

TAYLAINE APARECIDA PERUCCI

CARACTERIZAÇÃO SISTEMÁTICA DO PADRÃO ESPECTROSCÓPICO
CUMARINA 6

Ouro Preto - Minas Gerais
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

TAYLAINE APARECIDA PERUCCI

CARACTERIZAÇÃO SISTEMÁTICA DO PADRÃO ESPECTROSCÓPICO
CUMARINA 6

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Física da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Física.

Orientadora: Prof^a. Dra. Bruna Bueno Postacchini
Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Cazati

Ouro Preto - Minas Gerais
2023



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE BACHARELADO EM FÍSICA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Taylaine Aparecida Perucci

“Caracterização Sistemática Padrão do Espectroscópico Cumarina 6”

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Física da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Física.

Aprovada em 23 de março de 2023.

Membros da banca

Doutora - Bruna Bueno Postacchini - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutora - Ive Silvestre de Almeida - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutor - Rodrigo de Souza Corrêa - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Bruna Bueno Postacchini, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 23/03/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Bueno Postacchini, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 09/02/2024, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0494962** e o código CRC **E0FD7B05**.

RESUMO

A Cumarina 6 tem sido utilizada como padrão espectroscópico pois apresenta alta eficiência quântica de formação de estados singlete. As condições externas/meio influenciam no valor absoluto da eficiência e em outros parâmetros fotofísicos, mas a maioria dos artigos publicados que utilizam os parâmetros do Cumarina 6 como padrão espectroscópico, omitem informações quanto ao solvente e a concentração. Neste trabalho foi feita a caracterização sistemática da Cumarina 6 em diferentes solventes e diferentes concentrações calculando a eficiência quântica de fluorescência pelo método comparativo e também a partir dos tempos de vida do estado excitado. A forma dos espectros de absorção óptica e de fluorescência da Cumarina 6 não apresentou alteração de forma na faixa de concentração trabalhada, no entanto ocorreu perda de eficiência quântica de fluorescência. A dependência do deslocamento de Stokes da Cumarina 6 em função da polaridade dos solventes foi analisada de acordo com a equação de Lippert Mataga. A dependência do tempo de vida de permanência das moléculas no estado excitado e a eficiência quântica de fluorescência permitiram o cálculo das taxas de decaimento radiativo e não radiativo. O conhecimento dos parâmetros fotofísicos dos padrões de referência utilizados é de extrema importância para o cálculo das propriedades fotofísicas de compostos inéditos. Além disso, promover o controle dos processos fotofísicos de qualquer cromóforo favorece projetar aplicações tecnológicas para o cromóforo orgânico. Os cromóforos como a Cumarina 6 possuem aplicação como sondas fluorescente para investigação de polaridade do meio, para eficiência de reações químicas, rastreamento de nano drogas, fabricação de camadas ativas de células solares e muitos outros processos fotônicos

Palavras-chave: Fotofísica, Cumarina 6, espectroscopia ótica, eficiência quântica de fluorescência, equação de Lippert-Mataga.

ABSTRACT

Coumarin 6 has been used as a spectroscopic standard because it exhibits high quantum efficiency of single-state formation. The external/medium conditions influence the absolute value of the efficiency and other photophysical parameters, but most of the published papers using the parameters of coumarin 6 as a spectroscopic standard omit information regarding the solvent and concentration. In this work, the systematic characterization of coumarin 6 in different solvents and different concentrations was carried out by calculating the fluorescence quantum efficiency by the comparative method and also from the excited state lifetimes. The shape of the optical absorption and fluorescence spectra of Coumarin 6 showed no shape change in the worked concentration range, however a loss of fluorescence quantum efficiency occurred. The dependence of the Stokes shift of Coumarin 6 as a function of solvent polarity was analyzed according to the Lippert Mataga equation. The dependence of the lifetime residence time of the molecules in the excited state and the fluorescence quantum efficiency allowed the calculation of the radiative and non-radiative decay rates. Knowledge of the photophysical parameters of the reference standards used is of utmost importance for the calculation of the photophysical properties of novel compounds. Moreover, promoting the control of the photophysical processes of any chromophore favors designing technological applications for the organic chromophore. Chromophores such as Coumarin 6 have application as fluorescent probes for investigation of medium polarity, for efficiency of chemical reactions, nano drug screening, fabrication of active layers of solar cells and many other photonic processes.

Keywords: Photophysics, Coumarin 6, optical spectroscopy, fluorescence quantum efficiency, Lippert-Mataga equation.

Lista de Figuras

Figura 1: Diagrama de Jablonski.....	13
Figura 2: Subníveis de energia no estado singleto e tripleto com representação da orientação dos spins.....	13
Figura 3: Curva de Intensidade vs Comprimento de onda para os espectros de absorção e Emissão de um fluoróforo.....	15
Figura 4: Diagrama de Jablonski mostrando a mudança dos níveis energéticos do estado excitado devido a relaxação dos solventes mais e menos polares.....	18
Figura 5: Fórmula estrutural da (a) Cumarina; e da (b) Cumarina 6.....	21
Figura 6: Esquema básico de funcionamento de um espectrofotômetro.	22
Figura 7: Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro simples.	23
Figura 8: Esquema de funcionamento do espectrômetro utilizado[18]	24
Figura 9: Espectrômetro do LAMOE e Laboratório de Fotofísica Molecular do Departamento de Física da UFOP.....	25
Figura 10: Espectros de absorção (esquerda) e fluorescência (direita) da Cumarina 6 em solução etanol para diferentes concentrações..	26
Figura 11: Ajuste linear da absorbância da Cumarina 6/Etanol em função da concentração...27	
Figura 12: Comportamento constante da Eficiência Quântica de Fluorescência em função da concentração para diferentes solventes.....	28
Figura 13: Absorbância da Cumarina 6 em etanol para diferentes concentrações, e a direta a eficiência quântica de fluorescência constante independente de concentração e do comprimento de onda de excitação.	29
Figura 14: Diagrama de Lippert-Mataga para a C6 em diferentes solventes	30
Figura 15: Curva de decaimento de fluorescência para os diferentes solventes.	32

Lista de Tabelas

Tabela 1: Coeficiente de absorção molar ϵ e Eficiência quântica Φ da Cumarina 6 em função do solvente.	27
Tabela 2: Orientação de polarização do solvente (Δf) e deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$) para diferentes solventes calculado a partir dos máximos de absorção λ_{max} (AO) e de fluorescência λ_{max} (PL) da Cumarina 6.....	31
Tabela 3: Eficiência quântica, tempo de vida do estado excitado e taxas de decaimentos radiativos e não radioativos da Cumarina 6 em diferentes solventes.	32

Lista de abreviaturas e símbolos

λ	- Comprimento de onda
c	- Velocidade de propagação da luz no vácuo
f	- Frequência de propagação da onda
E	- Energia de radiação
h	- Constante de planck
ε	- Coeficiente de absorção molar
S_0	- Estado singleto fundamental
$S_1, S_2, \dots$	- Estado singleto excitado
$T_1, T_2, \dots$	- Estado tripleto fundamental
A, AO	- Absorbância
I_0	- Intensidade do feixe de luz da fonte
I	- Intensidade da luz transmitida
l	- Comprimento do caminho óptico percorrido na cubeta
c	- Concentração molar da solução
ϕ_r	- Rendimento quântico de fluorescência do composto de referência
ϕ	- Rendimento quântico de fluorescência
n	- Índice de refração do solvente
PL	- área sob o espectro de fluorescência
μ_E	- Momento dipolo
μ_G	- Momento dipolo do estado fundamental
VR	- Relaxamento vibracional
IC, k_{IC}	- Conversão Interna
k_{ISC}	- Conversão Intersistema
$\Delta\bar{\nu}$	- Deslocamento de Stokes
Δf	- Polaridade do solvente
κ	- Constante dielétrica
THF	- Tetrahydrofurano
DMF	- Dimetilformamida
$UV-Vis$	- Ultravioleta-Visível
$TCSPC$	- Contagem de fótons singular com correlação temporal
SE	- Solução Estoque
k_{nr}^s	- Processos de desativação não radiativos
k_T	- Desativação radiativa do estado tripleto
k_{foster}	- Transferência de energia interna
k_r^s	- Taxa de desativação radiativa do estado singleto
τ_s	- Tempo de vida do estado excitado singleto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA - FOTOFÍSICA MOLECULAR	12
2.1 Tempo de vida do estado excitado e eficiência quântica de fluorescência	16
2.2 Dependência com o solvente.....	17
2.3 Relação entre o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) e o parâmetro de polaridade do solvente Δf	19
3. CUMARINA 6	20
4. OBJETIVOS	21
5. TÉCNICAS E MÉTODOS CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA	22
5.1 Espectroscopia de Absorção Óptica na Região UV-Vis.....	22
5.2 Fluorescência Estacionária.....	23
5.3 Fluorescência Resolvida no Tempo.....	23
6. MATERIAIS E METODOLOGIA	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Determinação dos coeficientes de absorção molar e eficiência quântica de fluorescência da Cumarina 6 em função da concentração e dos solventes.....	26
7.2 Influência do comprimento de onda de excitação na determinação da eficiência quântica de fluorescência.....	29
7.3 Estudo da interação do cromóforo com o solvente.....	30
7.4 Determinação dos tempo de vida e taxas de decaimentos radioativas e não radioativas em função da concentração e para diferentes solventes	31
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	33
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	34
10. APÊNDICES.....	36
10.1 Apêndice A.....	36
10.2 Apêndice B.....	39
10.3 Apêndice C.....	41
10.4 Apêndice D.....	43
10.5 Apêndice E	46

1. INTRODUÇÃO

A caracterização fotofísica de moléculas nos permite identificar diversas propriedades do material, tal como o espectro de absorção. A fluorescência nos permite identificar se a substância em questão é potencialmente aplicada em tecnologias, como por exemplo, na criação de dispositivos fotoelétricos. Uma das propriedades mais importantes nesse tipo de estudo é a eficiência quântica de fluorescência, usada para indicar se o material é um bom formador de estado singlete. O cálculo da eficiência quântica de fluorescência de um cromóforos com propriedades inéditas é realizado por método denominado método comparativo no qual se utiliza um padrão espectroscópico com eficiência quântica conhecida (reportada na literatura) sendo usual a Cumarina 6, que tem a eficiência quântica conhecida 0,78 quando excitado em 460 nm em Etanol [1]. Atualmente há inúmeras moléculas de referência (padrão espectroscópico) sendo estudadas e cada uma dessas moléculas apresentam propriedades diferentes entre si. Essa propriedade também depende do meio onde o material está dissolvido, dessa forma é de suma importância fazer a caracterização da mesma molécula em soluções com diferentes solventes e variadas concentrações.

Neste trabalho foram estudadas as propriedades fotofísicas do padrão espectroscópico orgânico Cumarina 6 amplamente utilizado como padrão espectroscópico para o cálculo de eficiência quântica de novos cromóforos com propriedades ainda inéditas.

Os cromóforos/fluoróforos são compostos orgânicos utilizados para dar cor e/ou conferir promover brilho em substâncias, sendo comumente empregados em indústrias de cosméticos, celulose, têxteis, alimentos, mas atualmente também são empregados em terapia fotodinâmica para tratamento de câncer, na confecção de células solares como captadores de radiação e na construção de sensores (ou ainda bio sensores) de dimensões nanométricas e sondas fluorescentes. As aplicações citadas relacionam-se com o fato dessas moléculas possuírem cromóforos conjugados permitindo ocorrer transições eletrônicas em ampla faixa da região de radiações UV-VIS (associação com a cor dos materiais). A fotofísica molecular é a área da ciência que procura compreender todos os processos envolvidos desde a absorção de luz até a total desativação da molécula e para as aplicações citadas estão envolvidos os processos fotofísico monomoleculares e bimoleculares descritos por Jablonski [2]. No qual o estado excitado de moléculas isoladas pode ser desativado: i) por diferentes vias tal como a perda de energia por relaxação vibracional; ii) por emissão de luz, processo de luminescência, que ocorre em comprimento de onda ligeiramente mais longo que o comprimento de onda de

absorção; iii) por formação de estados tripleto - Cruzamento Inter Sistema (multiplicidade de spin diferente) que podem desativar por vibração ou emissão de fosforescência. Na presença de um conjunto de moléculas, sejam elas da mesma espécie ou de espécies diferentes, ocorrem novas vias de desativação: incluindo reação fotoquímica, formação de complexos de transferência de carga, transferência de energia radiativa e não-radiativa, na qual a molécula excitada transfere sua energia a outra molécula. O estado excitado será desativado por combinação dos mecanismos descritos, obedecendo a uma cinética associada aos tempos de vida de cada um desses processos. O tempo que a molécula permanece no estado excitado, tempo de vida de estado excitado, é proporcional ao inverso da soma de todas as taxas que competem na desativação, ou seja, processos não radiativos e radiativos. A emissão de fluorescência corresponde ao processo radiativo, enquanto os processos não radiativos compreendem entre outros a formação de estados tripletos, conversão interna e transferência de energia ressonante. Experimentalmente é possível determinar o tempo de vida do estado excitado singleto pela detecção de um fóton emitido com relação ao fóton incidente, usando-se a técnica de espectroscopia resolvida no tempo com arranjo de contagem de fótons.

Os processos fotofísicos podem apresentar dependência com o ambiente externo (pH, viscosidade, polaridade), também com presença de outras moléculas (agentes supressores de fluorescência) e em ambos os casos dependem de restrições espaciais e orientação dos dipolos elétricos envolvidos. Processos de desativação não radiativos (tal como a transferência de energia de Forster) podem ser empregados para conduzir a energia radiativa captada em uma região do sistema a outros sítios de interesse. Em filmes, a disposição espacial (orientação/estrutura) e condições de ancoramento das moléculas requerem que a teoria seja reformulada para um mecanismo de interação dos dipolos com grau de liberdade reduzido [3]. O controle da eficiência de luminescência e dos processos de transferência de energia e/ou carga são de fundamental importância no desenvolvimento das áreas de Eletrônica Orgânica e Biotecnologia. Se por um lado a migração da excitação eletrônica desativa uma molécula excitada fazendo-a perder eficiência de luminescência, por outro a migração pode conduzir a energia aos sítios de conversão e armazenamento nas células fotovoltaicas da mesma forma que operam as moléculas de clorofila no processo de fotossíntese. O controle molecular das estruturas e a arquitetura conferem aos materiais propriedades diferenciadas. Essa geração de dispositivos combina diferentes materiais que apresentam interações específicas [4], sendo o desafio atual o controle das propriedades óticas, eletrônicas e estruturais desses materiais em nível molecular.

Uma das propriedades mais importantes nesse tipo de estudo é a eficiência quântica de fluorescência, usada para indicar se o material é um bom formador de estado singlete. O cálculo da eficiência quântica de fluorescência de um cromóforos com propriedades inéditas é realizado por método denominado método comparativo no qual se utiliza um padrão espectroscópico com eficiência quântica conhecida (reportada na literatura) sendo usual a Cumarina 6. No entanto como mencionado anteriormente esses parâmetros dependem da influência do meio (química e fisicamente) a qual nem sempre é mencionada nos artigos de referência.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA - FOTOFÍSICA MOLECULAR

As ondas eletromagnéticas são formadas por campos elétricos e magnéticos que oscilam perpendicularmente entre si quando cargas elétricas são aceleradas. É possível classificá-las de acordo com seu comprimento e frequência [5]; a relação entre essas duas grandezas é dada por:

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad \text{Eq.(1)}$$

Onde:

λ é o comprimento de onda [m]

c é a velocidade de propagação da luz no vácuo [m/s]

f é a frequência da onda [s^{-1}]

O comprimento de onda também é inversamente proporcional a energia de radiação, dada de pela equação:

$$E = \frac{c.h}{\lambda} \quad \text{Eq.(2)}$$

Onde:

h é a constante de Planck [$m^2.kg/s$]

O espectro eletromagnético é composto por ondas que variam de 10^{-14} m (raios gama) a 10^6 m (ondas de rádio). É possível que tais ondas interajam com a matéria de acordo com o comprimento de onda e as características químicas estruturais da molécula. É sabido que cada átomo possui valores discretos de energia a partir de um valor de energia mínimo, chamado de estado fundamental, S_0 . Quando incide-se um feixe de radiação em uma molécula é possível que ela absorva e emita fótons fazendo com que os elétrons da nossa amostra passem de um

estado de energia para outro. Essas transições eletrônicas são representadas no diagrama de Jablonski como mostra a Figura 1.

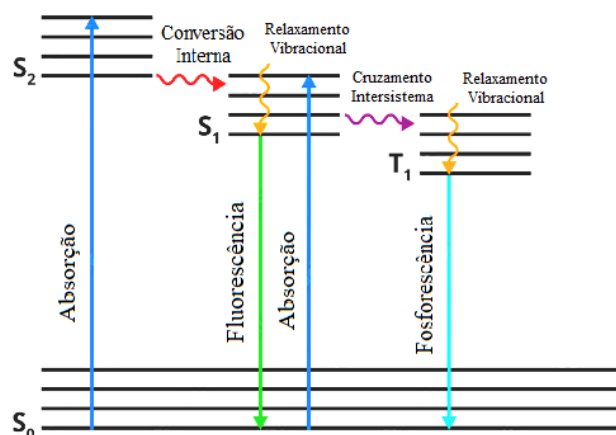


Figura 1: Diagrama de Jablonski

Os níveis de energia S_1 , S_2 são chamados de níveis de energia do estado singlete, já os T_1 , T_2 , T_3 , são chamados de níveis de energia em estado tripleto. No estado singlete fundamental, S_0 há dois spins emparelhados no orbital (sentidos opostos), no estado singlete excitado a um spin em cada um dos subníveis também em sentidos oposto; Já no estado tripleto excitado os spins estão em sub níveis distintos mas com o mesmo sentido, como representado na Figura 2.

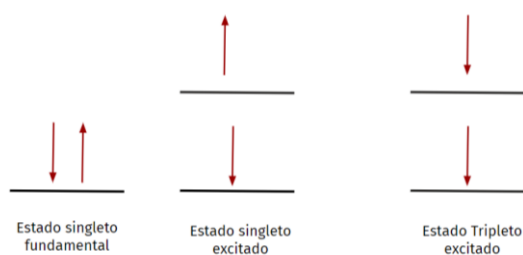


Figura 2: Subníveis de energia no estado singlete e tripleto com representação da orientação dos spins.

Havendo incidência de radiação na molécula é possível que ocorra 5 "fenômenos", representados na Figura 1, de interação entre luz e matéria são eles: Absorção, fluorescência, fosforescência, conversão interna, relaxamento vibracional e cruzamento intersistema.

Na conversão interna a molécula irá de um estado singleto excitado para outro estado singleto excitado ou de um estado tripleto excitado para outro nível de energia no estado tripleto excitado, nunca de um nível de energia no estado singleto para um em estado tripleto ou de um estado tripleto para singleto. Na fosforescência a molécula irá de um nível maior de energia em estado tripleto excitado para o estado fundamental. No relaxamento vibracional a molécula se manterá no mesmo nível eletrônico de energia perdendo a energia vibracional. No cruzamento intersistema a molécula irá de um estado singleto excitado para o estado tripleto excitado e vice-versa.

A absorção e a fluorescência são as duas formas de interação entre luz e matéria, que serão tratadas neste trabalho. No processo de absorção a radiação eletromagnética que é absorvida tem energia suficiente para que um elétron passe para um nível mais energético que o atual. A quantidade de energia que é absorvida é denominada absorbância. É possível calcular a absorbância de um material utilizando a lei de Beer-Lambert, que dá a seguinte relação entre absorbância e concentração:

$$A = -\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Eq.(3)}$$

Onde:

I_0 é a intensidade do feixe de luz da fonte;

I é a intensidade da luz transmitida;

l é o comprimento do caminho óptico percorrido na cubeta;

c é a concentração molar da solução;

ε é o coeficiente de absorção molar, característico do material e depende do comprimento de onda;

No processo de fluorescência ocorre a emissão de luz de um nível de energia do estado excitado singleto para nível de energia no estado singleto de menor, e o elétron excitado não muda a orientação de spin, continuando assim desemparelhado. A fluorescência sempre ocorre de um estado de maior energia para um estado de menor energia, com emissão de fótons, e ocorre com maior frequência entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental. Ela ocorre em um processo de tempo de 10^{-9} s a 10^{-7} s. Os comprimentos de onda no espectro de fluorescência são sempre maiores do que os comprimento de onda do espectro de absorção e em muitos casos os dois espectro se sobrepõem em determinados comprimentos de onda, sendo a curva de emissão sempre a direita da curva de absorção, como mostra a Figura 3.

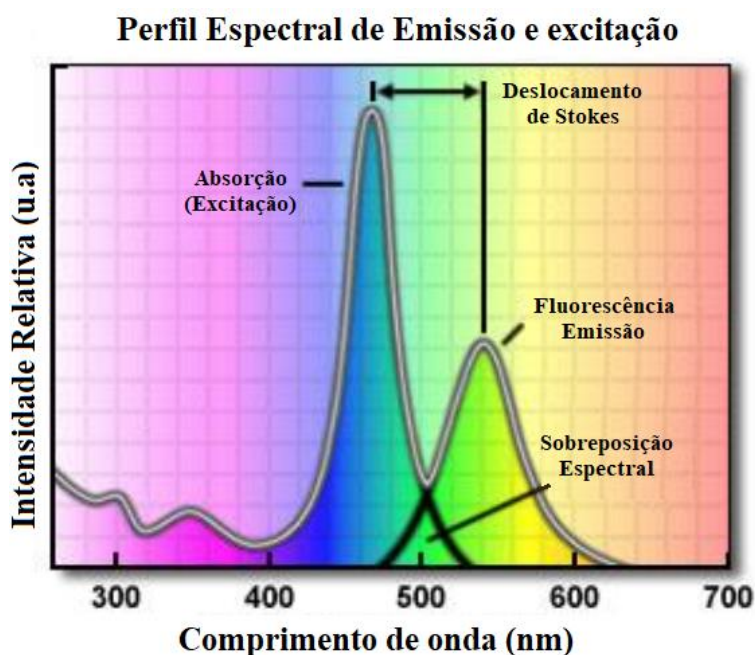


Figura 3: Curva de Intensidade vs Comprimento de onda para os espectros de absorção e Emissão de um fluoróforo.

Na Figura 3 também se vê uma região entre os máximos de fluorescência e absorbância chamada de deslocamento de Stokes, tal deslocamento é dado pela subtração do máximo de fluorescência pelo máximo da absorção de uma mesma transição eletrônica [6]. O comprimento de onda no valor máximo de absorção é o comprimento no qual deve-se excitar a amostra a fim de se obter o espectro de fluorescência de forma a se calcular o deslocamento. O deslocamento do gráfico ocorre em razão da perda de energia pela molécula, que ocorre durante o processo de emissão; sabendo que o comprimento de onda é inversamente proporcional a energia de radiação como mostrado na equação 2, assim tem-se que o espectro de emissão irá se deslocar para comprimentos de onda maiores em relação ao espectro de absorção. O deslocamento Stokes varia com a estrutura molecular do composto e com a polaridade do solvente quando em solução. [7]

É possível identificar se uma molécula é fluorescente ou não por meio de tal deslocamento, além de obter informações sobre os estados excitados da molécula.

Relacionando a absorbância e a fluorescência do material é possível obter rendimento quântico relativo ou eficiência quântica relativa de luminescência (Φ_F) que é definida como a razão entre o número de fótons emitidos e o número absorvido por um determinado material sob excitação óptica, assim:

$$\Phi_F = \left(\frac{n.de \text{ fótons emitidos}}{n.de \text{ fótons absorvidos}} \right) \quad \text{Eq. (4)}$$

A eficiência quântica de fluorescência relativa do fluoróforo pode ser calculada utilizando a seguinte equação:

$$\Phi_F = \Phi_r \left(\frac{PL_A}{1-10^{-AO_A}} \right) \left(\frac{1-10^{-AO_r}}{PL_r} \right) \left(\frac{n_A^2}{n_r^2} \right) \quad \text{Eq. (5)}$$

Na equação temos:

Φ_r = Eficiência quântica de fluorescência do composto de referência;

AO_A = absorbância da amostra;

AO_r = absorbância da referência;

n_A = índice de refração do solvente da amostra;

n_r = índice de refração do solvente da referência;

PL_A = área sob o espectro de fluorescência da amostra;

PL_r = área sob o espectro de fluorescência da referência;

A eficiência quântica de um material é determinada a partir dos valores absolutos, porém em razão das limitações experimentais utilizamos neste trabalho valores de referência encontrados na literatura.

2.1 Tempo de vida do estado excitado e eficiência quântica de fluorescência

A molécula em um estado fotofísico (tal como S_0 , S_1^* , T_1^*) pode ser desativada por diferentes vias radiativas e não radiativas. A probabilidade de desativação por um processo dependerá da taxa dessa desativação deste processo dividido pela soma de todas as taxas que podem ocorrer. A fluorescência ocorre como uma desativação radiativa do estado singleto (k_r^S), a fosforescência é a desativação radiativa do estado tripleto (k_T). Entre os processos não radiativos (k_{nr}) estão às conversões inter sistema (k_{isc}), conversão interna (k_{ic}), transferência de energias intermoleculares como, por exemplo, transferência de Förster ($k_{forster}$).

Assim a eficiência quântica da fluorescência (Φ_F) pode ser representada pela razão entre a taxa de desativação radiativa do estado singleto (k_r^S) e a soma desse processo com os demais processos de desativação não radiativos (k_{nr}) conforme a seguinte equação:

$$\phi_F = \frac{k_r^S}{(k_r^S + k_{nr}^S)} = k_r^S \tau_s \quad \text{Eq.(6)}$$

Sendo o tempo de vida do estado excitado singlete (τ_s) descrito por:

$$\tau_s = \frac{1}{(k_r^S + k_{nr}^S)} \quad \text{Eq.(7)}$$

Determinando experimentalmente o tempo de vida do estado excitado singlete (τ_s) com a técnica de contagem de fótons singular com correlação temporal, TCSC (que será apresentada em detalhes adiante), e calculando a eficiência quântica usando o método comparativo, é possível estimamos a taxa de decaimento radiativo e não radiativo usando:

$$k_r^S = \frac{\phi_F}{\tau_s} \text{ e } k_{nr}^S = \frac{1-\phi_F}{\tau_s} \quad \text{Eq.(8)(9)}$$

2.2 Dependência com o solvente

A polaridade, assim como outras características químicas e físicas do meio, afeta as propriedades fotofísicas de um fluoróforo. No entanto é extremamente complicado definir quais efeitos acontecem, pois normalmente há combinação de mais de um deles, tais como [8]:

- Polaridade e viscosidade do solvente;
- Taxa de relaxação do solvente;
- Mudança conformacional dos fluoróforos;
- Transferência de carga interna;
- Transferência de prótons e reações do estado excitado;
- Interação fluoróforo-fluoróforo (como formação de excímeros, exciplexos);
- Mudanças nas taxas de decaimento radiativos e não radiativos;
- Rigidez local do meio;

Normalmente a radiação emitida pelos fluoróforos ocorre em comprimentos de onda maiores do que a radiação absorvida devido a uma série de processos dinâmicos durante o estado excitado. O solvente pode participar desses processos dinâmicos contribuindo não somente com o tempo que o cromóforo se acomoda à configuração estável do estado excitado, mas também com o valor energético desse estado. Havendo o processo de “relaxação do solvente” são esperadas mudanças na forma espectral e/ou da posição energética dos máximos de emissão e absorção. Conforme mostrado na Figura 4, os cromóforos nos estados excitados exibem maior momento de dipolo (μ_E) em relação ao momento de dipolo do estado fundamental (μ_G). A reorientação dos dipolos do solvente ocorre em virtude dessa mudança no

momento de dipolo do fluoróforo excitado. Assim, nos solventes mais polares haverá uma maior perda de energia em virtude do processo de “relaxação dos dipolos do solvente” (perdas não radiativas) e consequentemente a energia de emissão será deslocada para a região do vermelho (*red shift*). O processo de “relaxação do solvente” também afeta o tempo de permanência da molécula no estado excitado, pois muda a taxa de decaimento não radiativo.

Inicialmente consideramos a molécula no estado fundamental rodeada por moléculas do solvente em um equilíbrio dinâmico (solvatação). De acordo com o princípio de Franck-Condon os núcleos de um cromóforo permanecem imóveis durante a transição eletrônica de absorção, pois trata-se de um processo muito rápido da ordem de femtossegundos (10^{-15} s). Em contraste, mesmo nesse intervalo temporal tão curto, os elétrons no cromóforo podem se distribuir gerando um dipolo de estado excitado. Os processos de relaxação vibracional (VR) e de conversão interna (IC) que ocorrem imediatamente após a absorção são independentes do efeito de “relaxação do solvente” porque essas transições ocorrem em um período de tempo mais curto (10^{-12} s). Afetando assim o decaimento radiativo por fluorescência (10^{-9} s). O tempo de permanência da molécula no estado excitado é da ordem de 10^{-8} s permitindo que ocorra a “relaxação do solvente” que é um processo não radiativo da ordem de 10^{-10} . O cromóforo no estado excitado fará então uma transição eletrônica emitindo radiação por fluorescência (10^{-9} s). Finalmente, o solvente relaxa ao redor do cromóforo no estado fundamental, resultando na mínima energia para a interação cromóforo/solvente [8].

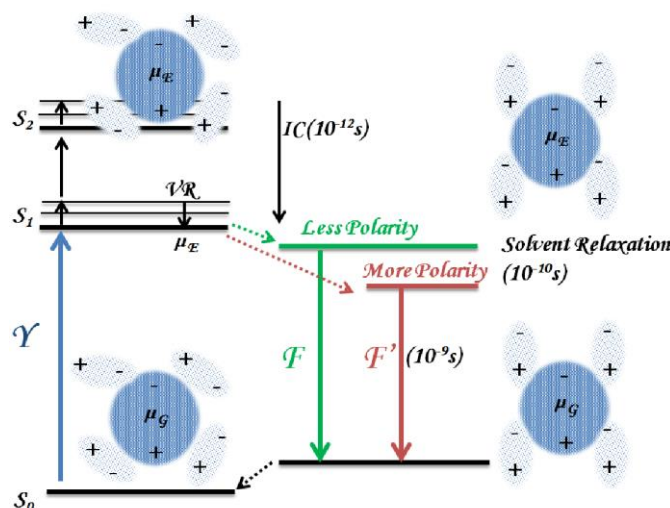


Figura 4: Diagrama de Jablonski mostrando a mudança dos níveis energéticos do estado excitado devido a relaxação dos solventes mais e menos polares.

2.3 Relação entre o deslocamento de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) e o parâmetro de polaridade do solvente Δf

A polaridade do solvente afeta o deslocamento de Stokes (também chamado de deslocamento espectral) do fluoróforo, e apesar de muitos outros mecanismos também produzirem o mesmo efeito na equação de Lippert-Mataga representa uma boa aproximação para o efeito de polaridade. Nesse modelo o fluoróforo ocupa uma cavidade esférica (notando-se que se trata de um modelo ruim para moléculas alongadas) de um meio dielétrico contínuo (homogêneo) e o efeito do solvente depende da magnitude do momento de dipolo relacionada com a distribuição de elétrons e também da orientação dos dipolos ambos do solvente. A polarizabilidade do fluoróforo é desprezada e a direção do vetor momento de dipolo intrínseco do cromóforo nos estados fundamental (μ_G) e excitado (μ_E) aponta na mesma direção. Outras interações solvente/fluoróforo tal como pontes de hidrogênio comuns em solventes apróticos ou formação de estados de transferência de carga são desprezadas nesse modelo assim os desvios do diagrama de Lippert-Mataga pode indicar a ocorrência desses efeitos.

A equação de Lippert-Mataga apresenta uma relação linear entre o deslocamento Stokes ($\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F$) do fluoróforo expresso em cm^{-1} e o parâmetro de polaridade do solvente (Δf) considerando também a mudança no momento dipolar entre o estado fundamental e excitado.

Equação de Lippert:

$$\Delta\bar{\nu} (\text{cm}^{-1}) = \nu_A - \nu_F = \frac{2\Delta f}{hca^3} (\mu_E - \mu_G)^2 + \text{cte} \quad \text{Eq.(10)}$$

Na equação de Lippert- Mataga a representa o raio da cavidade que o fluoróforo ocupa no solvente (raio de Onsager), μ_E e μ_G são os momentos de dipolo do fluoróforo (expresso em Debye) no estado excitado e fundamental respectivamente, $h=6,6256 \times 10^{-27}$ ergs (constante de planck), $c=3 \times 10^8$ m/s (velocidade da luz no vácuo).

A orientação de polarização do solvente (Δf) é definida conforme equação a seguir e depende do índice de refração (n) e da constante dielétrica (κ) ambos do solvente:

$$\Delta f = \frac{\kappa-1}{2\kappa+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \quad \text{Eq.(11)}$$

ou quando o fluoróforo é polar:

$$\Delta f = \frac{\kappa-1}{\kappa+2} - \frac{n^2-1}{n^2+2} \quad \text{Eq.(12)}$$

Assim devem ser medidos os comprimentos de onda recíprocos $\bar{\nu}_A$ e $\bar{\nu}_F$ nos máximos dos espectros de absorção e emissão respectivamente, para diferentes solventes (diferente valores de κ , n e Δf). O diagrama de Lippert-Mataga ($\Delta\bar{\nu}$ versus Δf) será obtido plotando o deslocamento Stokes $\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F$ no eixo das ordenadas e a orientação de polarização do solvente (Δf) no eixo das abscissas. Calcula-se a partir da inclinação do ajuste linear a diferença nos momentos de dipolo causada pela excitação eletrônica, conforme equação:

$$\text{inclinação} = \frac{2}{hca^3} (\mu_E - \mu_G)^2 \quad \text{Eq.(13)}$$

3. CUMARINA 6

A Cumarina 6 é um composto natural encontrado em inúmeras fontes vegetais como no morango, na erva-doce, na canela, na castanha-da-índia, no agrião e entre outros; o composto é derivado do ciclo secundário dessas plantas e seu nome é dado em razão árvore *Dipteryx odorata* popularmente chamada de Cumarú (do tupi Kumarú) encontrada no norte do Brasil, suas sementes possuem cerca de 1% a 3% de cumarina [9]. Esse bio-corante tem alta capacidade de fluorescência com emissão entre os comprimentos de onda de 410 e 470 nm [10]; em estado sólido e em solução. Suas características fotofísicas permitem que ela seja amplamente utilizada em fármacos, cosmetologia e biotecnologia.

A Cumarina e seus compostos eram utilizados como flavorizantes pela indústria alimentícia, porém hoje sabe-se que as Cumarinas são compostos tóxicos, no qual pode causar irritações e erupções na pele até mesmo a necrose. No Brasil seu uso como flavorizante é proibido e sua utilização é considerada adulteração do produto de acordo com o Decreto número 50.040, de 24 de janeiro de 1961, que dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras de Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos. [11][12].

As Cumarinas são classificadas como heterociclos e fazem parte do grupo de compostos benzopironas, onde todos possuem um anel benzênico unido a uma pirona (anel heterocíclico de seis membros sendo um átomo de oxigênio e cinco átomos de carbonos com hibridização sp^2), podendo ser divididas em diversos subgrupos, de acordo com sua estrutura química: Cumarinas simples, isocumarinas, furanocumarinas, piranocumarinas, biscumarinas, triscumarinas e cumarinolignanas.

Atualmente são conhecidos mais de 1300 compostos cumarinicos, sendo eles orgânicos e sintéticos, a fórmula mais simples é a $C_9H_6O_2$ [11] representada na Figura 5a.

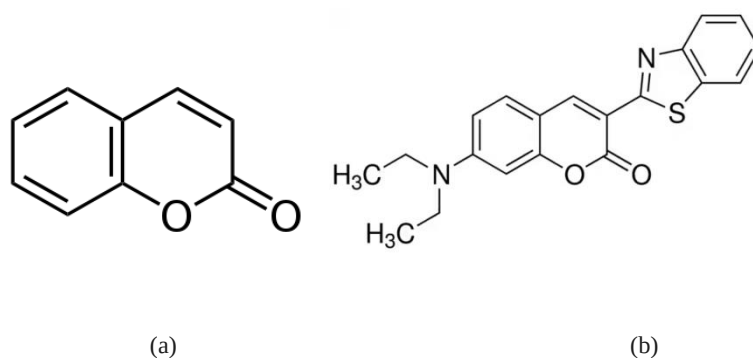


Figura 5: Fórmula estrutural da (a) Cumarina; e da (b) Cumarina 6.

Nesse trabalho será utilizado um composto orgânico conjugado derivado da Cumarina com um grupo benzotiazolil, denominado de Cumarina 6 ou 6-Cumarina (nome IUPAC 3-(2-Benzotiazolyl)-7-(diethylamino)cumarina). A Cumarina 6 tem fórmula molecular $C_{20}H_{18}N_2O_2S$ e está representada na Figura 5b. A Cumarina faz parte do subgrupo furabocumarinas e possui estrutura tricíclica com os seguintes parâmetros de rede $a = 8,962 \text{ \AA}$, $b = 11,136 \text{ \AA}$, $c = 8,922 \text{ \AA}$, $\alpha = 95,14^\circ$, $\beta = 104,50^\circ$ e $\gamma = 86,74^\circ$ [12]. A Cumarina 6 é conhecida e comumente utilizada por possuir uma alta eficiência quântica e sua principal aplicação hoje é no desenvolvimento de dispositivos ópticos.

4. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi o estudo sistemático das propriedades fotofísicas Padrão Cumarina 6 em diferentes solventes e variando a concentração. Sendo feita a determinação dos espectros de absorção e fluorescência, o cálculo do coeficiente de absorção molar, do deslocamento de Stokes, da Eficiência Quântica, dos tempos de vida do estado excitado e das taxas de decaimento radiativo e não radiativo. Sendo possível comparar com resultados da literatura para um número vasto de condições Cumarina 6/solvente.

O projeto teve como objetivos específicos:

- Estudo das propriedades fotofísicas em diferentes solventes: Etanol, metanol, acetonitrila, acetona, clorofórmio, diclorometano, THF, DMF.
- Estudo de absorbância coletando os espectros de absorção óptica, determinando o comprimento de onda máximo, calculando o coeficiente de absorção molar ϵ .
- Estudo da fluorescência coletando espectro com excitação no comprimento de onda máximo.

- Combinação dos resultados de absorção e fluorescência calculando a eficiência quântica ϕ em diferentes solventes e em diferentes concentrações.
- Construção do diagrama de Lippert-Mataga a partir do deslocamento de Stokes $\Delta\bar{\nu}$.
- Obtenção das curvas de decaimento de fluorescência, cálculo dos tempos de vida.
- Cálculo das taxas de decaimento radiativo e não radiativo.

5. TÉCNICAS E MÉTODOS CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

5.1 Espectroscopia de Absorção Óptica na Região UV-Vis

Através da Espectroscopia de Absorção Óptica na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis), é possível caracterizar moléculas e íons em solução através de sua interação com a luz, com o comprimento de onda no intervalo de 100 nm a 750 nm. Tal técnica consiste em medir a quantidade de luz que é absorvida pela amostra e relacioná-la com a concentração da mesma. A caracterização de absorção óptica na região UV-Vis em moléculas orgânicas depende da presença de um grupo cromóforo [13].

A espectroscopia de absorção utiliza a absorbância e a transmitância deduzidas por Beer-Lambert para caracterizar o material com o uso de um instrumento que permita incidir um feixe de luz com comprimentos de onda na região UV-Vis e coletar as informações da amostra, como por exemplo, a concentração de determinada substância na amostra [14].

O instrumento utilizado para medir a absorção óptica é o espectrofotômetro, sendo os mais simples compostos por: uma fonte de radiação monocromática, um detector, um amplificador, um receptor de sinal e uma base para a solução. Esquematizado na Figura 6.

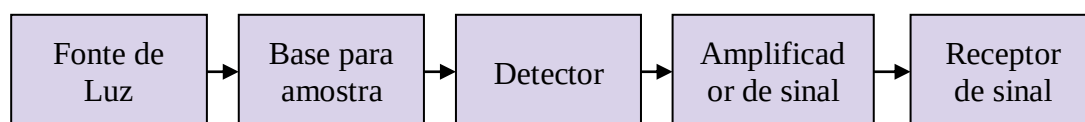


Figura 6: Esquema básico de funcionamento de um espectrofotômetro.

Neste trabalho utilizou-se o espectrofotômetro UV-Vis da marca GENESYS modelo 10S Séries localizado no Laboratório de Química Estrutural e Inorgânica - LaQuESI, professor responsável: Dr. Rodrigo de Souza Correa; do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP.

5.2 Fluorescência Estacionária

A fluorescência em estado estacionário é medida a partir da emissão de fótons pela amostra, sob irradiação com radiação eletromagnética constante. [15] A fluorescência ocorre em um período de tempo entre 10^{-10} e 10^{-7} s, então assim que for incidido um feixe de luz a solução irá fluorescer fazendo com que os elétrons voltem para o nível energético do estado estacionário. Através dessa técnica é possível obter os espectros de emissão e excitação da amostra.

O instrumento utilizado para obter os espectros mencionados é o espectrofluorímetro, também chamado de fluorímetro, e seu princípio de funcionamento consiste na excitação da amostra por meio de um feixe de luz que passa por um monocromador de excitação e por um filtro. Em um ângulo de 90° com a amostra e o feixe de luz há um segundo filtro e um monocromador de emissão que manda um sinal para o detector e o transmite para uma interface [16], esquematizado na Figura 7.

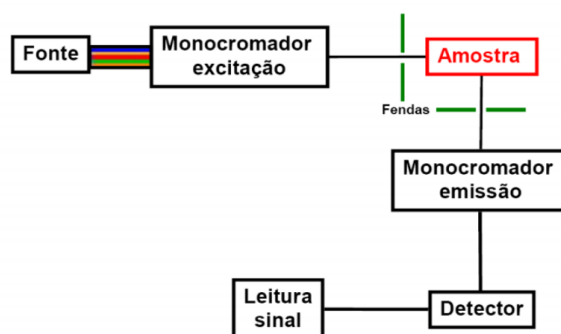


Figura 7: Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro simples.

Em nosso estudo utilizou-se o espectrofluorímetro de marca Shimadzu modelo RF-5301PC pertencente ao Laboratório de Materiais Optoeletrônicos (LAMOe) & Fotofísica Molecular do Departamento de Física da UFOP.

5.3 Fluorescência Resolvida no Tempo

A técnica de caracterização através da fluorescência resolvida no tempo consiste em medir a intensidade de fluorescência em função do tempo e medir o tempo que a molécula

permanece no estado excitado. Nessa técnica a amostra é exposta a pulsos de radiações eletromagnéticas, diferente da fluorescência estacionária que é exposta a um feixe de luz contínuo. O tempo de decaimento de fluorescência ocorre em uma escala de 10^{-9} segundos, o que dificulta a medida do espectro uma vez que é necessário captar o sinal de dados proveniente da amostra e armazená-la na mesma escala de tempo do decaimento de fluorescência, a maioria dos equipamentos não conseguem captar e armazenar esse dado de forma muito eficaz. No entanto é possível fazer a análise do decaimento de tempo da fluorescência através da contagem de fótons singular com correlação temporal, do inglês *time correlated single photon counting*, TCSPC, tal técnica consiste em medir e detectar um fóton em um instante de tempo após incidir um pulso de luz no comprimento de onda de excitação da nossa amostra, depois de realizar a medida para uma sequência, com grande número, de pulsos de excitação é possível plotar a curva de decaimento de intensidade de fluorescência. [17]

O instrumento utilizado para fazer a análise do tempo de vida é composto por: um módulo de frequência, um módulo TCSPC, um polarizador de emissão, um polarizador de excitação, um monocromador, um detector, espelhos e lentes. E funciona da seguinte forma: Primeiro acoplamos um módulo TCSPC e um módulo de frequência do laser que será utilizado, o pulso de luz que sai do laser passa por uma lente e é direcionado para um polarizador de excitação e um focalizador que incide o feixe na amostra, ao atravessar a amostra o feixe passa por duas lentes coletoras e um polarizador de emissão até chegar ao monocromador e em seguida à unidade detectora que envia o sinal para o módulo TCSPC, que é transmitido para um computador e interpretado por um software de análise específico, geralmente do mesmo fabricante do espectrômetro. Esquematizado na Figura 8.

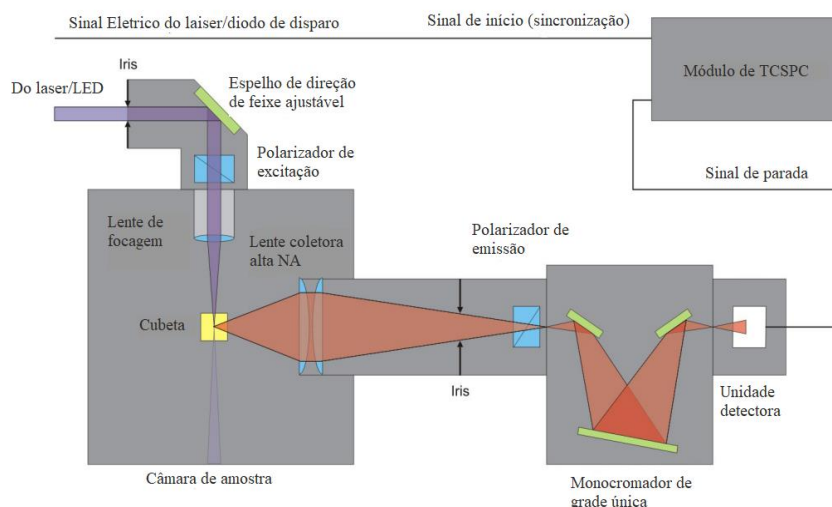


Figura 8: Esquema de funcionamento do espectrômetro utilizado .

Utilizamos um espectrômetro da marca Picoquant modelo Fluotime 200 (Figura 9), pertencente ao LAMOE e ao Laboratório de Fotofísica Molecular do Departamento de Física da UFOP, para realizar as medidas necessárias. Utilizamos como fonte de luz um laser de diodo pulsado de 401 nm e frequência de pulso 40MHz. E o software usado para interpretar os dados e fazer a análise foi o Fluofit®. Depois de realizarmos as medidas de cada um das soluções foi medida a curva de decaimento de fluorescência do laser utilizado, para isso utilizamos uma solução espalhadora e a curva obtida foi subtraída das curvas de decaimento obtidas para cada uma das amostras. [21]



Figura 9: Espectrômetro do LAMOE e Laboratório de Fotofísica Molecular do Departamento de Física da UFOP.

6. MATERIAIS E METODOLOGIA

As atividades foram desenvolvidas de acordo com as etapas citadas abaixo:

1ª ETAPA – Determinação de concentração ideal da solução de trabalho.

Para a medida dos espectros de fluorescência e absorção, as soluções devem ter concentração cuja densidade ótica não sature o limite dos equipamentos. Após testes preliminares foi produzida uma solução matriz de concentração $2,283 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em etanol.

Essa solução foi usada para obter as soluções estoques, SE, com concentração $1,8364 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ para oito solventes são eles: acetona, acetonitrila, álcool etílico, álcool metílico, clorofórmio, diclorometano, DMF, THF. A partir de cada uma das SE obteve-se seis amostras de Cumarina 6 em solução, para cada um dos solventes, com a concentração variando de $0,37 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ a $2,20 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

2ª ETAPA – Estudo da influência da concentração do cromóforo em solução

Foram obtidos os espectros de absorção e os espectros de fluorescência e fluorescência resolvida no tempo da Cumarina 6 nas oitos séries de solventes. Foi realizado o cálculo da eficiência quântica de fluorescência pelo método comparativo utilizando os dados da Cumarina

6 em concentração de $1,10 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ como padrão de referência cuja eficiência quântica quando excitada em 460 nm é de 0,78.[22]

3ª ETAPA – Estudo da interação do cromóforo com o solvente.

Utilizando se os máximos de absorção e fluorescência foi calculado o deslocamento de Stokes $\Delta\bar{\nu}$ e construído o diagrama de Lippert-Mataga.

4ª ETAPA– Foram medidas as curvas de decaimento de fluorescência nas soluções e calculados os tempos de vida do estado excitado. Foi utilizada a técnica de fluorescência resolvida no tempo com contagem de fótons isolados. Também foram calculadas as taxas de desativação radiativas e não radiativas.

7. RESULTADOS

7.1 Determinação dos coeficientes de absorção molar e eficiência quântica de fluorescência da Cumarina 6 em função da concentração e dos solventes.

Conforme descrito 2ª ETAPA da metodologia foram obtidos os espectros de absorção e os espectros de fluorescência da Cumarina 6 em acetona, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, DMF, Etanol, metanol e THF. A Figura 10 apresenta na esquerda os espectros de absorbância e à direita os espectros de fluorescência da Cumarina 6 em Etanol em função da concentração. Os comprimentos de onda máximos de absorção e de fluorescência foram destacados nos gráficos. Em detalhes (*inset* gráfico), tanto para absorção como para a fluorescência foram destacados o comportamento linear das intensidades no máximo da banda. Caso haja o interesse em analisar o perfil dos espectros e o comportamento linear nos oito solventes consulte o Apêndice A.

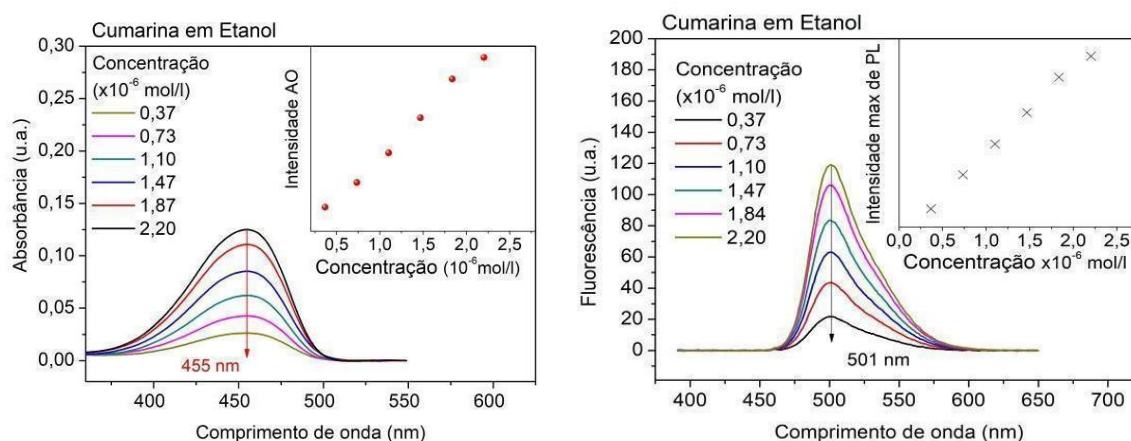


Figura 10: Espectros de absorção (esquerda) e fluorescência (direita) da Cumarina 6 em solução etanol para diferentes concentrações. Em detalhe, a intensidade em função da concentração. Resultados para os demais solventes podem ser consultados no Apêndice A.

O valor do coeficiente de absorção $\varepsilon(\lambda)$ no comprimento máximo de absorção foi calculado fazendo-se o ajuste linear sobre o gráfico de absorbância máxima em função da concentração. O ajuste $y=A.x$ corresponde a lei de Beer-Lamber (Eq.3) sendo o coeficiente angular $A=\varepsilon(\lambda).l$ para uma cubeta de $l = 1\text{cm}$. A Figura 11 representa o ajuste para os máximos de absorbância da Cumarina 6 em etanol e os demais ajustes estão representados no Apêndice B. O valor do coeficiente de absorção $\varepsilon(\lambda)$ para cada solvente está apresentado na Tabela 1.

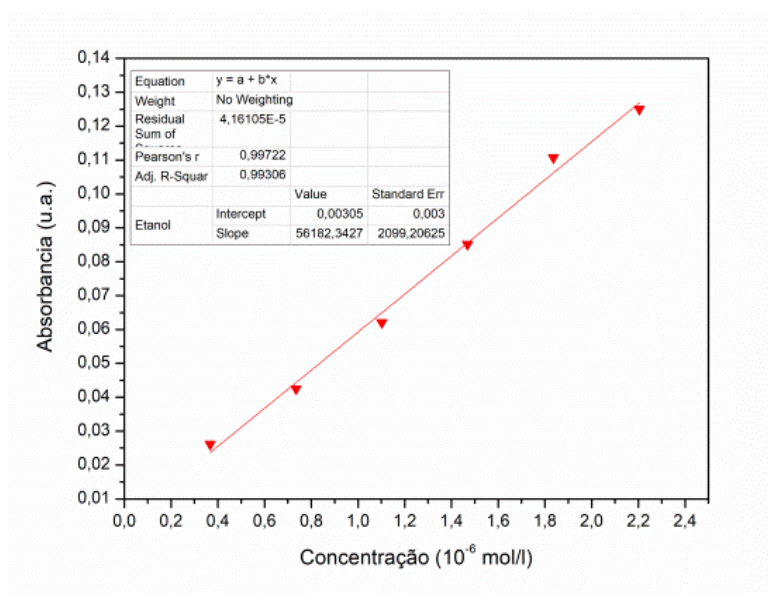


Figura 11: Ajuste linear da absorbância da Cumarina 6/Etanol em função da concentração.

Tabela 1: Coeficiente de absorção molar ε e Eficiência quântica Φ da Cumarina 6 em função do solvente.

Solvente	$\varepsilon (10^3) \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	Eficiência ($\Phi \pm \Delta\Phi$)
Acetona	88 ± 3	$0,78 \pm 0,01$
Acetonitrila	$53,0 \pm 0,9$	$0,76 \pm 0,01$
Clorofórmio	$44,2 \pm 0,2$	$0,91 \pm 0,01$
Diclorometano	91 ± 6	$0,91 \pm 0,01$
DMF	$95,3 \pm 1,1$	$0,79 \pm 0,01$
Etanol	56 ± 2	$0,78 \pm 0,01$
Metanol	79 ± 3	$0,66 \pm 0,03$
THF	$38,1 \pm 1,6$	$0,85 \pm 0,02$

A Figura 12 representa a eficiência quântica de fluorescência obtida pelo método comparativo conforme Equação 5 utilizando-se os valores de absorbância, integral do espectro

de fluorescência e índices de refração da amostra e da referência. Os valores para todas as concentrações e solventes são apresentados no Apêndice C. Os dados da Cumarina 6 em concentração de $1,10 \times 10^{-6}$ mol/l foram utilizados como “referência” no cálculo sendo a eficiência quântica de 0,78, quando excitado em 460 nm em Etanol. Os resultados mostram que o valor de Eficiência Quântica não varia para os valores de concentração utilizados indicando que não há formação de agregados de Cumarina 6 nessa faixa de concentração. Na Tabela 1 também são apresentados os valores da eficiência quântica de fluorescência média para todos os solventes. Os resultados de eficiência calculados para a amostra de mais baixa concentração foram descartados, pois nessa condição os espectros ficaram com resolução muito baixa prejudicando significativamente os cálculos.

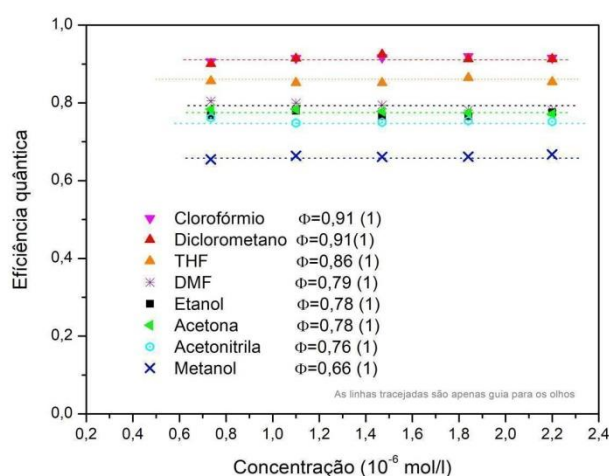


Figura 12: Comportamento constante da Eficiência Quântica de Fluorescência em função da concentração para diferentes solventes

Ressalta-se que os espectros de fluorescência foram obtidos com aberturas de 1,5 mm de largura para o feixe de excitação da amostra e 3 mm para a coleta do feixe de emissão em baixa (LOW) intensidade para todos os solventes e todas as concentrações. Esses parâmetros controlam a intensidade coletada que será plotada no eixo y do espectro. Como a intenção desse estudo é produzir um guia de parâmetros para uso da Cumarina 6 como padrão espectroscópico em mesmas condições de novos materiais que serão analisado, foram medidos e catalogados (Apêndice D) os espectros de fluorescência também para outros *slit* nas intensidades LOW e HIGH podendo-se prever as condições de medida que serão sujeitos tanto a amostra como o padrão para que não ocorra a saturação dos detectores de emissão.

7.2 Influência do comprimento de onda de excitação na determinação da eficiência quântica de fluorescência

Foi feito o estudo da eficiência quântica da Cumarina 6 em etanol para diferentes concentrações variando se os comprimentos de onda de excitação de 401 nm, 425 nm, 460 nm e 485 nm a fim de verificar se a energia de excitação influencia a eficiência. O gráfico de Figura 13 mostra as curvas de absorbância das seis diferentes concentrações e o comportamento linear da absorbância nos diferentes comprimentos de onda de absorção. Os espectros de fluorescência das amostras nas seis concentrações distintas foram obtidos para cada comprimento de onda de excitação (espectros não mostrados na monografia). Os valores da área sob o espectro de excitação, a absorbância para cada amostra e a eficiência quântica de fluorescência são apresentados no Apêndice E. O gráfico mostrado na Figura 13 a direita mostra que a eficiência quântica, além de não depender da concentração na faixa estudada, também não depende do comprimento de onda de excitação.

Assim podemos dizer que a eficiência quântica de fluorescência média da cumarina 6 independente do comprimento de onda de excitação é de 0,78(5) com tolerância de 5% para esse método.

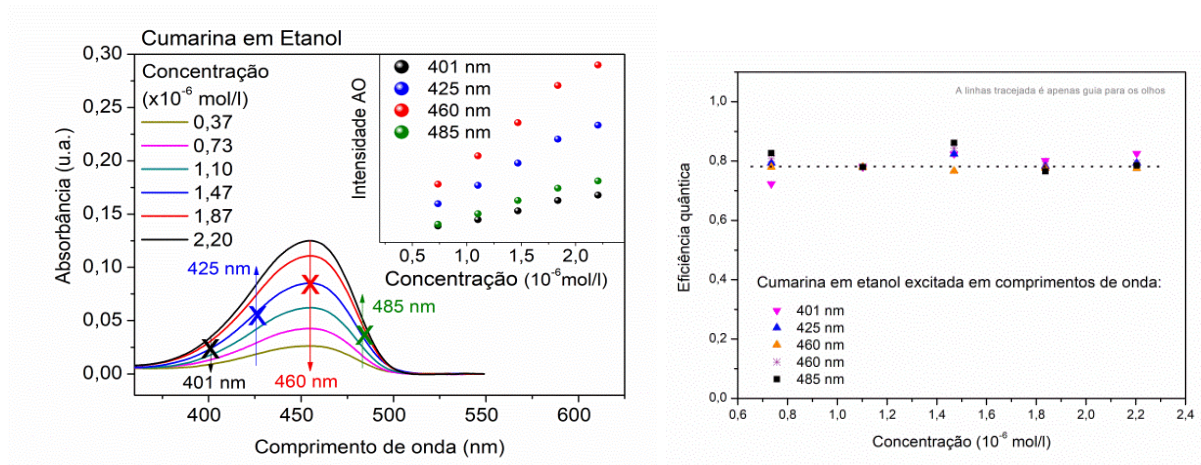


Figura 13: Absorbância da Cumarina 6 em etanol para diferentes concentrações, em detalhe a linearidade da absorbância para essa faixa de concentração e diferentes comprimentos de onda de absorção e a direta a eficiência quântica de fluorescência constante independente de concentração e do comprimento de onda de excitação.

7.3 Estudo da interação do cromóforo com o solvente.

Conforme descrito na 3ª ETAPA para o estudo da interação do cromóforo com o solvente. Utilizou-se os máximos de absorção e fluorescência para o cálculo do deslocamento de Stokes $\Delta\bar{\nu}$ (

Tabela 2) e foi construído o diagrama de Lippert-Mataga (Figura 14) em função da orientação de polarização do solvente (Δf) que apresentou comportamento linear. Indicando que nas concentrações utilizadas a influência polarizabilidade solventes é o fator mais importante.

Os solventes próticos (metanol e etanol) também seguem a linearidade da equação, portanto não há evidência de formação de “ligações” de hidrogênio. Nesses solventes é possível que ocorra uma inversão dos níveis de energia, em razão dos átomos de nitrogênio e as moléculas do solvente, por meio de ligações de hidrogênio. O que resultaria no deslocamento do espectro de AO, para o vermelho ou para o azul, gerando mudanças na simetria, da curva, interferindo diretamente na intensidade de absorção e na eficiência quântica de fluorescência. Sendo, a eficiência quântica de fluorescência diretamente ligada ao espectro emissão que pode ter a energia do estado excitado alterada por ligações de hidrogênio e conseqüentemente um deslocamento na curva de emissão.

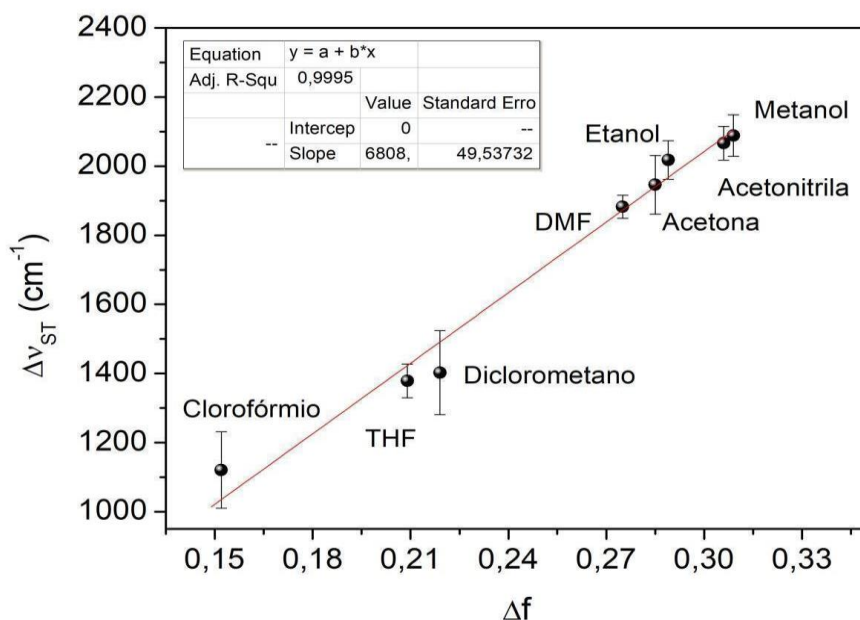


Figura 14: Diagrama de Lippert-Mataga para a Cumarina 6 em diferentes solventes

Tabela 2: Orientação de polarização do solvente (Δf) e deslocamento de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) para diferentes solventes calculado a partir dos máximos de absorção $\lambda_{\max}$ (AO) e de fluorescência $\lambda_{\max}$ (PL) da Cumarina 6.

Solvente	Δf	$\lambda_{\max}$ (AO) (nm)	$\lambda_{\max}$ (PL) (nm)	$\Delta\bar{\nu}$ cm ⁻¹ (tolerância)
clorofórmio	0,152	464	490	1120 (10%)
THF	0,209	456	491	1378 (3%)
diclorometano	0,219	459	494	1402 (7%)
DMF	0,275	462	506	1882 (2%)
Acetona	0,285	454	498	1946 (4%)
Etanol	0,289	455	501	2018 (3%)
acetonitrila	0,306	454	501	2066 (2%)
Metanol	0,309	456	504	2089 (3%)

7.4 Determinação dos tempos de vida e taxas de decaimentos radioativas e não radioativas em função da concentração e para diferentes solventes

A partir das medidas das curvas de decaimento de fluorescência (Figura 15) coletadas por espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo (4ª ETAPA) foi realizado o cálculo dos tempos de vida do estado excitado para às oitos séries de solventes apresentados na

Tabela 3. A excitação foi realizada com laser pulsado de 401 nm (apenas para a solução em etanol, além da medida utilizando um laser pulsado de 401 nm, foi realizada uma segunda medida utilizando um laser pulsão de 485 nm) e coleta da emissão no comprimento de onda de máximo de fluorescência para cada solvente. A

Tabela 3 também apresenta os cálculos das taxas de desativação radiativas e não radiativas utilizando se nas Equações 8 e 9.

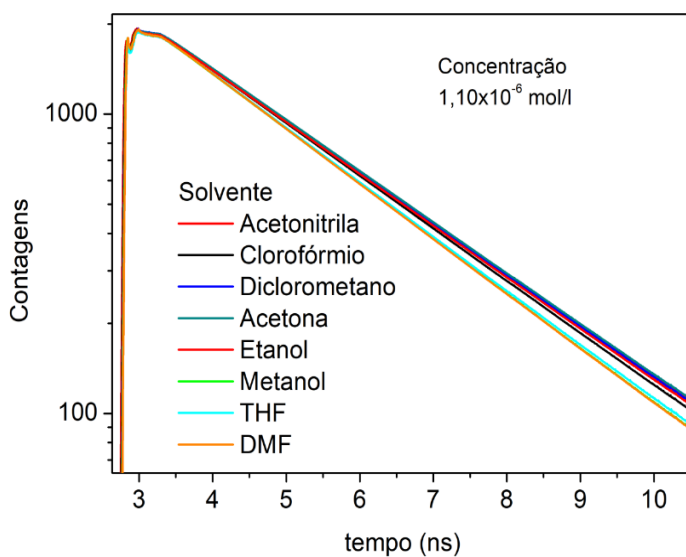


Figura 15: Curva de decaimento de fluorescência para os diferentes solventes. A excitação foi feita com laser pulsado de 401 nm e a fluorescência foi coletada no comprimento de onda máximo de fluorescência de cada solvente

Tabela 3: Eficiência quântica, tempo de vida do estado excitado e taxas de decaimentos radiativos e não radiativos da Cumarina 6 em diferentes solventes.

solvente	eficiência ($\Phi \pm \Delta\Phi$)	tempo de vida ($\tau \pm \Delta\tau$) (s)	($K_{nr} \pm \Delta K_{nr}$) (10^8 s^{-1})	($K_r \pm \Delta K_r$) (10^8 s^{-1})
Acetonitrila	$0,76 \pm 0,01$	$2,517 \pm 0,005$	$0,954 \pm 0,013$	$3,02 \pm 0,04$
Acetona	$0,78 \pm 0,01$	$2,517 \pm 0,002$	$0,874 \pm 0,011$	$3,10 \pm 0,04$
Clorofórmio	$0,91 \pm 0,01$	$2,447 \pm 0,009$	$0,368 \pm 0,004$	$3,72 \pm 0,04$
Diclorometano	$0,91 \pm 0,01$	$2,491 \pm 0,015$	$0,361 \pm 0,005$	$3,65 \pm 0,5$
Etanol 401	$0,78 \pm 0,01$	$2,516 \pm 0,004$	$0,874 \pm 0,013$	$3,10 \pm 0,04$
Etanol 485	$0,78 \pm 0,01$	$2,518 \pm 0,010$	$0,874 \pm 0,012$	$3,10 \pm 0,04$
Metanol	$0,66 \pm 0,03$	$2,339 \pm 0,015$	$1,45 \pm 0,07$	$2,82 \pm 0,13$
DMF	$0,79 \pm 0,01$	$2,329 \pm 0,003$	$0,902 \pm 0,015$	$3,39 \pm 0,04$
THF	$0,85 \pm 0,02$	$2,368 \pm 0,004$	$0,633 \pm 0,015$	$3,59 \pm 0,08$

Observação: Os numeros acompanhando o Etanol 401 e Etanol 485, na coluna de solventes faz referencia ao comprimento de onda em que as soluções foram excitadas. As demais soluções foram excitadas em 401 nm.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse estudo foi mostrado que o uso da Cumarina 6 como padrão espectroscópico é adequado nas concentrações entre $0,735 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $2,20 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Concentrações mais baixas resultam em espectros muito pouco resolvidos aumentando a incerteza dos cálculos, portanto devem ser evitadas (motivo pelo qual os cálculos obtidos a partir da primeira concentração foram descartados). As concentrações maiores também devem ser evitadas de forma que os máximos de absorbância não ultrapassem o valor unitário ($AO < 1$), mesmo que as fendas de excitação e de coleta de fluorescência possam ser ajustadas. Concentrações mais altas podem favorecer formação de agregados que não foram testadas neste trabalho.

Usado o método comparativo foram calculadas as eficiências quânticas da Cumarina 6 em diferentes solventes e esse resultado é constante não dependendo da faixa de concentrações estudada.

Nas concentrações utilizadas, a influência polaridade solventes é o fator mais importante, pois o diagrama de Lippert-Mataga tem comportamento linear tanto para o grau de polaridade como para solventes próticos (sem evidência de formação de “ligações” de hidrogênio).

O tempo de vida de permanência da Cumarina 6 no estado excitado varia de 2,3 a 2,6 ns para os diferentes solventes. Mesmo com essa pequena variação no tempo de vida do estado excitado o cálculo das constantes não radioativas apresentou maiores taxas predominante no Metanol e Acetonitrila e o cálculo das constantes radioativas apresentou maiores taxas para clorofórmio e diclorometano.

Do ponto de vista do uso da Cumarina 6 como padrão espectroscópico todos os solventes são adequados e o catálogo de parâmetros de intensidade de fluorescência é fundamental para análises de novos materiais.

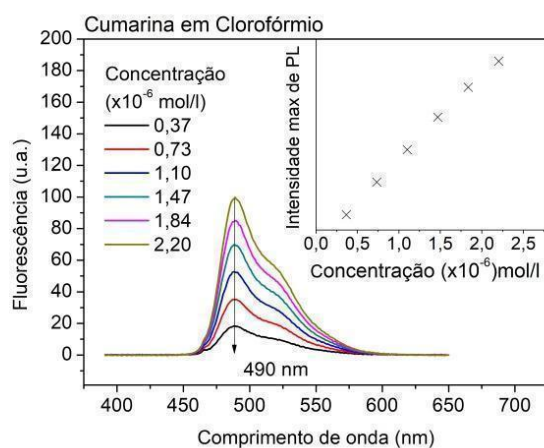
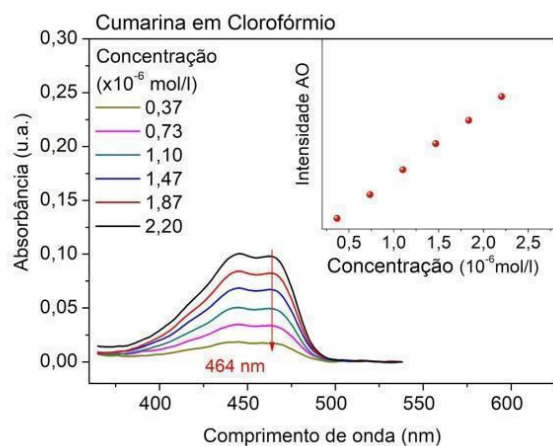
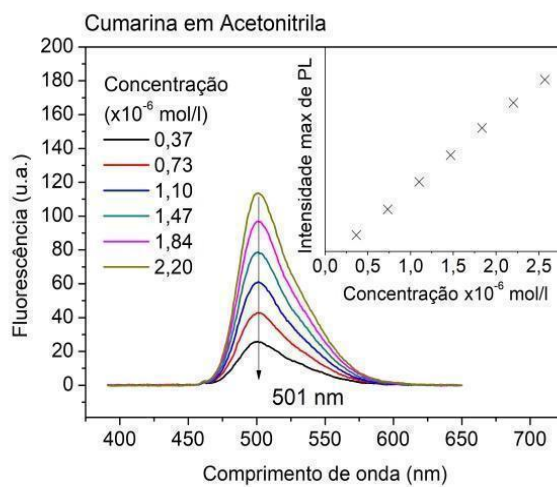
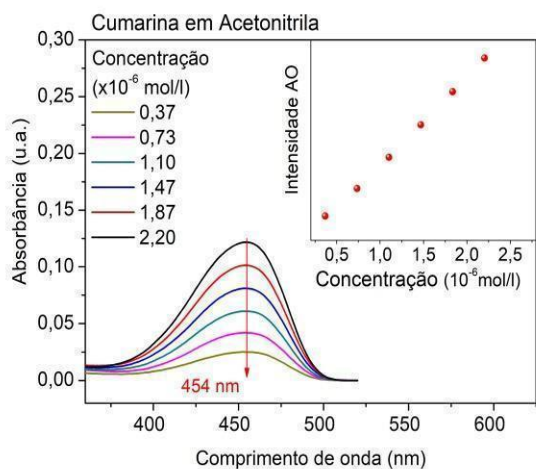
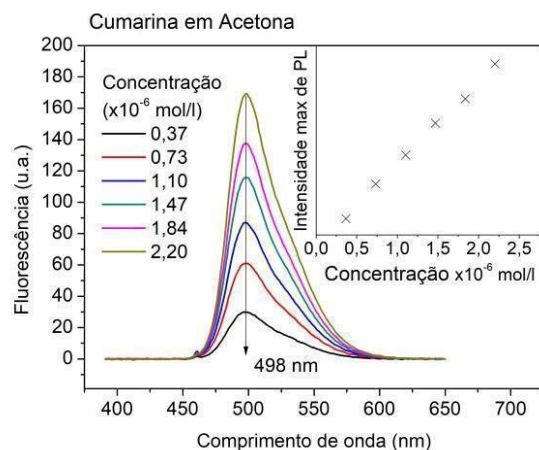
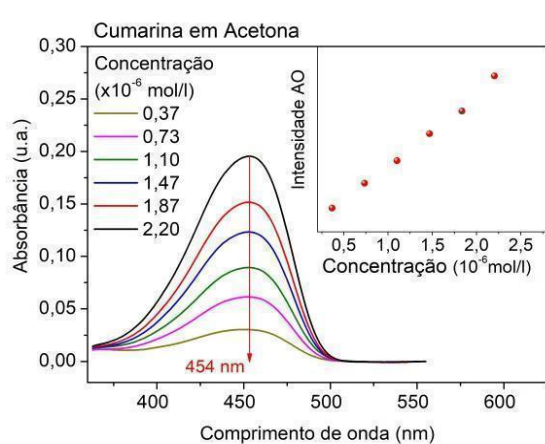
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

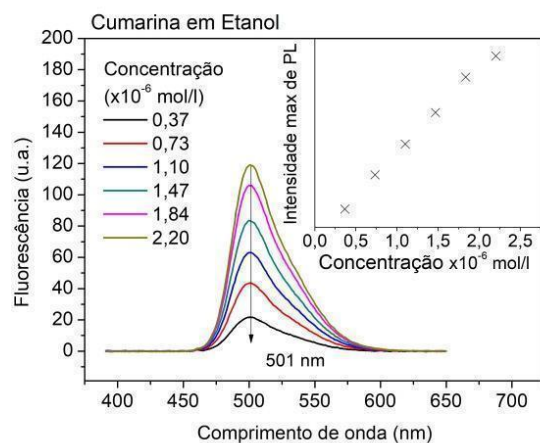
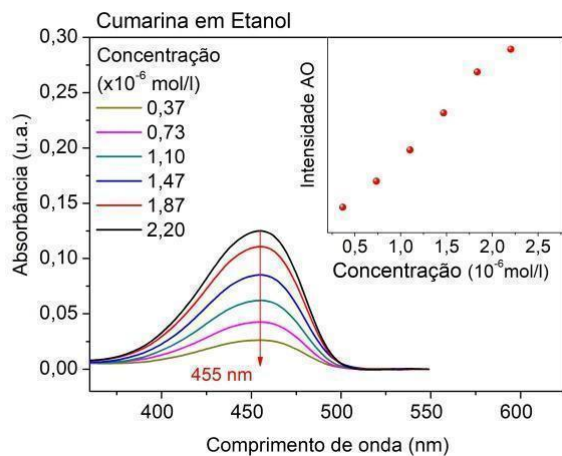
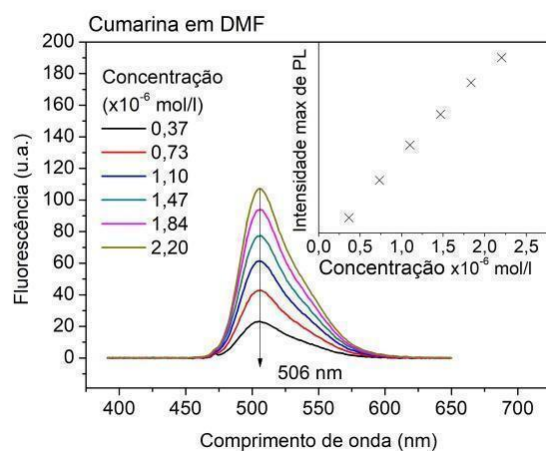
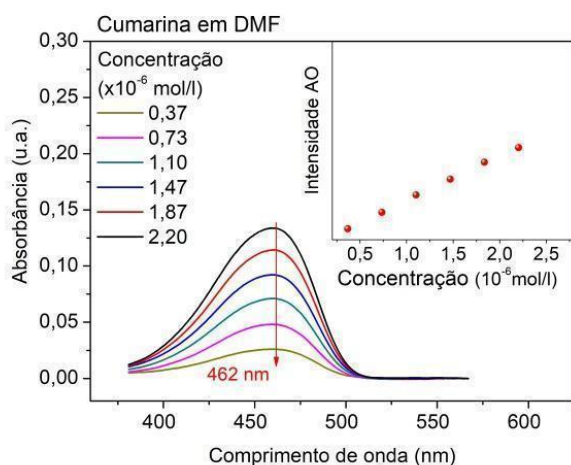
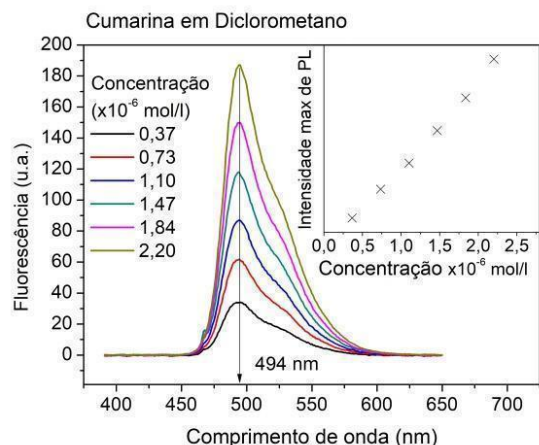
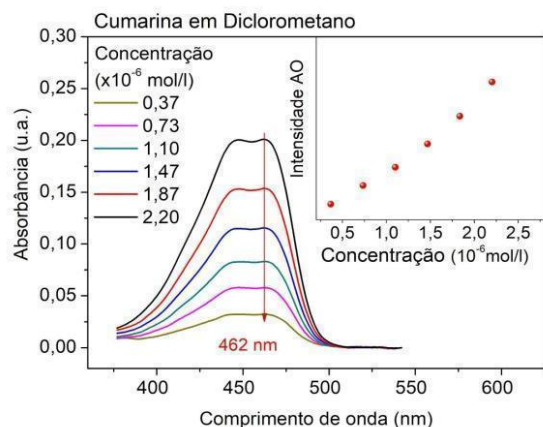
- [1] JONES, Guilford; JACKSON, William R.; HALPERN, Arthur M. Medium effects on fluorescence quantum yields and lifetimes for coumarin laser dyes. *Chemical Physics Letters*, Amsterdam, v. 72, p. 391–395, 1980. DOI: 10.1016/0009-2614(80)80314-9
- [2] ROHATGI-MUKHERJEE, K. K. Fundamentals of photochemistry. New Delhi: Wiley, 1978.
- [3] POSTACCHINI, B.B.; ZUCOLOTTI, V.; DIAS, F.B.; MONKMAN, A.; OLIVEIRA JR., O.N.; Energy Transfer in Nanostructured Films Containing Poly(p-phenylenevinylene) and Acceptor Species, *J. Phys. Chem. C* 113, 10303, 2009.
- [4] FAVARIM, H.R. et al. *Adv. Func. Mat*, v.17, n.15, p.2862-2868, 2007.
- [5] PAULO, S. UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE JULIANA ESTEPHAN NOBILE avaliação do espectro de absorção e da viabilidade de linhagens celulares cultivadas sob estresse nutricional e submetidas à fotobiomodulação. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://bibliotecatede.uninove.br/bitstream/tede/2782/2/Juliana%20Estephan%20Nobile.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [6] Espectroscopia de fotoluminescência, fosforescência y fluorescência. Disponível em: <https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/M%C3%A9todos_F%C3%ADsicos_en_Qu%C3%ADmica_y_Nano_Ciencia_%28Barron%29/04%3A_Especi%C3%B3n_qu%C3%ADmica/4.05%3A_Espectroscopia_de_fotoluminiscencia%2C_fosforescencia_y_fluorescencia>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [7] Princípios básicos de excitação e emissão de fluorescência | Olympus LS. Disponível em: <<https://www.olympus-lifescience.com/pt/microscope-resource/primer/lightandcolor/fluoroexcitation/>>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [8] LAKOWICZ, J. R.; MASTERS, B. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *Journal of Biomedical Optics*, v. 13, n. 2, p. 029901, 2008.
- [9] Disponível em: <https://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=EGwfxWnqDymHIheEJmzQtaOi6FS0_DJLGH3oRRKy0ahwBB-0NhnVJGwTf46Fgh93kbBveU0w4TW7OCTcnNeUuA==#:~:text=As%20cumarinas%20s%C3%A3o%20subst%C3%A2ncias%20de>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [10] Coumarin and Coumarin Derivatives | Thermo Fisher Scientific - UK. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/coumarin.html>>.
- [11] FERNANDES DE ARAÚJO, V.; ECHEVERRIA, R.; PASTORE, F. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB) INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ) -LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA QUÍMICA (LATEQ) “Produção não-madeira e desenvolvimento Sustentável na Amazônia” Objetivo Específico No. 3, Resultado 3.2 Sistema de extração de sementes de Cumaru. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2202/Technical/3.2%20Sistema%20de%20extra%C3%A7%C3%A3o%20de%20sementes%20de%20cumaru.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [12] **DECRETO Nº 50.040, DE 24 DE JANEIRO DE 1961.**
- [13] MARTINS, P. et al. DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE CUMARINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2008/anais/arquivosINIC/INIC1203_01_A.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [14] JASINSKI, J. P.; PAIGHT, E. S. 3-(2-Benzothiazolyl)-7-(diethylamino)coumarin. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, v. 51, n. 3, p. 531–533, 15 mar. 1995.
- [15] MARIA DE ALMEIDA, J.; CÉSAR, J.; DA SILVA, J. Química Analítica V Mestranda: Espectrofotometria UV-Vis. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula-2-UV-Vis-1o-Sem-2018-parte-1.pdf>>.
- [16] FUNDAMENTOS DA ESPECTROFOTOMETRIA [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www2.ufjf.br/quimica/files/2016/08/Espectrometria-UV-vis.pdf>>.
- [17] Introdução à Fluorescência 2.1. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/15676/15676_3.PDF>
- [18] Moodle USP: e-Disciplinas. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4611034/mod_resource/content/1/fluorimetria-%2015032019.pdf>.

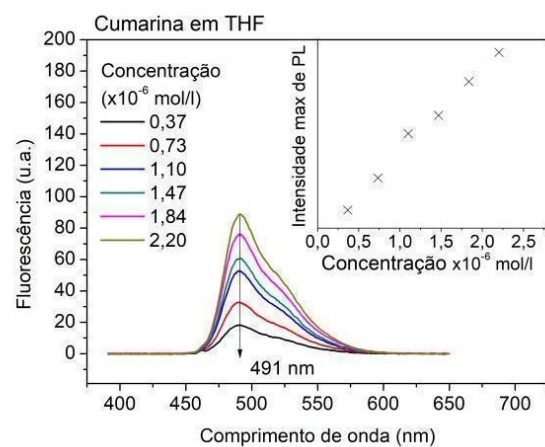
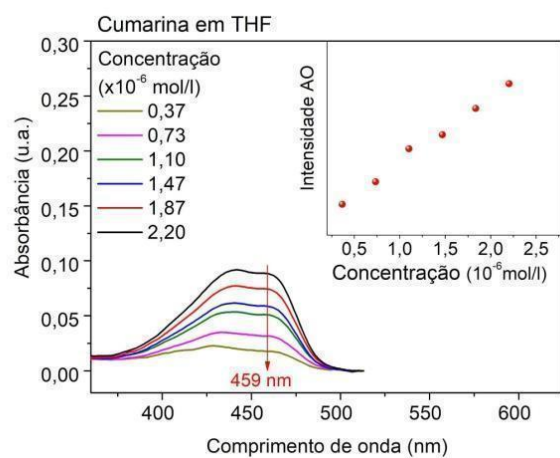
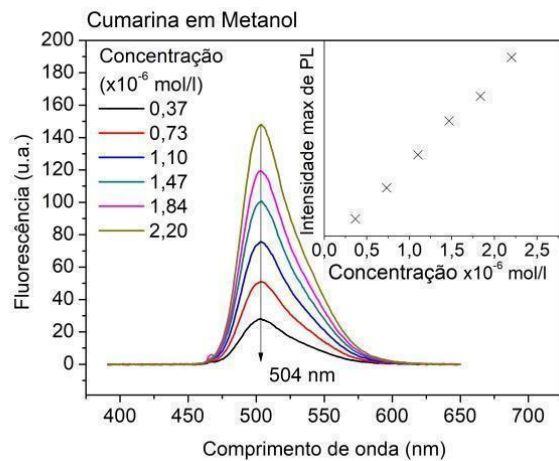
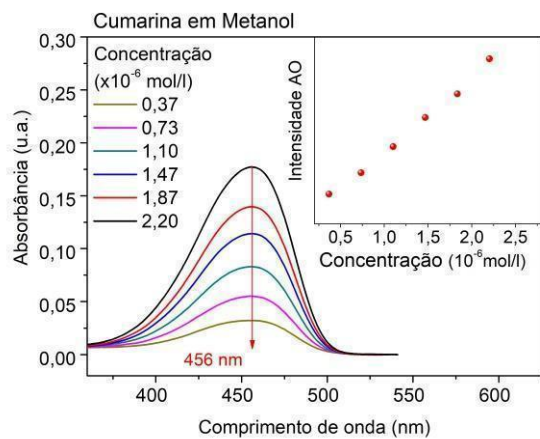
- [19] VALEUR,B; MOLECULAR FLUORESCENCE: Principles and Applications; Wiley-VCH, ed 1, 2002
- [20] FluoTime 200 High Performance Fluorescence Lifetime Spectrometer. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/fluotime200.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [21] Universidade Federal de Ouro Preto - Sergio Fernando Curcio, Estudo das propriedades fluorescentes da ftalocianina de hidróxido de alumínio em presença de nanotubos de carbono funcionalizados OURO PRETO -MG 2017. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.monografias.ufop.br/bitstream/35400000/1394/1/MONOGRAFIA_EstudoPropriedadesFluorescente s.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- [22] REYNOLDS, G. A.; DREXHAGE, K. H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. Optics Communications, v. 13, n. 3, p. 222–225, mar. 1975.

10. APÊNDICES

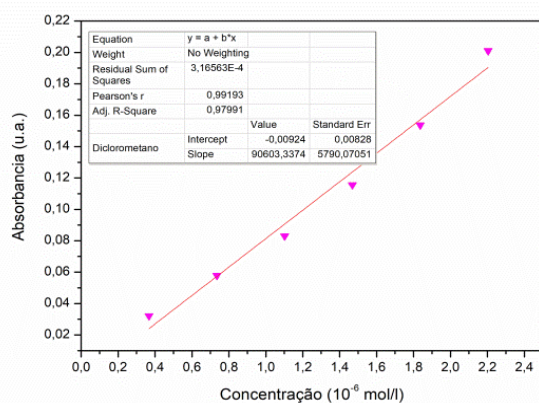
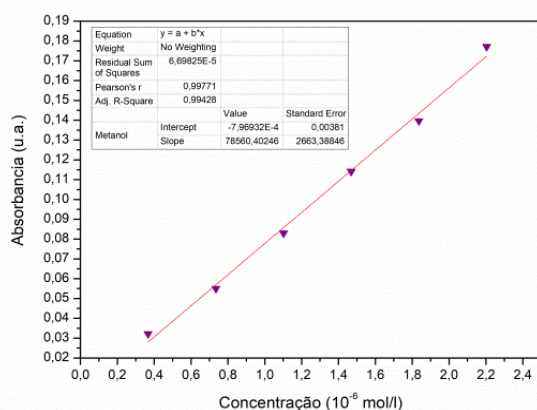
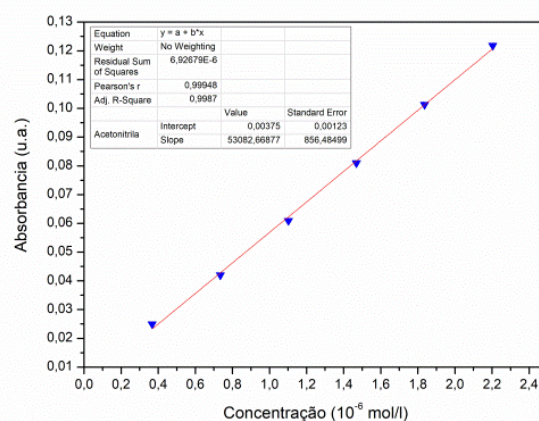
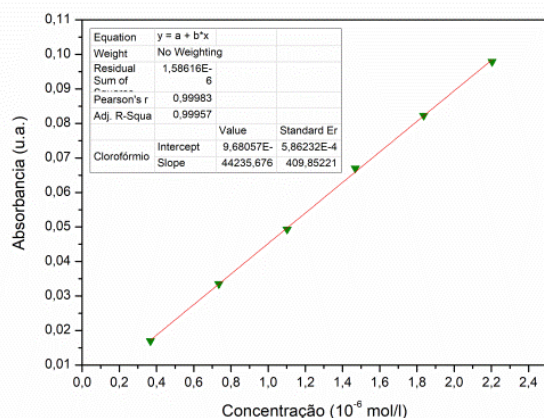
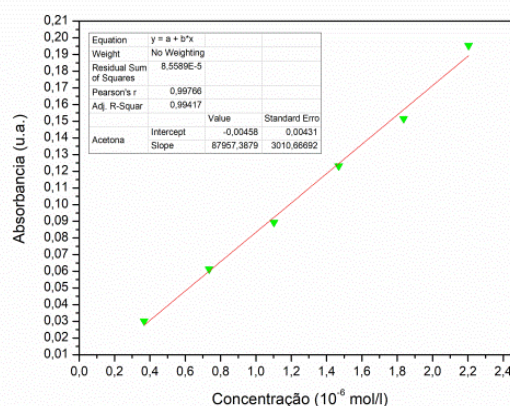
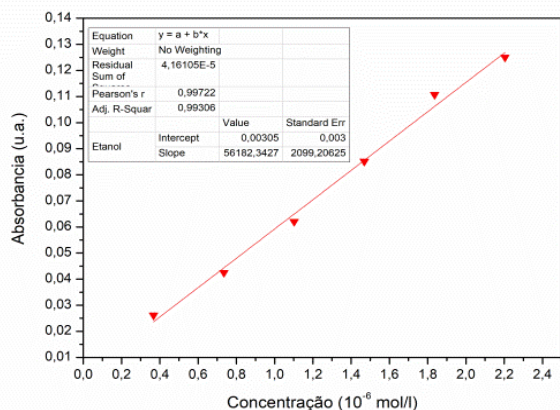
10.1 Apêndice A - Espectros de absorção (esquerda) e fluorescência (direita) da Cumarina 6 diferentes solvente para diferentes concentrações. Em detalhe, a intensidade em função da concentração.

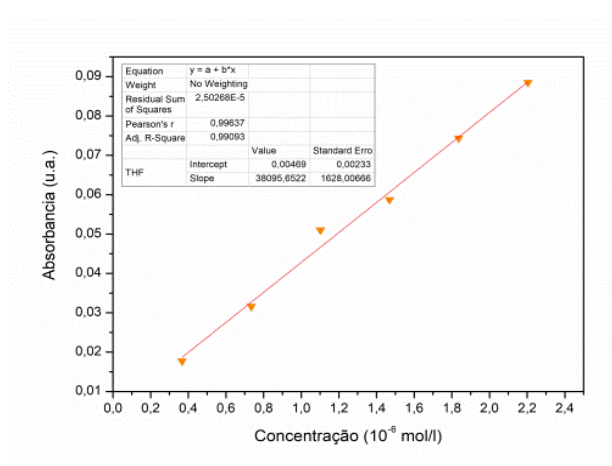
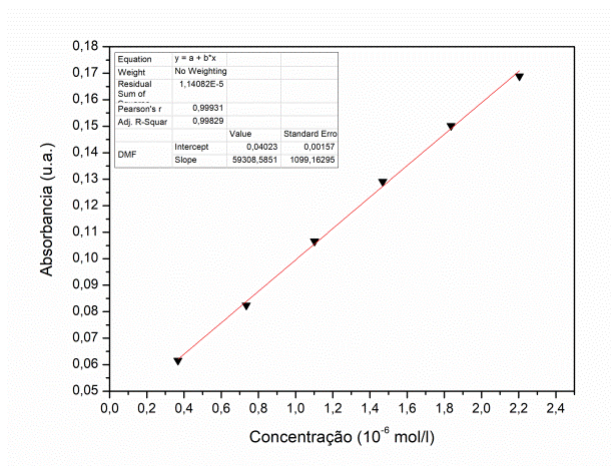






10.2 Apêndice B - Cálculo do coeficiente de absorção molar a partir do ajuste linear da lei de Beer-Lambert





10.3 Apêndice C: Dados para o cálculo de eficiência quântica de fluorescência da Cumarina 6 em função da concentração para cada solvente.

ϕ = Eficiência quântica de fluorescência;

AO = absorvância da amostra;

n = índice de refração;

PL = área sob o espectro de fluorescência;

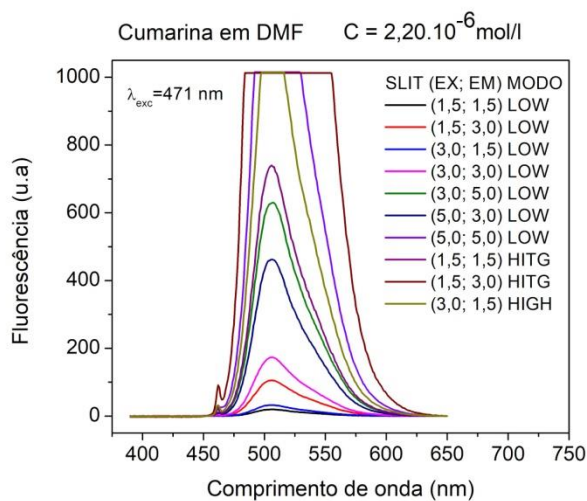
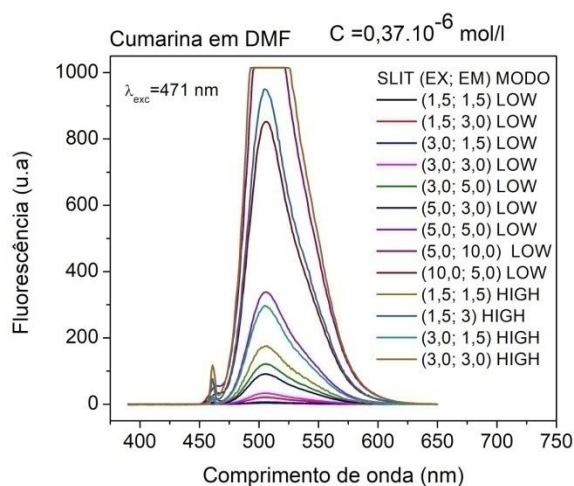
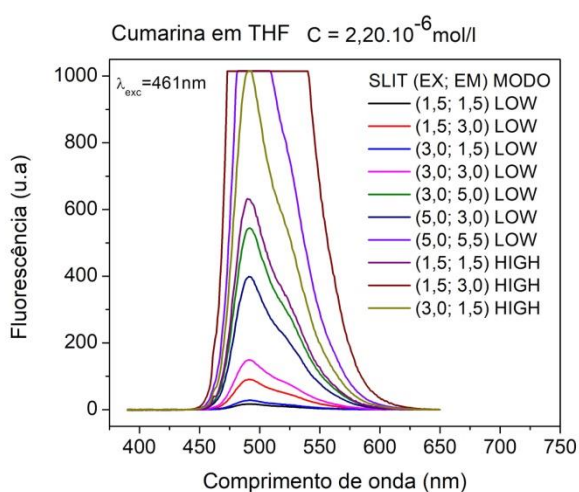
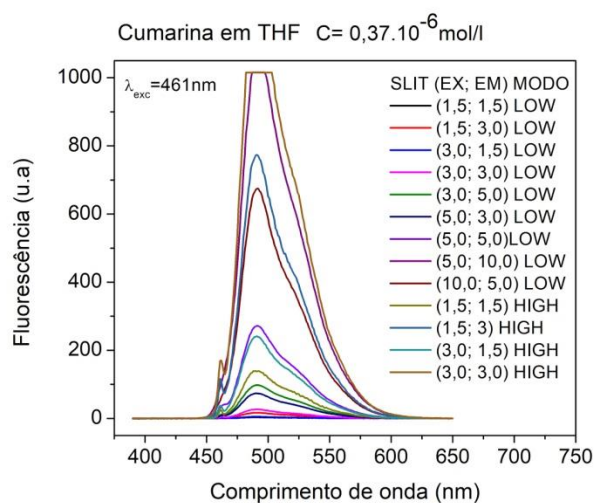
Usados como referência os parâmetros de Cumarina com concentração de 1,10E-06 mol/l em etanol (n= **1,361**), sendo PL=3263, AO=0,061 e a eficiência quântica descrita na literatura como sendo 0,78.

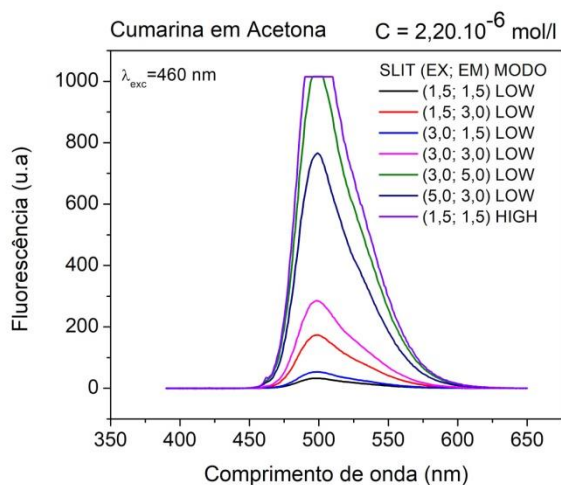
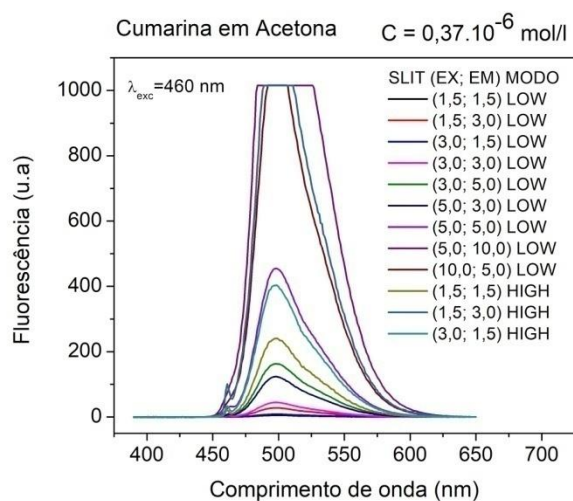
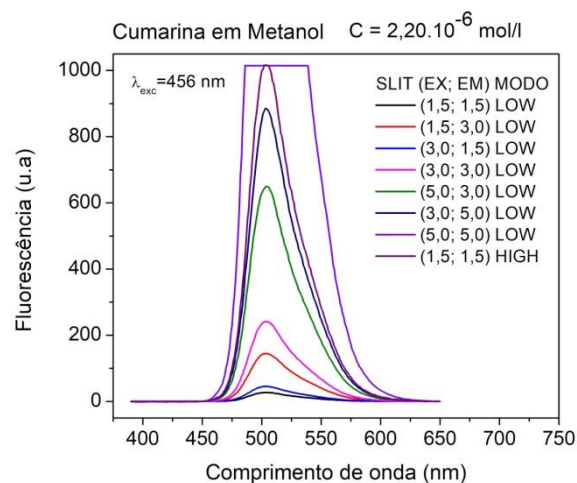
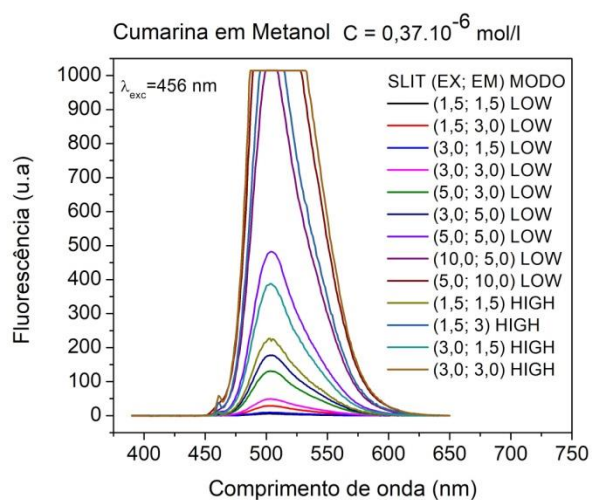
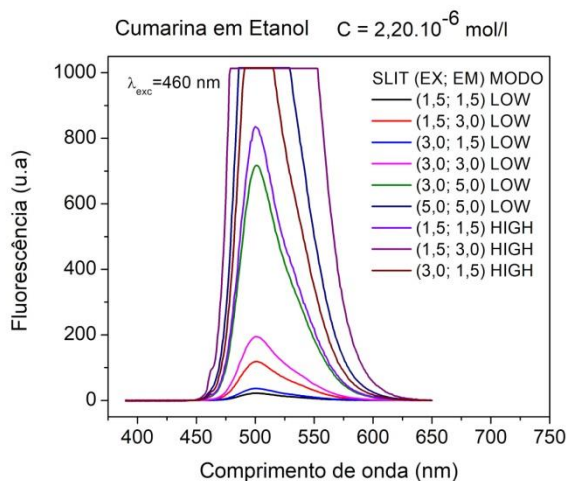
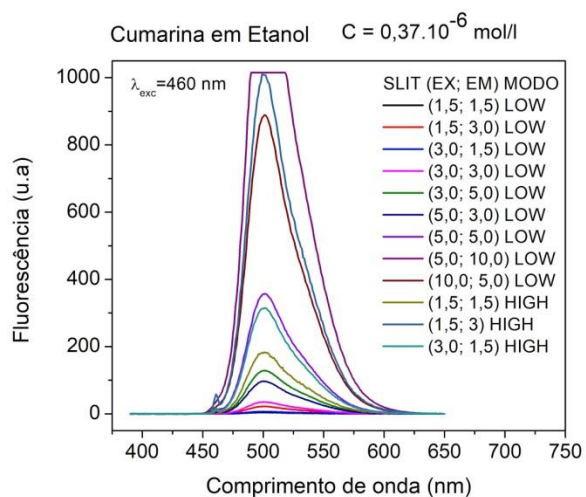
	Diclorometano				DMF			
Conc (mol/l)	N	PL	AO (466nm)	ϕ	n	PL	AO (471 nm)	ϕ
3,67E-07	1,429	1741	0,031	-	1,429	1199	0,024	0,79
7,35E-07	1,429	3108	0,055	0,9	1,429	2211	0,043	0,8
1,10E-06	1,429	4402	0,079	0,91	1,429	3191	0,064	0,8
1,47E-06	1,429	5979	0,11	0,92	1,429	4028	0,084	0,79
1,84E-06	1,429	7554	0,146	0,91	1,429	4823	0,104	0,78
2,20E-06	1,429	9404	0,191	0,91	1,429	5531	0,122	0,78
	Média ϕ			0,91	Média ϕ			0,79
	Desvio Padrão			0,01	Desvio Padrão			0,01
	Acetonitrila				Clorofórmio			
Conc (mol/l)	N	PL	AO (460nm)	ϕ	n	PL	AO (465 nm)	ϕ
3,67E-07	1,344	1376	0,025	0,77	1,444	958	0,017	0,9
7,35E-07	1,344	2252	0,041	0,76	1,444	1818	0,032	0,91
1,10E-06	1,344	3155	0,06	0,75	1,444	2687	0,048	0,91
1,47E-06	1,344	4101	0,079	0,75	1,444	3562	0,064	0,92
1,84E-06	1,344	5041	0,099	0,75	1,444	4322	0,079	0,92
2,20E-06	1,344	5910	0,119	0,75	1,444	5041	0,094	0,92
	Média ϕ			0,76	Média ϕ			0,91
	Desvio Padrão			0,01	Desvio Padrão			0,01
	Metanol				Etanol			
Conc (mol/l)	N	PL	AO (456nm)	ϕ	n	PL	AO (460 nm)	ϕ
3,67E-07	1,328	1423	0,032	-	1,361	1110	0,026	-

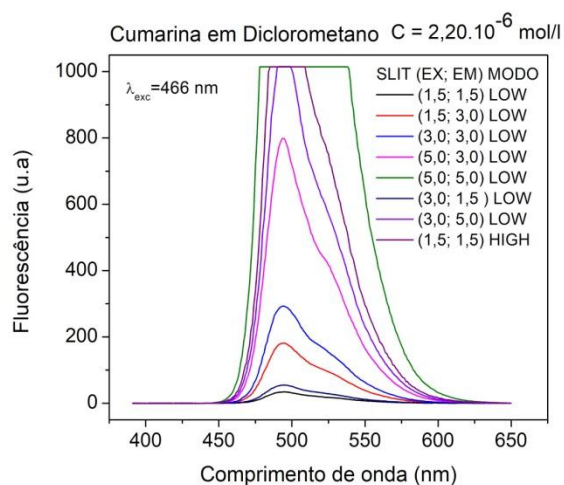
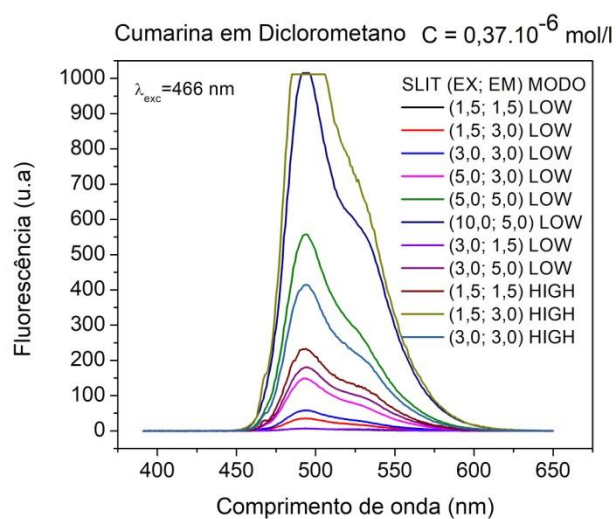
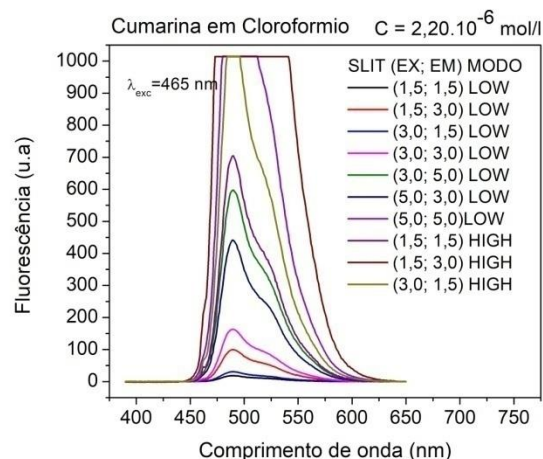
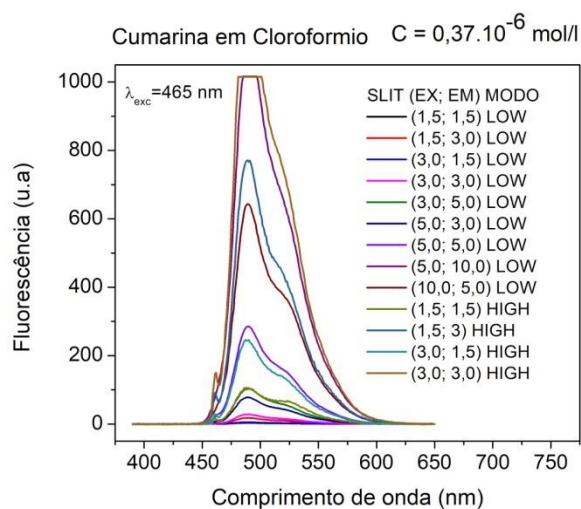
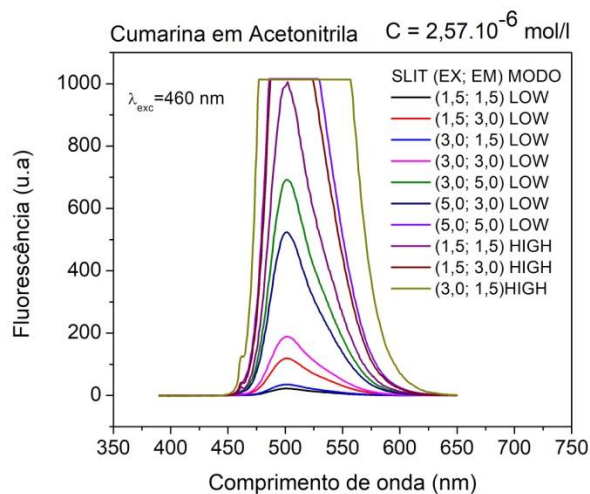
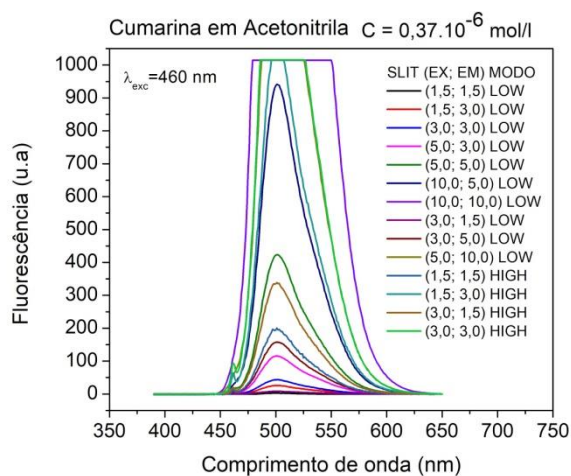
7,35E-07	1,328	2609	0,055	0,65	1,361	2280	0,042	0,78
1,10E-06	1,328	3867	0,083	0,66	1,361	3263	0,061	0,78
1,47E-06	1,328	5119	0,114	0,66	1,361	4290	0,084	0,77
1,84E-06	1,328	6095	0,14	0,66	1,361	5500	0,109	0,78
2,20E-06	1,328	7490	0,177	0,67	1,361	6104	0,123	0,78
	Média ϕ			0,66	Média ϕ			0,78
	Desvio Padrão			0	Desvio Padrão			0,01
	THF				Acetona			
Conc (mol/l)	N	PL	AO (461nm)	F	n	PL	AO (460 nm)	F
3,67E-07	1,407	949	0,018	-	1,359	1570	0,029	0,76
7,35E-07	1,407	1727	0,03	0,86	1,359	3203	0,059	0,78
1,10E-06	1,407	2721	0,049	0,85	1,359	4533	0,087	0,78
1,47E-06	1,407	3131	0,057	0,85	1,359	5992	0,12	0,78
1,84E-06	1,407	3945	0,072	0,86	1,359	7121	0,147	0,77
2,20E-06	1,407	4582	0,086	0,85	1,359	8737	0,19	0,77
	Média ϕ			0,86	Média ϕ			0,78
	Desvio Padrão			0,01	Desvio Padrão			0,01

10.4 Apêndice D - Catálogo de parâmetros de intensidade de fluorescência.

A seguir estão os espectros de fluorescência da Cumarina 6 coletados em diferentes *slits* e em resoluções High e LOW. Para utilizar a Cumarina 6 como parâmetro espectroscópico na análise de um novo material, planeje a concentração a ser usada, a abertura dos *slits* e a sensibilidade do fluorímetro para coletar o espectro de ambos (amostra e padrão) em mesmas condições.







10.5 Apêndices E - Dados para o cálculo de eficiência quântica de fluorescência da Cumarina 6 em função da concentração para ETANOL com diferentes comprimentos de onda de excitação.

		Etanol	Etanol			Etanol	Etanol	
Conc (mol/l)	N	PL	AO (460 nm) slits 1,5/3,0 low		n	PL	AO (410 nm) slits 1,5/1,5 High	
3,67E-07	1,361	1110	0,02	0,77	1,361	1418,818	0,0073	0,65
7,35E-07	1,361	2280	0,042	0,78	1,361	2849,138	0,01325	0,72
1,10E-06	1,361	3263	0,061	0,78	1,361	4072,762	0,01765	0,78
1,47E-06	1,361	4290	0,084	0,77	1,361	5728,004	0,02366	0,82
1,84E-06	1,361	5500	0,109	0,78	1,361	7160,095	0,03064	0,8
2,20E-06	1,361	6104	0,123	0,78	1,361	8218,676	0,0343	0,83
			Média	0,78			Média	0,77
			Desvio Padrao	0			Desvio Padrao	0,07
				1%				9%
		Etanol	Etanol			Etanol	Etanol	
Conc (mol/l)	N	PL	AO (460 nm) slits 1,5/1,5 High		n	PL	AO (425 nm) slits 1,5/1,5 High	
3,67E-07	1,361	9551	0,0245	0,72	1,361	4180,236	0,0178	0,66
7,35E-07	1,361	17826	0,04175	0,81	1,361	7923,252	0,02843	0,79
1,10E-06	1,361	24676	0,06108	0,78	1,361	11085,21	0,04102	0,78
1,47E-06	1,361	35691	0,08378	0,84	1,361	15777,52	0,0562	0,82
1,84E-06	1,361	42245	0,10907	0,79	1,361	18985,62	0,07253	0,78
2,20E-06	1,361	47241	0,12309	0,79	1,361	21528,6	0,082	0,79
			Média	0,79			Média	0,77
			Desvio Padrao	0,04			Desvio Padrao	0,06
				5%				7%
Conc (mol/l)	N	PL	AO (485 nm) slits 1,5/1,5 High					
3,67E-07	1,361	3694,776	0,0084	0,76				
7,35E-07	1,361	6844,689	0,01439	0,83				
1,10E-06	1,361	9649,566	0,02169	0,78				
1,47E-06	1,361	14939,79	0,03071	0,86				
1,84E-06	1,361	16720,46	0,03906	0,77				
2,20E-06	1,361	19216,51	0,04399	0,79				
			Média	0,8				
			Desvio Padrao	0,04				
				5%				