

2

Introdução ao estudo da fluorescência

O presente capítulo tem por objetivo descrever e conceituar o fenômeno da fluorescência e como o mesmo pode ser utilizado como ferramenta no estudo de fenômenos moleculares. Para tal, os livros utilizados para a estruturação desse capítulo e do próximo capítulo foram (Lakowicz, 2006 e Valeur 2002)

2.1

Introdução à fluorescência

As primeiras observações de substâncias que emitiam luz depois de expostas uma fonte de luz excitatória, carecia de explicações, entretanto nem a mecânica newtoniana e nem tampouco a óptica eletromagnética de Maxwell eram capazes de explicá-la. Primeiramente, era curioso que para todas as substâncias estudadas só emitissem luz num comprimento maior que da luz excitatória, também carecia de uma explicação dos mecanismos de emissão luminosa, como também uma conclusiva explicação do porquê de determinadas substâncias eram luminescentes e outras não. Ademais, foi uma revolução à época a possibilidade de reconhecimento de substâncias pelos seus espectros de absorção e ou emissão.

O professor Alexander Jablonski deu uma grande contribuição ao entendimento dos componentes que formam a matéria ao elucidar os fenômenos de fluorescência e fosforescência de maneira simples, elegante e inovadora através de um diagrama que leva o seu nome, que representa pedagogicamente os processos de absorção de radiação eletromagnética (aqui, representando a faixa de comprimentos de onda UV-Visível), conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistemas e fosforescência.

Um típico diagrama de Jablonski (Figura 2.1) representa os níveis energéticos S_0 , S_1 e S_2 correspondentes, respectivamente, aos níveis singletos fundamental, primeiro e segundo estados eletrônicos excitados; os estados tripleto, representados por T_1 , T_2 , T_3 (primeiro estado tripelo excitado, segundo e

terceiro, etc). A cada uma desses estados estão associados estados vibracionais, que são representados por números: 0,1,2,..., etc.

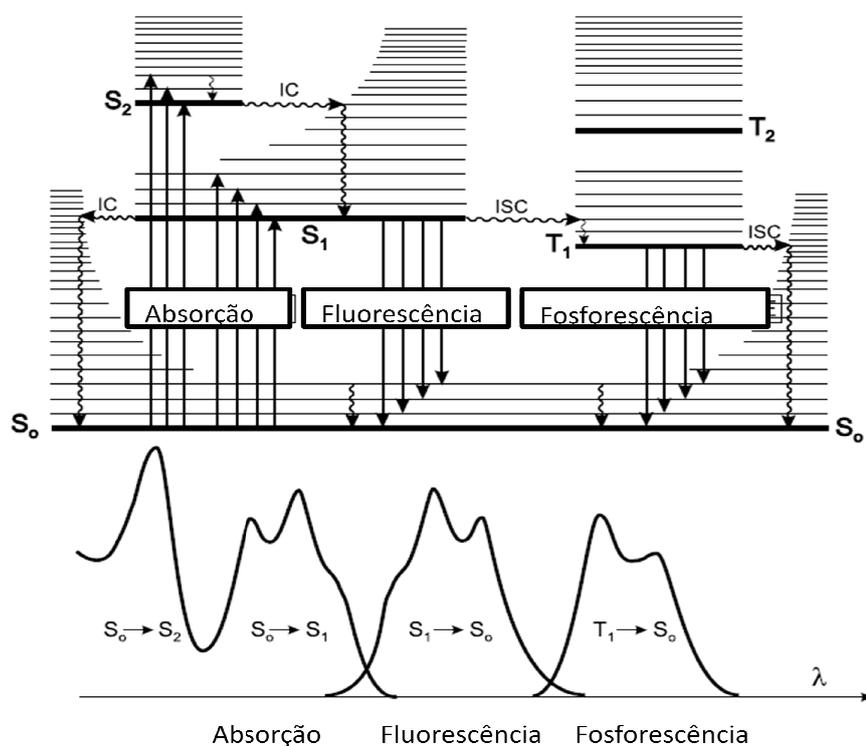


Figura 2.1. Diagrama de Jablonski. (Retirada de Valeur; 2002).

Há uma variedade de diagramas de Jablonski, entretanto é comum a todos representarem as transições eletrônicas como setas verticais (na Figura 2.1, as transições eletrônicas radiativas são representadas por linhas retas, já as transições eletrônicas provocadas por mecanismos não radiativos são representadas por setas onduladas). É importante atentar ao fato de que a ordem de grandeza do tempo das transições correspondentes à absorção da luz é de femtossegundos, tempo este muito menor que qualquer outro processo e, sendo os núcleos muito massivos, não apresentam um significativo deslocamento durante essa transição (princípio de Franck-Codon).

O nível energético fundamental (S_0) corresponde ao nível mais populado pelas moléculas em equilíbrio termodinâmico com reservatório térmico. A absorção de radiação eletromagnética pode levar a molécula a um dos níveis vibracionais de um dos estados singletos excitados S_1 , S_2 , etc. E a partir de então, a molécula retorna ao estado fundamental S_0 por diversos processos de decaimento radiativo ou não radiativo.

2.1.1 Diferentes processos de decaimento

- Conversão interna

É uma transição não radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spins. Em solução, este processo é seguido de uma relaxação vibracional até o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico final, sendo o excesso de energia vibracional transferido para as moléculas do solvente através de colisões. Esse processo faz com que moléculas que foram levadas, pela absorção de fótons, a um nível vibracional eletrônico acima do menor nível vibracional do primeiro estado singlete excitado (S_1) relaxem até esse nível. A escala de tempo desse processo é da ordem de grandeza de 10^{-13} a 10^{-11} segundos. É possível que, a partir de S_1 , a conversão interna leve a molécula até o estado singlete fundamental, entretanto este processo não é tão eficiente quanto o que leva a molécula dos singletos superiores até o S_1 .

- Fluorescência

É um processo de relaxação eletrônica que leva a molécula do estado vibracional mais baixo do primeiro nível singlete excitado para o nível energético fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), através da emissão de radiação eletromagnética. Por esse motivo, o espectro de emissão é independente da frequência da luz de excitação. Justamente porque depois de excitada, a nuvem eletrônica relaxa por processos não radiativos até o nível eletrônico S_1 . Ademais, o espectro de fluorescência se dá sempre em comprimentos de onda maiores que da luz de excitação, correspondendo a fótons de menor energia. Tal regra, denominada Regra de Stokes (por seu pioneirismo ao observar este fato) está de acordo com a conservação da energia, visto que parte da energia obtida através da absorção de fótons é perdida por vibração da rede.

- Cruzamento intersistemas.

É um processo de transição eletrônica não radiativa que leva a nuvem eletrônica do estado S_1 até um estado tripleto T_1 . Seguem-se então outros processos que relaxam o sistema até o nível vibracional, conforme o diagrama da Fig. 2.1.

- Fosforescência

É um processo de decaimento radiativo que leva a nuvem eletrônica do estado vibracional 0 do primeiro nível tripleto ao nível singlete fundamental (T_1

→ S_0). Tanto o cruzamento intersistemas, quanto a fosforescência são transições proibidas, pois não respeitam a multiplicidade dos spins. Essa transição se torna possível, por causa do acoplamento spin-órbita. É de suma importância lembrar que esses diferentes processos competem entre si, e em geral são mais eficientes em relaxar a nuvem excitada. A fosforescência pode ser otimizada em baixas temperaturas e/ou num meio rígido. As escalas de tempo características desses processos são mostradas mais abaixo.

<i>Processo</i>	<i>Tempo característico (s)</i>
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Tempo de vida do estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Tempo de vida do estado excitado T_1	$10^{-6} - 10^0$

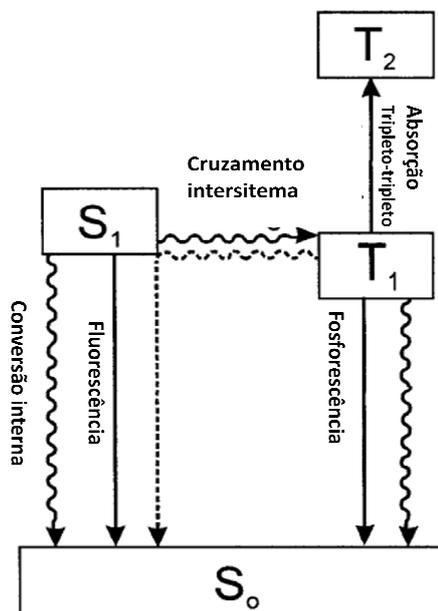


Figura 2.2. Esquema dos diferentes processos de relaxamento de uma molécula excitada. (Valeur, 2002).

2.1.2 Tempos de vida e rendimentos quânticos.

Todos os processos de decaimentos descritos acima estão associados a taxas de decaimento (k), que são típicas de cada molécula e das condições em que a mesma se encontra. Na realidade o tempo de vida e o rendimento quântico (que serão discutidos nesse capítulo) são características marcantes de um fluoróforo.

Basicamente os decaimentos são divididos entre: radiativos (r) e não radiativos (nr), também as transições singlete-singlete serão representadas por (k^S) e transições que violem a multiplicidade dos spins por (k^T).

- k_r^S : taxa de emissão de fluorescência.
- k_{ic}^S : taxa de conversão interna do estado $S_1 \rightarrow S_0$.
- k_{isc} : taxa de cruzamento intersistemas

Para o decaimento desde um estado tripleto T_1 para um estado fundamental. $T_1 \rightarrow S_0$ temos:

- k_r^T : decaimento através da emissão de fótons (fosforescência).
- k_{nr}^T : cruzamento intersistemas, decaimento não radiativo.

Suponhamos que, numa solução, uma espécie fluorescente de concentração $[A]$ seja excitada por um pulso de luz extremamente rápido. Isso significa que o seu tempo de duração é muito menor que os inversos das taxas de decaimento envolvidas. Depois da absorção dos fótons, e da devida relaxação (conversão interna) até o primeiro estado singlete excitado, temos que a concentração de moléculas no estado excitado S_1 será $[^1A^*]$. Por analogia com o decaimento radioativo, temos que a taxa de despopulação do estado excitado, ou a taxa de decaimento para o estado fundamental, pode ser descrita com a equação diferencial dada por:

$$\frac{-d[^1A^*]}{dt} = (k_r^S + k_{nr}^S)[^1A^*] \quad (2.1)$$

Daí segue que a solução dessa equação será do tipo:

$$[^1A^*] = [^1A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (2.2)$$

onde $[^1A^*]_0$ é a concentração de moléculas no estado excitado no tempo $t = 0$ e τ_s é o tempo de vida do estado excitado S_1 , dado por:

$$\tau_s = \frac{1}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad (2.3)$$

A intensidade de fluorescência instantânea, i_F , que se segue após a absorção de um pulso muito curto de luz, tem a sua evolução governada por uma equação similar à mostrada acima, pois temos que a i_F num certo tempo t é proporcional à população do primeiro estado singlete excitado (S_1). Através uma análise dimensional, é possível perceber que a constante de proporcionalidade é a própria taxa de decaimento radiativo, de maneira que:

$$i_F(t) = k_r^s [^1A^*] = k_r^s [^1A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (2.4)$$

sendo $i_F(t)$ a intensidade de fluorescência instantânea, a qual diminui segundo a exponencial acima.

O tempo de decaimento de fluorescência τ_s define uma janela temporal em que se pode observar a dinâmica do sistema. Na realidade o tempo de vida pode ser definido como o tempo em que a molécula permanece no estado excitado em analogia ao decaimento radioativo.

O tempo de vida de uma molécula é independente da frequência da luz de excitação (há exceções). Como os mecanismos de conversão interna são muito rápidos (para moléculas em solução), a emissão de luz se dá do primeiro nível singlete excitado para o estado fundamental $S_1 \rightarrow S_0$.

O rendimento quântico de fluorescência Φ_F é a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Obviamente o decaimento total é proporcional ao número de fótons absorvidos, o que nos leva até:

$$\Phi_F = \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s} = k_r^s \tau_s \quad (2.5)$$

O rendimento quântico também pode ser interpretado como a fração de moléculas no estado excitado que retornam ao estado fundamental S_0 via emissão de fótons.

Da expressão 2.4, a razão entre i_F e $[^1A^*]_0$ é:

$$\frac{i_F(t)}{[^1A^*]_0} = k_r^s \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (2.6)$$

A integração desta razão durante todo o decaimento fornece o rendimento quântico de fluorescência:

$$\frac{1}{[{}^1A^*]_0} \int_0^{\infty} i_F(t) dt = k_r^s \tau_s = \Phi_F \quad (2.7)$$

2.1.3 Supressão de fluorescência

Há diversos processos de supressão de fluorescência, i.e., diminuição da intensidade de emissão sem deslocamento do pico ou modificação da forma do espectro. Aqui serão descritos dois dos principais mecanismos de supressão da emissão fluorescente.

Supressão dinâmica ou colisional.

A supressão colisional (dinâmica) ocorre quando um fluoróforo no estado excitado perde energia através do choque com alguma molécula da solução, retornando ao estado fundamental sem emissão de fótons.

Suponhamos que $[{}^1A^*]$ seja a concentração de moléculas no estado excitado S_1 , depois da absorção de um curto pulso de luz. A despopulação desse estado vai depender das taxas usuais de decaimento, radiativo e não radiativo, mais um termo proporcional à concentração do supressor de fluorescência ($[Q]$), e obtemos:

$$\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = -(k_r^s + k_{nr}^s) \cdot [{}^1A^*] - k_q [Q][{}^1A^*] \quad (2.9)$$

Entretanto, pela relação (2.3) obtemos:

$$\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = -\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]\right) \cdot [{}^1A^*] \quad (2.10)$$

sendo τ_0 o tempo de vida da molécula na ausência do supressor e k_q a constante bimolecular, que reflete a acessibilidade do supressor ao fluoróforo.

Solucionado a equação diferencial (2.10) temos:

$$[{}^1A^*] = [{}^1A^*]_0 \exp\left\{-\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]\right)t\right\} \quad (2.11)$$

E como a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de moléculas no estado excitado, temos que:

$$i(t) = i(0) \exp\left\{-\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q[Q]\right)t\right\} \quad (2.12)$$

E, portanto, o novo tempo de vida (na presença do supressor) será:

$$\tau = \frac{\tau_0}{1 + k_q\tau_0[Q]} \quad (2.13)$$

Segue que:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (2.14)$$

Como o rendimento quântico de fluorescência depende do tempo de vida segundo a equação (2.5) chegamos a relação de Stern-Volmer:

$$\frac{i_0}{i} = \frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] = K_{SV}[Q] + 1 \quad (2.15)$$

Sendo i e i_0 são as intensidades da emissão estacionária de fluorescência na presença e ausência do supressor respectivamente. E temos que $K_{SV} = k_q\tau_0$;

Supressão estática de fluorescência

A supressão de fluorescência pode ocorrer também pela formação de um complexo não fluorescente. Tomando a formação de complexo não fluorescente 1:1, segundo o equilíbrio $F + Q \rightleftharpoons F-Q$, teremos:

$$K_s = \frac{[F-Q]}{[F] \cdot [Q]} \quad (2.16)$$

Pela conservação da massa teremos que a concentração total do fluoróforo ($[F]_t$) será dada por

$$[F]_t = [F] + [F-Q] \quad (2.17)$$

Considerando as intensidades de fluorescência proporcionais a concentração de espécies fluorescentes e combinando as equações (2.16) e (2.17) chegamos a:

$$\frac{i_0}{i} = 1 + K_s[Q] \quad (2.18)$$

Ademais, é importante perceber que na supressão estática não há mudança no tempo de vida, visto que as moléculas que continuam emitindo radiação eletromagnética são as que não formaram complexo não fluorescente.