

3. Espectroscopia de absorção e de fluorescência

3.1. Absorção de luz UV-visível (transições eletrônicas em moléculas)

(De acordo com “Molecular Fluorescence” de Bernard Valeur, 2005)

Uma transição eletrônica consiste na passagem de um elétron de um orbital molecular no estado fundamental para um orbital não ocupado por absorção de um fóton. Portanto, diz-se que a molécula está em um estado excitado. Primeiro veremos os vários tipos de orbitais moleculares.

Um orbital σ pode ser formado por dois orbitais atômicos s, ou por um s e um p, ou a partir de dois orbitais p tendo um eixo colinear de simetria. A ligação formada deste modo é chamada de ligação σ . Um orbital π é formado a partir de dois orbitais atômicos p sobrepondo-se lateralmente. A ligação resultante é chamada de ligação π . Por exemplo, em etileno ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$), os dois átomos de carbono estão unidos por uma ligação σ e por uma ligação π . A absorção de um fóton com energia apropriada pode promover a passagem de um dos elétrons π para um orbital não ocupado denominado π^* . A transição é então chamada $\pi \rightarrow \pi^*$. A excitação de um elétron σ requer uma energia muito maior (absorção no UV distante) e não será considerada aqui.

Uma molécula também pode possuir elétrons não ligados localizados em heteroátomos tais como oxigênio ou nitrogênio. Os orbitais moleculares correspondentes são chamados orbitais n. A excitação de um elétron não ligado para um orbital não ocupado é possível e a transição associada é denotada por $n \rightarrow \pi^*$.

A energia dessas transições eletrônicas está, geralmente, na seguinte ordem:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

Para ilustrar esses níveis de energia, a Figura 3.1 mostra o formaldeído como exemplo, com todas as possíveis transições. A transição $n \rightarrow \pi^*$ necessita de mais atenção: sob excitação, um elétron é removido do átomo de oxigênio e vai para o orbital π^* , localizado parte sobre o átomo de carbono e parte sobre o átomo de oxigênio. O estado excitado $n \rightarrow \pi^*$ tem um caráter de transferência de carga, caracterizado por um aumento no momento de dipolo de aproximadamente 2D em relação ao momento de dipolo no estado fundamental de C=O (3D). ($1 \text{ C m} = 2.9979 \times 10^{29} \text{ D (debye)}$).

Em espectroscopia de absorção e fluorescência, dois tipos importantes de orbitais são considerados: o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) e o orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (LUMO). Ambos referem-se ao estado fundamental da molécula. Por exemplo, no formaldeído, o HOMO é o orbital n e o LUMO é o orbital π^* . (Figura 3.1).

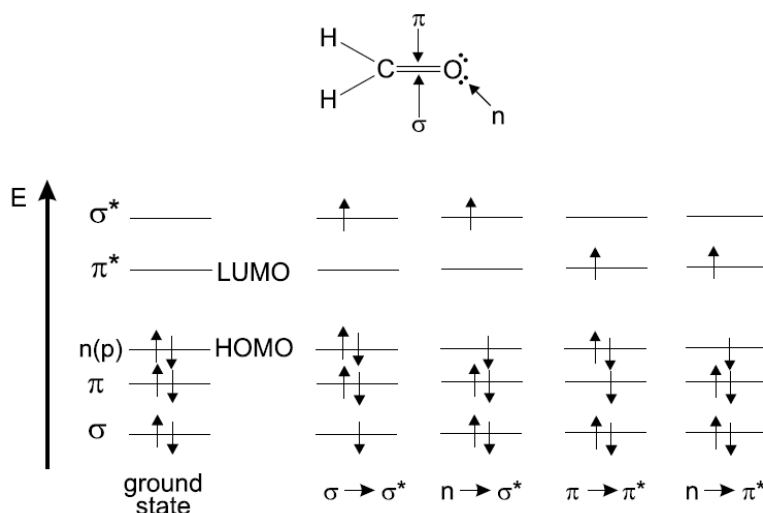


Figura 3.1. Níveis de energia de orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) (Bernard Valeur, 2001).

Quando um de dois elétrons de spins opostos (pertencentes ao orbital molecular no estado fundamental) é transferido para um orbital molecular de maior energia, seu spin, em princípio, não é alterado; então o número quântico de spin total ($S = \sum s_i$, com $s_i = +\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$) permanece igual a zero. Por causa da multiplicidade dos dois estados, fundamental e excitado, ($M = 2S + 1$) ser igual a

1, ambos são chamados de estado singleto (normalmente denominado S_0 para o estado fundamental, e S_1, S_2, \dots para os estados excitados) (Figura 3.2).

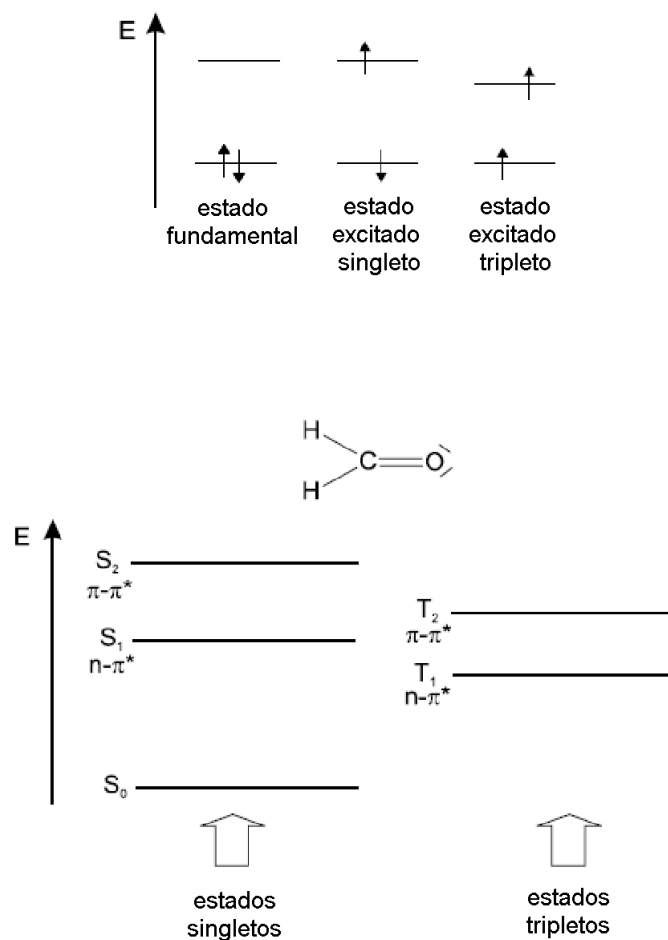


Figura 3.2. Distinção entre os estados singleto e tripleto, usando o formaldeído como exemplo (Valeur, 2005).

A transição correspondente é chamada de uma transição singleto-singletto. Uma molécula em um estado excitado singleto pode sofrer uma conversão para um estado em que o elétron excitado tenha seu spin modificado; devido a existir dois elétrons com spins paralelos, o número quântico total de spin é 1 e a multiplicidade é 3. Tal estado é chamado de estado tripleto porque corresponde a três estados de mesma energia. De acordo com a regra de Hund, o estado tripleto tem uma energia menor que a do estado singleto de mesma configuração.

Em uma molécula como o formaldeído, os orbitais ligantes e não-ligantes são localizados (como as ligações) entre pares de átomos. Tal imagem da localização desses orbitais é válida para os orbitais σ de ligações simples e para os orbitais π de ligações duplas isoladas, mas não é adequada no caso de ligações

carbono-carbono alternadas simples e duplas (nos chamados sistemas conjugados). Na verdade, a sobreposição dos orbitais π permite que os elétrons estejam “delocalizados” sobre todo o sistema (efeito de ressonância). 1,3-Butadieno e benzeno são os casos mais simples de sistemas conjugados, linear e cíclico, respectivamente (Figura 3.3).

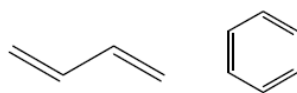


Figura 3.3. Exemplos de moléculas com sistemas conjugados, à esquerda: 1,3-butadieno (linear); à direita: benzeno (cíclico) (Bernard Valeur, 2001).

Porque não há sobreposição entre os orbitais σ e π , o sistema de elétrons π pode ser considerado como independente das ligações σ . Quanto maior a extensão do sistema de elétrons π , menor a energia da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e, conseqüentemente, maior o comprimento de onda da banda de absorção correspondente. Esta regra aplica-se a sistemas conjugados lineares (polienos) e sistemas conjugados cíclicos (moléculas aromáticas).

Lei de Beer - Lambert

A probabilidade de absorção para um único comprimento de onda é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar para aquele comprimento de onda. Isto é mais facilmente definido em termos de como ele é medido. Se luz de intensidade I_0 passa através de uma substância (que pode estar em solução) de espessura d e concentração molar c , a intensidade I da luz transmitida obedece a lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon d c} \quad \text{ou} \quad \log(I_0 / I) = \varepsilon d c$$

em que ε é o coeficiente de absorção molar. Os dados de absorção podem ser colocados em porcentagem (%) de transmissão ($T = 100 I / I_0$) ou, mais comumente, como a absorvância $A = \log(I_0 / I)$. Quando $d = 1$ cm, A é comumente chamado de densidade ótica (OD_λ), em que o índice λ informa o comprimento de onda em que a medida foi feita. A densidade ótica é conveniente, pois é igual a (εc) . Em alguns casos, se a concentração é alta, ε aparece como uma função de c e pode ser dito que a lei de Beer-Lambert, nesse caso, não é válida. Isto pode

resultar da alta absorção, do espalhamento ou das mudanças estruturais (por exemplo: dimerização, agregação, ou mudanças químicas) para concentrações altas.

A espectroscopia de absorção é uma técnica que consiste em obter dados de absorção ótica de uma amostra diluída por meio de um feixe de luz incidente cujo comprimento de onda varia do infravermelho até o ultravioleta. O espectrofotômetro é composto de um sistema ótico e da eletrônica acoplada a um computador por meio de uma placa de interface para controle e aquisição de dados. Apesar de variarem em desenho, todos os espectrofotômetros consistem de uma fonte de luz, um monocromador (para a seleção dos comprimentos de onda), um porta-amostra transparente chamado de cubeta, um detector de luz, e um registrador para acumular os dados de saída do detector. A Figura 3.4 mostra o esquema do espectrofotômetro HP-8452A, com detecção por arranjo de diodos.

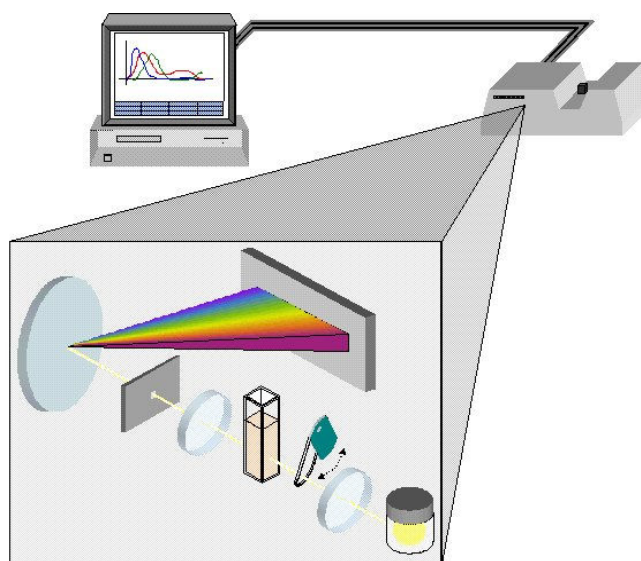


Figura 3.4. Esquema do espectrofotômetro HP-8452A. A luz da lâmpada passa através da amostra e solvente contidos em uma cubeta. Em seguida passa pela rede de difração, para seleção do comprimento de onda, e atinge o arranjo de diodos para a detecção (da Silva, Tese de mestrado, PUC-Rio).

3.2.

Fluorescência (transições radiativas e não-radiativas entre estados eletrônicos)

Este tópico descreve as características da emissão de fluorescência de uma molécula excitada em solução. O diagrama de Jablonski (Figura 3.5) é conveniente para visualizar de um modo simples os possíveis processos: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema, fosforescência, fluorescência com retardo e transições tripleto-tripletto. Os estados eletrônicos singletos são representados por S_0 (estado eletrônico fundamental), S_1 , S_2 , ... e estados tripletos, T_1 , T_2 , ... Níveis vibracionais são associados com cada estado eletrônico. É importante perceber que a absorção é muito rápida ($\cong 10^{-15}$ s) em relação a todos os outros processos, não há deslocamento concomitante do núcleo de acordo com o princípio de Franck-Condon (uma transição eletrônica ocorre preferencialmente sem mudanças nas posições dos núcleos atômicos nas moléculas e em seu ambiente).

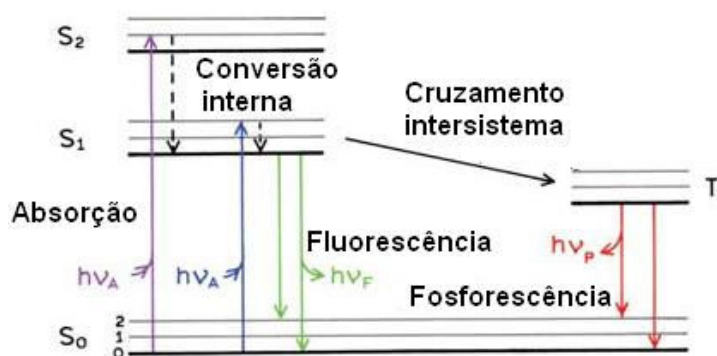


Figura 3.5. Diagrama de Jablonski (modificado de Lakowicz, 2006).

As setas verticais correspondem ao início da absorção a partir do nível mais baixo de energia vibracional de S_0 , porque à temperatura ambiente a maioria das moléculas está neste nível. A absorção de um fóton pode levar a molécula para um dos níveis vibracionais de S_1 , S_2 , Os possíveis processos subsequentes de desexcitação podem ser:

- Conversão interna – é uma transição não-radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Em solução, este processo é seguido por uma relaxação vibracional para o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico final. O excesso de energia vibracional pode inclusive ser transferido para o

solvente durante colisões da molécula excitada com as moléculas do solvente na sua vizinhança. Tempo característico de 10^{-11} a 10^{-9} s.

- Fluorescência – a emissão de fótons que acompanha a relaxação $S_1 \rightarrow S_0$ é chamada de fluorescência. Deve ser enfatizado que, apesar de algumas exceções, a emissão de fluorescência ocorre a partir de S_1 e suas características (exceto polarização) não dependem do comprimento de onda de excitação (considerando que somente exista uma espécie no estado fundamental).

A transição 0-0 é geralmente a mesma para absorção e fluorescência. No entanto, o espectro de fluorescência é localizado em comprimentos de onda maiores (energia mais baixa) que o espectro de absorção, por causa da perda de energia no estado excitado devido à relaxação vibracional. De acordo com a regra de Stokes (uma observação empírica anterior ao diagrama de Jablonski), o comprimento de onda de emissão de fluorescência deve ser sempre maior que o da absorção. Entretanto, na maioria dos casos, o espectro de absorção intercepta parcialmente o espectro de fluorescência, isto é, uma fração de luz é emitida em comprimento de onda menor que a luz absorvida. Tal observação parece estar, em um primeiro momento, em contradição com o princípio da conservação da energia. No entanto, isto pode ser explicado (como observou Einstein pela primeira vez) pelo fato de que em temperatura ambiente uma pequena fração de moléculas está em um nível vibracional maior que o nível 0 (distribuição entre os níveis de energia de acordo com a lei de Boltzmann), tanto no estado fundamental como no estado excitado. Em temperaturas baixas, essa violação da lei de Stokes deve desaparecer.

Em geral, as diferenças entre os níveis vibracionais são similares nos dois estados: fundamental e excitado, tanto que o espectro de fluorescência frequentemente apresenta a primeira banda de absorção (regra do espelho). O intervalo (expresso em número de onda) entre o máximo da primeira banda de absorção e o máximo de fluorescência é chamado de desvio de Stokes.

Deve ser percebido que a emissão de um fóton é tão rápida quanto à absorção de um fóton ($\cong 10^{-15}$ s). Entretanto moléculas excitadas ficam no estado S_1 por certo tempo (de poucas dezenas de picosegundos a poucas centenas de nanosegundos, dependendo do tipo da molécula e do meio) antes de emitir um fóton ou percorrer outros processos de desexcitação. Então, após a excitação de uma população de moléculas por um pulso de luz muito curto, a intensidade da

fluorescência decresce exponencialmente com um tempo característico, refletindo o tempo de vida médio das moléculas no estado excitado S_1 .

- Cruzamento intersistema – é uma transição não-radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes. Por exemplo, uma molécula excitada no nível vibracional 0 do estado S_1 pode mover-se para o nível vibracional isoenergético do estado tripleto T_n ; então a conversão interna seguida da relaxação vibracional leva-a para o nível vibracional mais baixo de T_1 . Cruzamento intersistema pode ser rápido suficientemente ($10^{-7} - 10^{-9}$ s) para competir com outros caminhos de desexcitação a partir de S_1 (fluorescência e conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$).

- Fosforescência versus desexcitação não-radiativa – em solução a temperatura ambiente, desexcitação não-radiativa a partir do estado tripleto T_1 é predominante sobre desexcitação radiativa chamada fosforescência. Na verdade, a transição $T_1 \rightarrow S_0$ é proibida (mas pode ser observada devido ao acoplamento spin-órbita), e a constante de decaimento radiativo é muito pequena. Durante esse processo, que é lento, ocorrem numerosas colisões com moléculas do solvente que favorecem o cruzamento intersistema e a relaxação vibracional em S_0 .

Em temperaturas baixas e/ou em meios rígidos, a fosforescência pode ser observada. O tempo de vida do estado tripleto pode, nessas condições, ser longo o suficiente para se observar a fosforescência em uma escala de tempo até segundos, até minutos ou mais.

O espectro de fosforescência é localizado em comprimentos de onda maiores que no espectro de fluorescência, porque a energia do nível vibracional mais baixo do estado tripleto T_1 é menor que o do estado singleto S_1 .

- Fluorescência com retardo ativada termicamente – cruzamento intersistema reverso $T_1 \rightarrow S_1$ pode ocorrer quando a diferença de energia entre S_1 e T_1 é pequena e quando o tempo de vida de T_1 é suficientemente grande. Isso resulta em uma emissão com a mesma distribuição espectral da fluorescência normal, mas com uma constante de decaimento de tempo muito maior, porque a molécula fica no estado tripleto antes de emitir de S_1 . Esta emissão de fluorescência é ativada termicamente, conseqüentemente sua eficiência aumenta com o aumento da temperatura.

- Aniquilação tripleto-triplete – Em soluções concentradas, uma colisão entre duas moléculas no estado T_1 pode fornecer energia suficiente para permitir que uma delas retorne ao estado S_1 , levando a uma emissão de fluorescência com retardo.
- Transições tripleto-triplete – uma vez que uma molécula está excitada e alcança o estado tripleto T_1 , ela pode absorver outro fóton em um comprimento de onda diferente, porque transições tripleto-triplete são permitidas pelo spin. Estas transições podem ser observadas quando a população de moléculas no estado tripleto é grande o suficiente, o que pode ser conseguido pela iluminação com um pulso intenso de luz.

3.2.1.

Medidas de fluorescência estacionária

Implementar medidas de fluorescência é certamente mais difícil do que parece em um primeiro momento, isso por algumas razões:

- Dependência do comprimento de onda: (i) da intensidade da luz da fonte, (ii) da eficiência de transmissão dos monocromadores, (iii) da sensibilidade do detector. Correções adequadas dos espectros de emissão e excitação não são simples;
- Efeito de polarização da luz incidente e da emissão de fluorescência (a eficiência de transmissão do monocromador depende da polarização da luz);
- Possível contaminação do sinal por espalhamento de luz (Rayleigh ou Raman), especialmente a partir de amostras turvas ou por fluorescência de fundo devido ao meio (fluorescência de impurezas do solvente, autofluorescência de amostras biológicas, etc.) (Valeur, 2005).

A Figura 3.6 mostra os componentes de um espectrofluorímetro convencional. A fonte de luz é geralmente uma lâmpada de xenônio de alta pressão, que oferece a vantagem de emissão contínua de $\cong 250$ nm até o infravermelho. Um monocromador é usado para selecionar o comprimento de onda de excitação. A fluorescência é direcionada em um ângulo reto em relação ao feixe incidente e detectada através de um monocromador por um fotomultiplicador. Varreduras automáticas dos comprimentos de onda são realizadas por monocromadores motorizados, que são controlados por dispositivos eletrônicos e pelo computador, no qual os dados são armazenados. O módulo

ótico contém várias partes: um porta-amostra, fendas, polarizadores e um espalhador de feixe para fotodiodos.

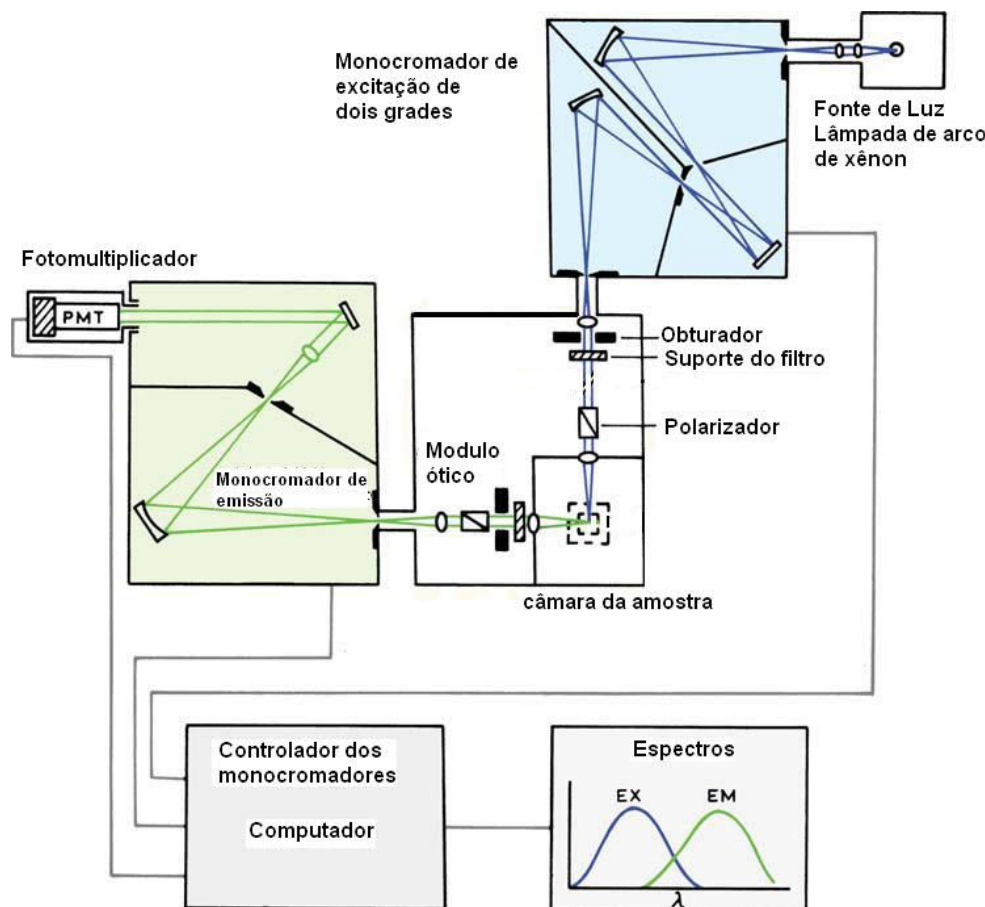


Figura 3.6. Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro com geometria perpendicular para excitação e emissão (modificado de Lakowicz, 2006).

O espectro de emissão mostra as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, e obtém-se fixando o comprimento de onda da luz de excitação. Ele representa a transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 . O espectro de fluorescência pode nos informar sobre reações no estado excitado do fluoróforo, enquanto que o espectro de absorção pode nos fornecer informações sobre reações do estado fundamental. O espectro de excitação mostra as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda da luz de excitação, obtém-se mantendo o detector em um mesmo comprimento de onda, em geral no máximo de emissão. No caso de uma solução homogênea de um fluoróforo, o espectro de excitação corrigido corresponderá ao espectro de absorção, desde que o relaxamento radiativo ocorra do nível vibracional fundamental do estado

eletrônico excitado. Este parâmetro irá mudar se a energia potencial relativa entre os estados excitado e fundamental for modificada por alguma perturbação. O rendimento quântico é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos. O rendimento quântico é geralmente determinado pela comparação com uma fluorescência padrão, isto é, um composto de rendimento quântico conhecido que atende aos seguintes critérios (Demas, 1982 em Valeur, 2005):

- Prontamente disponível em uma forma altamente pura;
- Estável fotoquimicamente em solução e em estado sólido na armazenagem;
- Alto rendimento quântico de fluorescência precisamente conhecido;
- Espectros de absorção e fluorescência amplos, sem características acentuadas, para evitar erros;
- Espectro de fluorescência e rendimento quântico independentes do comprimento de onda de excitação;
- Pequena sobreposição entre os espectros de absorção e emissão para evitar erros de auto-absorção (grande deslocamento de Stokes);
- Emissão não polarizada.

A fluorescência apresenta grandes vantagens quando comparada a outros métodos de espectroscopia, pois é muito sensível a vizinhança do fluoróforo, tem um amplo espectro de análise e o erro inerente à medição é praticamente constante em todo o intervalo de resposta.

A sensibilidade da fluorescência é uma consequência do longo tempo que o fluoróforo permanece no estado excitado antes do decaimento. O estado singlete leva aproximadamente 10^{-9} s para decair. Durante esse tempo vários processos podem ocorrer, tais como reações de protonação / desprotonação, mudanças conformacionais locais em proteínas e interações de diversas drogas com biomoléculas.

A fluorescência pode ser suprimida (supressão da fluorescência), resultado da interação entre o composto fluorescente e outras substâncias presentes na solução, por efeitos da temperatura, por efeitos de filtro interno, pela presença de oxigênio ou impurezas na solução. Além disso, em concentrações elevadas pode ocorrer a formação de dímeros ou polímeros maiores, o que origina a diminuição da eficiência quântica e a alteração dos espectros de absorção e emissão,

resultando em uma diminuição da intensidade de fluorescência. No fenômeno de fotodecomposição, a luz incidente altera as propriedades químicas da molécula fluorescente e a converte em outra espécie, mudando o espectro inicial de absorção e emissão do fluoróforo.

A intensidade de fluorescência é proporcional à concentração do fluoróforo em soluções muito diluídas (absorvância muito baixa). Para concentrações suficientemente baixas (absorvância < 0.1) a luz incidente é ligeiramente atenuada ao longo da cubeta. Já em concentrações altas, uma parte significativa da luz incidente é absorvida antes de chegar ao ponto onde a fluorescência é observada (efeito de filtro interno). Outra parte significativa da luz emitida também é reabsorvida antes de sair da cubeta (efeito de filtro interno secundário), levando a um aparente decréscimo da intensidade de fluorescência. A intensidade de fluorescência medida vai depender da densidade ótica do fluoróforo no comprimento de onda de excitação e emissão. Consequentemente a intensidade de fluorescência de um composto é proporcional à concentração apenas para uma gama restrita de densidades óticas. Será necessário, em alguns casos, aplicar fatores de correção (correção dos efeitos de filtro interno).

3.2.2. Fluorescência resolvida no tempo

O conhecimento da dinâmica dos estados excitados é da maior importância na compreensão dos processos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos, podendo fornecer informações sobre reações moleculares, formação de dímeros, excímeros, transferência de energia, distâncias moleculares, difusão rotacional e também revelando detalhes sobre o microambiente do fluoróforo. Duas técnicas resolvidas no tempo, fluorimetria por pulso e fluorimetria por modulação e fase, são comumente usadas para descobrir os tempos de vida; ou de uma forma mais geral, os parâmetros característicos da resposta por pulso δ de uma amostra fluorescente (a resposta de um pulso de luz infinitamente curto expresso como uma função δ de Dirac).

Fluorimetria por pulso usa um pulso de luz de excitação curto e apresenta a resposta de pulso δ da amostra após convolução do instrumento. Fluorimetria por modulação e fase usa luz modulada a frequências variáveis e apresenta a resposta harmônica da amostra, que é a transformada de Fourier da resposta de pulso δ . A

primeira técnica trabalha no domínio de tempo, e a segunda no domínio de frequência. Fluorimetria por pulso e fluorimetria por modulação e fase são teoricamente equivalentes, mas os princípios dos instrumentos são diferentes (Figura 3.7). Somente iremos tratar de fluorimetria por pulso, pois a utilizamos neste trabalho.

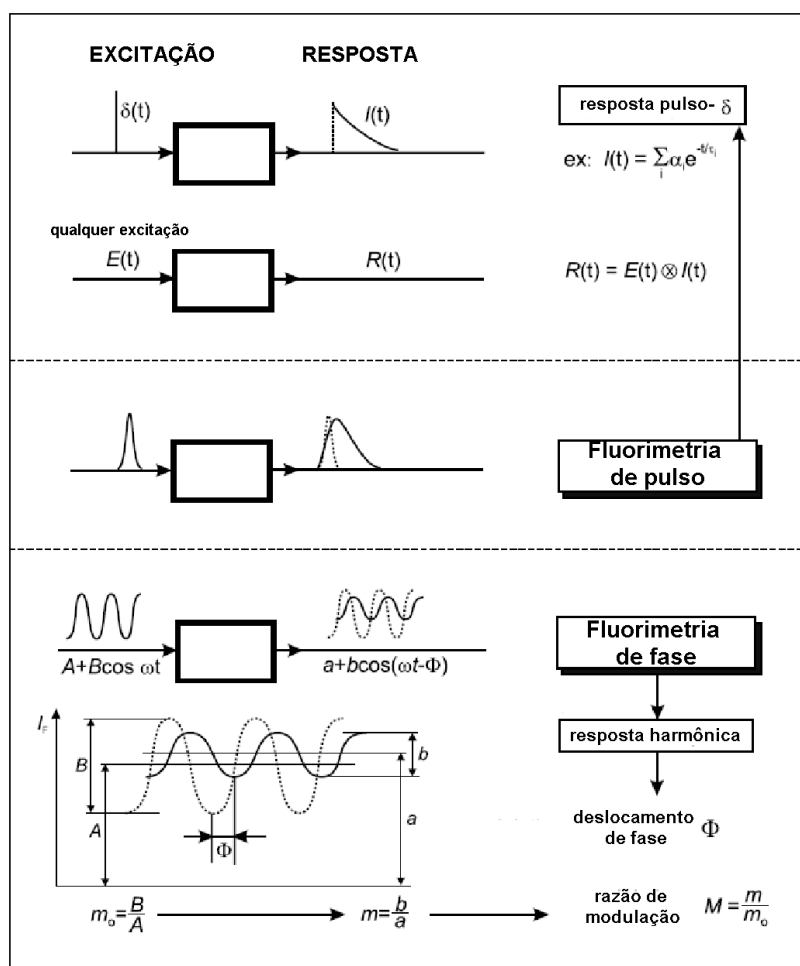


Figura 3.7. Princípios de fluorimetria resolvida no tempo (modificado de Valeur, 2005).

Fluorimetria por pulso

A amostra é excitada por um pulso de luz curto e a resposta da fluorescência é apresentada como uma função do tempo. Se a duração do pulso é longa em relação às constantes de tempo do decaimento da fluorescência, a resposta da fluorescência será dada por um produto de convolução, dado por:

$$R(t) = E(t) \otimes I(t) = \int_{-\infty}^t E(t') I(t - t') dt'$$

A intensidade da fluorescência aumenta, passa por um máximo e torna-se idêntica a verdadeira resposta de pulso δ , $i(t)$, tão rápido que a intensidade do pulso de luz é desprezada. Neste caso, a análise dos dados para a determinação dos parâmetros característicos da resposta de pulso δ requer a deconvolução da resposta de fluorescência.

Suponhamos que uma amostra contendo um fluoróforo é excitada com um pulso de luz infinitamente curto resultando em uma população inicial N_0 de fluoróforos no primeiro estado excitado singleto. A população no estado excitado decai a uma taxa $k_r + k_{nr}$ de acordo a equação

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr}) \cdot N(t) \quad 3.1$$

sendo $N(t)$ o número de moléculas excitadas no tempo t , k_r a taxa radiativa (fluorescência ou fosforescência), e k_{nr} a taxa de decaimento não radiativa. A emissão é um evento aleatório, e cada fluoróforo tem a mesma probabilidade de emitir em um dado período de tempo. Integrando a equação 3.1, obtemos um decaimento exponencial da população excitada, da seguinte forma

$$N = N_0 \cdot \exp(-t / \tau) \quad 3.2$$

Como a intensidade radiativa (I) é proporcional a $N(t)$ podemos expressa-la como

$$I = \alpha \cdot \exp(-t / \tau) \quad 3.3$$

sendo $\tau = (k_r + k_{nr})^{-1}$ o tempo de vida e α a intensidade no tempo zero.

O tempo de vida de fluorescência é geralmente igualado ao tempo requerido para a intensidade decair 63.21% (1/e) de seu valor inicial. Comumente, o tempo de vida é determinado a partir do coeficiente angular do gráfico $\log I(t)$ versus t (Figura 3.8).

Para um decaimento multi-exponencial com n componentes, a resposta de pulso δ é:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \exp(-t / \tau_i) \quad 3.4$$

Observe que a intensidade fracionária da componente i , isto é, a contribuição fracionária da componente i para a intensidade estacionária, é

$$f_i = \frac{\int_0^{\infty} I_i(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} I(t) \cdot dt} = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i} \quad 3.5$$

Com $\sum_{i=1}^n f_i = 1$.

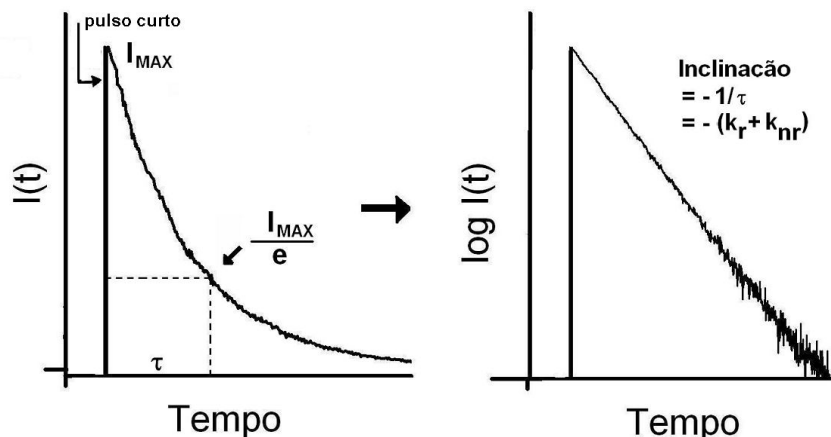


Figura 3.8. Descrição esquemática de uma curva de decaimento de fluorescência utilizando o método por pulso (modificado de Lakowicz, 2006).

Quando o decaimento da fluorescência de um fluoróforo é multi-exponencial, o caminho natural de definição de um tempo médio de decaimento (ou tempo de vida) é:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot I(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} I(t) \cdot dt} \quad 3.6$$

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i} = \sum_{i=1}^n f_i \cdot \tau_i \quad 3.7$$

Nesta definição, cada tempo de decaimento é ponderado pela intensidade fracionária correspondente. Esta média é chamada de tempo de decaimento com média nas intensidades (ou tempo de vida).

Outra possibilidade é usar as amplitudes (fatores pré-exponenciais) como pesos:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} = \sum_{i=1}^n a_i \cdot \tau_i \quad 3.8$$

Onde a_i representa as amplitudes fracionárias

$$a_i = \frac{\alpha_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} \quad 3.9$$

Com $\sum_{i=1}^n a_i = 1$. Esta média é chamada tempo de decaimento com média nas amplitudes (ou tempo de vida).

A definição usada depende do fenômeno em estudo. Por exemplo, o tempo de vida com média nas intensidades deve ser usado para o cálculo de uma constante de supressão média colisional; enquanto que em experimentos de transferência de energia ressonante, o tempo de decaimento com média nas amplitudes ou tempo de vida deve ser usado para o cálculo da eficiência da transferência de energia.

Fluorímetro de contagem de fóton único

A fluorimetria de pulso é a técnica mais popular para a determinação de tempos de vida (ou parâmetros de decaimento). Muitos instrumentos são baseados no método de contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC – time-correlated single-photon counting), ou simplesmente contagem de fótons. Neste trabalho foi utilizado um instrumento desse tipo. O princípio básico se fundamenta no fato de que a probabilidade de detecção do primeiro fóton no tempo t depois de um pulso de excitação é proporcional à intensidade de fluorescência naquele tempo. Após a contagem e gravação dos primeiros fótons detectados depois de um grande número de pulsos de excitação, a curva de decaimento da intensidade de fluorescência é reconstruída.

A Figura 3.9 mostra um instrumento convencional de contagem de fóton único.

A fonte de excitação pode ser uma lâmpada de flash ou um laser. Um pulso elétrico associado com o pulso ótico é gerado e dirigido – através de um discriminador – para a entrada do sinal de início do conversor de tempo em amplitude (TAC – time-to-amplitude converter). Nesse tempo, a amostra é

excitada pelo pulso ótico e emite fluorescência. O sistema ótico é ajustado de modo que o fotomultiplicador não detecte mais que um fóton por cada pulso de excitação. O correspondente pulso elétrico é dirigido – através de um discriminador – para a entrada do sinal de parada do TAC. Este último gera um pulso de saída cuja amplitude é diretamente proporcional ao intervalo de tempo entre os pulsos de início e parada. O intervalo de tempo é convertido em um valor digital por meio de um conversor analógico-digital.

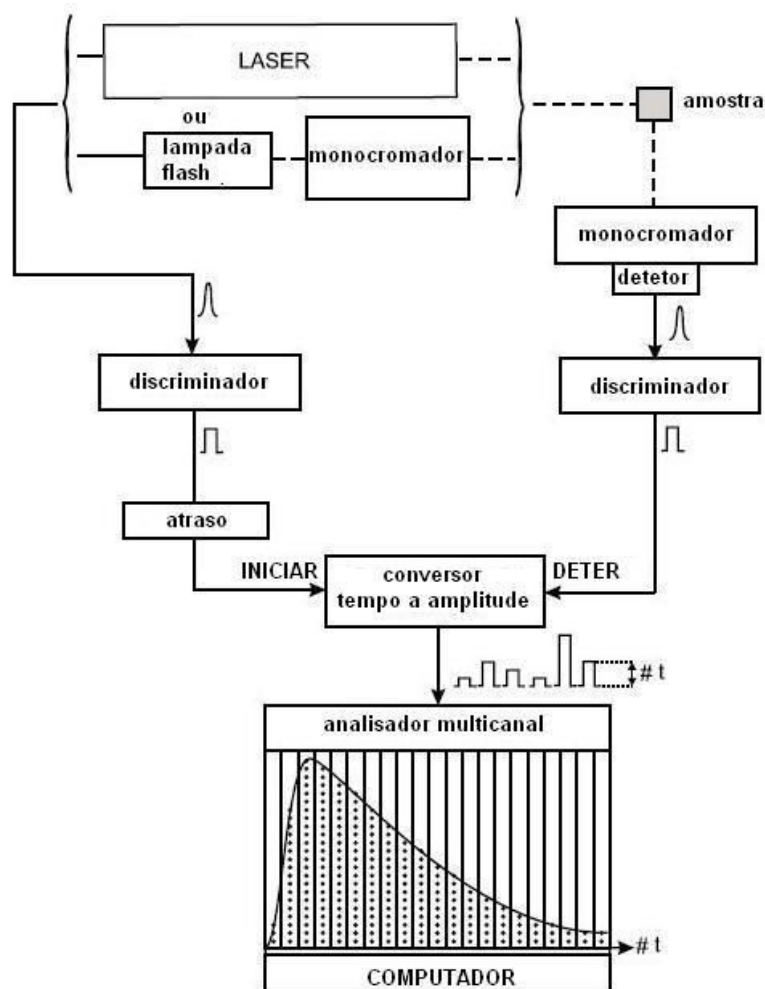


Figura 3.9. Diagrama esquemático de um fluorímetro de contagem de fóton único (modificado de Valeur, 2005).

O analisador multicanal aumenta de uma unidade o conteúdo da memória do canal correspondente ao valor digital do pulso detetado. Depois de um grande número de eventos de excitação e detecção, é montado um histograma das alturas dos pulsos detetados que representa a curva de decaimento da fluorescência. Obviamente, quanto maior o número de eventos, mais precisa será a curva de

decaimento da fluorescência. A precisão depende da complexidade da resposta de pulso δ do sistema, por exemplo, uma alta precisão é necessária para recobrir uma distribuição de tempos de decaimento. As fontes luminosas disponíveis fornecem pulsos de diferentes intervalos de duração. Como consequência, o decaimento de fluorescência observado deve ser corrigido pela largura do pulso da lâmpada. Este procedimento é denominado deconvolução espectral. Quando a deconvolução é requerida, o perfil temporal do pulso de excitação da lâmpada é medido pela substituição da amostra por outra, nas mesmas condições, contendo uma solução espalhadora (Ludox, sílica coloidal, ou glicogênio). Esta dificuldade causada pela largura do pulso pode ser minimizada pelo uso de lasers com pulsos de curta duração (picosegundos).

Análise das medidas

Considerável esforço tem sido feito para resolver as dificuldades de deconvolução e ajuste das curvas de decaimento, que frequentemente são ajustadas por uma soma de exponenciais. O método dos mínimos quadráticos é o mais largamente utilizado. Uma vez obtidos os melhores parâmetros de ajuste, a qualidade da função de decaimento utilizada deve ser avaliada usando critérios estatísticos e gráficos.

No método dos mínimos quadráticos, o primeiro critério é a redução do Qui quadrado, χ^2 , cujo valor deve estar próximo a 1 para um bom ajuste. Valores aceitáveis estão no intervalo de 0.8 a 1.2. Valores baixos indicam que o conjunto de dados é pequeno demais para um ajuste significativo e valores altos são causados por expressivos desvios do modelo teórico (por exemplo, número insuficiente de termos exponenciais). Erros sistemáticos (surgindo, por exemplo, da interferência de radiofrequências com a detecção) podem também explicar valores altos.

Testes gráficos são úteis em adição aos valores de χ^2 . O mais importante destes é o gráfico dos resíduos ponderados. Se o ajuste for bom, os resíduos ponderados estarão distribuídos aleatoriamente em torno de zero.