos os fotões emitidos. A razão entre as integrações é igual à razão dos respectivos rendimentos quânticos.

$$\frac{\phi}{\phi_p} = \frac{\int I}{\int I_p} \qquad (6)$$

**Soluções diluídas versus soluções concentradas.** Existem algumas vantagens em utilizar soluções diluídas para obter os espectros de emissão. A expressão (3) pode ser desenvolvida em série, e se a absorvência A for bastante baixa, podem ser desprezados os termos de ordem superior a 2, dando origem a (7), onde $\varepsilon$ e C são respectivamente a absortividade molar e a concentração da espécie emissiva

$$I_{abs} = I_0 (1 - 10^{-A}) \approx 2.303\, \varepsilon\, I_0 C \qquad (7)$$

Voltando à definição de rendimento quântico, eq.(5), tendo em conta o factor geométrico *G*, podemos escrever

$$I_{em} = G\, \phi\, 2.303\, I_{abs} C \qquad (8)$$

O factor geométrico *G*, resulta como se disse, do facto de não se poder recolher a totalidade da luz emitida. De notar que a expressão (8) tanto se pode aplicar ao espectro integrado como a um valor de emissão a um dado comprimento de onda. Nesse caso *G* contém para além de um factor geométrico, uma dependência com o comprimento de onda de emissão, proporcional à forma do espectro de emissão.

A eq.(8) é também a base da *utilização da flurescência como método analítico*. Com efeito, a um dado comprimento de onda de excitação e de emissão, mantendo a geometria, a intensidade de emissão é proporcional à concentração da espécie emissiva.

É frequente acontecer a um operador sem experiência, introduzir no espectrofluorímetro com geometria a 90° uma solução de uma substância muito emissiva e, para sua surpresa, não observar qualquer emissão ou quando muito deparar com uma emissão muito débil. Qual o motivo? A resposta é simples. Solução muito concentrada, ou melhor, uma solução que absorve demais.

Na fig.7A que corresponde ao caso de uma solução diluída, a luz incide na amostra como uma lâmina que a atravessa. Nestas condições a emissão provém dessa camada de luz que atravessa a solução. Pelo contrário uma solução muito concentrada como na Fig.7B, absorve praticamente toda a luz numa espessura pequena junto à superfície.. Podemos inclusivé fazer alguns cálculos para avaliar a dimensão dessa camada, usando a eq.(3). Consideremos uma substância com um valor de absortividade molar de 10.000 $M^{-1}cm^{-1}$, e uma concentração de $10^{-1}$M. O percurso optico necessário para que 99.9% da luz haja sido absorvida (absorvência *A*=3) é de 3 mm. Nestas condições nenhuma luz de excitação chega à parte central da célula. E como o monocromador de emissão está apontado para o centro da célula não "vê" qualquer luz.

Nos casos em que não é desejável diluir a solução, pode recorrer-se a células triangulares, como exemplificado na Fig 7C. A lâmina de luz vai incidir no centro da célula, a emissão segue em diversas direcções, nomeadamente para a zona onde está apontado o monocromador de emissão

**Aplicações.** Devido à sua elevada sensibilidade a fluorescência é muito utilizada como método analítico, nomeadamente como método de detecção de técnicas cromatográficas como seja a "HPLC". No entanto o maior fascínio desta técnica, é a possibilidade de obter de um modo tão simples informação sobre os estados excitados. Não reduzir a fluorescência a uma técnica analítica foi um também um dos objectivos deste escrito.

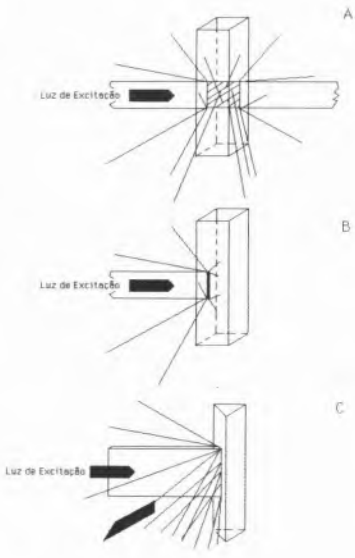



Fig. 7- Ilustração de alguns problemas práticos relacionados com a absorção da substância emissiva: A- solução diluída; B-solução concentrada; C-célula de geometria triangular para utilizar com soluções concentradas.

** em memória do Professor João Conte que me ensinou as primeiras letras de Espectroscopia, com uma grande saudade das estimulantes discussões no C.Q.E., a propósito de tudo e de nada, protagonizadas pelos meus companheiros, M. Prieto, A. L . Maçanita e E. Melo.*

***Grupo de Fotoquímica do Departamento de Química da FCT/UNL, Quinta da Torre, 2825 Monte de Caparica*