

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUIMICA

Este exemplar corresponde a relação final da Tese de Mestrado defendida por Deborah Nunes Dibbern - Aprovada pela Comissão Julgadora.

Cps, 2ª de Abril de 1989

Z. Dib Zambon Atvars  
Teresa Dib Zambon Atvars.

ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA FLUORESCÊNCIA EM  
POLICALCOOL VINÍLICO E POLIACETATO DE  
VINILA).

DEBORAH NUNES DIBBERN

Tese de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. TERESA DIB ZAMBON  
ATVARS

Abril 1989

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*Aos meus pais, Conrado e Martha, irmãos Conrado,  
Helena, Christianne e à amiga Neli, pelo apoio,  
desde o meu ingresso na Universidade.*

*Ao meu marido, Dava Leonardo, pelo amor, dedicação  
e incentivo.*

**AGRADECIMENTO ESPECIAL:**

*Não poderia deixar de agradecer especialmente à Professora Dra. TERESA DIB ZAMBON ATVARS pela orientação segura e participação efetiva neste trabalho, além de sua valiosa amizade.*

- AGRADECIMENTOS -

Aos meus amigos, Vilardes Nunes Jr, Eliana L. Tassi, Mauricio X. Countrim e Sandra M. M. Franchetti pela dedicada amizade.

À amiga Claudia A. Bortolato, que cedeu-me gentilmente os espectros eletrônicos de absorção e emissão da uranina dispersa em PVA.

Aos amigos, Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira e especialmente ao Prof. Edvaldo Sabadini que cedeu-me, gentilmente, a figura 2.1 da tese, pelas sugestões e discussões.

Aos amigos, Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine e Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran pelo apoio.

Ao Amigo, Prof. Pedro Antonio Muniz Vazquez pela utilização dos programas computacionais.

Ao Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero, pela utilização do espectrofluorímetro Perkin Elmer.

Ao Prof. Dr. Roy Edward Bruns, pela utilização do micro-computador (DICOM).

Ao Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves, pela utilização do espectrofotômetro Cary 2300 - Varian.

A todos os funcionários do Instituto de Química que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Mário e à Helena.

À direção do Instituto de Química, à FAPESP (Processo 85/2905-9) e à CAPES pelo apoio financeiro.

## INDICE

Resumo .....	1
Abstract .....	4
Capítulo 1 - Introdução Teórica .....	7
1.1- Corantes xantênicos .....	7
1.1.1- Características e propriedades .....	7
1.2- Comportamento fotofísico da fluoresceína .....	8
1.2.1- Transição eletrônica não-radiativa - Conversão interna	8
1.2.2- Transição eletrônica não-radiativa - Cruzamento inter- sistema .....	12
1.2.3- Fosforescência e fluorescência atrasada .....	13
1.3- Efeitos dos solventes em espectros eletrônicos .....	15
1.3.1- Introdução .....	15
1.3.2-Teorias de deslocamentos espectrais causados por solvente	16
A- Interação entre os dipolos permanentes do soluto e solvente	21
B- Interação entre o dipolo permanente do soluto e o dipolo induzido do solvente.....	23
C- Interação entre o dipolo induzido do soluto e o dipolo permanente do solventes .....	24
D- Interação entre dipolos mutuamente induzidos do soluto e solvente .....	26
1.4- Aplicação das teorias de deslocamentos espectrais aos resultados experimentais .....	30
1.4.1- Hidrocarbonetos aromáticos como cromóforos não-polares	30

1.4.2- Derivados polares dos hidrocarbonetos aromáticos .....	33
1.5- Efeito do "solvente" nos espectros eletrônicos de um so- luto em uma matriz polimérica .....	37
1.6- Objetivos .....	44
1.7- Referências - Introdução teórica .....	45
Capítulo 2 - Parte experimental .....	48
2.1- Purificação das substâncias .....	48
2.1.1- Purificação dos solventes .....	48
2.1.2- Purificação da fluoresceína .....	49
2.1.3- Purificação dos polímeros .....	50
A- Poli(acetato de vinila) .....	50
B- Poli(álcool vinílico) .....	50
2.2- Preparação das soluções líquidas em solventes próticos e apróticos .....	52
A- Soluções aquosas diluídas .....	52
B- Soluções aquosas saturadas .....	52
C- Soluções em solventes apróticos .....	53
D- Soluções em solventes próticos .....	53
2.3- Preparação das matrizes poliméricas contendo fluoresceína	54
A- Filmes de poli(acetato de vinila) .....	54
B- Filmes de poli(álcool vinílico) .....	54
2.4- Instrumentação .....	55
2.4.1- Espectros eletrônicos de absorção .....	55
2.4.2- Espectros eletrônicos de emissão e excitação .....	56
A- Instrumentação utilizada .....	56

B- Princípios das técnicas utilizadas .....	58
2.4.3- Espectros de absorção infravermelho .....	61
2.4.4- Deconvolução das bandas eletrônicas de absorção da fluoresceína em soluções aquosas diluídas .....	62
2.5- Referências - Parte experimental .....	64
Capítulo 3 - Resultados e discussão .....	65
3.1- Análise dos espectros eletrônicos de absorção e emissão da fluoresceína em soluções aquosas diluídas .....	65
3.1.1- Considerações gerais sobre os espectros de absorção ...	65
3.1.2- Resultados obtidos dos espectros eletrônico de absorção Região do visível .....	68
3.1.3- Considerações gerais sobre os espectros eletrônicos de emissão .....	81
3.1.4- Resultados obtidos dos espectros eletrônicos de emissão	82
3.1.5- Relações entre os resultados obtidos dos espectros ele- trônicos de absorção e emissão .....	94
3.2- Análise dos espectros eletrônicos de absorção e de emissão da fluoresceína em soluções aquosas saturadas .....	98
3.2.1- Considerações gerais sobre a formação de agregados ....	98
3.2.2- Resultados obtidos .....	105
A- Soluções de fluoresceína em ácido sulfúrico 5 e 10 M .....	105
B- Soluções ácidas (pKa < 2,13) .....	107
C- Soluções ácidas (pKa < 4,4) .....	111
D- Soluções ácidas (pKa < 6,7) .....	114
E- Soluções neutras e básicas (pKa ≥ 6,7) .....	118

3.3- Análise dos espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína em soluções aquosas diluídas e saturadas em vários pH	122
3.3.1- Resultados obtidos	122
3.3.2- Modelos para as estruturas dos agregados da fluoresceína	135
3.3.3- Conclusão	145
3.4 - Análise dos espectros eletrônicos de absorção, emissão e excitação da fluoresceína em solventes apróticos	146
3.4.1- Acetato de etila	146
A- Solução diluída	147
B- Solução concentrada	148
3.4.2- Acetona	151
A- Soluções diluídas	151
B- Soluções concentradas	154
3.4.3- Dioxano	157
A- Solução diluída	157
B- Solução concentrada	157
3.4.4- Conclusões	160
3.5- Análise dos espectros eletrônicos de absorção e emissão da fluoresceína em solventes próticos	162
3.5.1- Etanol	162
A- Solução diluída	162
B- Solução concentrada	163
3.5.2- Etileno glicol	167
A- Solução diluída	167
B- Soluções concentradas	168

3.5.3- Estudo da espécie lactônica em soluções aquosas diluídas	170
3.5.4- Conclusões .....	174
3.6- Análise do espectro eletrônico de absorção da fluoresceína na forma cristalina .....	178
3.7- Estudo do efeito do solvente na fotofísica das formas moleculares da fluoresceína .....	180
3.8- Análise dos espectros eletrônicos de absorção e de emissão da fluoresceína em matrizes de PVAc e de PVA .....	184
3.8.1- Considerações gerais .....	184
3.8.1.A- Modelos de dissolução de moléculas aromáticas em ma- trizes poliméricas .....	184
3.8.1.B- Características dos polímeros PVA e PVAc .....	187
3.8.1.C- Influência do processo de recozimento no grau de cris- talidade .....	190
3.8.2- Resultados obtidos .....	194
3.8.2.1- Poli(acetato de vinila) .....	194
A- Amostra diluída .....	194
B- Influência do processo de recozimento .....	197
C- Amostra concentrada .....	198
D- Influência do processo de recozimento .....	198
E- Espectros de absorção infravermelho .....	202
F- Conclusão .....	202
3.8.2.2- Poli(álcool vinílico) .....	205
A- Amostra diluída .....	205
B- Amostra concentrada .....	208

C- Espectroscopia de absorção infravermelho da fluoresceína em PVA - Confirmação das espécies presentes em PVA .....	218
D- Recozimento dos filmes .....	222
E- Conclusão .....	230
3.9- Conclusões .....	235
3.10- Perspectivas futuras do trabalho .....	239
3.11- Referências - Resultados e discussão .....	241
3.12- Apêndice 1 .....	248
3.13- Apêndice 2 .....	252

# ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA FLUORESCEÍNA EM POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) E POLIACETATO DE VINILA

## RESUMO:

Através das técnicas de espectroscopia eletrônica de absorção UV/VIS e emissão foram realizados estudos do comportamento fotofísico da fluoresceína em diversos sistemas: (a) soluções aquosas de diferentes pH, (b) solventes próticos (etanol e etileno glicol), (c) poli(álcool vinílico) (PVA), (d) solventes apróticos (acetato de etila, dioxano e acetona), (e) poli(acetato de vinila) (PVAc). Os estudos em soluções permitiram que se determinasse o comportamento de todas as espécies de dissociação da fluoresceína bem como das características de seus agregados e serviu como base para a interpretação dos resultados obtidos com as matrizes poliméricas, que possibilitaram, ainda, identificar a natureza dos sítios de adsorção da fluoresceína nas matrizes poliméricas.

Observou-se que, em soluções aquosas diluídas, todas as formas de dissociação da fluoresceína são fortemente dependentes do pH da solução, estão presentes no estado eletrônico fundamental e que apenas as formas neutras lactônica e anfo-ion não estão presentes no estado eletrônico excitado. Utilizando-se a técnica de espectroscopia eletrônica de excitação, verificou-se que nas soluções aquosas saturadas em pH ácidos ( $\text{pH} < 4,0$ ) e, neutros e básicos ( $\text{pH} > 6,0$ ) ocorre a formação de agregados do tipo sanduíche.

Verificou-se que, nos solventes apróticos utilizados, somente a espécie lactônica está presente nos estados eletrônicos fundamental e excitado nas soluções diluídas e que nas soluções concentradas, há um deslocamento do equilíbrio de dissociação no sentido da formação do anfo-íon.

No caso da fluoresceína dispersa em PVAc, observou-se quer nas amostras diluídas, quer nas concentradas, a presença da forma neutra lactônica no polímero, no estado eletrônico fundamental. Porém, no estado eletrônico excitado há um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da forma neutra anfo-íon, que é responsável pela emissão de fluorescência. O espectro eletrônico de emissão da amostra concentrada apresenta duas bandas com alto grau de sobreposição, que desaparecem, resultando em uma banda única de meia largura maior, quando do processo de recozimento, concluindo-se, portanto, que o corante ocupa sítios de adsorção diferentes na matriz polimérica, uma vez que esse processo altera o grau de cristalinidade do polímero.

Através dos espectros eletrônicos de absorção UV/VIS e emissão, concluiu-se que, nas soluções diluídas em solventes próticos, há um equilíbrio entre as formas neutras lactônica e quinonóide no estado eletrônico fundamental e entre a forma neutra quinonóide e, provavelmente, a forma monoaniônica no estado eletrônico excitado. Nas soluções concentradas, concluiu-se que há um equilíbrio entre as formas quinonóide, monoaniônica e, provavelmente, a forma dianiônica.

Nos filmes diluídos de PVA contendo fluoresceína, observou-se um equilíbrio entre as espécies quinonóide e monoaniônica nos estados eletrônicos fundamental e excitado. Utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção infravermelho e processo de recozimento das amostras, verificou-se que a forma quinonóide ocupa os sítios de adsorção na interfase dos cristalitos e a espécie monoaniônica ocupa os sítios de adsorção da fase amorfa. A dispersão de fluoresceína em filmes mais concentrados de PVA, resulta na formação de agregados segundo um modelo linear.

Esses resultados permitem as seguintes conclusões: os estudos do corante em solução foram úteis para a identificação das propriedades fotofísicas das espécies de dissociação da fluoresceína; através desses estudos foi possível identificar as espécies presentes nas matrizes poliméricas; sendo as diferenças espectrais atribuídas às forças de interação distintas polímero-polímero e polímero-corante nos sítios de adsorção do filme.

SPECTROSCOPIC STUDY OF DISPERSED FLUORESCEIN IN POLY (VINYL ALCOHOL) AND POLY (VINYL ACETATE) MATRIXES.

ABSTRACT:

Using the electronic absorption (UV/VIS) and fluorescence emission spectroscopies, it was studied the photophysics of fluorescein in several systems: (a) aqueous solutions at different pH's, (b) protic solvents (ethanol and ethylene glycol), (c) poly (vinyl alcohol) (PVA), (d) aprotic solvents (ethyl acetate, dioxane and acetone) and (e) poly (vinyl acetate) (PVAc). In this way it was possible to understand the behavior of all dissociation forms, as well as the characteristics of the aggregates of the dye molecule.

The studies of the fluorescein in low viscosity liquid solvents, allowed: the interpretation of the results obtained for fluorescein dispersed in rigid polymeric matrixes and the identification of the nature of the different absorption sites of the dye in the polymeric films.

In aqueous dilute solutions, the dissociation forms present in solution depend on the pH and all the species exist in the ground and excited electronic states, except the neutral forms: lactonic and amphoteric, that are not present in the later state. Utilising the electronic excitation spectroscopy, it was verified that in the saturated aqueous solutions in acid (pH < 4,0) and, neutral and basic (pH >6,0) media there is the

formation of a type sandwich aggregates.

In the aprotic dilute system, only the lactonic form is present in the ground and excited electronic states. However, in more concentrated solutions, there is a shift of the dissociation equilibrium to form the amphoteric ion in electronic states.

For fluorescein dispersed in PVAc, the lactonic form is present in both, dilute and concentrated films, in the electronic ground state. In the excited state, there is a shift of the dissociation equilibrium toward the neutral form amphoteric ion, which is responsible for the fluorescence. The emission spectrum of the concentrated polymeric film showed two highly overlapped bands. When this film was heated to 50°C (annealing process) and slowly cooled, the two bands collapsed, resulting in a single broader band; indicating that the dye exists in different adsorption sites of the polymeric matrix.

There is a dissociation equilibrium between the neutral lactonic and quinonoid forms of fluorescein (both in the ground electronic state) in protic dilute systems. It was suggested that in the excited electronic state, there is an equilibrium between the neutral quinonoid form and monoanion. In concentrated solutions, the neutral quinonoid form, the monoanion and, probably, the dianion are present in equilibrium, in both, ground and excited electronic states.

In the dilute films of PVA containing fluorescein, it was seen that the quinonoid and monoanionic forms are present in the

ground and excited electronic states. The infrared spectra showed that the neutral quinonoid form occupy the adsorption sites in crystallite interfaces and the monoanion is dispersed in the adsorption sites of the amorphous fase. Concentrated films of PVA containing fluorescein result in the formation of the structure aggregates.

These results allow the following conclusions:

- (A) the studies on fluorescein solutions permitted the identification of the photophysical behavior of the dissociation forms;
- (B) utilising these studies it could be possible identify the forms present in the polymeric matrixes;
- (C) the spectral differences were ascribed to different interaction forces for polymer-polymer and polymer-dye system in the different adsorption sites

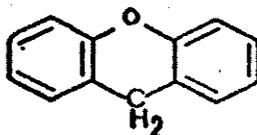
- CAPÍTULO 1 -

- INTRODUÇÃO TEÓRICA -

1.1- CORANTES XANTÊNICOS:

1.1.1- CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES:

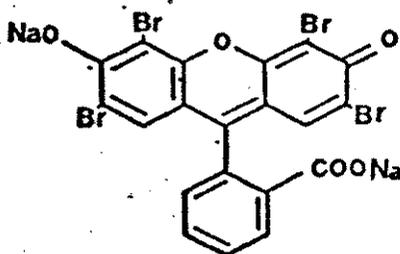
Corantes desse grupo são derivados do xanteno, dibenzo-1.4-pirano (I), geralmente com substituintes  $-NH_2$  ou  $-OH$  na posição meta em relação ao oxigênio ligado em ponte<sup>(1)</sup>. As fluoresceínas contêm os grupos hidroxila e as rodaminas contêm os grupos amino no anel xantênico<sup>(2)</sup>.



(I)

Um dos primeiros corantes xantênicos sintetizado foi a fluoresceína, obtida por condensação do anidrido ftálico com resorcinol em presença de ácido sulfúrico concentrado (Baeyer, 1871)<sup>(1)(3)</sup>. A emissão de fluorescência intensa, mesmo em soluções diluídas, permite que a fluoresceína seja utilizada como um marcador para salva-vidas no mar, para traçar fluxos de água subterrâneos, e na medicina para determinação de circulação de sangue<sup>(3)</sup>.

O sal de sódio ou potássio da fluoresceína é denominado uranina. Atualmente, a fluoresceína é utilizada, principalmente, como intermediário na obtenção de seu derivado tetrabromado denominado eosina (II), descoberta por Caro, 1874<sup>(3)</sup>.



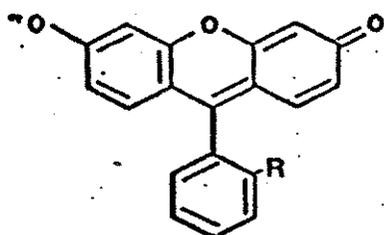
(II)

## 1.2- COMPORTAMENTO FOTOFÍSICO DA FLUORESCEÍNA:

### 1.2.1- TRANSIÇÃO ELETRÔNICA NÃO-RADIATIVA - CONVERSÃO INTERN.

Martin e Lindqvist<sup>(4)</sup> estudaram o efeito de solventes deuterados nos processos de conversão interna ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) e cruzamento inter-sistema ( $S_1 \rightarrow T_1$ ) nas moléculas de 6-hidroxi-9-fenil-fluoron (HPF) e fluoresceína, através de medidas de rendimentos quânticos de fluorescência ( $\Phi_f$ ) e fosforescência ( $\Phi_p$ ) em soluções alcalinas de  $H_2O$ ,  $D_2O$ ,  $CH_3OH$ ,  $CH_3OD$ <sup>(4)</sup>.

Nas condições do estudo, HPF (R = H) e fluoresceína (R =  $COO^-$ ) estavam presentes na forma dissociada<sup>(4)</sup>.



Os resultados obtidos por estes autores para os solventes água e metanol protonados e deuterados são mostrados na tabela 1.1.

Tabela 1.1: Rendimentos quânticos de fluorescência ( $\Phi_F$ ), fosforescência ( $\Phi_P$ ) e conversão interna ( $\Phi_{CI}$ ) de HPF e fluoresceína em solventes protonados e deuterados.

COMPOSTO	REND. QUANTICO	SOLVENTE (0.01 M NaOH ou KOH)				
		H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OD	CD <sub>3</sub> OD
HPF	$\Phi_F$	0.21	0.30	0.21	0.30	0.30
	$\Phi_P$	0.008	0.009	0.011	0.013	0.013
	$\Phi_{CI}$	0.78	0.69	0.78	0.69	0.69
FLUORESCÉINA	$\Phi_F$	0.92	0.92	1.00	1.00	1.00
	$\Phi_P$	0.032	0.030	0.035	0.033	0.032
	$\Phi_{CI}$	0.05	0.05	0	0	0

Uma vez que os corantes são ácidos fortes tanto no estado eletrônico excitado, como no estado fundamental, não ocorre a

protonação dos ânions eletronicamente excitados. Na ausência de protonação e outras reações fotoquímicas, os efeitos de isótopos nos rendimentos quânticos de fluorescência e fosforescência devem ser devidos às variações nos processos não-radiativos de conversão interna (CI) e cruzamento inter-sistema (CIS)<sup>(14)</sup>.

A deuteração do grupo xantênico apresentou efeitos desprezíveis nos rendimentos quânticos dos processos radiativos. Isto indica que as vibrações CH não estão envolvidas nos processos não-radiativos<sup>(4)</sup>.

Segundo Martin e Lindqvist, o estudo dos corantes em solventes deuterados mostrou que a transição não-radiativa principal ocorre via vibrações do grupo OH do solvente. Através da tabela 1.1, pode-se verificar que a deuteração do grupo OH diminui significativamente a probabilidade de conversão interna. A deuteração dos grupos metila não influencia acentuadamente o processo de conversão interna para o corante HPF.

O rendimento quântico de fluorescência da fluoresceína não é afetado pelo processo da conversão interna, uma vez que este é desprezível<sup>(4)</sup>.

Martin<sup>(5)</sup> estudou, posteriormente, o efeito de pontes de hidrogênio nas transições eletrônicas não-radiativas em corantes xantênicos e obteve os resultados mostrados na tabela 1.2 para a fluoresceína.

Tabela 1.2: Comprimentos de onda máximos das bandas eletrônicas de absorção ( $\lambda_{\text{abs. max}}$ ) e emissão ( $\lambda_{\text{em. max}}$ ), tempo de vida ( $\tau_{\text{rad}}$ ) do estado excitado, rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_{\text{Fl}}$ ), rendimento quântico de conversão interna ( $\Phi_{\text{CI}}$ ).

SOLVENTES	$\lambda_{\text{abs. max}}$ (nm)	$\tau_{\text{rad}}$ (ns)	$\lambda_{\text{em. max}}$ (nm)	$\Phi_{\text{Fl}}$	$\Phi_{\text{CI}}$
$\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$	484	$4,0 \pm 0,2$	508	$1,00 \pm 0,05$	0
$\text{H}_2\text{O}$	491	$4,0 \pm 0,2$	514	0,02	0,05
$\text{CH}_3\text{OH}$	496	$4,0 \pm 0,2$	518	$1,00 \pm 0,05$	0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	499	$3,9 \pm 0,2$	520	$0,97 \pm 0,05$	0
$\text{HCONH}_2$	508	$3,6 \pm 0,2$	528	$0,75 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,08$
$\text{HCONC(CH}_3)_2$	519	$4,0 \pm 0,2$	543	$0,55 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,06$
$\text{CH}_3\text{SOCH}_3$	520	$3,6 \pm 0,2$	543	$0,60 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,06$

O deslocamento espectral para comprimentos de onda menores com o aumento na capacidade de formação de pontes de hidrogênio, indica que o estado eletrônico fundamental é melhor estabilizado pela ligação de hidrogênio em relação ao estado excitado. Esta observação é concordante com o fato da fluoresceína ser um ácido mais forte no estado eletrônico excitado<sup>(5)</sup>. Os deslocamentos similares para a região do azul dos espectros eletrônicos de absorção e emissão de fluorescência, com a formação de pontes de hidrogênio, indicam que os estados  $S_0$  e  $S_1$  sofrem a mesma mudança na geometria molecular, fazendo com que os fatores de Franck-Condon para as transições permaneçam

essencialmente os mesmos.

Resultados anteriores mostraram que a formação de pontes de hidrogênio influencia, principalmente, o processo não-radiativo  $S_1 \rightarrow S_0$ : quanto maior a capacidade de formação deste tipo de ligação, menor é  $\Phi_{CI}^{(5)}$ .

Martin<sup>(5)</sup> verificou que a constante de velocidade ( $K_{CI}$ ) da fluoresceína é menor em relação à  $K_{CI}$  do HPF. Como os grupos fenila e xantênico (cromóforo) não estão conjugados, pois não estão no mesmo plano, deve-se esperar que o fator de Franck-Condon não seja influenciado pelo grupo carboxila da fluoresceína<sup>(5)</sup>. Segundo Martin<sup>(5)</sup>, a transição não-radiativa de conversão interna é influenciada pela proximidade dos grupos carboxila e xantênico. A presença do grupo carboxila cria uma estrutura ordenada do solvente em torno do grupo xantênico e aumenta a solvatação do corante<sup>(5)</sup>.

### 1.2.2- TRANSIÇÃO ELETRÔNICA NÃO-RADIATIVA.

#### CRUZAMENTO INTER-SISTEMA:

Segundo Fleming e co-autores<sup>(6)</sup>, na série: fluoresceína (Fl), eosina ( $Br_4Fl$ ), eritrosina ( $I_4Fl$ ) e rosa de bengala ( $I_4Cl_4Fl$ ) há um aumento acentuado da constante de velocidade para o cruzamento inter-sistema por um fator de  $\approx 600$  da fluoresceína para a eritrosina, que é causado pela halogenação do anel xantênico da fluoresceína. A substituição de átomos pesados tanto

no corante, como no solvente, resulta em um aumento do acoplamento spin-órbita entre os estados singlete e triplete, fazendo com que o processo não-radiativo de cruzamento inter-sistema  $S_1 \rightarrow T_1$  seja mais eficiente<sup>(7)</sup>.

### 1.2.3- FOSFORESCENCIA E FLUORESCENCIA ATRASADA:

Uma solução diluída de fluoresceína em qualquer solvente ácido que foi resfriada até o estado vítreo, sem cristalização, é fosforescente. O solvente pode ser ácido fosfórico, ácido sulfúrico ou os ácidos cítrico, tartárico ou bórico fundidos. Nesses casos, há emissão de fosforescência da espécie catiônica da fluoresceína<sup>(8)</sup>.

Segundo Lewis e co-autores<sup>(8)</sup>, embora a fosforescência seja uma propriedade característica de meios rígidos, não é a rigidez macroscópica o fator mais importante. Uma solução de fluoresceína em 85% de ácido fosfórico apresenta emissão de fosforescência a  $-80^\circ\text{C}$ , embora nesta temperatura, uma haste de vidro dispersa no ácido super resfriado possa ser rotacionada sem muita dificuldade. Todos os solventes utilizados no estudo da emissão de fosforescência da fluoresceína possuem muitos grupos hidroxila e permitem a formação de pontes de hidrogênio solvente-solvente e solvente-soluto, diminuindo, portanto, a velocidade de difusão do corante<sup>(8)</sup>.

O espectro de fosforescência da fluoresceína em ácido

bórico apresenta, à temperatura ambiente, uma banda intensa (banda  $\alpha$ ) em  $\approx 475$  nm e uma banda de baixa intensidade relativa na região do verde (banda  $\beta$ ). À medida que a temperatura decresce há uma diminuição gradual da intensidade relativa da banda na região do azul. A temperaturas menores do que  $-35^{\circ}\text{C}$ , só é verificada a banda na região do verde, em  $\approx 575$  nm<sup>(8)</sup>.

Posteriormente, Mc Glynn e co-autores<sup>(7)</sup> denominaram a fosforescência  $\alpha$  de fluorescência térmica atrasada, pois há um cruzamento inter-sistema  $T_1 \dashrightarrow S_1$ , ativado termicamente e uma emissão de fluorescência  $S_1 \longrightarrow S_0$ , que tem o tempo de vida do estado tripleto. Este tipo de emissão também é denominado fluorescência atrasada do tipo E, por ser do mesmo tipo daquela característica da eosina<sup>(7)</sup>.

Todos os processos fotofísicos citados neste capítulo e no capítulo 3 são discutidos detalhadamente por Birks em seu livro intitulado: *Photophysics of Aromatic Molecules*<sup>(9)</sup>.

## 1.3- EFEITOS DOS SOLVENTES EM ESPECTROS ELETRONICOS

### 1.3.1- INTRODUÇÃO:

Sabe-se que o espectro eletrônico de uma molécula imersa em um solvente sofre um deslocamento da energia em relação ao espectro da molécula isolada<sup>(10)</sup>. Duas classes de fenômenos de deslocamento foram definidas:

(A) Muitos, especialmente os maiores, são atribuídos a efeitos químicos específicos do solvente em um ou mais estados eletrônicos do cromóforo. Alguns efeitos específicos importantes são: formação de pontes de hidrogênio; transferência de carga ou de próton entre soluto e solvente; e equilíbrios de agregação dependentes do solvente, ionização e isomerização. (B) A segunda classe é atribuída a interações físicas entre moléculas de soluto e solvente. Teorias destes efeitos gerais assumem que os níveis de energia do cromóforo isolado (à baixa pressão na fase de vapor) e solvatado são os mesmos em uma aproximação de ordem zero e tratam os efeitos do solvente como uma perturbação física dos níveis de energia do cromóforo. Frequentemente, só perturbações devidas a interações intermoleculares atrativas são incluídas na análise<sup>(11)</sup>.

### 1.3.2- TEORIAS DE DESLOCAMENTOS ESPECTRAIS CAUSADOS POR SOLVENTE:

É apropriado construir uma teoria completa na qual relações entre deslocamentos causados por solvente e por forças intermoleculares são usadas juntamente com o conhecimento do efeito dessas forças em funções de distribuição molecular, relacionando todas as propriedades de equilíbrio do sistema soluto-solvente com os dados espectrais; no entanto, uma teoria completa não é possível devido ao atual estágio da teoria de fluidos densos. Na tentativa de resolver o problema, se estabelecem parametrizações sistemáticas e menos gerais dos deslocamentos espectrais causados por solventes em termos de suas propriedades macroscópicas (índice de refração, constante dielétrica). Tais parametrizações assumem que as interações moleculares responsáveis pelos deslocamentos espectrais podem ser expressas em termos dos parâmetros que governam a interação de moléculas isoladas com um campo externo, como polarizabilidades moleculares e momentos de dipolo. O problema é relacionar propriedades macroscópicas do sistema à suas propriedades moleculares individuais (1). Para isto, adota-se as relações de Clausius-Mosotti, ou as de Onsager para a ligação entre polarizabilidade e momento de dipolo, e índice de refração e constante dielétrica (10).

Uma outra rota possível para uma teoria de deslocamentos

espectrais parte do princípio de que o meio solvente que rodeia a molécula do soluto, é uma fonte de campo elétrico oscilante cuja média, quadrado médio, etc, exerce efeitos observáveis no espectro de uma molécula do soluto. Nesta aproximação, o problema consiste em relacionar estes valores médios às propriedades macroscópicas do meio <sup>(10)</sup>.

A teoria da perturbação de segunda ordem é utilizada para desenvolver expressões para as duas mudanças dos níveis de energia eletrônica estacionários e de diferenças de energia, ou energias de transição de uma molécula de soluto simples, que se originam de campos elétricos devidos a uma configuração particular de uma molécula de solvente individual. A média dos deslocamentos resultantes é feita sobre todas as configurações apropriadas das moléculas do solvente da solução. Esta média se relaciona às propriedades macroscópicas da solução, do solvente e do soluto pelas equações aproximadas citadas anteriormente <sup>(10)</sup>.

Absorção, ou emissão de radiação por um cromóforo ocorre em uma escala de tempo pequena, comparada com aquela necessária para ocorrer a re-orientação molecular em um líquido. Portanto, considera-se que as moléculas do solvente que circundam um dado cromóforo permanecem em posições fixas durante os processos de absorção ou emissão. A configuração do solvente apropriada é a correspondente ao estado inicial do soluto <sup>(11)</sup>.

As expressões mecânico-quânticas resultantes que descrevem os deslocamento espectrais podem ser desenvolvidas em termos de duas moléculas, o cromóforo e uma molécula simples do solvente. As soluções deste problema, que são obtidas da média da função de distribuição do par soluto-solvente apropriado, podem ser expressas em termos das funções de onda  $|k,i\rangle = |k\rangle|1\rangle$  para o k-ésimo estado eletrônico de uma molécula do solvente apropriada e o i-ésimo estado eletrônico de um cromóforo do soluto isolado. O Hamiltoniano  $H = H_0 + H'$  para este par soluto-solvente é definido em termos de  $H_0$ , a soma dos Hamiltonianos não perturbados para as moléculas do soluto e do solvente isolados, e  $H'$  é o operador interação (11).

A soma das energias não-perturbadas da molécula do solvente no estado k e do soluto no estado i é definida por  $E_{ki}$ , e as energias perturbadas correspondentes, incluindo termos de segunda ordem na perturbação são expressas por  $E_{ki}$ . As energias das transições para o soluto não-perturbado entre os estados 0 e 1 é  $E(00-01)$ ; e  $E(00-01)$  para o soluto perturbado (solvatado), onde  $E(00-01)$  é igual a  $E_{00} - E_{01}$  e  $E(00-01)$  é igual a  $E_{00} - E_{01}$  (11). O deslocamento espectral para esta configuração particular é então (11):

$$\Delta\nu(\text{cm}^{-1}) = (hc)^{-1} [\Delta E(00-01)] = (hc)^{-1} [E'(00-01) - E(00-01)] \quad (1)$$

As energias perturbadas do par solvente-cromóforo do solvente são  $\tilde{\epsilon}_0$  (11):

$$E_{00} = E_{00} + \langle 00 | H' | 00 \rangle + \sum_{k \neq 0} \frac{|\langle 00 | H' | k0 \rangle|^2}{E_{00} - E_{k0}} + \sum_{i \neq 0} \frac{|\langle 00 | H' | 0i \rangle|^2}{E_{00} - E_{0i}} + \sum_{i, k \neq 0} \frac{|\langle 00 | H' | ki \rangle|^2}{E_{00} - E_{ki}} \quad (2)$$

$$E_{01} = E_{01} + \langle 01 | H' | 01 \rangle + \sum_{k \neq 0} \frac{|\langle 01 | H' | k1 \rangle|^2}{E_{01} - E_{k1}} + \sum_{i \neq 0} \frac{|\langle 01 | H' | 0i \rangle|^2}{E_{01} - E_{0i}} + \sum_{\substack{i \neq 1 \\ k \neq 0}} \frac{|\langle 01 | H' | ki \rangle|^2}{E_{01} - E_{ki}} \quad (3)$$

O primeiro termo do lado direito das equações (2) e (3) é a energia de ordem zero não perturbada do cromóforo isolado. O termo de primeira ordem seguinte representa, na aproximação de dipolo, as interações dos momentos de dipolos permanentes das moléculas do solvente e do cromóforo. Os três termos restantes são de segunda ordem e representam respectivamente: (a) a interação do momento de dipolo permanente do cromóforo com o momento de dipolo induzido na molécula do solvente pelo dipolo do soluto; (b) interação do momento de dipolo permanente do solvente com o momento de dipolo induzido no cromóforo pelo dipolo do solvente, e (c) a interação dos dipolos induzidos mutuamente do cromóforo e do solvente (11).

Obtém-se a expressão (4) para o deslocamento médio da energia de transição devido à interação soluto-solvente, subtraindo-se a equação (2) da equação (3) e calculando-se a média

da expressão resultante sobre as funções de distribuição de duas partículas para a separação e orientação mútua da molécula de solvente em relação ao cromóforo. Esta é representada na equação (4) pelo índice Av<sup>(11)</sup>.

$$\begin{aligned}
 \langle \Delta E(00-01) \rangle_{Av} &= \langle E(00-01) \rangle_{Av} - E(00-01) = \\
 &= \langle [ \langle 01 | H' | 01 \rangle ]_{Av} - [ \langle 00 | H' | 00 \rangle ]_{Av} \rangle + \\
 &+ \left[ \sum_{k \neq 0} \left\{ \frac{[ \langle 01 | H' | k1 \rangle ]^2_{Av}}{E_{01} - E_{k1}} - \frac{[ \langle 00 | H' | k0 \rangle ]^2_{Av}}{E_{00} - E_{k0}} \right\} \right] + \\
 &+ \left[ \sum_{i \neq 1} \frac{[ \langle 01 | H' | 0i \rangle ]^2_{Av}}{E_{01} - E_{0i}} - \sum_{i \neq 0} \frac{[ \langle 00 | H' | 0i \rangle ]^2_{Av}}{E_{00} - E_{0i}} \right] + \\
 &+ \left[ \sum_{\substack{k \neq 0 \\ i \neq 1}} \frac{[ \langle 01 | H' | ki \rangle ]^2_{Av}}{E_{01} - E_{ki}} - \sum_{\substack{k \neq 0 \\ i \neq 0}} \frac{[ \langle 00 | H' | ki \rangle ]^2_{Av}}{E_{00} - E_{ki}} \right] \quad (4)
 \end{aligned}$$

Esta equação retém claramente as quatro contribuições distintas que devem ser consideradas na aproximação adotada. Como a dinâmica molecular detalhada da transição é desconhecida, a perturbação é representada em termos do campo elétrico Em, que o solvente produz em um sítio do soluto. O operador interação é aproximado para:

$$H' = -E_m \cdot \mu_{\text{soluto}} \quad (5)$$

onde,  $\mu_{\text{soluto}}$  é o operador momento de dipolo nas coordenadas do soluto. Funções de onda para o sistema, que são produtos simples de funções de onda de moléculas isoladas, são introduzidas de tal forma que cada elemento da matriz de perturbação na equação (4) pode ser expressa como na equação (6), de modo que sejam um produto de três termos:

$$\langle 0i | H' | kj \rangle = \langle 0i | -E_m \cdot \mu_{\text{solute}} | kj \rangle = - \langle 0 | E_m | k \langle i | \mu_{\text{solute}} | j \rangle \cdot \cos \theta \quad (6)$$

(a) um termo que representa o campo elétrico no sítio do soluto produzido pelo  $\mu_{0k}$ -ésimo momento de dipolo permanente ou de transição do solvente; (b) um termo que representa o momento de dipolo permanente ou de transição do soluto; (c) um termo que representa um efeito das orientações mútuas do solvente e cromóforo <sup>(11)</sup>.

#### A- INTERAÇÃO ENTRE OS DÍPOLOS PERMANENTES DO SOLUTO E SOLVENTE:

O primeiro termo da equação (4) representa a interação dos dipolos permanentes das moléculas de solvente e cromóforo e pode ser escrito como:

$$\begin{aligned} [\langle 01 | H' | 01 \rangle]_{Av} - [\langle 00 | H' | 00 \rangle]_{Av} &= -E_{m,perm} \cdot [\mu_{\text{solute}}^1 - \mu_{\text{solute}}^0] \\ &= -E_{m,perm} \cdot [\mu_{\text{solute}}^1 \cdot \cos \beta - \mu_{\text{solute}}^0] \quad (7) \end{aligned}$$

onde,  $\mu_{\text{solute}}^1$  e  $\mu_{\text{solute}}^0$  são as magnitudes dos momentos de dipolo permanente dos estados excitado e fundamental, respectivamente, do cromóforo;  $\beta$  é o ângulo entre eles no sistema de coordenadas moleculares,  $E_{m,perm}$  é o campo que os dipolos permanentes do meio solvente produz no sítio do cromóforo e pode ser avaliado pelo método de campo de reação em termos de  $\mu_{\text{solute}}^0$ , da constante

dielétrica  $\epsilon$ , e do índice de refração  $n$  da solução. Se for feita a aproximação de que o cromóforo é uma partícula esférica de raio  $d$ , a expressão seguinte é obtida<sup>(11)</sup>:

$$E_{m,perm} = \frac{2 \cdot \mu_{\text{soluto}}^0}{d^3} \left[ \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] \quad (8)$$

Considerando-se que no equilíbrio, antes da excitação,  $E_{m,perm}$  deve ser paralelo a  $\mu_{\text{soluto}}^0$  ( $\cos\theta = 1$ ), temos que o primeiro termo da equação (4) contribui com o seguinte deslocamento espectral<sup>(11)</sup>:

$$\begin{aligned} [\langle 01 | H' | 01 \rangle]_{Av} - [\langle 00 | H' | 00 \rangle]_{Av} &= \\ &= -2 \left[ (2d^{-3}) \cdot (\mu_{\text{soluto}}^0) \cdot (\mu_{\text{soluto}}^1 \cdot \cos\beta - \mu_{\text{soluto}}^0) \right] \times \\ &\quad \times \left[ \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] \\ &= D \left[ \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] \quad (9) \end{aligned}$$

A derivação das equações (8) e (9) assume que a orientação dos dipolos permanentes do solvente não pode mudar durante o processo de excitação e só são aplicadas a moléculas com grandes dipolos permanentes no estado fundamental<sup>(11)</sup>.

B - INTERAÇÃO ENTRE O DIPOLO PERMANENTE DO SOLUTO E O DIPOLO INDUZIDO DO SOLVENTE:

O segundo termo da equação (4) pode ser representado em termos da interação do momento de dipolo permanente de um cromóforo polar com o campo de reação  $E_{m,induzido}$ , devido à polarização eletrônica do solvente induzida pelo momento de dipolo permanente do cromóforo.  $E_{m,induzido}$  é diferente para cada estado eletrônico do cromóforo, mas para ambos os estados, o termo  $\cos\theta$  da equação (6) é igual à unidade. A magnitude apropriada de  $E_{m,induzido}$  para o estado  $i$ -ésimo do cromóforo pode, então, ser aproximada por um campo de reação de um contínuo polarizável de constante dielétrica  $n^2$ , que é produzido devido ao momento de dipolo pontual  $\mu_{soluto}$ , localizado no centro de uma cavidade de raio  $d$ . A equação correspondente é <sup>(11)</sup>:

$$\begin{aligned} \sum_{k \neq 0} \left\{ \frac{[|\langle 01 | H' | ki \rangle|^2]_{Av}}{E_{00} - E_{ki}} - \frac{[|\langle 00 | H' | k0 \rangle|^2]_{Av}}{E_{00} - E_{k0}} \right\} &= \\ = - \left[ \frac{1}{2} \right] \cdot \left[ E_{m,induzido}^1 \cdot \mu_{soluto}^1 - E_{m,induzido}^0 \cdot \mu_{soluto}^0 \right] &= \\ = - \left[ d^{-3} \cdot (\mu_{soluto}^1)^2 - (\mu_{soluto}^0)^2 \right] \cdot \left[ \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] &= \\ = C \cdot \left[ \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] & \quad (10) \end{aligned}$$

C - INTERAÇÃO ENTRE O DIPOLO INDUZIDO DO SOLUTO E DIPOLO PERMANENTE DO SOLVENTE:

O terceiro termo da equação (4) é o mais difícil de ser avaliado, exceto no caso usual de um solvente não polar. Como Mc Rae observou, não pode ser resolvido pela aproximação do campo de reação que pode ser utilizada para os outros termos. Foram feitas soluções aproximadas desse termo para o caso de solutos não polares e solventes polares, no qual o mesmo tem uma contribuição significativa <sup>(11)</sup>.

No caso limite, no qual o soluto é aproximadamente isotrópico, as somas nesse terceiro termo podem ser decompostas no produto de um campo médio quadrado (Stark) e a polarizabilidade do estado apropriado do soluto <sup>(11)</sup>.

O efeito Stark do solvente considera o modelo no qual a molécula do soluto ocupa uma cavidade esférica de raio  $d$ , a qual é atribuída uma polarizabilidade  $\alpha$ . Essa cavidade é circundada por uma camada esférica do solvente de raio  $R$ , que é denominada camada do solvente. Considera-se que a cavidade esférica do soluto e a camada do solvente estão imersas em um meio contínuo (solução), que possui uma constante dielétrica,  $\epsilon$ . Para cada configuração das moléculas na camada do solvente, há uma polarização líquida resultante  $M_s$  que produz um campo  $E_s$  no sítio da molécula do soluto <sup>(11)</sup>.

Se o campo Stark e o soluto são orientados

aleatoriamente, tem-se que<sup>(11)</sup>:

$$\begin{aligned} \sum_{i \neq 0} \frac{[|\langle 00 | H' | 0i \rangle|^2]_{Av}}{E_{00} - E_{0i}} &= \sum_{i \neq 0} \frac{[|E_{m,perm} \langle 0 | \mu_{\text{solute}} | i \rangle \cos \theta|^2]_{Av}}{E_{00} - E_{0i}} = \\ &= - \left[ (E_{m,perm})^2 / 3 \right]_{Av} \cdot \sum_{i \neq 0} \frac{(\langle 0 | \mu_{\text{solute}} | i \rangle)^2}{E_{00} - E_{0i}} \quad (11) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum_{i \neq 1} \frac{[|\langle 01 | H' | 0i \rangle|^2]_{Av}}{E_{01} - E_{0i}} - \sum_{i \neq 0} \frac{[|\langle 00 | H' | 0i \rangle|^2]_{Av}}{E_{00} - E_{0i}} &= \\ &= - \left[ (E_{m,perm})^2 / 3 \right]_{Av} \cdot [\alpha_{\text{solute}}^1 - \alpha_{\text{solute}}^0] \quad (12) \end{aligned}$$

onde,  $\alpha_{\text{solute}}^0$  e  $\alpha_{\text{solute}}^1$  representam as polarizabilidades dos estados inicial e final do soluto, respectivamente. Não é claro se a orientação aleatória em relação ao campo Stark é válida para solutos polares, mas como este termo é pouco significativo em relação aos outros termos para esse tipo de soluto, a equação (12) pode ser utilizada. A aproximação de Mc Rae para esse termo pode ser utilizada<sup>(11)</sup>.

$$\left[ (E_{m,perm})^2 / 3 \right]_{Av} = \left( [E_{m,perm}]_{Av} \right)^2 / 3 \quad (13)$$

onde  $[E_{m,perm}]_{Av}$  é tomado como o campo de reação do solvente em relação ao dipolo permanente do soluto<sup>(11)</sup>.

O valor de  $[\langle E_{m,perm} \rangle^2]_{Av}$  é calculado através da expressão abaixo<sup>(11)</sup>.

$$[\langle E_{m,perm}^2 \rangle]_{Av}/3 = \left[ \frac{108.1n^2(R/d)}{R^3} \right] \cdot \left[ \frac{(\epsilon - n^2) \cdot (2\epsilon + n^2)}{\epsilon \cdot (n + 2)^2} \right] \quad (14)$$

e a equação (13) torna-se<sup>(11)</sup>:

$$\begin{aligned} \sum_{i \neq 1} \frac{[|\langle 01 | H' | 0i \rangle|^2]_{Av}}{E_{01} - E_{0i}} - \sum_{i \neq 0} \frac{[|\langle 00 | H' | 0i \rangle|^2]_{Av}}{E_{00} - E_{0i}} &= - \left( \frac{[\langle E_{m,perm}^2 \rangle]_{Av}}{3} \right) \times \\ &\quad (\alpha_{soluto}^1 - \alpha_{soluto}^0) \\ &= \left[ \frac{108.1n^2(R/d)}{R^3} \right] kT (\alpha_{soluto}^1 - \alpha_{soluto}^0) \left[ \frac{(\epsilon - n^2) \cdot (2\epsilon + n^2)}{\epsilon \cdot (n + 2)^2} \right] = \\ &= B' \cdot \left[ \frac{(\epsilon - n^2) \cdot (2\epsilon + n^2)}{\epsilon \cdot (n + 2)^2} \right] \quad (15) \end{aligned}$$

#### D- INTERAÇÃO ENTRE DIPOLOS MUTUAMENTE INDUZIDOS DO SOLUTO E SOLVENTE:

O termo final da equação (4) representa a polarização de dipolo mutuamente induzida das moléculas do solvente (as forças de London). Cada soma nesse termo pode ser expressa como séries de energia de polarização para um meio de constante dielétrica igual a  $\epsilon^2$  reagindo com os dipolos de transição  $\mu_{soluto}^{ij}$ . Para o típico soluto esférico, cada termo nessas séries é multiplicado por um

fator  $A_{ij}$ , dependendo das frequências de transição do soluto e solvente <sup>(11)</sup>.

$$A_{ij} = 1 - \left( \frac{\nu_{ij}}{\bar{\nu}_{ij}} \right) \quad (16)$$

onde,

$$\bar{\nu}_{ji} = \sum_{k \neq 0} \frac{\nu_{k0} (c_{\mu_{\text{solvente}}}^{k0})^2}{\nu_{k0}^2 - \nu_{ji}^2} \Bigg/ \sum_{k \neq 0} \frac{(c_{\mu_{\text{solvente}}}^{k0})^2}{\nu_{k0}^2 - \nu_{ji}^2} \quad (17)$$

é o recíproco do comprimento de onda médio de Mc Rae do espectro de absorção do solvente. Em termos dos parâmetros definidos acima, a contribuição das forças de London para o deslocamento espectral <sup>(11)</sup> é:

$$\left[ \sum_{\substack{k \neq 0 \\ i \neq 1}} \frac{[ |\langle 01 | H' | ki \rangle|^2 ]_{Av}}{E_{01} - E_{ki}} \right] - \left[ \sum_{\substack{k \neq 0 \\ i \neq 0}} \frac{[ |\langle 00 | H' | ki \rangle|^2 ]_{Av}}{E_{00} - E_{ki}} \right] =$$

$$- \left[ \left( \sum_{i \neq 1} A_{ji} \frac{(c_{\mu_{\text{solute}}}^{11})^2}{d^3} \left[ \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] \right) - \left( \sum_{i \neq 0} A_{0i} \frac{(c_{\mu_{\text{solute}}}^{0i})^2}{d^3} \left[ \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] \right) \right] \quad (18)$$

Para cada termo  $i$ -ésimo dessas somas, o índice de refração do solvente deve ser avaliado na frequência  $\nu_{ij}$ . Essa dispersão é desprezada frequentemente de modo que a equação (18) anterior pode ser fatorada para fornecer, aproximadamente, o resultado apresentado na equação (19) <sup>(11)</sup>.

$$\begin{aligned}
& \left[ \sum_{\substack{k \neq 0 \\ i \neq 1}} \frac{[ \langle 01 | H' | ki \rangle ]^2 J_{Av}}{E_{01} - E_{ki}} \right] - \left[ \sum_{\substack{k \neq 0 \\ i \neq 0}} \frac{[ \langle 00 | H' | ki \rangle ]^2 J_{Av}}{E_{00} - E_{ki}} \right] = \\
& = - \left[ \frac{1}{d^3} \right] \cdot \left[ \left( \sum_{i \neq 1} A_{1i} (\mu_{\text{soluto}}^{1i})^2 \right) - \left( \sum_{i \neq 0} A_{0i} (\mu_{\text{soluto}}^{0i})^2 \right) \right] \cdot \left[ \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] = \\
& = A \cdot \left[ \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] \tag{19}
\end{aligned}$$

Isto completa a decomposição da equação (4). No caso de um espectro de absorção, este pode ser expresso em termos de propriedades macroscópicas dos componentes e parâmetros do modelo acima através da combinação das equações (9), (10), (15) e (19), resultando em <sup>(11)</sup>:

$$\begin{aligned}
\langle \Delta \epsilon(00-01) \rangle_{Av} &= (A + C) \cdot \left[ \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] + B' \cdot \left[ \frac{(\epsilon - n^2) \cdot (2\epsilon + n^2)}{\epsilon \cdot (n + 2)^2} \right] + \\
&+ D \cdot \left[ \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] \tag{20}
\end{aligned}$$

Os parâmetros A, B', C e D são as constantes a serem avaliadas à partir dos resultados experimentais ou em termos das expressões dependentes do modelo desenvolvido anteriormente <sup>(11)</sup>.

$$A = - \left[ \sum_{i \neq 1} A_{1i} (\mu_{\text{soluto}}^{1i})^2 - \sum_{i \neq 0} A_{0i} (\mu_{\text{soluto}}^{0i})^2 \right] / d^3 \tag{21}$$

$$B = - [108 \cdot \ln^2(R/d) kT (\alpha_1 - \alpha_0)] / R^3 \tag{22}$$

$$C = - \left[ (\mu_{\text{soluto}}^1)^2 - (\mu_{\text{soluto}}^0)^2 \right] / d^3 \tag{23}$$

$$D = - 2. \left[ \mu_{\text{solute}}^0 \cdot \mu_{\text{solute}}^1 - (\mu_{\text{solute}}^0)^2 \right] / d^3 \quad (24)$$

As equações (21) a (23), também são aplicáveis à emissão do estado  $i$  para o estado fundamental. No entanto, a expressão apropriada de  $D_e$ , para um espectro de emissão pode diferir da equação (24) quando o tempo de vida do estado excitado é maior do que o tempo de reorientação dielétrica. Nesse caso a expressão para  $D_e$  é <sup>(11)</sup>:

$$D_e = - 2 \left[ (\mu_{\text{solute}}^1)^2 - (\mu_{\text{solute}}^1 \cdot \mu_{\text{solute}}^0) \right] / d^3 = - D + 2C \quad (25)$$

A aplicação da equação (20) a um problema arbitrário deve ser realizada cuidadosamente, uma vez que essa foi derivada com aproximações, algumas das quais incompatíveis mutuamente. Cada termo da equação (20) representa o termo principal em uma aproximação semi-clássica das propriedades da solução. Essa equação deve se aproximar muito do comportamento das contribuições dominantes para o deslocamento espectral para um par soluto-solvente particular. No entanto, os termos das expressões exatas das contribuições dominantes que tenham sido omitidas podem ser maiores do que os termos principais das contribuições menores em um caso particular. O termo que envolve  $B'$  e representa a interação do dipolo induzido do soluto com o dipolo permanente do solvente, por exemplo, pode ser desprezível em relação a outros termos omitidos na expressão da interação dos dipolos permanentes para o caso de um soluto polar em um solvente polar <sup>(11)</sup>.

#### 1.4- APLICAÇÃO DAS TEORIAS DE DESLOCAMENTOS ESPECTRAIS AOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS:

Esta seção tem por finalidade ilustrar alguns fenômenos representativos que podem ser explicados pelas teorias discutidas na seção 1.3<sup>(11)</sup>.

##### 1.4.1- HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS COMO CROMÓFOROS NÃO-POLARES:

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos condensados parecem ser bons protótipos de cromóforos não-polares e tem sido utilizados frequentemente para estudos de deslocamentos espectrais<sup>(11)</sup>.

Um exemplo consiste em se aplicar a teoria descrita anteriormente aos dados obtidos por Weigang e Wild para a transição eletrônica  ${}^1L_a$  do tetraceno. Um gráfico da frequência da banda 0-0 da transição  ${}^1L_a$  do tetraceno versus a função  $(n^2-1)/(2n^2+1)$  (figura 1.1), mostra como estes dados são correlacionados quando só se considera a contribuição da polarização induzida mútua do soluto e do solvente<sup>(11)</sup>.

As linhas na figura 1.1 representam os ajustes do valor A da equação (19) por quadrados mínimos, usando os dados para os diversos solventes: hidrocarbonetos, haloalcanos, álcoois e cetonas. Embora um ajuste relativamente bom tenha sido obtido

dentro de cada classe de solventes, exceto para os álcoois, os valores de  $A$  calculados diferem por um fator de 2. Há, também, uma grande variação nos valores calculados de  $\nu_0$ , obtidos por extrapolação para: índice de refração igual à unidade<sup>(12)</sup>.

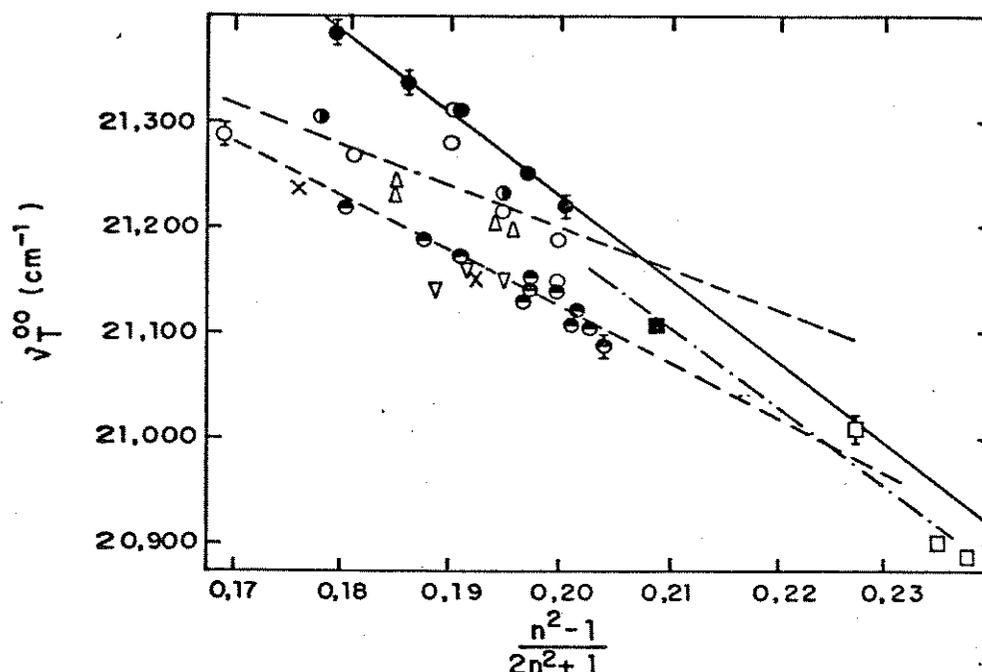


Figura 1.1: Gráfico do número de onda experimental da banda 0-0 da transição  $^1L_a$  do tetraceno versus a função  $(n^2-1)/(2n^2+1)$  para 39 solventes, onde  $n$  é o índice de refração do solvente. As curvas representam os ajustes por quadrado mínimo da correlação entre estas variáveis para os hidrocarbonetos (—), haloalcanos (-.-.-), álcoois (- - -) e cetonas (-.-.-)<sup>(11)</sup>.

Quando se considera, também a contribuição da interação entre o dipolo induzido do soluto e o dipolo permanente do

solvente, há um melhor ajuste dos dados, que pode ser verificado através da figura 1.2<sup>(12)</sup>.

A figura 1.2 consiste no gráfico das frequências de transição experimentais versus os deslocamentos das frequências calculados com os melhores parâmetros de ajuste (A e B'), segundo as contribuições citadas<sup>(12)</sup>.

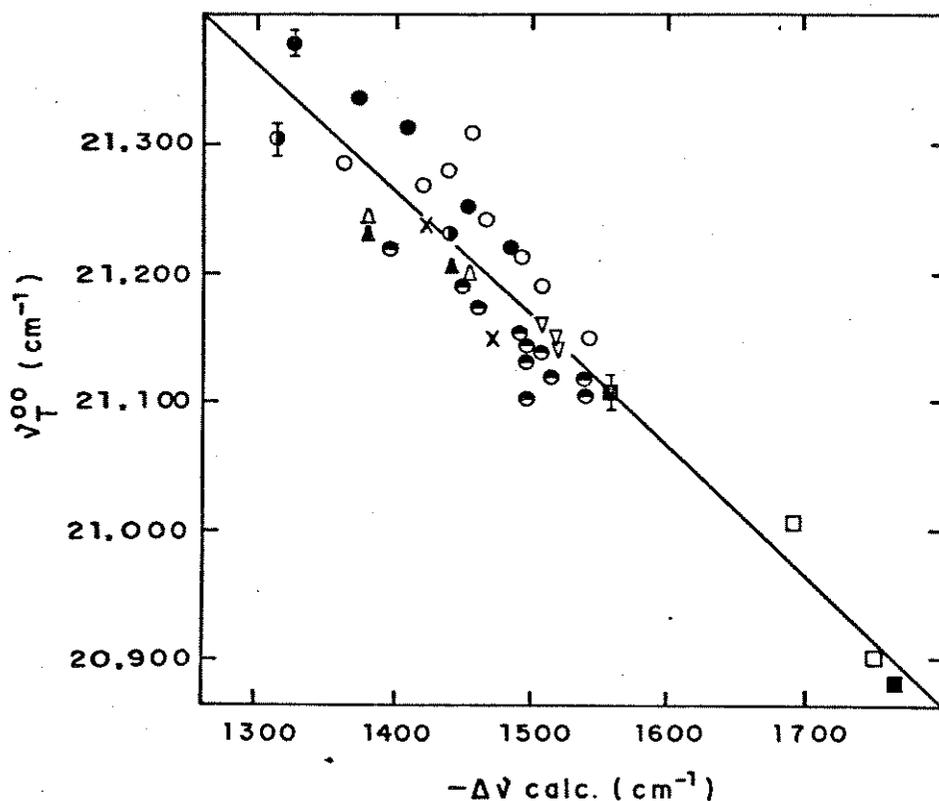


Figura 1.2: Gráfico do número de onda experimental da banda 0-0 da transição  $^1L_a$  do tetraceno versus o deslocamento do número de onda para o melhor ajuste destes dados, A e B<sup>(11)</sup>.

Similarmente, bons ajustes foram obtidos por Nicol e colaboradores para várias bandas vibrônicas das transições  $^1L_a$  e  $^1L_b$  de cinco outros hidrocarbonetos aromáticos, incluindo o antraceno<sup>(11)</sup>.

#### 1.4.2- DERIVADOS POLARES DOS HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS:

A dependência dos espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta próximo e de fluorescência da estrutura da antronitrila ilustra algumas das mudanças mais simples que ocorrem em hidrocarbonetos aromáticos<sup>(11)</sup>.

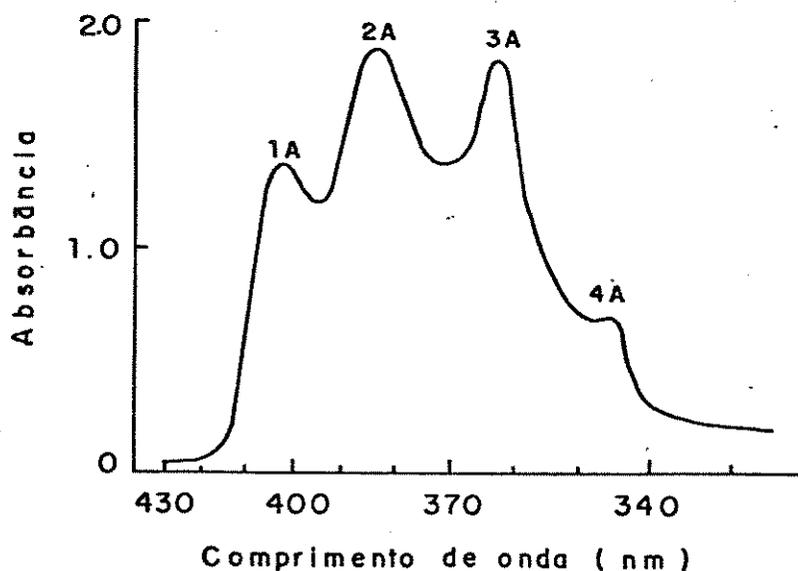


Figura 1.3: Espectro eletrônico de absorção no ultravioleta próximo da antronitrila ( $1 \times 10^{-4}$  M em formamida a  $25^\circ\text{C}$ )<sup>(11)</sup>.

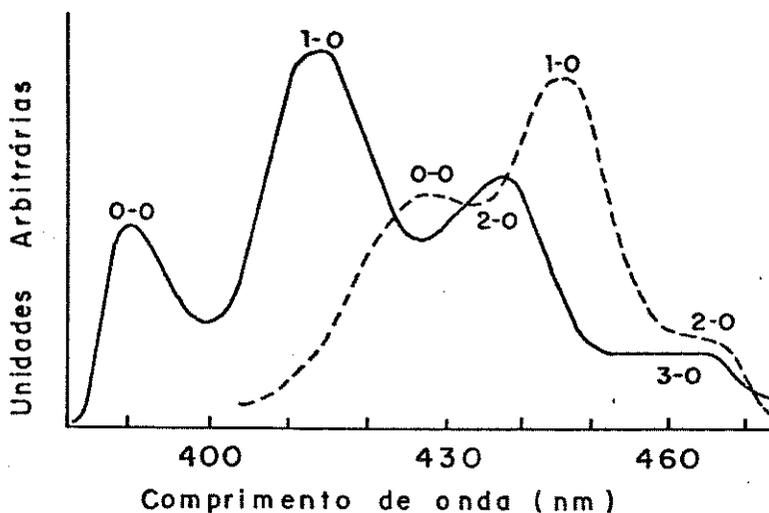


Figura 1.4: Espectros eletrônicos de emissão de fluorescência do antraceno (—) e da antronitrila (---) em um filme de poliacrilonitrila a 25°C<sup>(11)</sup>.

A influência do solvente nas energias das três bandas do espectro de absorção (1A, 2A e 3A) e da banda 1-0 do espectro de fluorescência da antronitrila podem ser ajustados consideravelmente bem à partir da equação (20), onde se considera, também, a interação entre os dipolos permanentes do soluto e solvente, e a interação entre o dipolo permanente do soluto e o dipolo induzido do solvente<sup>(11)</sup>.

Os valores obtidos para os parâmetros A, B', C e D ou De para estas bandas são comparados na tabela 1.3 com os valores obtidos para a banda de absorção 0-0 do antraceno pelo ajuste de quadrados mínimos<sup>(11)</sup>.

Tabela 1.3: Melhores valores de ajuste dos parâmetros da expressão de deslocamento do solvente (equação (20)) para a antronitrila e antraceno<sup>(11)</sup>.

TRAN-SIÇÃO	SOLVENTES	(cm <sup>-1</sup> )			
		$\nu_0$	$(A+C)\times 10^{-3}$	B'	$D\times 10^{-1}$
ANTRONITRILA					
1A	nitrometano	26579±37	-8,0±0,3	-12±3	-32±4
2A	acetato de etila	27931±37	-7,9±0,5	-13±5	-41±6
3A	ácido acético	28083±20	-3,2±0,2	-3±2	-4±2
1-OE	acetato de amila	25441±127	-11,0±1,2	-20±12	-102±13
ANTRACENO					
0-0	1-bromobutano	27894±76	-6,6±0,3	-15,1±0,7	-9,5±4,3

Os valores de (A+C) para as bandas eletrônicas de absorção 1A e 2A e para a banda eletrônica de emissão da antronitrila são comparáveis, mas levemente maiores do que o valor de A das bandas correspondentes do antraceno. Isto é coerente, pois a principal contribuição para A de ambas as moléculas é o termo relativo à polarizabilidade do sistema de elétrons  $\pi$  do anel do antraceno. Há ainda a contribuição adicional do grupo ciano na polarizabilidade da antronitrila<sup>(13)</sup>.

Como era esperado para uma molécula polar, os valores de D para as bandas 1A, 2A, e a de emissão da acetronitrila são diferentes de zero. O quociente obtido pela divisão do valor do

parâmetro D para a banda de emissão pelo valor do parâmetro D referente à banda de absorção correspondente deve indicar a magnitude do momento de dipolo do estado excitado, se os momentos dos estados excitado e fundamental são paralelos (ou antiparalelos) e a relaxação dielétrica completa ocorre durante o tempo de vida do estado excitado<sup>(13)</sup>. Esta razão  $D_e/D$  sugere que o momento de dipolo do estado excitado é  $3 \pm 1$  vezes maior que o do estado fundamental<sup>(11)</sup>. Embora uma interpretação precisa deste número esteja sujeita a uma considerável incerteza, este resultado indica claramente uma mudança significativa no momento de dipolo na excitação deste estado da antronitrila. Mudanças no momento de dipolo desta magnitude não são muito grandes, no entanto, deve haver uma mistura da transição  $^1L_a$  com um processo de transferência de carga do substituinte do anel<sup>(13)</sup>.

O grande valor negativo do valor de D para a banda 1A e 2A, indica que a separação entre as bandas 0-0 dos espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência aumenta com o aumento da constante dielétrica do solvente. Cerca de dois terços da separação 0-0 é atribuída ao termo que envolve o parâmetro D na equação (19), enquanto que um terço deste efeito é atribuído ao termo que envolve o parâmetro B,<sup>(13)</sup>.

## 1.5- EFEITO DO SOLVENTE NOS ESPECTROS ELETRONICOS DE UM SOLUTO EM UMA MATRIZ POLIMERICA:

Este estudo é consideravelmente simplificado se são utilizados para comparação solventes líquidos, nos quais o soluto apresenta espectros eletrônicos de absorção e de emissão idênticos àqueles do soluto na matriz polimérica, isto é, a matriz polimérica e o solvente devem fornecer ambientes químicos similares para a molécula do soluto. Para o poliacrilonitrila o solvente modelo seria a acetonitrila, por exemplo. Para o polietileno tereftálico, o solvente de estudo deve ser o benzoato de etila ou o tereftalato de di-butila<sup>(14)</sup>.

Através da teoria de perturbação de segunda ordem, Mataga e Kubota<sup>(15)</sup> elaboraram as seguintes equações para calcular os deslocamentos espectrais relativos dos espectros de absorção e fluorescência em diferentes solventes, considerando que o termo  $f^2$  é nulo:

$$\Delta\bar{\nu}_A^{\max} = \bar{\nu}_A^{\max} - \bar{\nu}_0 = \delta_A - B_p - C \cdot \mu_0 \cdot (\mu_e - \mu_0) \cdot f \quad (26)$$

$$\Delta\bar{\nu}_E^{\max} = \bar{\nu}_E^{\max} - \bar{\nu}_0 = \delta_E - B_p - C \cdot \mu_0 \cdot (\mu_e - \mu_0) \cdot f \quad (27)$$

onde:  $p = (n^2 - 1)/(2n^2 + 1)$  e  $f = [(\epsilon - 1)/(\epsilon + 2) - (n^2 - 1)/(n^2 + 2)]$ , B e C são funções do soluto,  $\Delta\bar{\nu}_A^{\max}$  e  $\Delta\bar{\nu}_E^{\max}$  são os deslocamentos espectrais do máximo dos espectros de absorção e emissão, respectivamente,  $\bar{\nu}_A$  e  $\bar{\nu}_E$  são números de onda máximos. Os termos  $\delta_A$

e  $\delta_E$  são os números de onda máximos corrigidos em relação à transição 0-0 dos espectros eletrônicos de absorção e emissão. A magnitude dos momentos de dipolo do soluto nos estados eletrônicos fundamental e excitado são  $\mu_0$  e  $\mu_e$ , respectivamente<sup>(14)</sup>.

O deslocamento de Stokes é dado nesta aproximação por<sup>(14)</sup>:

$$\bar{\nu}_A^{\max} - \bar{\nu}_E^{\max} = (\delta_A + \delta_E) + C.(\mu_e - \mu_0)^2.f \quad (28)$$

Espectros de absorção são devidos a transições eletrônicas do estado de equilíbrio fundamental para o estado excitado de Franck-Condon, isto é, as configurações moleculares do estado de equilíbrio fundamental do soluto e do solvente é mantida. A reorientação das moléculas do solvente em relação ao estado excitado de equilíbrio dura o tempo  $\tau_R$ , tempo de relaxação. Se o tempo de vida médio  $\tau_E$  dos solutos no estado excitado é muito menor que  $\tau_R$ , a emissão ocorre à partir do estado excitado de Franck-Condon e o lado direito da equação (27) é substituído pelo lado direito da equação (26) com  $-\delta_E$  ao invés de  $+\delta_A$ . Isto, no entanto, é exceção para solventes líquidos à temperatura ambiente. O tempo de vida  $\tau_E$  para transições permitidas é da ordem de  $1 \times 10^{-9}$  s<sup>(14)</sup>.

Polímeros sintéticos, geralmente apresentam regiões cristalinas e amorfas. Aceita-se que moléculas do soluto migram para a parte amorfa no processo de adição do corante<sup>(14)</sup>.

É uma questão discutida, se corantes e moléculas fluorescentes com graus internos de liberdade possuem tempos de relaxação  $\tau_R < 1 \times 10^{-9}$  s à temperatura ambiente em polímeros com grupos polares e não polares. Não é pré-requisito que o soluto relaxe em um nanosegundo, mas que o sistema inteiro do soluto, assim como as moléculas do *solvente* imediatamente próximas, relaxem neste intervalo de tempo<sup>(14)</sup>.

Para exemplificar a aplicação da teoria de deslocamento espectral anterior a sistemas onde o *solvente* é um polímero, escolheu-se o polietileno tereftálico (em poliéster, PES), pois as propriedades deste, que contém grupos éster polares, são relativamente bem conhecidas. Obteve-se os números de ondas máximos da banda de maior comprimento de onda dos espectros eletrônicos de absorção e fluorescência de 15 solutos diferentes (agentes branqueantes fluorescentes) em 10 solventes líquidos, assim como em polietileno de tereftalato (poliéster, PES) em tecido e filme. Estes dados foram ajustados de acordo com as equações (26) e (27)<sup>(14)</sup>.

Foi realizada uma análise de regressão linear múltipla dos dados dos espectros de absorção e fluorescência, segundo as equações (26) e (27) com a finalidade de se estimar os valores dos parâmetros  $p$  e  $f$  para o filme e tecido de poliéster e, de se calcular através destes parâmetros o índice de refração  $n$  e a permissividade  $\epsilon$  (à baixa frequência) efetiva nos sítios das moléculas do soluto. Isto foi feito separadamente para cada um dos

15 solutos  $i$ , e a seguir somou-se e calculou-se a média<sup>(14)</sup>:

$$\frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} \nu_{A,ij}^{\max} = \frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} (\nu_o + \delta_A)_i - \left( \frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} B_i \right) \cdot p_j - \left( \frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} [C \mu_o (\mu_e - \mu_o)] \right) f_j \quad (29)$$

$$\frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} \nu_{E,ij}^{\max} = \frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} (\nu_o + \delta_E)_i - \left( \frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} B_i \right) \cdot p_j - \left( \frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} [C \mu_o (\mu_e - \mu_o)] \right) f_j \quad (30)$$

$$(\tau_R \ll \tau_E)$$

As equações de regressão resultantes são<sup>(14)</sup>:

$$\frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} \nu_{A,ij}^{\max} = (29940 \pm 360) - (11080 \pm 1600) \cdot p_j - (330 \pm 200) \cdot f_j \quad (31)$$

$$\frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} \nu_{E,ij}^{\max} = (26280 \pm 750) - (11670 \pm 3300) \cdot p_j - (1470 \pm 400) \cdot f_j \quad (32)$$

No entanto, verificou-se que para o poliéster,  $\tau_R \gg \tau_E$  e que para o último termo da equação (32) tem que ser substituído por aquele da equação (31). Este coeficiente, no entanto, é mais do que 30 vezes menor do que aquele do termo  $p$ . Como  $p$  e  $f$  são da mesma ordem de grandeza para solventes polares, isto mostra que para polietileno tereftalato o valor pequeno ou nulo de  $f$  é desprezível quando comparado com o termo  $p$ <sup>(14)</sup>.

Reddish<sup>(16)</sup> estudou as propriedades dielétricas deste polímero nos estados cristalino e amorfo nas condições úmido e

seco, e verificou que a contribuição devida ao termo  $f$  está dentro da incerteza do valor de  $p$  e é desprezível para todos os valores de  $\epsilon$  e  $n$  para este polímero.

Em princípio, deve ser possível prever se o termo  $f$  tem uma contribuição significativa no deslocamento espectral causado por solvente, como foi sugerido por medidas dielétricas. As moléculas do soluto adequadas devem possuir valores de momento de dipolo ( $\mu_0$ ) altos no estado eletrônico fundamental, e a diferença  $\mu_e - \mu_0$  deve ser significativa. Lippert e co-autores<sup>(17)</sup> obtiveram espectros eletrônicos de absorção dessas moléculas e verificaram que os coeficientes de  $f$  têm valores altos. Os coeficientes de  $p$  nas equações (31) e (32), que devem ser idênticos nesta aproximação, estão dentro dos limites de confiança.

As figuras 1.5 e 1.6 mostram os números de onda observados para os máximos de absorção e fluorescência versus aqueles calculados segundo as equações (31) e (32), respectivamente. A eliminação do termo  $f^2$  parece ser justificada para esta escolha de solutos e solventes, verificando-se o ajuste excelente das equações de regressão múltipla linear. Só para solutos com momentos de dipolo muito diferentes nos estados fundamental e excitado, assim com altos valores de  $\mu_0$ , este termo é importante.

Os valores calculados para o polietileno tereftalato (com  $n = 1,66$  para o tecido e  $n = 1,70$  para o filme de poliéster ( $f_{\text{PES}} = 0$ )) estão muito próximos dos números de onda observados.

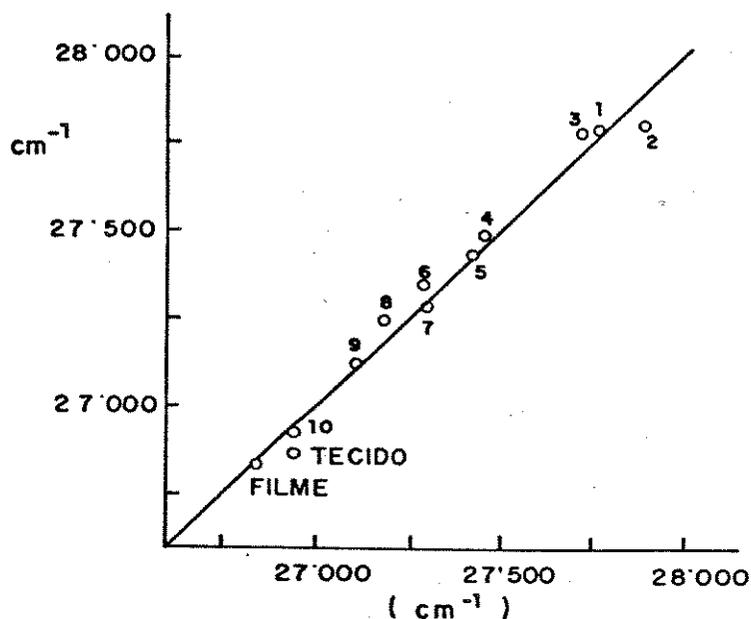


Figura 1.5: Gráfico dos números de onda observados versus os calculados a partir da média dos máximos de absorção  $\frac{1}{15} \sum_{j=1}^{15} \nu_{A,ij}^{\text{max}}$  nos solventes  $j=1$  a  $j=10$ , assim como em tecido ( $n=1,66$ ;  $f=0$ ) e filme de polietileno tereftalato ( $n=1,70$ ;  $f=0$ ). Os solventes indicados na figura são: 1-acetato de etila, 2-hexano, 3-ciclohexano, 4-N,N-dimetil formamida, 5-tolueno, 6-tereftalato de di-butila, 7-benzoato de etila, 8-cloro-benzeno, 9-benzoato de benzila e 10-1-cloro-naftaleno<sup>(14)</sup>.

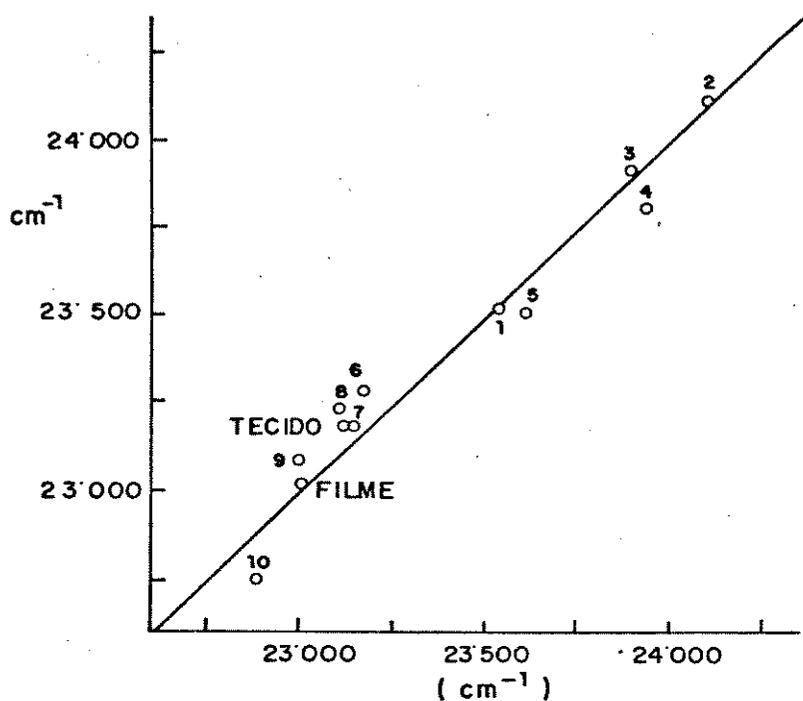


Figura 1.6: Gráfico dos números de onda observados versus calculados a partir da média dos máximos de emissão de fluorescência  $\frac{1}{15} \sum_{i=1}^{15} \nu_{E,ij}^{\max}$  nos solventes  $j=1$  a 10, assim como em tecido de polietileno tereftalato ( $n=1,66$  ;  $f=0$ ) e filme ( $n=1,70$  ;  $f=0$ ). A numeração dos solventes é a mesma da figura 1.5<sup>(14)</sup>.

## 1.6- OBJETIVOS:

Este trabalho tem por objetivo principal, o estudo do comportamento fotofísico da fluoresceína em duas classes distintas de solventes: (a) líquidos, pouco-viscosos ou não-viscosos e (b) rígidos, viscosos.

A primeira parte do trabalho consiste, então, na análise dos espectros eletrônicos de absorção UV/VIS e emissão da fluoresceína em diferentes solventes não-viscosos, visando:

(A) A identificação das bandas características das várias formas de dissociação presentes em soluções aquosas diluídas em pH diferentes;

(B) A identificação de agregados de várias ordens e o tipo de disposição geométrica dos monômeros em soluções aquosas saturadas em uma faixa de pH;

(C) A atribuição das bandas características da forma neutra lactônica da fluoresceína em solventes apróticos (acetato de etila, acetona e dioxano) e a influência do aumento da concentração;

(D) A caracterização dos equilíbrios químicos de dissociação do corante em solventes próticos (etanol, etileno glicol) e, como no caso anterior, o efeito de aumento da concentração;

(E) O estudo da fotofísica da fluoresceína na forma cristalina dispersa em nujol.

A segunda parte do trabalho visa identificar as formas de

dissociação do corante, através do estudo comparativo do comportamento deste disperso nos solventes rígidos como: poli(acetato de vinila) e poli(álcool vinílico), e nos solventes líquidos, cujas estruturas são análogas às unidades repetitivas dos polímeros como: acetato de etila e etanol, relacionados, respectivamente, ao primeiro e segundo polímeros citados.

Além disto, e a nível preliminar, procurar-se-á identificar os diferentes sítios de adsorção dos polímeros e as diferentes formas dispersas da fluoresceína em cada um deles.

Propõe-se, ainda, correlacionar os deslocamentos espectrais observados nos polímeros em relação aos solventes orgânicos a modelos já existentes e às propriedades físico-químicas, como parâmetros de solubilidade ( $\delta_t$ ).

#### 1.7- REFERENCIAS - INTRODUÇÃO TEÓRICA:

- (1) Allen, N. S., Mc Kellar, J. F., "Photochemistry of Dyed and Pigmented Polymers", Applied Science Publishers Ltd., London, 1a. edição (1980).
- (2) Venkataraman, K., "The Chemistry of Synthetic Dyes", volume II, Academic Press, New York, 1a. edição (1952).
- (3) Allen, R. L. M., "Colour Chemistry", Thomas Nelson and Sons Ltd., South Africa, 1a. edição (1971).

- (4) Martin, M. M. e Lindqvist, L., "Deuterium Effects on Radiationless Electronic Transitions of Xanthene Dyes in Aqueous and Alcoholic Solutions", *Chem. Phys. Lett.* 22, 309(1973).
- (5) Martin, M. M., "Hydrogen Bond Effects on Radiationless Electronic Transitions in Xanthene Dyes", *Chem. Phys. Lett.* 35, 105(1975).
- (6) Fleming, G. R., Knight, A. W. E., Morris, J. M., Morrison, R. J. S. e Robinson, G. W., "Picosecond Fluorescence Studies of Xanthene Dyes", *J. Am. Chem. Soc.* 99, 4306(1977).
- (7) Mc Glynn, S. P., Azumi, T. e Kinoshita, M., "Molecular Spectroscopy of the Triplet State", Prentice - Hall Inc - Englewood Cliffs (1969).
- (8) Lewis, G. N., Lipkin, D. e Magel, T. T., "Reversible Photochemical Processes in Rigid Media. A Study of the Phosphorescent State", *J. Am. Chem. Soc.* 63, 3005(1941).
- (9) Birks, J. B., "Photophysics of Aromatic Molecules", Wiley Interscience, London (1970).
- (10) Baur, M. E. e Nicol, M. F., "Solvent Stark Effect and Spectral Shifts", *J. Chem. Phys.* 44, 3337(1966).
- (11) Nicol, M. F. "Solvent Effects on Electronic Spectra", *Appl. Spectrosc. Rev.* B, 183(1974).
- (12) Nicol, M. F., Swain, J., Shum, Y. Y., Merin, R. e Chen, R. H. H., "Solvent Stark Effect and Spectral Shifts II", *J. Chem. Phys.* 48, 3587(1968).

- (13) Nicol, M. F., Wild, S. M. e Yancey, J., "Solvent and Pressure Dependence of the Absorption and Fluorescence Spectra of Anthronitrile", *J. Chem. Phys.* 58, 4350(1973).
- (14) Schimidt, E., Loeleger, H. e Zurcher, R., "What is the Solvent Effect on the Electronic Spectra of a Solute in a Polymer Matrix?", *Helvetica Chimica Acta* 61, 488(1978).
- (15) Mataga, N. e Kubota, T., "Molecular Interactions and Electronic Spectra", Marcel Dekker, Inc, New York (1970), citada na referência (14).
- (16) Reddish, W., "The Dielectric Properties of Poly-ethylene Terephthalate (Terylene)", *Trans. Faraday Soc.* 46, 459(1950).
- (17)(a) Lippert, E., "Dipolmoment und Elektronenstruktur von Angeregten Molekülen", *Z. Naturforschg.* 10a, 541(1955);  
(b) Lippert, E., "Spektroskopische Bestimmung des Dipolomentes Aromatischer Verbindungen un Ersten Angeregten Singulettzustand", *Z. Elektrochem.* 61, 962(1957);  
(c) Lippert, E., Lüder, W. e Moll, F., "Polarisations - und Relaxations - Effekte in der Temperaturabhängigkeit von Absorptions - und Fluoreszenzspektren Aromatischer Verbindungen in Polaren Lösungsmitteln", *Spectrochimica Acta* 10, 858(1959), citadas na referência (14).

- CAPITULO 2 -

- PARTE EXPERIMENTAL -

Neste capítulo serão discutidas as técnicas de purificação, preparação das soluções e filmes poliméricos, além dos equipamentos utilizados para a obtenção dos espectros de absorção, excitação e emissão.

2.1- PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS:

Faz-se necessária uma purificação dos solventes, fluoresceína e polímeros a fim de se evitar possíveis interferências de impurezas, tais como, sobreposição com as bandas espectrais do corante, processos de extinção da emissão de fluorescência e outros fatores.

2.1.1- PURIFICAÇÃO DOS SOLVENTES:

(A) ÁGUA: A água utilizada foi bidestilada em sistema de destilação de vidro;

(B) ACETATO DE ETILA (MERCK - PA): Inicialmente, este solvente foi seco sobre carbonato de potássio (VETEC - PA) durante 24 horas. A seguir, foi destilado fracionadamente;

(C) ACETONA (MERCK - PA): Este solvente foi seco sobre carbonato

de potássio (VETEC - PA) (previamente purificado por recristalização e seco em estufa) por 24 horas, filtrado e, a seguir, destilado fracionadamente através de uma coluna de vigreux<sup>(1)</sup>;

(D) ETANOL (MERCK - PA): Foi seco sobre sulfato de magnésio (FISHER SCIENTIFIC COMP.) anidro por 24 horas, filtrado e destilado fracionadamente através de uma coluna de vigreux<sup>(1)</sup>;

(E) n-HEXANO (QUIMIS - PA): Foi seco sobre sulfato de magnésio (FISHER SCIENTIFIC COMP.) anidro por 24 horas, filtrado e eluído em uma coluna (25 cm de comprimento) de sílica gel 60 (MERCK - 70 - 230 mesh ASTM) e alumina (MERCK - 70 - 230 mesh - ASTM) e sulfato de magnésio, sendo que este foi utilizado novamente para uma melhor eliminação da água.

#### 2.1.2- PURIFICAÇÃO DA FLUORESCEINA (MERCK):

Foi dissolvida até a saturação em uma solução diluída de hidróxido de sódio e filtrada. O corante foi precipitado através da adição de uma solução 1:1 de ácido clorídrico (MERCK - PA). Este processo de purificação é denominado *lactonização*, ou seja, conversão para a espécie *lactônica* (3). Segundo Neckers<sup>(2)</sup>, a *lactonização* proporciona um procedimento simples para purificar corantes xantênicos. Muitas impurezas nos produtos comerciais são inorgânicas, e a precipitação da lactona com ácido clorídrico concentrado deixa as impurezas em solução. Este precipitado foi

separado por filtração e lavado seguidamente com éter etílico (MERCK - PA) e água. A seguir, foi seco em estufa a 100°C<sup>(1)</sup>.

### 2.1.3- PURIFICAÇÃO DOS POLÍMEROS:

#### (A) POLIACETATO DE VINILA (CALDRICH - ALTO PESO MOLECULAR):

Foi preparada uma solução concentrada do polímero em acetona. A seguir, foi feita uma pequena diluição da solução para facilitar o processo de filtração em funil de haste curta, utilizando-se papel de filtro quantitativo (Whatman-40). O filtrado foi gotejado diretamente do funil para o béquer contendo n-hexano<sup>(3)</sup> e o polímero precipitado foi sendo coletado, imediatamente, com uma espátula de poli(propileno) e depositado em um béquer. Esta técnica de precipitação foi utilizada para se minimizar a oclusão de impurezas, uma vez que o PVAc forma um precipitado floculoso, que tende a se agregar, formando uma só massa polimérica.

Finalmente, o polímero purificado foi dissolvido em acetona, sendo que esta solução foi distribuída de modo mais uniforme possível, em uma placa de vidro recoberta com polietileno. Deixou-se evaporar o solvente naturalmente por cerca de 24 horas e obteve-se um filme muito fino do polímero, que pode ser pesado para a obtenção das amostras estudadas.

(B) POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) (CARLO ERBA - RPE) (PVA):

Preparou-se uma solução diluída do polímero e filtrou-se. Através de um dispersor de vidro, esta solução foi aspergida em uma placa de Petri contendo acetona<sup>(3)</sup>, ocorrendo a formação de um precipitado fino, facilmente coletado com uma espátula. O princípio de funcionamento do aspersor de vidro consiste no arraste da solução de PVA em água por nitrogênio gasoso. Um esquema do arranjo experimental é mostrado a seguir na figura 2.1. Após a precipitação, filtrou-se o polímero em funil de Buchner, lavou-se com acetona e secou-se em estufa a 60°C.

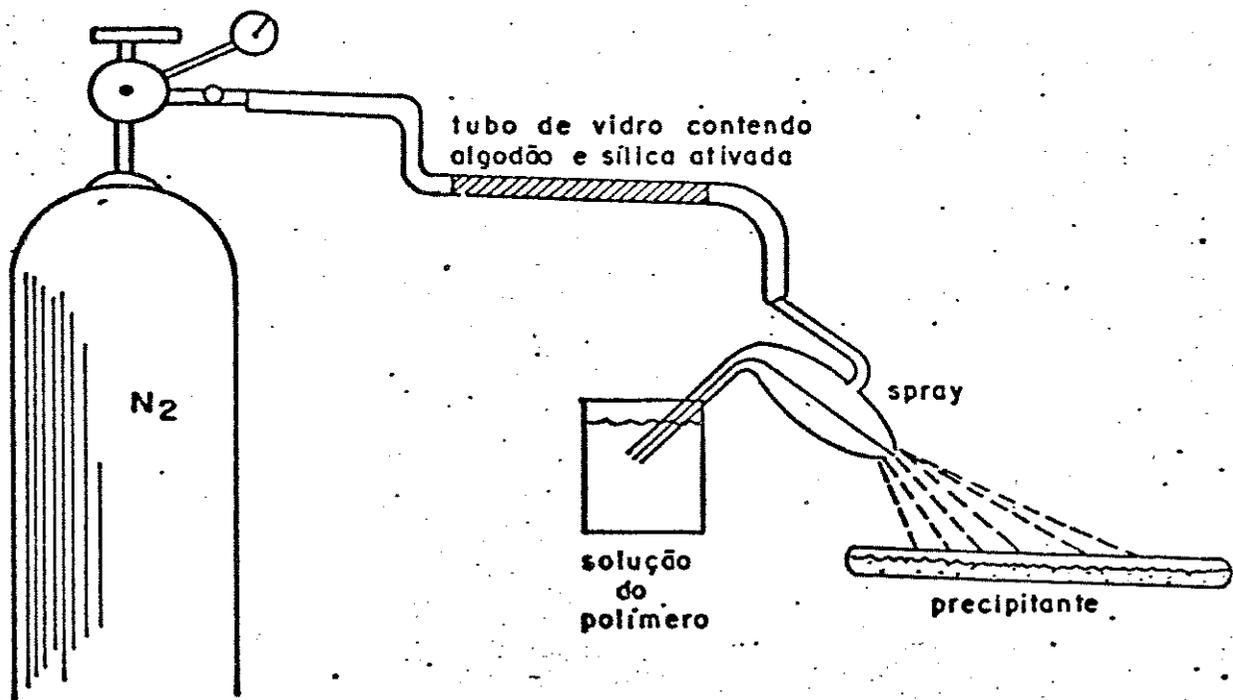


Figura 2.1 - Esquema do equipamento utilizado na purificação do poli(álcool vinílico).

## 2.2- PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES LÍQUIDAS EM SOLVENTES PRÓTICOS E APRÓTICOS:

### (A) SOLUÇÕES AQUOSAS DILUIDAS:

As soluções de fluoresceína em água foram preparadas na concentração de  $8,3 \times 10^{-6}$  M. As soluções em ácido sulfúrico 5 e 10 M foram preparadas a partir de ácido sulfúrico concentrado. As soluções ácidas de fluoresceína foram preparadas a partir das soluções em ácido sulfúrico, sendo que o pH medido por um pHmetro, DIGIMED - modelo DMPH2, que possui uma faixa de medição de 0,00 a 14,00, com uma precisão relativa de  $\pm 0,01$ ; obtendo-se os seguintes valores: 0,03; 0,12; 0,43; 0,79; 1,14; 1,48; 1,82; 2,19; 2,55; 2,92; 3,33; 3,73; 4,18; 4,58; 5,05 e 5,61.

As soluções na faixa de pH de 5,00 a 8,50 foram preparadas a partir das soluções tampão de fosfato de sódio monobásico  $6,7 \times 10^{-2}$  M (ECIBRA - PA) e fosfato de sódio dibásico  $8,4 \times 10^{-2}$  M (ECIBRA - PA), obtendo-se os seguintes valores de pH: 5,41; 5,72; 6,02; 6,37; 6,60; 6,79; 6,96; 7,14; 7,33; 7,57; 7,93 e 8,23.

### (B) SOLUÇÕES AQUOSAS SATURADAS:

Foram pesadas massas de fluoresceína suficientes para a preparação de soluções de concentração da ordem de  $10^{-3}$  M. A seguir, foram adicionadas as soluções ácidas (inclusive em ácido sulfúrico 5 e 10 M) e tamponadas à fluoresceína. Uma vez que a

solubilidade do corante é fortemente dependente do pH (como será discutido no próximo capítulo), na faixa de pH intermediária ácida e tamponada, houve saturação das soluções. Todas as soluções foram filtradas e, a seguir foi medido o pH, obtendo-se os seguintes valores: 1,02; 2,17; 2,50; 4,30; 4,37; 4,66; 5,47; 5,75; 6,31; 6,49; 6,67 e 7,73.

(C) SOLUÇÕES EM SOLVENTES APRÓTICOS:

Preparou-se soluções de fluoresceína em solventes apróticos (acetona, dioxano e acetato de etila), nas concentrações mostradas na tabela abaixo.

SOLVENTE	CONCENTRAÇÕES / M		
acetona	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$
acetato de etila	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$
dioxano	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-6}$

(D) SOLUÇÕES EM SOLVENTES PRÓTICOS:

Preparou-se soluções de fluoresceína em solventes próticos (etanol e etileno glicol) obtendo-se as concentrações mostradas na tabela abaixo.

SOLVENTE	CONCENTRAÇÕES / M		
etanol	$9,8 \times 10^{-4}$	$7,9 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-6}$
etileno glicol	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$

## 2.3- PREPARAÇÃO DAS MATRIZES POLIMÉRICAS

### CONTENDO FLUORESCEÍNA:

#### (A) FILMES DE POLIACETATO DE VINILA (PVAc):

O polímero foi dissolvido em acetona, adicionando-se a esta quantidade suficiente de uma solução de fluoresceína em acetona  $1,0 \times 10^{-4}$  M, a fim de se obter um filme com 0,50% em peso de fluoresceína.

A seguir, a solução de PVAc e acetona foi vertida em uma placa de vidro recoberta com polietileno e espalhada o mais uniformemente possível de modo que formasse uma camada fina. O solvente foi evaporado à temperatura ambiente, ocorrendo a formação de um filme pouco espesso e incolor.

Através do mesmo processo foi preparado o filme na porcentagem em peso de 0,10%.

Os filmes de uranina em PVAc foram preparadas por procedimentos semelhantes e seu estudo sistemático vem sendo objeto de outra tese de mestrado do grupo.

#### (B) FILMES DE POLICALCOOL VINILICO (PVA):

O polímero foi dissolvido a quente em água bidestilada, adicionando-se à solução, quantidade suficiente de uma solução  $1,0 \times 10^{-3}$  M de fluoresceína em etanol, a fim de se obter filme de PVA contendo fluoresceína 0,64% em peso. A seguir, evaporou-se a água em estufa a cerca de 70°C. Obteve-se um filme pouco espesso,

heterogêneo, mais concentrado nas bordas. Retirou-se da parte central e mais homogênea do filme polimérico a amostra utilizada para registrar os espectros eletrônicos de absorção, excitação e emissão. O filme contendo fluoresceína 0,07% em peso foi preparado simultaneamente ao filme descrito anteriormente pelo mesmo procedimento, diferindo apenas na concentração da solução inicial de fluoresceína em etanol. Obteve-se um filme homogêneo e transparente.

Os filmes de PVA contendo fluoresceína 0,002%, 0,007% e 1,47% em peso, também foram preparados a partir de uma solução de fluoresceína e PVA em água. Porém, as soluções foram concentradas em forno cromatográfico a 50°C e a seguir, foram evaporadas em dissecador a vácuo.

Os filmes de uranina em PVA foram preparados por procedimentos semelhantes e seu estudo sistemático vem sendo objetivo de outra tese de mestrado do grupo.

## 2.4- INSTRUMENTAÇÃO:

### 2.4.1- ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO:

Os espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em todas as soluções líquidas, exceto em soluções aquosas saturadas, foram registrados através de um espectrofotômetro UV/VIS, Varian - modelo Cary 2300, utilizando-se uma cubeta de 1,0cm de caminho

ótico; assim como os espectros do corante dispersos nos filmes poliméricos de PVA e PVAc, que foram adaptados a um suporte apropriado .

Embora o espectro eletrônico de absorção da acetona tenha sido compensado, não foi possível a obtenção do espectro da fluoresceína em solução diluída de acetona, devido à sobreposição da banda do solvente à banda do corante na região do ultravioleta. Não foram registrados, também, os espectros da fluoresceína dispersa em PVA nas concentrações de 0,002% e 0,007%, devido ao baixo coeficiente de extinção molar do corante e à baixa espessura do filme.

Através de um espectrofotômetro UV/VIS, Intralab - modelo DMS 100, obteve-se os espectros do corante nas soluções aquosas saturadas, utilizando-se cubetas de 1,0 cm de caminho ótico.

A utilização de um ou de outro espectrofotômetro em cada caso, não se deveu às suas características óticas, mas apenas por questões de disponibilidade, já que dados os altos coeficientes de extinção molar e a largura das bandas da fluoresceína não exige um instrumento de alta resolução.

#### 2. 4. 2- ESPECTROS ELETRÔNICOS DE EMISSÃO E EXCITAÇÃO:

##### (A) INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA:

Os espectros de emissão e de excitação da fluoresceína nas soluções líquidas foram registrados através de um

espectrofluorímetro (Perkin Elmer - modelo MFP-44B), que possui um tubo fotomultiplicador HAMAMATSU CORPORATION - modelo R928, cuja faixa de resposta espectral é 185 a 930 nm. Todos os espectros foram registrados, ajustando-se as larguras das fendas dos monocromadores de excitação e de emissão correspondentes a uma resolução de 5 nm, exceto os espectros de emissão e de excitação da fluoresceína em soluções diluídas em acetona e dioxano, que foram obtidos com uma largura da fenda do monocromador de excitação correspondente a uma resolução de 7nm. Não se utilizou filtros para se obter nenhum dos espectros.

Obteve-se os espectros de emissão da fluoresceína nos filmes poliméricos de PVA (amostras diluídas) e PVAc através de um espectrofluorímetro aberto que contém os seguintes componentes:

- (a) Lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão e arco curto, ORIEL, tipo SA-DC-M 200W - modelo 6137;
- (b) Cubeta de vidro, com janelas de quartzo de 5,0cm de caminho ótico, contendo uma solução de sulfato de níquel, na concentração de 200g/L;
- (c) Filtros de vidro FUNBEC - tipo UG - 1;
- (d) Frasco de Dewar com janela para UV/VIS, Scalon, modelo S-817;
- (e) Tubo de quartzo contendo a amostra;
- (f) Fotomultiplicadora, EMI, modelo 6256B, operando com uma tensão de 1095 V;
- (g) Monocromador de 0,5 m, Jarrel-ASH, modelo 82-405, com grade holográfica de 1800 g/mm, faixa espectral de 180 a 800 nm;

- (h) Nanoamperímetro, Keithley Instruments, modelo 610-C;
- (i) Registrador Xt, Hewlett-Packard, modelo 7100 BM, com papel milimetrado Darú S.A., modelo ML-9270-1037;
- (j) Fonte de tensão para a fotomultiplicadora RR products for Research Inc. S-502.

Uma vez que os dois filtros combinados transmitem na região de  $360 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ , utilizou-se esta faixa de comprimento de onda de excitação para registrar todos os espectros de emissão da fluoresceína, exceto em alguns casos, que serão especificados no capítulo 3, referente à discussão dos resultados.

A escolha desta faixa de excitação se deve ao fato de que todas as formas de dissociação da fluoresceína absorvem nessa região, apesar desses comprimentos de onda não corresponderem, necessariamente, ao comprimento máximo de absorção.

A escolha dos diferentes espectrofluorímetros se deveu apenas a conveniências experimentais e facilidade operacional, destacando-se o uso do espectrofluorímetro Perkin-Elmer para as medidas de fluorescência das diversas soluções e das medidas dos seus espectros de excitação. Como a emissão da fluoresceína em PVAc tem baixa intensidade, não foi possível registrar os espectros de emissão e excitação nesse equipamento. Problemas técnicos não permitiram, também, que se registrasse os espectros de excitação no espectrofluorímetro aberto.

## (B) PRINCÍPIOS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS:

Os princípios das técnicas de espectroscopia eletrônica de absorção UV/VIS e emissão têm sido muito discutidos na literatura<sup>(9, cap.1)</sup>. No entanto, a técnica de espectroscopia eletrônica de excitação, que é não menos importante, tem sido pouco abordada. Como esta técnica foi muito útil, no sentido de se identificar a formação de agregados, alguns comentários serão feitos a respeito desse tipo de espectroscopia.

A técnica de espectroscopia eletrônica de excitação consiste, basicamente, em uma medida indireta da absorção da amostra. A fim de se esclarecer esta definição, deve-se descrever o procedimento de obtenção do espectro de excitação, descrito a seguir.

Considere um exemplo hipotético, no qual um molécula orgânica qualquer tenha  $\lambda_{\max}$  de emissão em 450 nm e  $\lambda_{\max}$  de excitação em 300 nm. Para registrar o espectro de excitação, deve-se, primeiramente, fixar  $\lambda_{\max} = 450$  nm no monocromador de emissão e, a seguir, o comprimento de onda de excitação é variado. O espectro de excitação consiste em um gráfico da intensidade de emissão de fluorescência vs comprimento de onda de excitação. Isto significa que o feixe que incide no fotodetector é o da luz emitida, porém sua intensidade é dependente do comprimento de onda de excitação. O  $\lambda_{\max}$  da banda de excitação, no caso 300 nm, indica que neste comprimento de onda, a amostra apresenta maior intensidade de emissão. Portanto, o espectro de excitação é uma

medida indireta da absorção, pois analisa-se quais as espécies que estão no estado fundamental (absorvem) e emitem, por exemplo em 450 nm. O espectro eletrônico de emissão é uma medida direta, pois indica quais são as espécies presentes no estado eletrônico excitado e que decaem radiativamente para o estado eletrônico fundamental.

Segundo Barltrop e Coyle, a técnica de espectroscopia eletrônica de excitação complementa a de absorção<sup>(4)</sup>. O espectro de excitação pode apresentar o mesmo contorno e distribuição de comprimentos de onda observados no espectro de absorção. No entanto, em casos onde há uma sobreposição das bandas de absorção das espécies fluorescentes e não-fluorescentes, o espectro de excitação pode fornecer informações relacionadas, somente, às espécies emissoras<sup>(5)</sup>.

Observa-se, fundamentalmente, que quando uma espécie absorve a radiação e emite fluorescência, o espectro de excitação é idêntico ao espectro de absorção. Por outro lado, quando mais do que uma espécie absorve na mesma região, e essa é a situação comumente observada quando ocorre agregação de espécies, como a emissão geralmente ocorre em regiões diferentes e o espectro de excitação é medido em um comprimento de onda fixo de emissão, apenas o espectro de excitação de uma das espécies é registrado. Essa é uma das grandes utilidades da técnica de espectroscopia de excitação.

Outra grande aplicação dessa técnica aparece na

identificação de excímeros ou exciplexos, isto é, espécies presentes apenas no estado eletrônico excitado e como tal não apresentam espectros de absorção.

Além das vantagens da espectroscopia de excitação frente à de absorção, no que diz respeito a propriedades intrínsecas das moléculas, como a forte superposição das bandas de absorção, a análise fluorimétrica tem, ainda, uma outra vantagem, que diz respeito à própria técnica, dado que possui uma sensibilidade muito maior. Esse aumento da sensibilidade é verificado, porque o sinal de fluorescência pode ser observado, amplificado e registrado diretamente, enquanto que na espectroscopia eletrônica de absorção, o sinal registrado consiste na diferença entre as intensidades de luz transmitida e absorvida<sup>(4)</sup>.

Similarmente, para a fosforescência, onde a absorção direta  $T^* \leftarrow S$  é pouco provável e, portanto, ocorre com um baixo coeficiente de extinção, o espectro de excitação de fosforescência pode fornecer informações importantes a respeito das espécies que emitem fosforescência e estão presentes no estado eletrônico fundamental<sup>(5)</sup>.

#### 2. 4. 3- ESPECTROS DE ABSORÇÃO INFRAVERMELHO:

Os espectros infravermelho dos filmes poliméricos de PVAc e PVA foram obtidos através de um espectrômetro Perkin Elmer 180. Utilizou-se um equipamento de aquecimento, acoplado a um

controlador de temperatura Perkin Elmer. A amostra foi inserida entre duas placas circulares de vidro ótico, separadas por um espaçador com espessura determinada e maior do que a espessura do filme polimérico, para evitar a ocorrência de estiramento mecânico, o que alteraria o grau de cristalinidade do filme.

#### 2.4.4- DECONVOLUÇÃO DAS BANDAS DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA DA FLUORESCEINA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DILUIDAS:

Como os espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína consistem em um pacote de bandas vibrônicas, procurou-se realizar a sua decomposição através de um programa computacional de deconvolução de curva<sup>(6)</sup>. Basicamente, este programa calcula uma função matemática que mais se aproxime da banda de absorção obtida experimentalmente.

Duas funções são utilizadas no cálculo. A função de Gauss, expressa pela equação abaixo.

$$I = I_0 \cdot \exp \left[ \frac{-\ln 2 (\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)^2}{(\Delta \bar{\nu}_{1/2})^2} \right] + \alpha \quad (1)$$

onde,  $I$  é a intensidade para o número de onda  $\bar{\nu}$ ;  $I_0$  é a intensidade no ponto de máxima absorção;  $\bar{\nu}_0$  é o número de onda máximo;  $\Delta \bar{\nu}_{1/2}$  é a largura à meia altura (meia largura) e  $\alpha$  é a absorção no número de onda inicial<sup>(7)</sup>.

A função de Lorentz-Cauchy é mostrada abaixo.

$$I(\bar{\nu}) = I_0 \cdot \frac{(\Delta\bar{\nu}_{1/2})^2}{(\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)^2 + (\Delta\bar{\nu}_{1/2})^2} + \alpha \quad (2)$$

sendo que os parâmetros possuem o mesmo significado descrito acima<sup>(7)</sup>.

O programa de deconvolução faz o cálculo a partir do produto das funções gaussiana e lorentziana, resultando na equação (3).

$$I(\bar{\nu}) = I_0 \cdot \left\{ \left[ 1 + x_1^2 \cdot (\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)^2 \right]^{-1} \cdot \exp \left[ -x_2^2 \cdot (\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)^2 \right] \right\} + \alpha \quad (3)$$

onde,  $x_1/(x_1+x_2)$  caracteriza o contorno da banda, sendo igual a zero para a função gaussiana e igual a um para a função lorentziana<sup>(7)</sup>.

Para se iniciar o cálculo no programa são introduzidos os seguintes parâmetros para cada uma da banda: (a) valor da absorvância ou transmitância no comprimento de onda máximo de absorção; (b) comprimento de onda máximo em nm; (c) meia largura da banda da ordem de 30 nm e (d) valor do parâmetro  $x_1/(x_1+x_2)$  da equação 3.

O programa ajusta os parâmetros por sucessivos ciclos iterativos até que o espectro calculado se aproxime do espectro experimental, permitindo que se obtenha dessa forma o espectro deconvoluido.

## 2.5- REFERENCIAS - PARTE EXPERIMENTAL:

- (1) Vogel, A. I., "Química Orgânica - Análise Orgânica Qualitativa", tradução da 3a edição - Ao Livro Técnico S.A., Rio de Janeiro, vol. I, II, III (1982).
- (2) Neckers, D. C., "The Indian Happiness Wart in the Development of the Photodynamic Action", *J. Chem. Educ.* 64, 649(1987).
- (3) Perrin, D. D., Armarego, W. L. F. e Perrin, D. R., "Purification of Laboratory Chemicals", 2a edição, Pergamon Press, (1980).
- (4) Barltrop, J. A. e Coyle, J. D., "Excited States in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, 1a edição, London (1975).
- (5) Cowan, D. O. e Drisko, R. L., "Elements of Organic Photochemistry", Plenum Press, 1a edição, Nova York (1976).
- (6) "Programa Computacional para Deconvolução de Curva" adaptado pelo Prof. Pedro Muniz Vazquez (IQ - UNICAMP), a partir da referência Pitha, J. e Jones, R. N., "Computer Programs for Infrared Spectrophotometry", *NRCC Bull. (Ottawa)*, número 12 (1968).
- (7) Hippe, Z. e Hippe, R. "Computer Retrieval of Spectral Data", *Appl. Spec. Rev.* 16, 135(1980).

## CAPÍTULO 3

### - RESULTADOS E DISCUSSÃO -

#### 3.1- ANÁLISE DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO DA FLUORESCÉINA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DILUIDAS:

##### 3.1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ESPECTROS DE ABSORÇÃO:

Zanker e Peter<sup>(1)</sup> estudaram os espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em dioxano em uma faixa de pH ácidos e básicos, através da comparação destes com os da molécula 6-hidroxi-9-fenil-fluoron (HPF), análoga à fluoresceína, exceto pela ausência da carboxila; concluindo que dependendo do pH, a fluoresceína pode apresentar as seguintes formas de dissociação: cátion (1); moléculas neutras: quinonóide (2) e lactônica (3); monoânion (5) e diânion (6). Mencionaram, ainda, a possibilidade de existência de uma outra forma da molécula neutra, denominada zwitteriônica ou anfo-ion (4).

Martin e Lindqvist<sup>(2)</sup> assumiram a existência da espécie anfo-ion (4) e, posteriormente, a mesma foi constatada<sup>(3)</sup> por espectroscopia de absorção infravermelho, através de duas bandas características do ânion carboxilato, consistindo em uma forte entre 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente às vibrações de estiramento assimétrico e a outra mais fraca entre 1430-1400  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações de estiramento simétrico. Deve-se ressaltar que estas bandas não apareceram nos espectros de infravermelho das moléculas

neutras quinonóide (2) e lactônica (3).

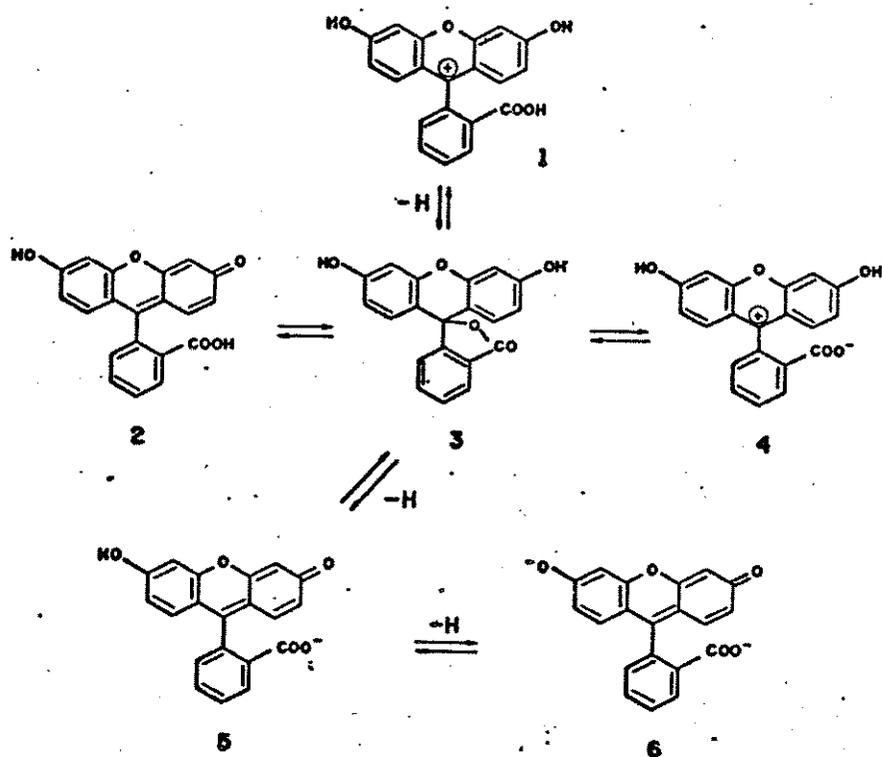
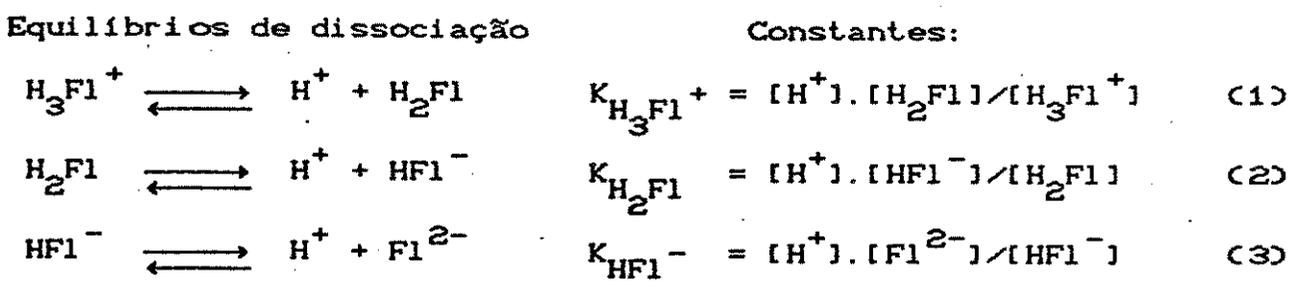


Figura 3.1: Formas iônicas da fluoresceína (2)

Adotando-se a seguinte notação para as constantes de dissociação da fluoresceína, tem-se que:



onde,  $H_3Fl^+$ ,  $H_2Fl$  e  $F1^{2-}$  representam as espécies: catiônica (1), molécula neutra (incluindo as formas quinonóide (2), lactônica (3) e anfo-ion (4)), monoaniônica (5) e dianiônica (6),

respectivamente.

Martin e Lindqvist<sup>(2)</sup> obtiveram os seguintes valores para as constantes de dissociação da fluoresceína:  $pK_{H_3Fl^+} = 2,2$ ;  $pK_{H_2Fl} = 4,4$  e  $pK_{HF1^-} = 6,7$ . Porém, Diehl e Markuszewski<sup>(4)</sup>, prosseguindo o estudo da fluoresceína, determinaram com maior precisão as duas primeiras constantes de dissociação através dos dados de solubilidade do corante em função do pH e chegaram aos seguintes resultados:  $pK_{H_3Fl^+} = 2,13$  e  $pK_{H_2Fl} = 4,44$ .

Martin e Lindqvist<sup>(2)</sup> utilizaram o estudo comparativo das moléculas da fluoresceína e do HPF em soluções aquosas, para identificar as várias espécies da fluoresceína em diferentes pH, nos estados eletrônicos fundamental e excitado. Considerando-se que os grupos xantênico e benzênico dissubstituído da fluoresceína não estão conjugados, pois se situam em planos perpendiculares, o espectro eletrônico de absorção do corante se divide em dois conjuntos distintos de bandas. O primeiro, na região do visível, pode ser atribuído à absorção eletrônica do anel xantênico e neste caso, as espécies: catiônica (1) e anfo-ion (4) (anel xantênico carregado positivamente) devem apresentar banda com comprimento de onda máximo e contorno análogos; o mesmo ocorrendo com as espécies quinonóide (2) e monoaniônica (5) (anel xantênico com carga efetiva nula). Deve-se esperar, portanto, que as espécies do corante que possuem anéis xantênicos análogos, apresentam o mesmo

tipo de espectro eletrônico de absorção na região do visível. O segundo conjunto de bandas aparece na região do ultra-violeta e pode ser atribuído à absorção do anel benzênico dissubstituído e a outras transições do grupo xantênico. A espécie lactônica (3) é a única que não apresenta absorção eletrônica na região do visível, pois a formação da ligação lactônica quebra a conjugação eletrônica do anel xantênico.

Apesar das várias formas da fluoresceína terem sido analisadas por espectroscopia ótica, existem dúvidas a respeito do comportamento fotofísico das diferentes formas da molécula neutra. Devido a este fato, definiu-se como primeiro objetivo o estudo dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em soluções aquosas diluídas ( $8,3 \times 10^{-6}$  M) de diferentes pH. Para isto, foi feita deconvolução das curvas espectrais através de um programa computacional<sup>(5)</sup>. Como todas as espécies da fluoresceína, exceto a espécie lactônica (3), são caracterizadas pela sua absorção na região do visível, serão discutidos, primeiramente, os espectros eletrônicos de absorção nesta região.

### 3.1.2- RESULTADOS OBTIDOS DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO:

#### - REGIÃO DO VISÍVEL:

O espectro de absorção da fluoresceína em ácido sulfúrico 10 M apresenta uma banda larga e não estruturada, que pode ser decomposta nos seguintes comprimentos de onda, em ordem

decrecente de intensidade de absorção: 435,8; 413,5 e 392,3 nm. Supõe-se que essa absorção seja devida à espécie catiônica (1) da fluoresceína<sup>(2)</sup> (figura 3.2a).

À medida que o pH da solução aumenta, observa-se um deslocamento espectral das duas primeiras bandas citadas anteriormente, de  $\approx 3$  nm para comprimentos de onda maiores, sendo que a terceira banda apresenta um deslocamento espectral maior, de  $\approx 7$  nm. Provavelmente, a espécie anfo-ion (4) da fluoresceína começa a se formar, causando um deslocamento da banda de absorção para energia menor, embora o contorno da mesma não varie. Pode-se atribuir este deslocamento a interações diferentes do solvente com as duas espécies do corante (figuras 3.2b a 3.4).

Em pH = 1,82 o espectro eletrônico de absorção da fluoresceína na região do visível apresenta, além da banda em 463,5 nm, as seguintes bandas decompostas e em ordem decrescente de intensidade de absorção: 438,6; 419,0 e 401,3 nm. Por comparação com o trabalho de Martin e co-autor<sup>(2)</sup>, atribui-se esta banda à absorção do anel xantênico com carga efetiva nula presente na espécie quinonóide (2) da fluoresceína. Nesse pH, provavelmente, existem em equilíbrio as espécies: catiônica(1), anfo-ion (4) e quinonóide (2) (figura 3.4b).

Considerando-se que o primeiro pKa para a dissociação da fluoresceína é 2,13, supõe-se que acima deste pH, a concentração da espécie catiônica (1) vai diminuindo gradativamente, havendo um equilíbrio predominante entre as formas neutras da fluoresceína.

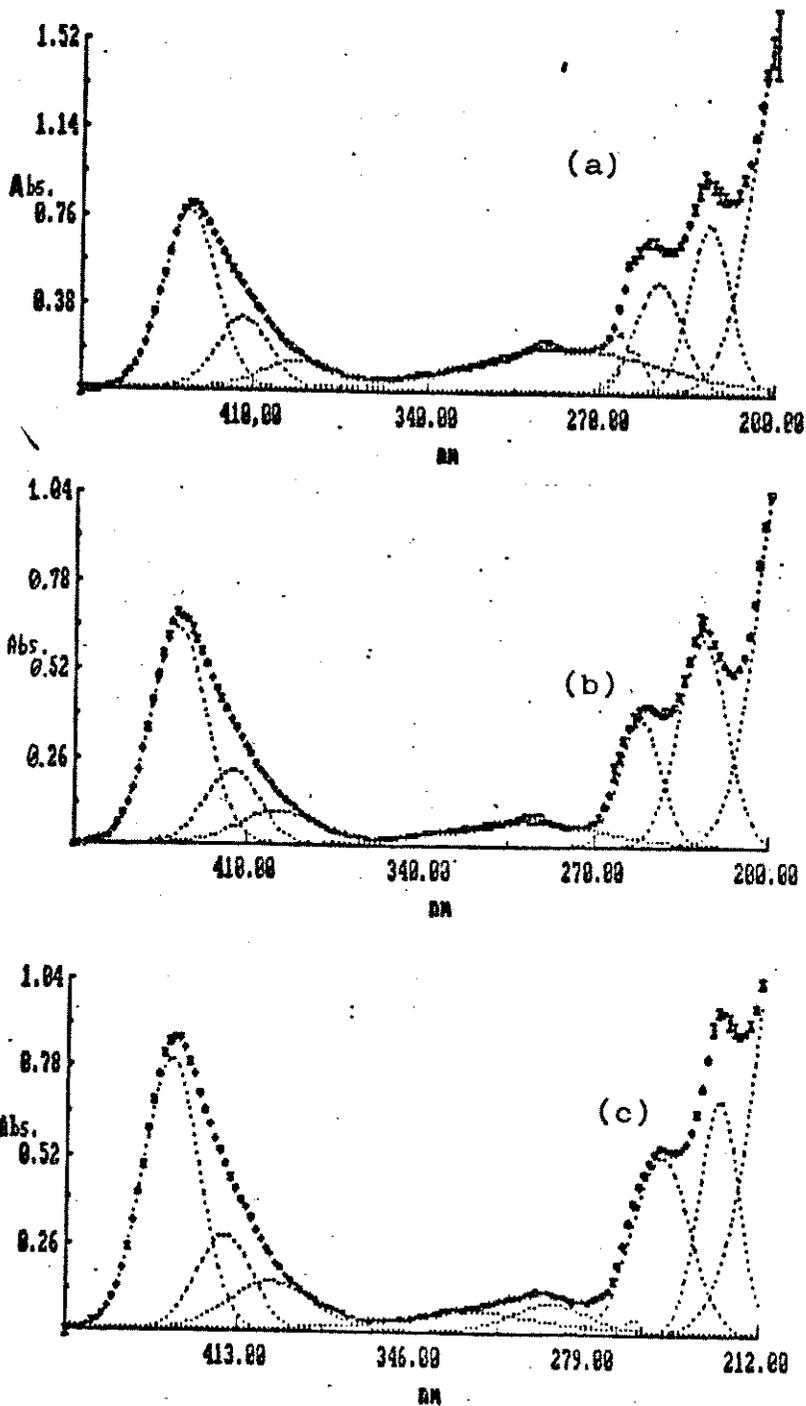


Figura 3.2: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nas seguintes concentrações em  $H_2SO_4$ : (a) 10 M (2); (b) 5 M (2) e (c) pH = 0,03 (3). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

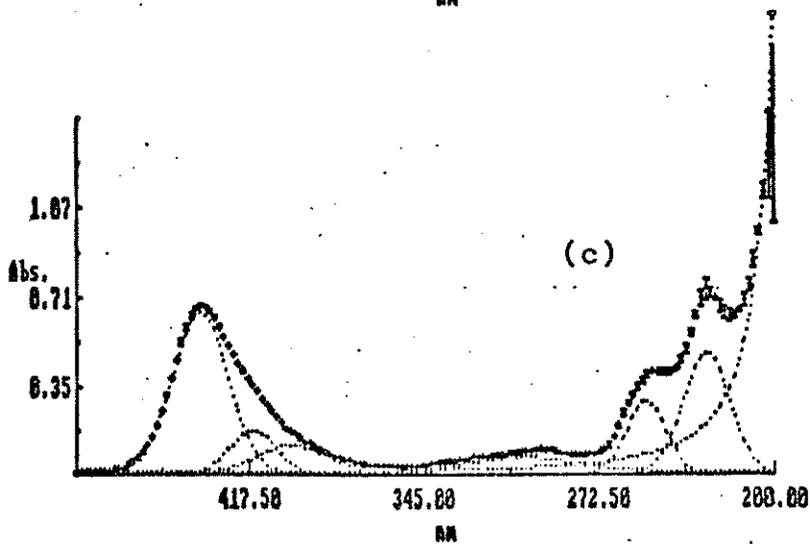
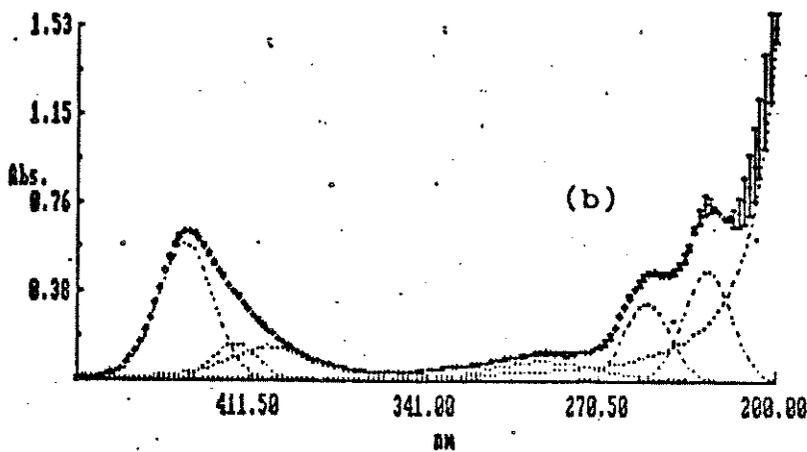
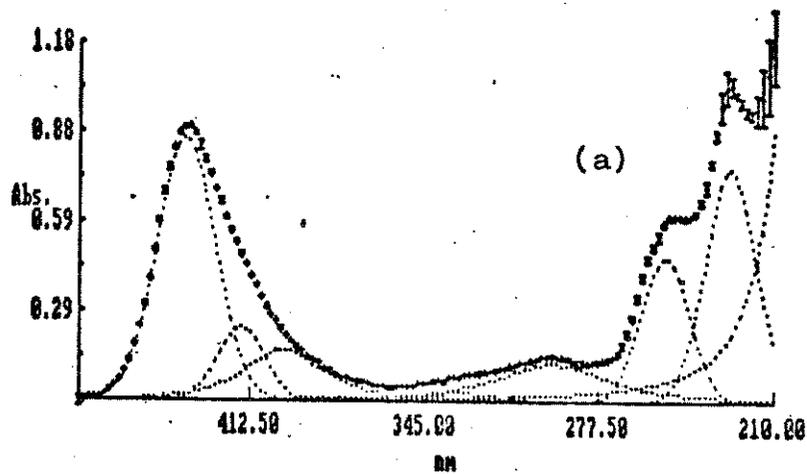


Figura 3.3: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 0,43 (3); (b) 0,79 (2) e (c) 1,14 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

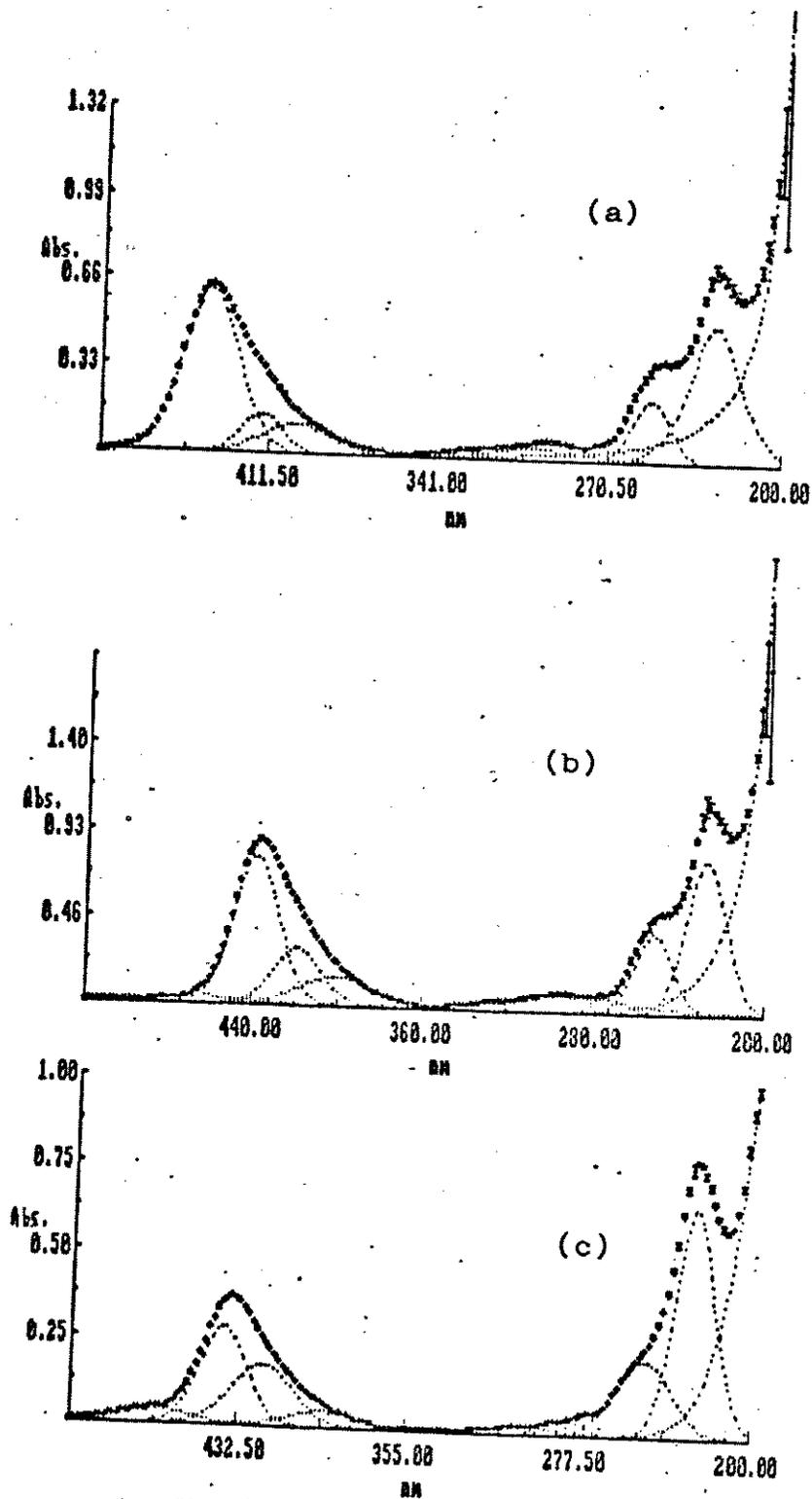


Figura 3.4: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 1,48 (2); (b) 1,82 (3) e (c) 2,55 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorvância.

À medida que o pH da solução aumenta, observa-se que a banda de absorção na região do visível tem a sua intensidade relativa diminuída. Em pH = 2,55 (figura 3.4c) a deconvolução dos espectros eletrônicos resulta nas seguintes bandas com máximos centrados nos comprimentos de onda: 474,5; 439,2; 420,9 e 393,2 nm. Verifica-se que há um deslocamento espectral das três primeiras bandas para a região de menor energia, enquanto que a última banda se desloca para a região de maior energia. Além disso, há uma intensificação relativa da banda em 474,5 nm, significando que o equilíbrio se desloca no sentido de formação da espécie quinonóide (2).

Com o aumento do pH das soluções diluídas de fluoresceína em água, constata-se a mesma tendência descrita acima, ou seja, deslocamento das três primeiras bandas para comprimentos de onda maiores, deslocamento da quarta banda para comprimento de onda menor e aumento da intensidade relativa da banda situada a cerca de 475 nm (figuras 3.5a e 3.5b).

No pH = 4,18 (figura 3.5c), verifica-se a existência das seguintes bandas decompostas: 476,9; 440,7; 421,7 e 387,1 nm. Além disso, há uma inversão das intensidades relativas das bandas em 476,9 e 440,7 nm. Supõe-se que haja um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da espécie monoaniônica (5), que possui o anel xantênico idêntico ao da espécie neutra quinonóide (2) (carga efetiva nula). Portanto, já devem estar em equilíbrio as espécies da molécula neutra e o monoânion (5).

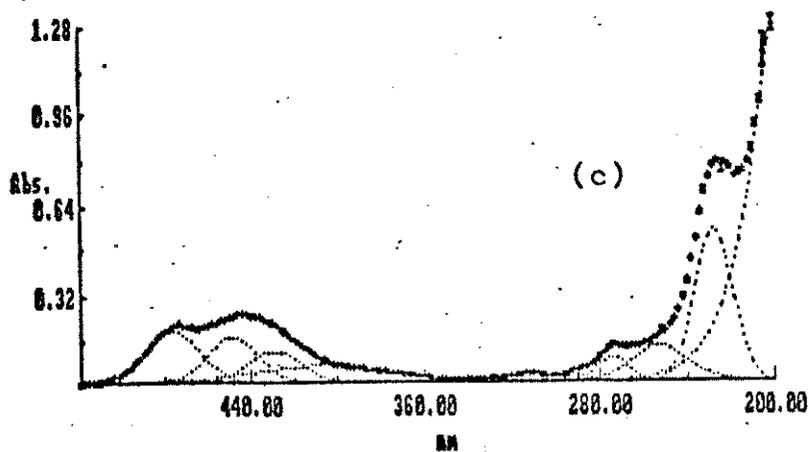
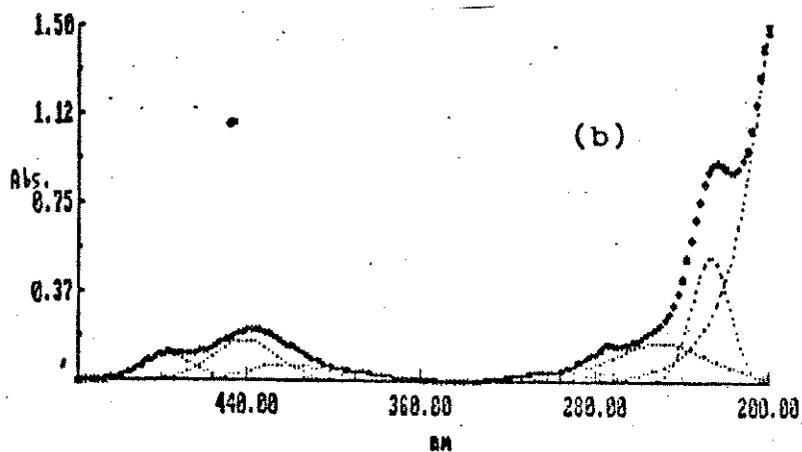
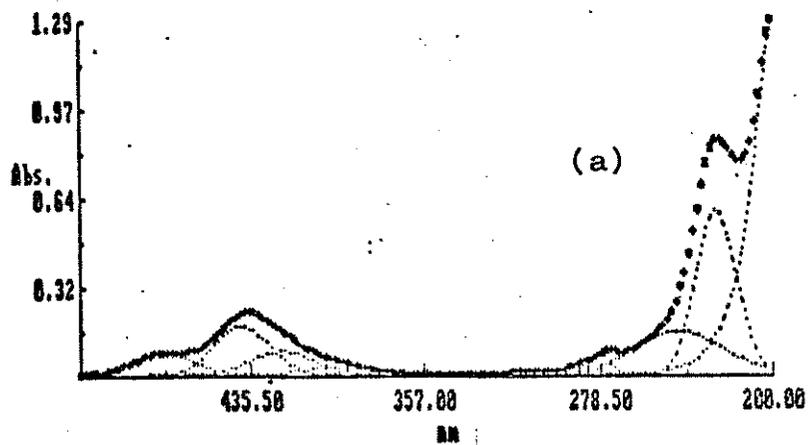


Figura 3.5: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 3,33 (2); (b) 3,73 (2) e (c) 4,18 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

No pH = 4,58 (figura 3.6a), pode-se notar as seguintes bandas: 474,5; 448,8; 429,8; 399,3 nm. Verifica-se que todas as bandas têm as suas intensidades relativas aumentadas, embora a banda, cujo máximo se situa em 474,5 nm, apresente uma maior intensificação em relação às outras bandas citadas. Considerando-se que o segundo pKa da fluoresceína é 4,44, supõe-se que no pH 4,58 há uma concentração maior da espécie monoaniônica (5).

À medida que o pH continua a aumentar (entre 4,58 e 5,72) observa-se que todas as bandas se deslocam  $\approx$  5 nm para a região do vermelho, exceto a última banda em  $\approx$  385 nm que tem um deslocamento para a região do azul (figuras 3.6b a 3.7a).

Em pH = 6,02 (figura 3.7b) verifica-se a existência de cinco bandas na região do visível centradas em: 488,5; 465,6; 448,2; 428,7 e 386,9 nm. Pode-se atribuir o aparecimento da quinta banda ao deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da espécie dianiônica (6). Provavelmente, neste pH, estão presentes em equilíbrio as espécies: quinonóide (2), monoaniônica (5) e dianiônica (6), equilíbrio este que, em pH = 6,60 (figura 3.8a) se desloca no sentido de formação do diânion (6). Observa-se uma diminuição da meia largura da banda e um aumento acentuado na intensidade relativa da banda em 489,2 nm. As outras bandas observadas são: 465,0; 449,0; 439,7 e 384,6 nm. Nota-se ainda que  $I_{489,0} : I_{465,0} \approx 2,5$ , indicando um aumento da concentração do diânion (6) em solução.

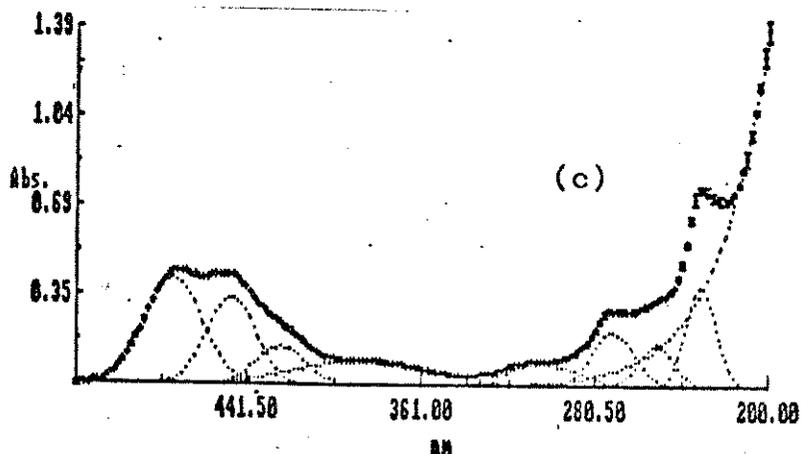
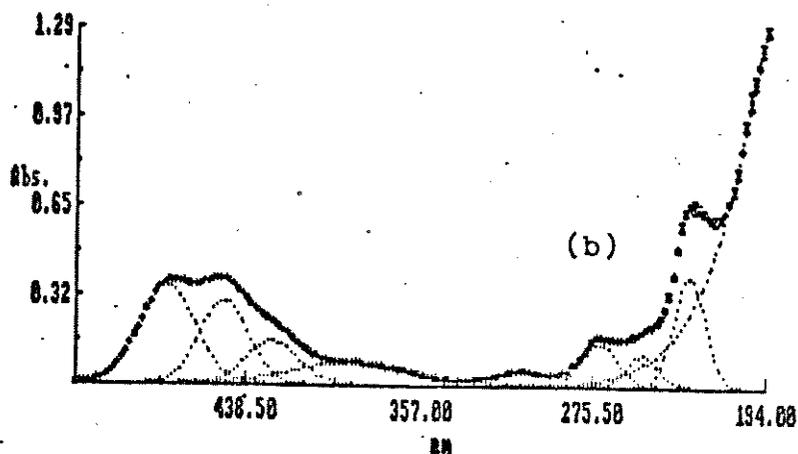
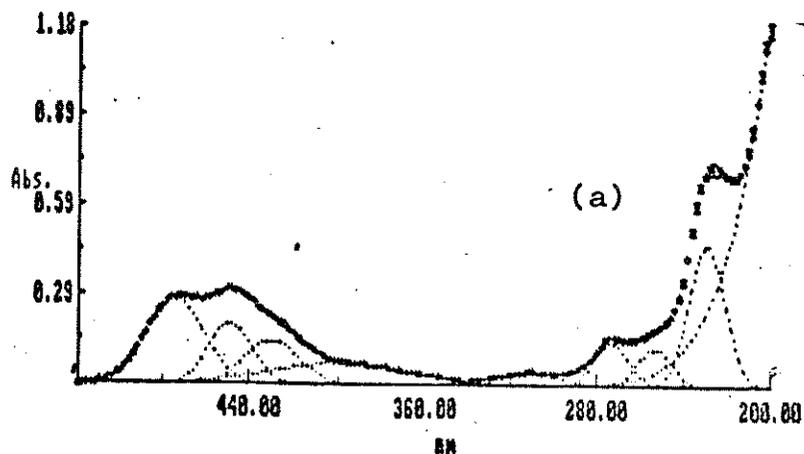


Figura 3.6: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 4,58 (2); (b) 5,05 (2) e (c) 5,61 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

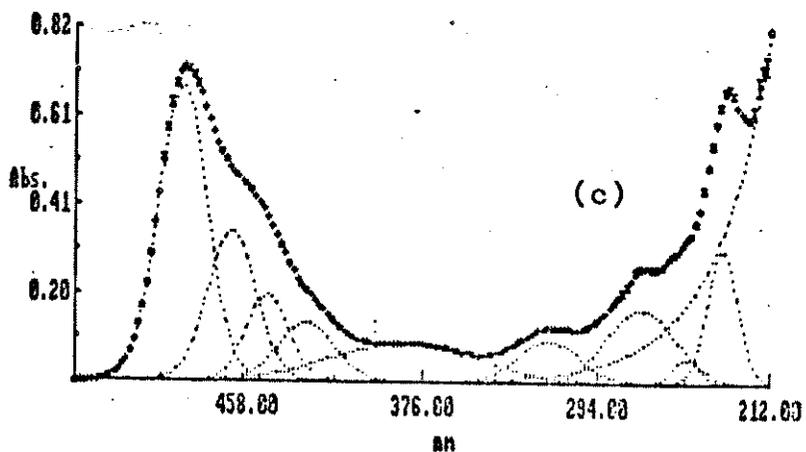
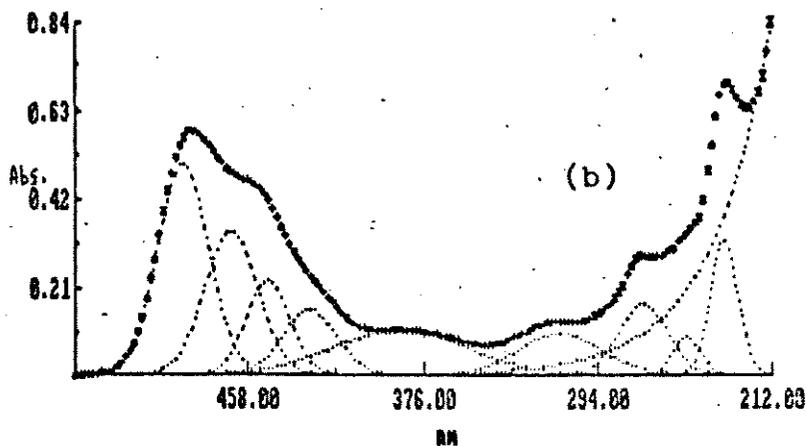
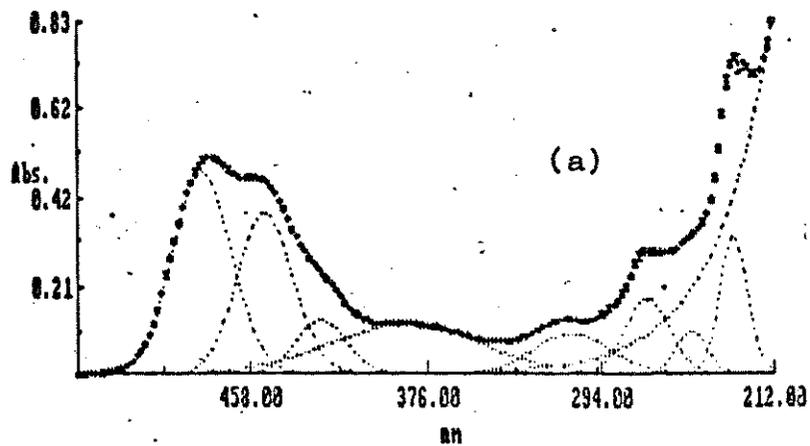


Figura 3.7: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 5,72 (2); (b) 6,02 (2) e (c) 6,37 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

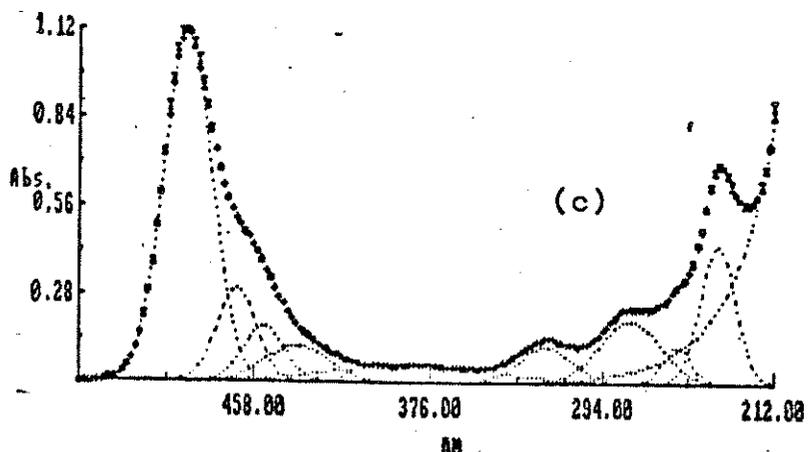
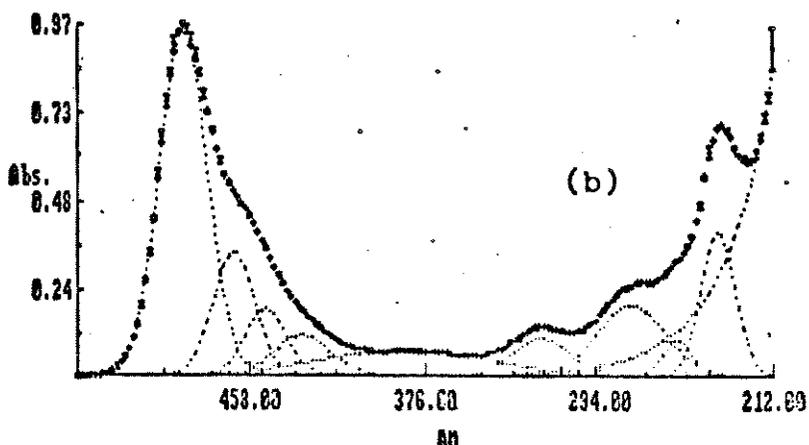
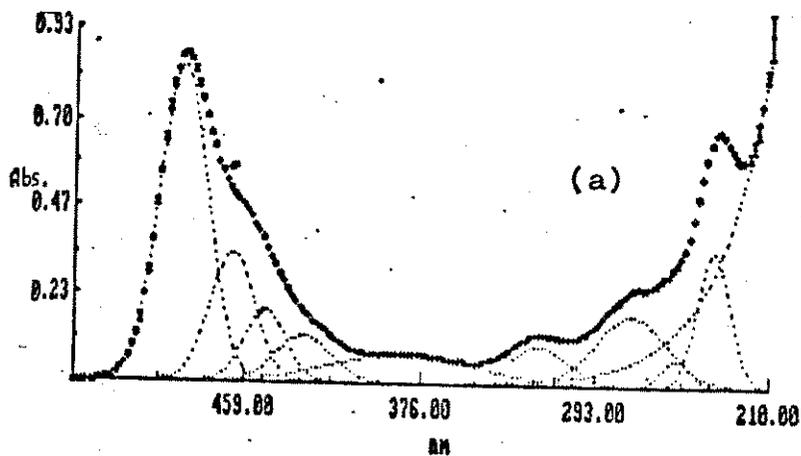


Figura 3.8: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 6,60 (2); (b) 6,79 (2) e (c) 7,14 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

A espécie dianiônica predomina em pH = 6,79, uma vez que o terceiro e último pKa da fluoresceína é atingido em 6,7. As bandas observadas são: 489,8; 465,6; 450,4; 432,9 e 385,2 nm. Verificando-se uma razão de intensidade  $I_{489,8} : I_{465,6} \approx 3:1$  (figura 3.8b).

Em pH subsequentes, constata-se um aumento significativo na intensidade da banda em cerca de 490 nm, em relação às outras bandas. Supõe-se que isto indica um aumento da concentração da espécie dianiônica (6) em solução (figuras 3.8c e 3.9a).

No último pH estudado (pH = 8,23) (figura 3.9b), o espectro eletrônico de absorção da fluoresceína na região do visível apresenta as seguintes bandas 489,3; 466,4; 454,7; 388,7 e 385,6 nm, com uma razão de intensidades de  $I_{489,3} : I_{466,4} \approx 4:1$ . Conclui-se assim, que o equilíbrio está totalmente deslocado no sentido de formação da espécie dianiônica (6).

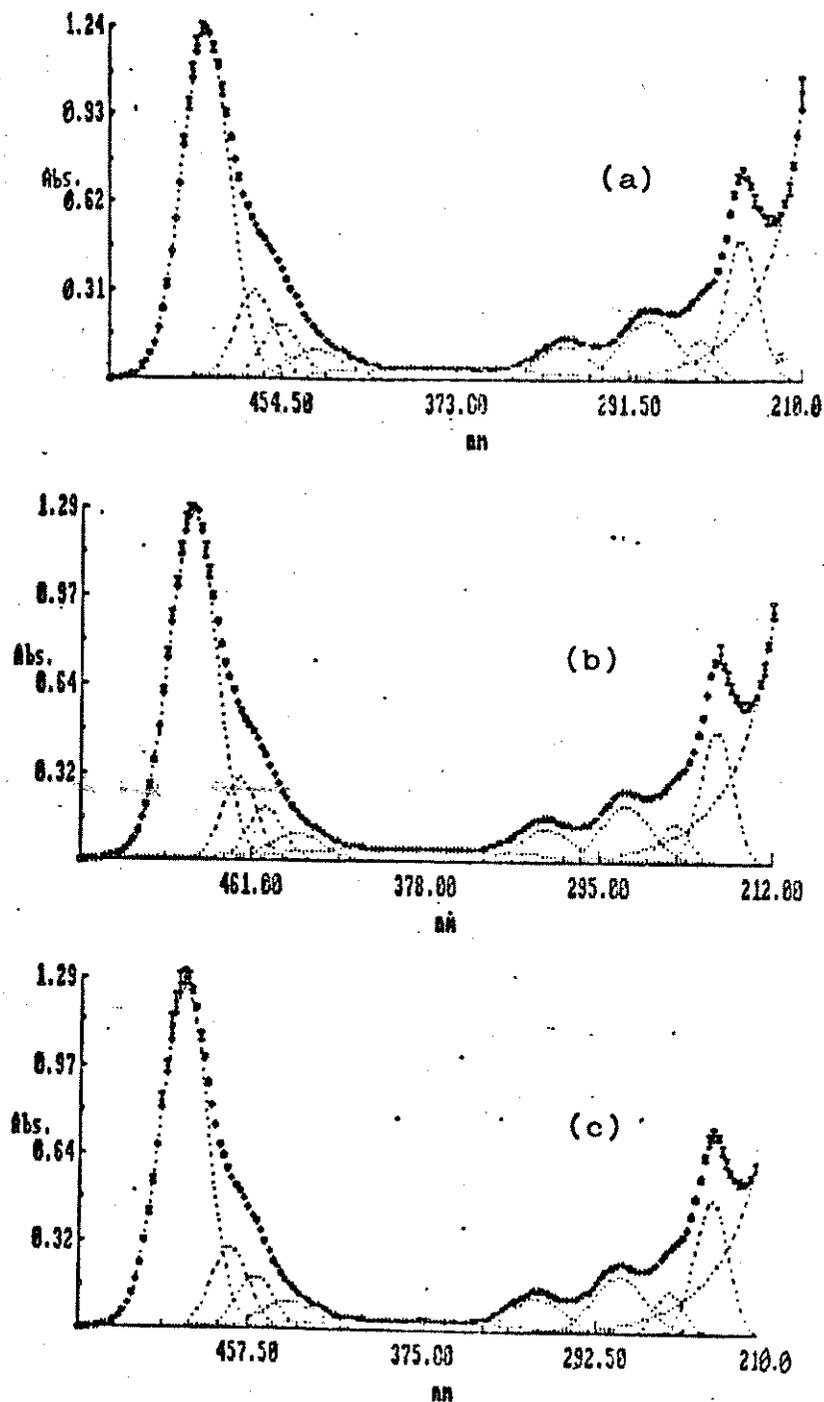


Figura 3.9: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 7,57 (2); (b) 7,93 (2) e (c) 8,23 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorvância.

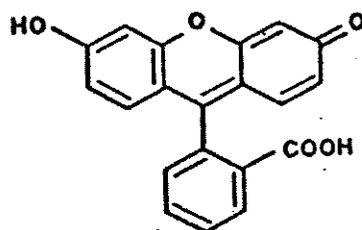
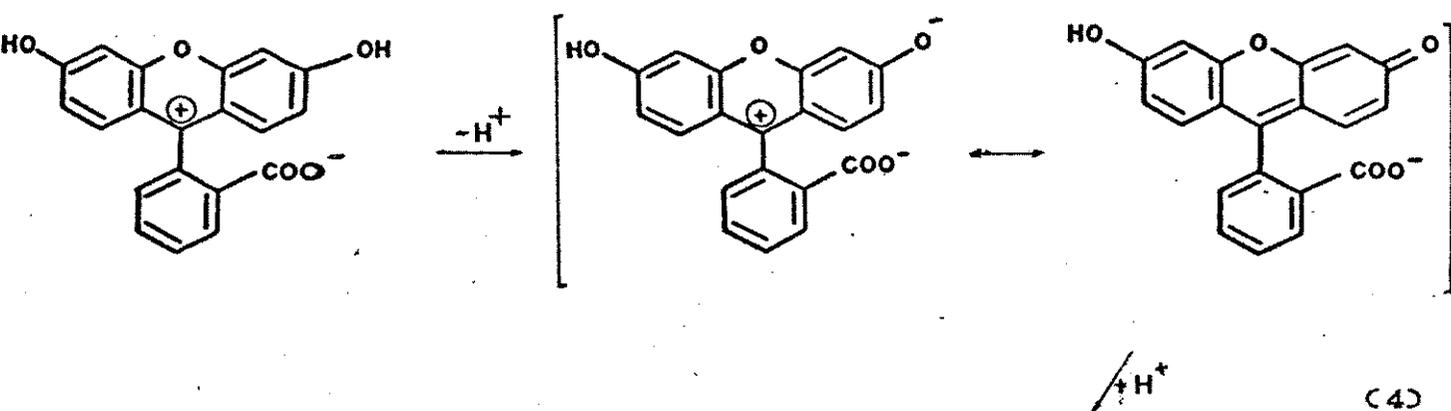
### 3.1.3- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE EMISSÃO:

Leonhart e co-autores<sup>(6)</sup> determinaram os valores dos rendimentos quânticos de fluorescência das quatro formas da fluoresceína: cátion (1), molécula neutra, monoânion (5) e diânion (6) são, respectivamente, 0,39, 0,00, 0,26 e 0,93. Assumiram, no entanto, que as formas neutras se apresentam apenas como espécie quinonóide (2) e lactônica (3) e obtiveram os valores das constantes de equilíbrio no estado excitado singlete:  $K_1^* = 0,18$ ,  $K_2^* = 9,0$  e  $K_3^* = 1,18 \times 10^{-7}$  ( $pK_3^* = 6,9$ ). O cálculo de  $K_1^*$  e  $K_2^*$  foi feito através de um programa computacional, considerando que a concentração relativa da molécula neutra era nula no estado excitado. Embora estes valores fossem compatíveis com os dados experimentais, questionaram o significado físico dos mesmos, uma vez que consideraram que a molécula neutra não emite fluorescência. Posteriormente, Guyot e outros<sup>(7)</sup> calcularam os seguintes valores para as constantes de equilíbrio no estado excitado singlete:  $pK_1^* = 2,0$ ;  $pK_2^* = 4,0$  e  $pK_3^* = 5,7$ . Os valores do rendimentos quânticos de fluorescência relativos às formas neutra e monoaniônica foram, respectivamente, 0,14 e 0,26. Em quaisquer casos, observa-se, que os  $pK^*$  são menores do que os do estado eletrônico fundamental.

### 3.1.4- RESULTADOS OBTIDOS DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE EMISSÃO:

Os espectros eletrônicos de emissão da fluoresceína nas soluções aquosas ácidas 5 e 10 M apresentam uma banda larga, assimétrica na região do vermelho, não resolvida vibronicamente com  $\lambda_{\text{max}} = 480$  nm, atribuída à espécie catiônica (1) (figuras 3.10.a e 3.10b).

No pH = 0,03 (figura 3.10c), observa-se uma banda larga de emissão de fluorescência com máximo em 508 nm e um ombro em  $\approx 480$  nm, além de uma diminuição na intensidade total de emissão. Embora as espécies catiônica (1) e anfo-íon (4) tenham o mesmo perfil da banda de absorção na região do visível, devido ao anel xantênico carregado positivamente, supõe-se que a banda de emissão em  $\lambda = 508$  nm seja devida ao anfo-íon (4), enquanto que o ombro é atribuído à emissão da espécie catiônica (1). Segundo Martín e Lindqvist<sup>(2)</sup>, ocorre uma reação protolítica do anfo-íon (4) no estado eletrônico excitado em duas etapas: (a) um próton é dissociado do grupo xantênico; e (b) a perda do próton neste grupo diminui a força ácida do grupo carboxilato e resulta na sua protonação do íon carboxila. O resultado efetivo é a transformação do anfo-íon (4), no estado eletrônico excitado, na forma quinonóide (2), de acordo com o seguinte mecanismo<sup>(2)</sup>:



ou seja,



Como informação adicional para confirmar o modelo descrito, observa-se que o espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em solução aquosa de ácido sulfúrico 5 M (figura 3.30d) apresenta uma banda assimétrica na região do azul com máximo em 460 nm ( $\lambda_{EM} = 480$  nm) relativa ao cátion (1). Esta banda é praticamente, a imagem especular da banda de emissão, podendo-se concluir que é a mesma espécie, no caso a catiónica (1), que absorve e emite.

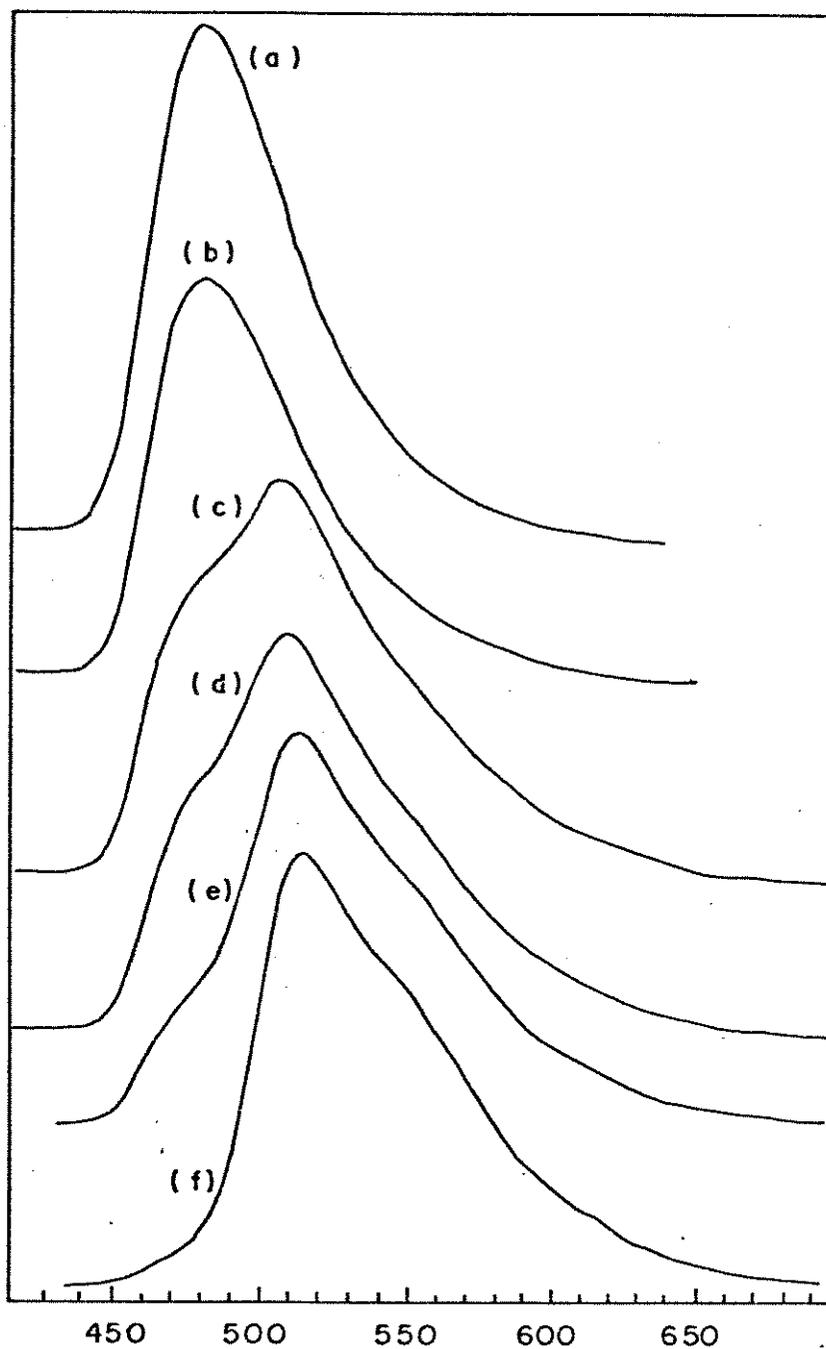


Figura 3.10: Espectros eletrônicos de emissão de fluorescência da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M em  $H_2SO_4$ , nas seguintes concentrações: (a) 10 M (1); (b) 5 M (1) e nos seguintes pH: (c) 0,03 (3); (d) 0,12 (3); (e) 0,43 (3) e (f) 1,14 (3). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

No pH = 0,12 (figura 3.10d), observa-se que a banda de emissão mais intensa aparece em 510 nm e tem um pequeno deslocamento espectral para a região do vermelho em relação ao espectro eletrônico de emissão do corante em pH 0,03. Além disso, o ombro em  $\approx 480$  nm tem sua intensidade relativa diminuída. Este resultado sugere uma diminuição na concentração da espécie catiônica (1) e um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do anfo-íon (4).

No pH seguinte, 0,43 (figura 3.10e), verifica-se que: (a) diminui a intensidade relativa do ombro em  $\approx 480$  nm; (b) o máximo da banda se situa em 514 nm; (c) há o aparecimento de um ombro em  $\approx 550$  nm. Este ombro em 550 nm é atribuído ao acoplamento de certas frequências vibracionais fundamentais da molécula como um todo ou em parte, com a transição eletrônica principal da molécula<sup>(8)</sup>. Sugere-se um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da espécie neutra quinonóide (2), estando ainda presentes em solução as espécies catiônica (1) e anfo-íon (4), que sofre uma reação no estado excitado e se transforma na espécie quinonóide (2).

O espectro eletrônico de excitação da fluoresceína no pH = 1,14 (figura 3.31b) apresenta uma banda muito similar à banda de excitação do corante em ácido sulfúrico 5 M (figura 3.30d), com  $\lambda_{\max} \approx 460$  nm ( $\lambda_{EM} = 516$  nm).

Esta hipótese de reação do anfo-íon no estado eletrônico excitado se fortalece quando se analisa os resultados espectrais

para a solução em pH = 1,14. Nesse caso, enquanto o espectro eletrônico de excitação apresenta uma banda muito similar àquela presente em solução aquosa de ácido sulfúrico 5 M,  $\lambda_{\max} \approx 460$  nm ( $\lambda_{EM} = 516$  nm), o espectro eletrônico de emissão difere tanto no comprimento de onda de emissão, com bandas em 480 nm e 516 nm, quanto no seu contorno (figura 3.10f).

Pode-se concluir, portanto, que o anfo-íon (4) absorve (está presente em solução no estado eletrônico fundamental), ou seja, é excitado e a espécie quinonóide (2) emite, estando presente no estado eletrônico excitado.

À medida que o pH da solução aumenta (até pH = 2,19) (figuras 3.11a a 3.11c) pode-se verificar que: o máximo de emissão se situa em 516 nm; o ombro existente em  $\approx 480$  nm desaparece e aquele situado em 550 nm tem um pequeno aumento de intensidade; verifica-se, ainda, uma diminuição na intensidade total de emissão. Sugere-se, desta forma, a presença da molécula neutra em equilíbrio. Paralelamente a este estudo, registrou-se os espectros eletrônicos de emissão da fluoresceína em soluções muito diluídas ( $1 \times 10^{-7}$  e  $1 \times 10^{-6}$  M) para as quais seguramente não há formação de agregados e verificou-se a existência de uma banda com máximo em 515 nm e um ombro na região de 550 nm (figuras 3.12a 3.12c).

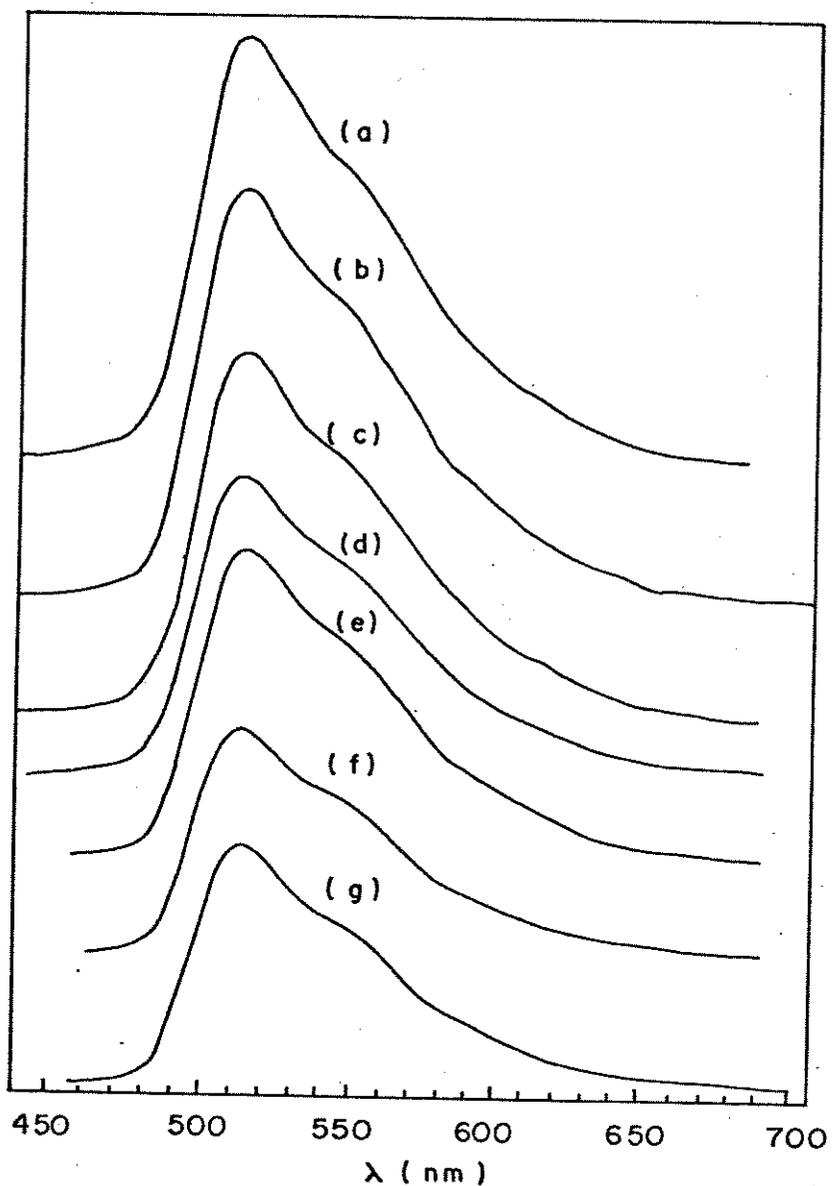


Figura 3.11: Espectros eletrônicos de emissão de fluorescência da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M, nos seguintes pH: (a) 1,48 (3); (b) 1,82 (3); (c) 2,19 (3); (d) 2,55 (3); (e) 2,92 (3); (f) 3,73 (1) e (g) 4,18 (1). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

Nos pH subsequentes, 2,55 e 2,92 (figuras 3.11d e 3.11e), não se observa mudança espectral significativa, exceto na intensidade total de emissão que tem uma diminuição mais pronunciada. Este comportamento é o mesmo observado nos espectros eletrônicos de absorção, para os quais nesta faixa de pH, ocorre uma diminuição no coeficiente de extinção molar. Outras observações sobre este comportamento serão detalhadas posteriormente no item 3.5.3.

No pH = 3,73 (figura 3.11f) observa-se um aumento pronunciado na intensidade de emissão, embora  $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$  e o contorno da banda não tenham se modificado. Pode-se sugerir como hipótese o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da espécie monoaniônica (5) e como o seu centro emissor é análogo ao da molécula neutra quinonóide (2), não se espera uma alteração no contorno da banda. Uma vez que os rendimentos quânticos de emissão de fluorescência das formas neutra e monoaniônica (5) são, respectivamente, 0,14 e 0,26<sup>(7)</sup>, deve-se chegar à mesma conclusão, isto é, que a espécie monoaniônica também esteja presente em solução.

Para pH mais altos, verifica-se que a intensidade total de emissão continua a aumentar, sendo o dobro em pH = 4,58 comparada àquela do pH = 4,18 (figuras 3.13a e 3.11g). Sugere-se que este comportamento seja devido ao deslocamento do equilíbrio cada vez mais no sentido da formação da espécie monoaniônica (5).

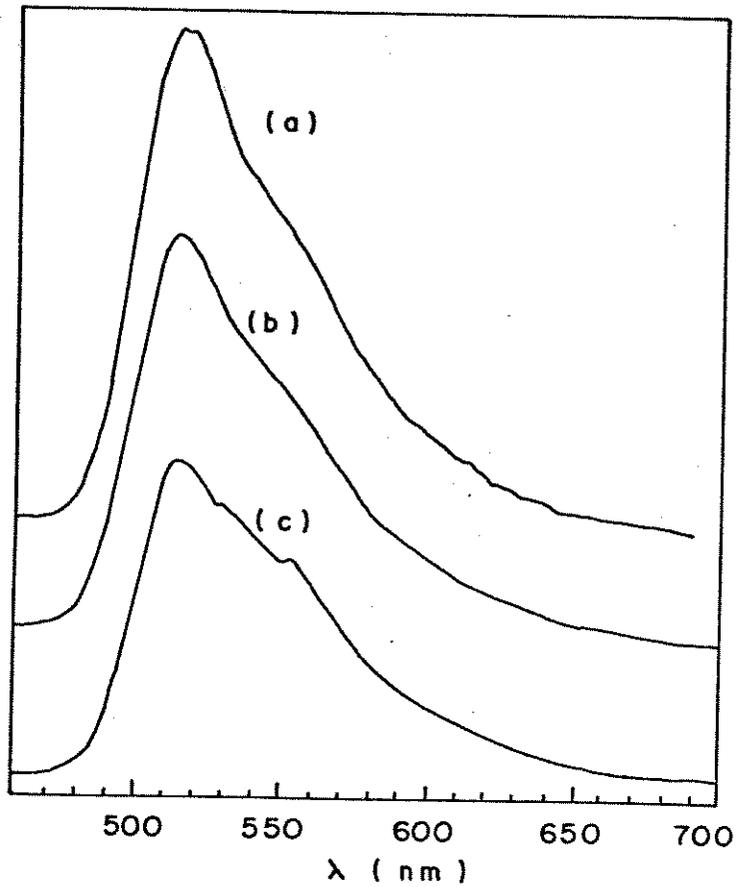


Figura 3.12: Espectros eletrônicos de emissão de fluorescência da fluoresceína em água nas seguintes concentrações: (a)  $1,0 \times 10^{-7}$  M (30); (b)  $1,0 \times 10^{-6}$  M (3); (c)  $1,0 \times 10^{-5}$  M (1). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

Nos pH subsequentes: 5,05, 5,41 e 5,81 (figuras 3.13b à 3.13d), não se observa modificações significativas na posição dos  $\lambda_{\text{max}}$ , no contorno ou na intensidade da banda de emissão. Porém, na solução de pH = 6,02 (figura 3.13e), constata-se que o  $\lambda_{\text{max}}$  de emissão se desloca para 517 nm e há uma alteração no contorno da banda, havendo um pequeno aumento na sua intensidade relativa e uma diminuição da intensidade relativa do ombro na região de  $\approx$  550 nm. Supõe-se que, com o aumento do pH, a concentração da espécie dianiônica (6) vai aumentando, à medida que se aproxima do  $\text{pK}_a = 6,7$ .

Nos pH seguintes: 6,37; 6,60; 6,79; 6,96 e 7,14, (figuras 3.13f à 3.15a) constata-se simultaneamente um deslocamento do máximo de emissão para  $\lambda = 519$  nm e uma diminuição na sua meia largura, que provavelmente está relacionada com o desaparecimento do ombro existente na região de 550 nm.

A partir de pH 7,33 até 8,23 (figuras 3.15b à 3.15d), não se observa alterações espectrais significativas, sugerindo-se que o equilíbrio de dissociação da fluoresceína se encontra totalmente deslocado no sentido de formação da espécie dianiônica (6).

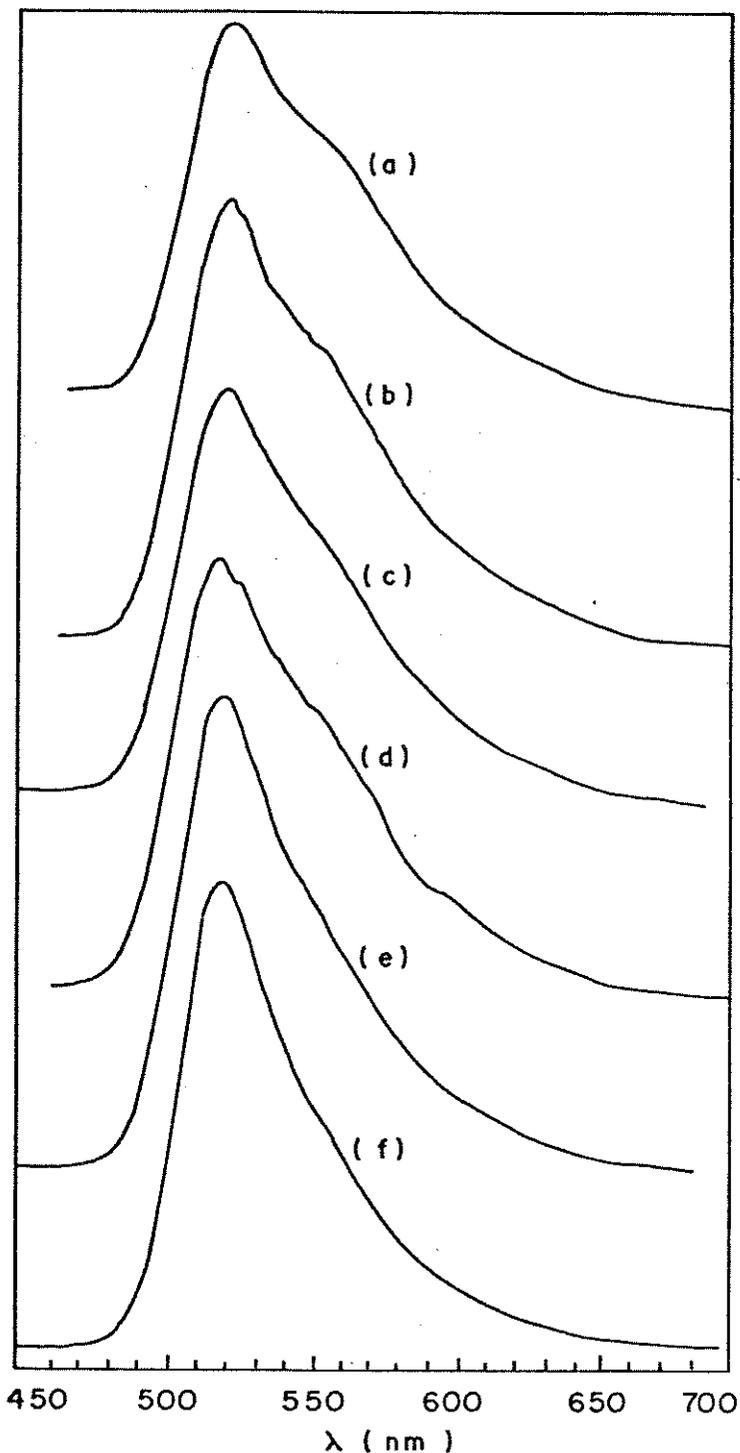


Figura 3.13: Espectros eletrônicos de emissão de fluorescência da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M, nos seguintes pH: (a) 4,58 (1); (b) 5,05 (1); (c) 5,41 (1); (d) 5,61 (1); (e) 6,02 (1) e (f) 6,37 (1). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

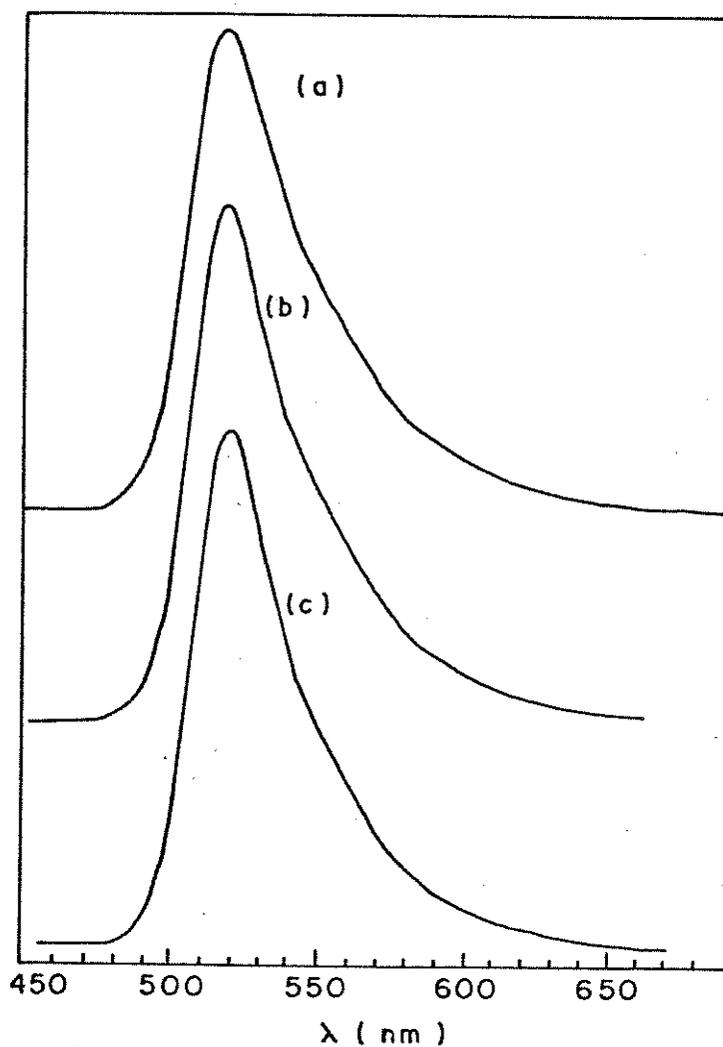


Figura 2.14: Espectros eletrônicos de emissão de fluorescência da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M, nos seguintes pH: (a) 6,60 (1); (b) 6,79 (1) e (c) 6,96 (1). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

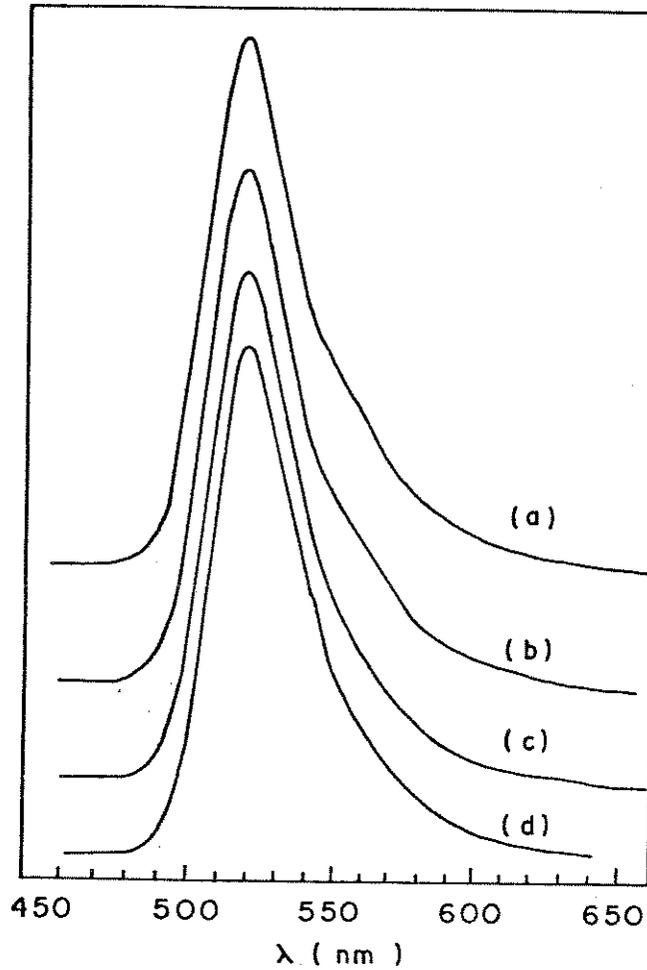


Figura 3.18: Espectros eletrônicos de emissão de fluorescência da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M, nos seguintes pH: (a) 7,14 (1); (b) 7,33 (1); (c) 7,93 (1) e (d) 8,23 (1). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

### 3.1.5- RELAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO:

Segundo Martin e co-autor<sup>(2)</sup>, a fluoresceína possui os anéis xantênico e benzênico dissustituído situados em planos perpendiculares, não havendo deslocalização eletrônica entre os mesmos. Devido a esta geometria molecular, os espectros eletrônicos de absorção do corante em solventes viscosos e não-viscosos podem ser separados em dois conjuntos distintos de bandas. Ao anel xantênico e ao anel benzênico dissustituído são atribuídas as bandas de absorção nas regiões do visível e ultra-violeta, respectivamente.

Pode-se constatar, ainda, que os equilíbrios de dissociação das formas iônicas da fluoresceína são fortemente dependentes do pH das soluções aquosas diluídas.

Em função do fato de que em solução aquosa a fluoresceína se encontra dissociada em diferentes formas em equilíbrio e, considerando-se, ainda, que algumas destas formas absorvem e emitem na região do visível em mesmos comprimentos de onda, não é possível se atribuir comprimentos de onda máximos precisos para cada forma.

A tabela 3.1 mostra os valores dos comprimentos de onda máximos aproximados de cada espécie. A espécie catiónica (1) tem o máximo de absorção situado em 436 nm e emissão em  $\approx$  480 nm. O anfo-íon (4) apresenta o comprimento de onda máximo de absorção

( $\approx 439$  nm) muito próximo ao da espécie catiônica, pois estas duas formas possuem o anel xantênico carregado positivamente. O comprimento de onda de emissão observado em soluções contendo o anfo-ion (4) no estado eletrônico fundamental, é observado em 508 nm e atribuído a emissão da forma quinonóide (2).

As espécies quinonóide (2) e monoaniônica (5), apresentam os comprimentos de onda máximos de absorção e emissão muito próximos, centrados em  $\approx 475$  nm e  $\approx 515$  nm, respectivamente. Pode-se atribuir este comportamento ao fato de que ambas as espécies possuem o anel xantênico com carga efetiva nula. Apesar desta coincidência de espectros eletrônicos, estas espécies podem ser identificadas devido ao deslocamento de equilíbrio, sendo que para pH mais baixos a forma quinonóide se apresenta em equilíbrio com as outras formas neutras, enquanto que em pH mais altos, este equilíbrio se desloca com a presença das formas monoaniônica e dianiônica. A consequência disto é que ocorre uma mudança de contorno das bandas.

Finalmente, por apresentar o anel xantênico carregado negativamente, a espécie dianiônica (6) apresenta os espectros eletrônicos de absorção e emissão diferentes das demais espécies, com máximos centrados em 489 nm e 520 nm, respectivamente.

TABELA 3.1: Comprimentos de onda máximos das bandas eletrônicas de absorção ( $\lambda_{\text{ABS}}$ ), emissão ( $\lambda_{\text{EM}}$ ) da fluoresceína em soluções aquosas diluídas.

ESPÉCIE	$\lambda_{\text{ABS}}$ (nm)	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm)
catiônica	436	480
anfo-ion	439	508
quinonóide	476	515
monoaniônica	476	515
di aniônica	489	520

A figura 3.16 procura mostrar a variação do comprimento de onda em relação ao pH, das bandas de absorção com  $\lambda_{\text{max}}$  inicial em  $\approx 436$  nm e  $\approx 464$  nm das soluções aquosas diluídas de fluoresceína. Esta figura permite a determinação aproximada dos três pKa da fluoresceína, relativos às suas diferentes formas de dissociação. Pode-se verificar uma mudança de coeficiente angular da curva □ entre os pH 2 - 3, faixa em que se situa o primeiro pKa, cujo valor é 2,13. Através da curva ▲, pode-se observar uma alteração do coeficiente angular em pH  $\approx 4,0$ ; valor próximo do segundo pKa, cujo valor é 4,44. Finalmente, pode-se observar uma nova mudança do coeficiente angular (curva □) em pH  $\approx 6,0$ , que corresponderia ao terceiro pKa, cujo valor é 6,7.

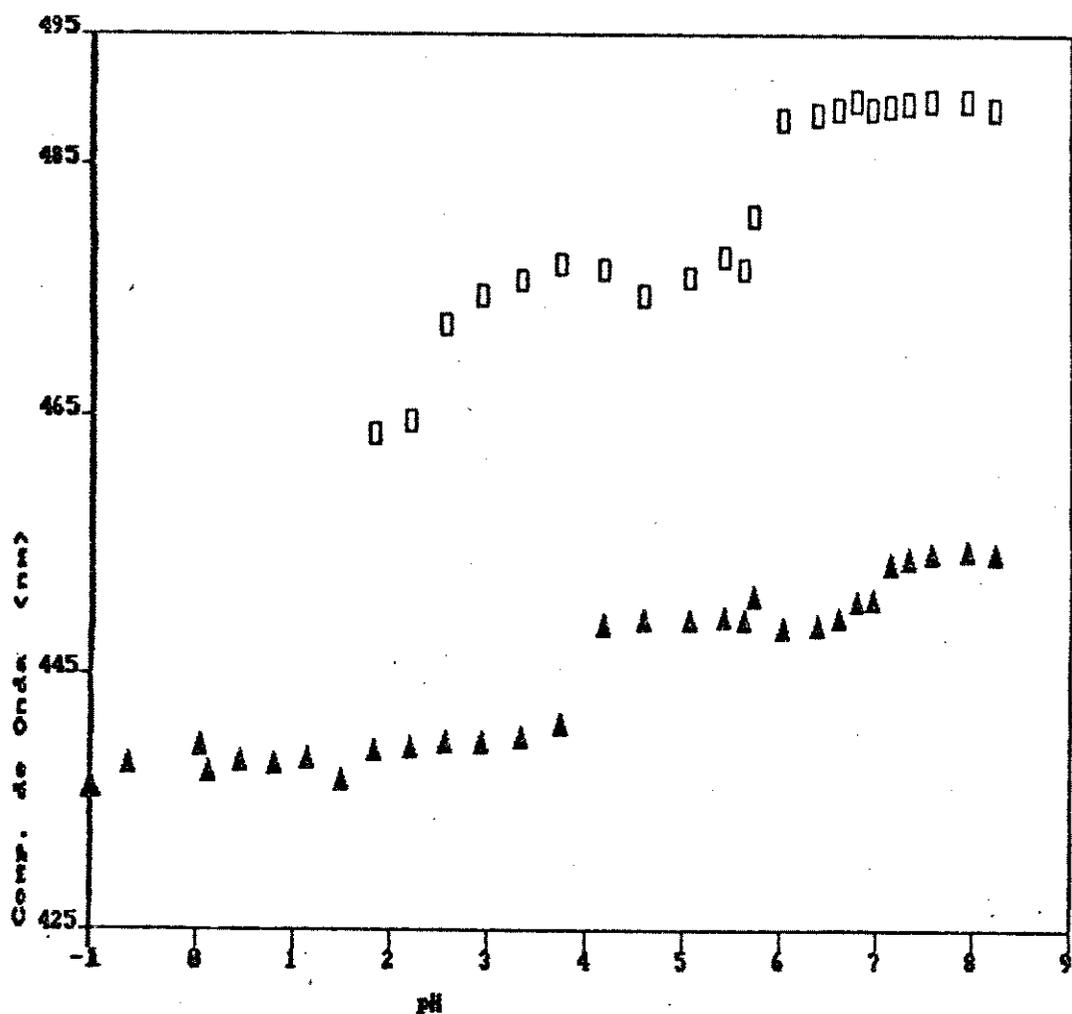


Figura 3.16: Gráfico do comprimento de onda vs. pH das bandas eletrônicas de absorção centradas em: (▲)  $\approx 436$  nm e (□)  $\approx 464$  nm; nas soluções diluídas de fluoresceína.

### 3.2- ANÁLISE DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO DA FLUORESCEINA EM SOLUÇÕES AQUOSAS SATURADAS:

#### 3.2.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FORMAÇÃO DE AGREGADOS:

Após o estudo do comportamento fotofísico das espécies monoméricas da fluoresceína em soluções diluídas, e para completar o estudo da fotofísica da fluoresceína, propõe-se como segundo objetivo o estudo do corante em soluções concentradas dependentes do pH, para a verificação do efeito de formação de agregados nos espectros eletrônicos de absorção e emissão.

Para uma melhor compreensão do comportamento da fluoresceína em soluções saturadas, foi necessário um estudo simultâneo dos espectros eletrônicos de absorção e emissão, uma vez que forneceram informações complementares, como será demonstrado a seguir.

Segundo Rohatgi<sup>(9)</sup>, a agregação de corantes causa mudanças pronunciadas nos espectros eletrônicos de absorção e emissão. Essas mudanças podem ser explicadas através da Teoria Excitônica, que se baseia na interação de cromóforos em cristais moleculares (Teoria de Davydov) e em agregados diméricos<sup>(9)</sup>.

A Teoria de Interação Excitônica quando aplicada a moléculas diméricas do corante, prediz um deslocamento espectral para alta frequência se dois cromóforos idênticos são arranjos

em uma orientação exatamente paralela, de modo que os dipolos de transição criados quando da excitação, então em fase para as duas moléculas componentes do dímero. É criada uma degenerescência, devida à probabilidade igual de excitação das duas moléculas no dímero. Esta degenerescência é destruída quando os dois dipolos de transição sofrem interações de primeira ordem com a radiação eletromagnética, e resultam em dois estados de energia, cujas auto-funções são:  $\psi_a \cdot \psi_b^* \pm \psi_a^* \cdot \psi_b$ , onde as funções de onda do estado fundamental podem ser representadas por  $\psi_a \cdot \psi_b$  e o asterisco representa a função de onda da molécula excitada<sup>(9)</sup>. A cada uma destas auto-funções está associado um auto-valor.

Para se analisar as possibilidades de transições eletrônicas para essa situação e, conseqüentemente, poder interpretar as observações experimentais, deve-se considerar três possibilidades de orientação dos momentos de transição das moléculas que formam o dímero<sup>(10)</sup>:

(a) Os dois momentos de transição estão oblíquos ao eixo dimérico. Neste caso, o arranjo em fase dos dipolos de transição dos monômeros é atrativo e causa uma diminuição de energia, enquanto que o arranjo fora de fase dos dipolos de transição é repulsivo e leva a um aumento da energia do estado excitado da molécula dimérica. Os momentos de transição relativos às transições de dipolo elétrico do estado fundamental para os estados excitônicos do dímero são ,ambos, diferentes de zero. Portanto, as duas transições são permitidas e causam um desdobramento da banda do

monômero. Na figura 3.17 é mostrado o diagrama dos níveis de energia dos estados excitônicos. Os ovais correspondem ao perfil da molécula, e as flechas duplas indicam o eixo de polarização da transição eletrônica molecular considerada<sup>(10)</sup>.

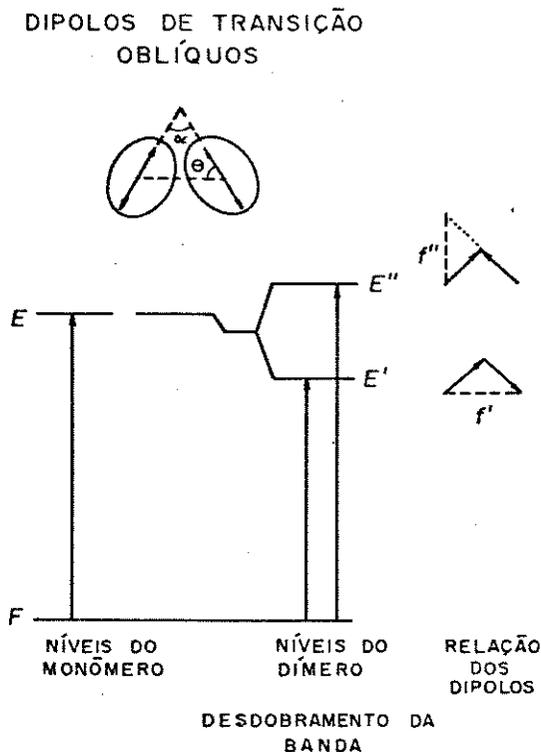


Figura 3.17: Diagrama de energia da banda excitônica para o dímero molecular com os dipolos de transição oblíquos<sup>(10)</sup>.

(b) Os dois momentos de transição paralelos, apresentam duas possibilidades de arranjo: (1) interação fora de fase, que corresponde eletrostaticamente a uma diminuição de energia e (2) interação em fase, que causa um aumento de energia devido à repulsão. Como o momento de transição é dado pelo vetor soma dos

momentos de dipolo individuais de transição na molécula componente, as transições do estado fundamental para o estado excitônico  $E'$  são proibidas, enquanto que as transições do estado fundamental para o estado  $E''$  são permitidas (figura 3.18), resultando em um deslocamento da banda eletrônica de absorção para a região do azul<sup>(10)</sup>.

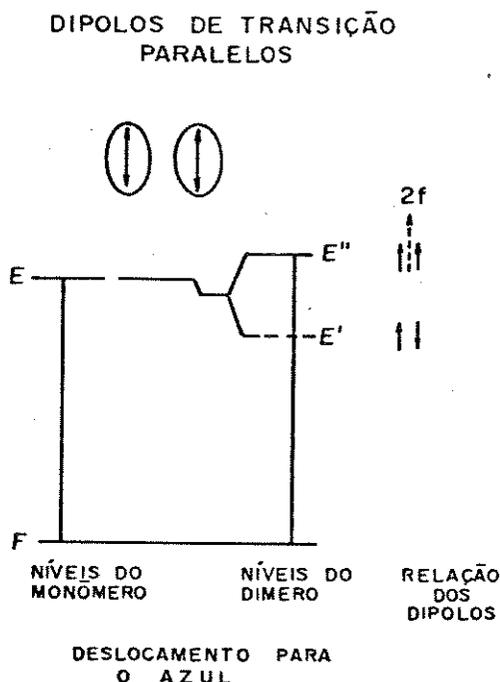


Figura 3.18: Diagrama de energia da banda excitônica para o dímero molecular, com os dipolos de transição paralelos<sup>(10)</sup>.

(c) Uma outra situação possível é aquela em que os dipolos de transição alinhados em uma molécula dimérica apresentam um diagrama de níveis de energia excitônica mostrado na figura 3.19. Através do diagrama pode-se observar que o arranjo em fase dos

dipolos de transição causa uma atração eletrostática, produzindo o estado excitado  $E'$ , enquanto que o arranjo fora de fase causa repulsão eletrostática, resultando no estado  $E''$ . Portanto, os momentos de transição têm valores finitos do estado fundamental para o estado  $E'$ , resultando em um deslocamento para a região do vermelho da banda de absorção<sup>(10)</sup>.

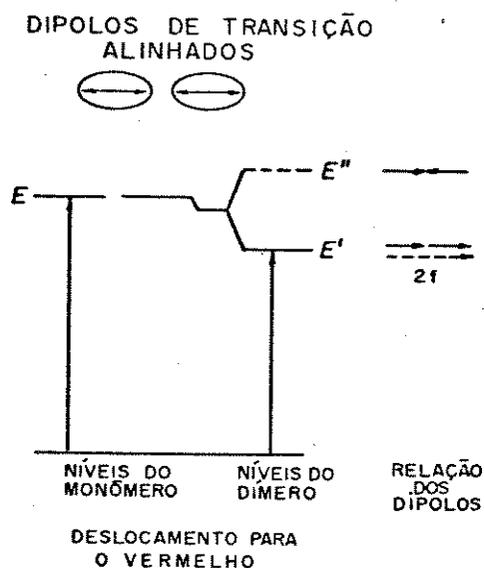


Figura 3.19: Diagrama de energia da banda excitônica para o dímero molecular, com os dipolos de transição alinhados<sup>(10)</sup>.

As propriedades espectrais de agregados moleculares estão relacionadas aos parâmetros estruturais e levam à avaliação de parâmetros deriváveis experimentalmente tais como: distância intermolecular, orientação molecular mútua e intensidade da absorção da luz pelas moléculas componentes<sup>(8)</sup>.

Para transições permitidas por dipolo elétrico (o caso da fluoresceína), o potencial de interação é do tipo dipolo-dipolo e a interação de ressonância é dada por:

$$U = - \frac{|\vec{M}|^2}{R^3} \cdot (\cos\theta + 3\cos^2\phi) \quad (6)$$

onde,  $R$  é a distância intermolecular,  $\vec{M}$  é o momento de transição do monômero,  $\theta$  é o ângulo entre os eixos de polarização dos monômeros e  $\phi$  é o ângulo entre os eixos de polarização dos monômeros e a linha dos centros moleculares. A interação de ressonância é igual à metade da diferença energética entre os máximos das bandas diméricas<sup>(11)</sup>. A extensão da separação entre estas bandas dependerá da força de interação entre os dois dipolos oscilantes nas duas moléculas<sup>(12)</sup>. O ângulo  $\theta$  é dado por:

$$\tan^2\theta = \frac{f_1}{f_2} \quad (7)$$

onde  $f_1$  e  $f_2$  são as forças dos osciladores das bandas diméricas nos comprimentos de onda maior e menor em relação à banda do monômero<sup>(13)</sup>.

A distância entre os monômeros ( $R$ ) depende da disposição geométrica<sup>(11)</sup>.

Com base no trabalho de Kasha e colaboradores<sup>(10)</sup>, Arbeloa e co-autores<sup>(11)</sup>, propuseram dois modelos, nos quais os momentos de dipolo elétrico estão oblíquos (figura 3.20).

No modelo I, os monômeros estão em planos paralelos com o ângulo *twist*,  $\theta$ , enquanto que no modelo II, eles estão no mesmo

plano formando um ângulo  $\theta$ . As interações de ressonância nestes modelos são <sup>(11)</sup>:

$$U = -\frac{|M^2|}{R^3} \cdot \cos\theta \quad (\text{modelo I}) \quad (8)$$

$$U = -\frac{|M^2|}{R^3} \cdot \left(\cos\theta + 3\text{sen}^2\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{modelo II}) \quad (9)$$

As hipóteses sobre se esse modelos se aplicam ou não ao caso da fluoresceína, têm que ser analisadas de modo diferente para cada uma de suas formas de dissociação, tendo em vista as possibilidades de diferentes interações eletrostáticas no caso dos ions e as possibilidades de interações soluto-solvente diferentes para as formas neutras. Para que as hipóteses possam ser colocadas, partir-se-á dos resultados espectrais obtidos.

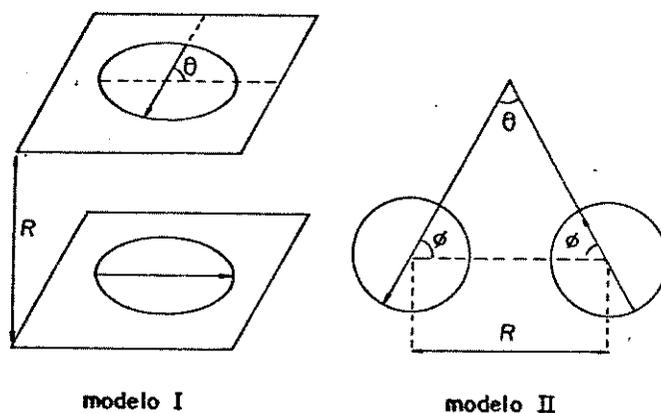


Figura 3.20: Modelos geométricos diméricos com dois parâmetros <sup>(11)</sup>.

### 3.2.2- RESULTADOS OBTIDOS:

#### A) SOLUÇÕES DE FLUORESCEINA EM ÁCIDO SULFÚRICO 5 E 10 M:

O espectro eletrônico de absorção na região do visível de uma solução saturada de fluoresceína (concentração  $\approx 1 \times 10^{-3}$  M em ácido sulfúrico 10 M apresenta uma banda assimétrica na região do azul em 436,5 nm (figura 3.21a), similar à banda observada na solução diluída análoga, atribuída à absorção do grupo xantênico carregado positivamente da espécie catiônica (1). O espectro eletrônico de emissão de fluorescência apresenta uma banda assimétrica na região do vermelho em 500 nm (figura 3.21c). Segundo Pandya e co-autor<sup>(14)</sup>, a emissão em concentrações muito baixas ( $\approx 3 \times 10^{-7}$  M) é essencialmente devida a monômeros, enquanto que em concentrações mais altas ( $\approx 3 \times 10^{-4}$  M) é devida a dímeros. Para concentrações intermediárias ( $\approx 3 \times 10^{-5}$  M), monômeros e dímeros co-existem em equilíbrio. Joshi e co-autores<sup>(15)</sup>, também chegaram à conclusão que já ocorre agregação em concentrações acima de  $1 \times 10^{-5}$  M. Portanto, pode-se concluir que em uma concentração  $\approx 1 \times 10^{-3}$  M, há absorção e emissão de agregados. É interessante notar que a banda de absorção relativa aos agregados não sofre um deslocamento significativo em relação à da espécie monomérica, enquanto que a banda de emissão sofre um deslocamento de 20 nm, comparando-se com o espectro eletrônico de emissão da

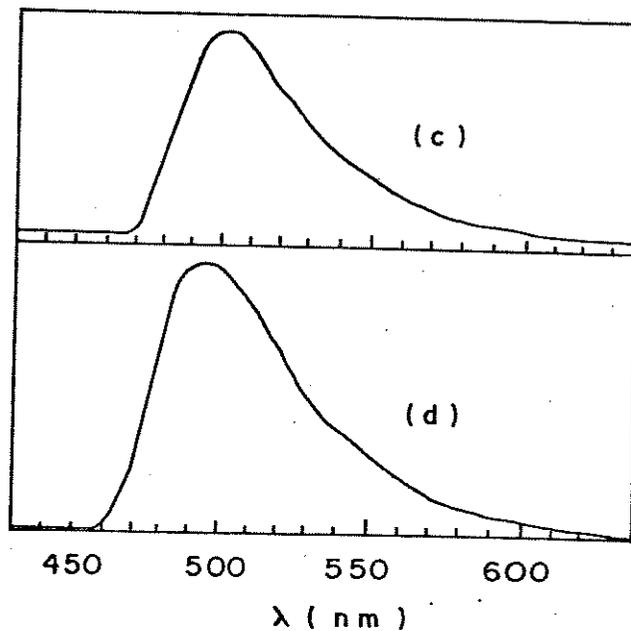
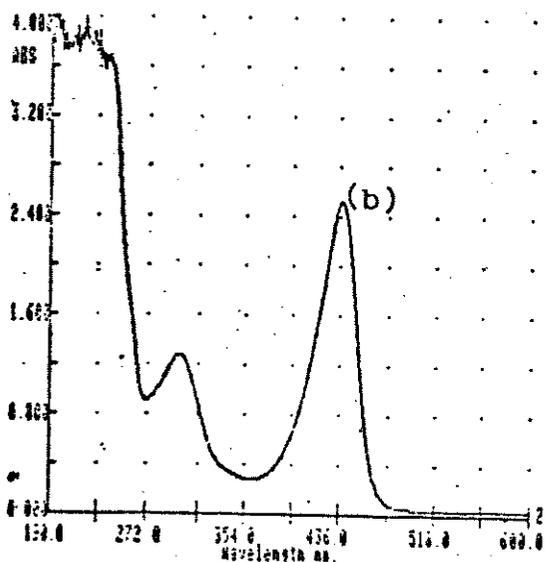
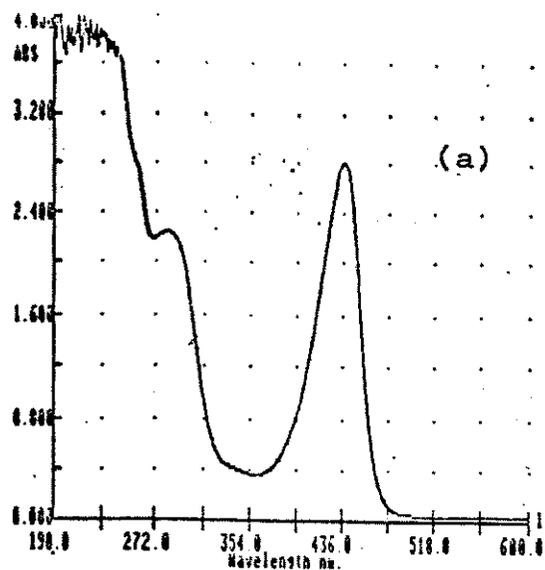


Figura 3.21: Espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência da fluoresceína em soluções aquosas saturadas, respectivamente, em: (a) e (c)  $H_2SO_4$  10 M (3,0); (b) e (d)  $H_2SO_4$  5 M (0,3). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro utilizado.

espécie monomérica. Supõe-se que a estrutura do agregado da fluoresceína tem o mesmo cromóforo da espécie monomérica.

O espectro eletrônico de absorção da fluoresceína em ácido sulfúrico 5 M apresenta o mesmo tipo de banda em 437,4 nm. O espectro de emissão apresenta uma banda assimétrica na região do vermelho em 495 nm, ou seja, o mesmo deslocamento espectral observado no espectro anterior. Nesse caso, também, deve-se inferir a existência de agregados nessa solução (figura 3.21b).

#### B) SOLUÇÕES ÁCIDAS (pKa < 2,13):

Em pH = 1,02, observa-se a presença de uma banda de absorção na região do visível em 437,4 nm, enquanto que a banda de emissão tem seu máximo em 515 nm, apresentando dois ombros, o primeiro menos pronunciado em  $\approx$  480 nm e o último em  $\approx$  550 nm (figura 3.22a). Através da análise do espectro de absorção, pode-se reafirmar que a espécie com anel xantênico carregado positivamente existe no estado eletrônico fundamental. Observa-se, porém, que a banda de emissão (figura 3.22c) é muito similar ao espectro de emissão da fluoresceína em soluções diluídas em pH = 0,43, que já havia sido atribuído à emissão do cátion (1) e anfo-ion (4). Segundo Diehl e co-autor<sup>(4)</sup>, as solubilidades das espécies anfo-ion (4) e quinonóide (2) decrescem na faixa  $1 \leq \text{pH} \leq 2$ , permanecendo aproximadamente constante entre  $2 \leq \text{pH} \leq 4$ . A partir do pH = 4, a solubilidade da fluoresceína

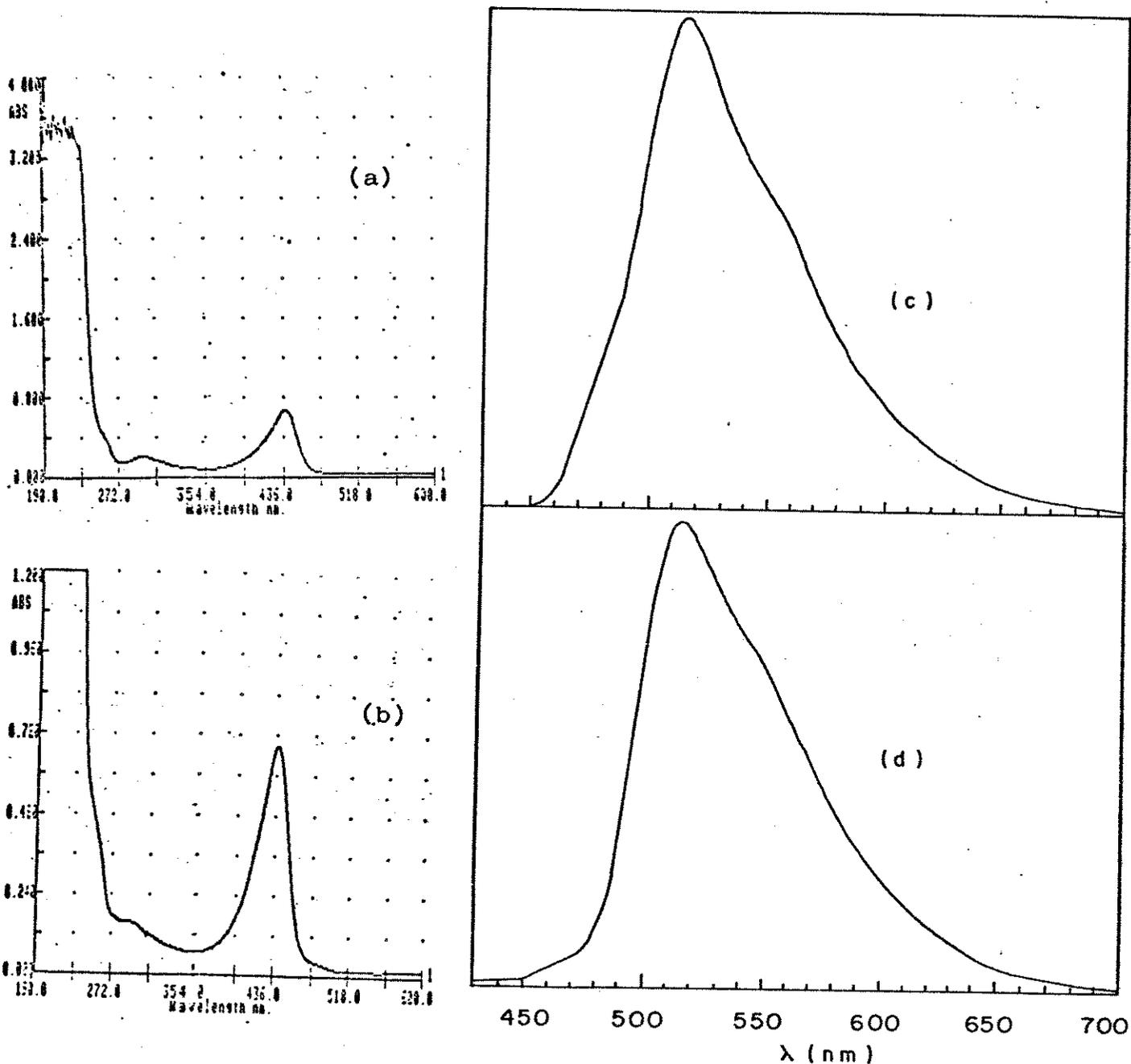


Figura 3.22: Espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência da fluoresceína em soluções aquosas saturadas, respectivamente, nos seguintes pH: (a) e (c) 1,02 (0,3); (b) e (d) 2,17 (1,0). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro utilizado.

passa a aumentar (figura 3.23) (tabela 3.2). À partir destes dados, verifica-se que tanto a espectroscopia eletrônica de absorção quanto a de emissão, não permitem conclusões definitivas sobre a presença de agregados na solução saturada de  $\text{pH} \approx 1,02$ , permitindo apenas a proposição da existência de um equilíbrio em solução envolvendo as formas: catiônica (1) e anfo-ion (4), conforme resultados apresentados no item 3.1.4. Os resultados da espectroscopia de excitação permitirão uma melhor identificação das espécies presentes nessa solução saturada e em outras, para as quais a solubilidade da fluoresceína é baixa (item 3.3.1).

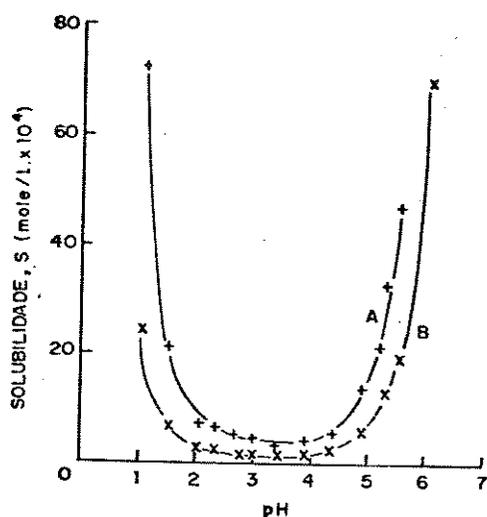


Figura 3.23: Solubilidade das espécies anfo-ion (4) (curva A) e quinonóide (2) (curva B) em função do pH a  $23^\circ\text{C}$  (4).

Tabela 3.2: Solubilidade das espécies: anfo-ion (4) e quinonóide (2) em função do pH, força iônica 0,10<sup>(4)</sup>.

pH INICIAL DO TAMPÃO	ANFO-ION		p-QUINONÓIDE	
	pH FINAL	CONCENTRAÇÃO CM	pH FINAL	CONCENTRAÇÃO CM
1,00	1,10	$7,22 \times 10^{-3}$	1,05	$2,41 \times 10^{-3}$
1,49	1,53	$2,11 \times 10^{-3}$	1,51	$6,92 \times 10^{-4}$
2,00	2,07	$7,82 \times 10^{-4}$	2,05	$2,59 \times 10^{-4}$
2,28	2,33	$6,62 \times 10^{-4}$	2,35	$2,50 \times 10^{-4}$
2,64	2,69	$5,29 \times 10^{-4}$	2,65	$1,87 \times 10^{-4}$
2,98	3,01	$4,81 \times 10^{-4}$	3,01	$1,69 \times 10^{-4}$
3,40	3,39	$3,85 \times 10^{-4}$	3,43	$1,50 \times 10^{-4}$
3,90	3,92	$4,45 \times 10^{-4}$	3,92	$1,62 \times 10^{-4}$
4,35	4,37	$5,84 \times 10^{-4}$	4,36	$2,17 \times 10^{-4}$
4,90	4,90	$1,40 \times 10^{-3}$	4,90	$5,06 \times 10^{-4}$
5,17	5,18	$2,15 \times 10^{-3}$	-	-
5,35	5,34	$3,31 \times 10^{-3}$	5,35	$1,25 \times 10^{-3}$
5,55	5,53	$4,72 \times 10^{-3}$	5,55	$1,90 \times 10^{-3}$
6,04	6,03	$1,80 \times 10^{-2}$	6,06	$6,95 \times 10^{-3}$

O espectro eletrônico de absorção da solução com pH = 2,17 (figura 3.22b) apresenta uma banda em 437,4 nm e uma banda pouco intensa em  $\approx$  469 nm, que é atribuída ao anel xantênico com carga efetiva nula. Quanto ao espectro eletrônico de emissão (figura 3.22d) constata-se uma diminuição da intensidade relativa

do ombro em  $\approx 480$  nm, além disso o  $\lambda$  máximo da banda se situa em 515 nm e não há alteração na intensidade relativa do ombro em  $\approx 550$  nm. Considerando-se que nesse pH a fluoresceína é pouco solúvel<sup>(4)</sup> e uma vez que o espectro de emissão é muito similar àquele observado utilizando-se solução diluída nesta faixa de pH, propõe-se que estão presentes apenas as espécies monoméricas em equilíbrio: catiônica (1) em concentração baixa, anfo-íon (4) e quinonóide (2).

#### C) SOLUÇÕES ÁCIDAS (pKa < 4.4):

Observa-se que a banda de absorção na região de comprimento de onda maior,  $\approx 470$  nm, se intensifica à medida que o pH aumenta (2,50; 4,30 e 4,37) (figuras 3.24a, 3.24b e 3.25a), havendo deslocamentos espectrais de  $\approx 10$  nm para a banda em  $\approx 440$  nm e de  $\approx 4$  nm para a banda em  $\approx 470$  nm. No pH 4,37, são observadas as seguintes bandas na região do visível: 473,2; 449,3 e  $\approx 390$  nm, sendo as intensidades relativas  $I_{473,2} \approx I_{449,3}$ . Quanto aos espectros eletrônicos de emissão (figuras 3.24c, 3.24d e 3.25c), observa-se uma banda em 515 nm com um ombro em  $\approx 550$  nm, não havendo deslocamento do máximo de emissão, com o aumento do pH. Considerando-se que as bandas de absorção e de emissão apresentam os deslocamentos espectrais das bandas análogos àqueles observados para soluções diluídas, propõe-se que não ocorra a formação de dímeros, trímeros ou oligômeros.

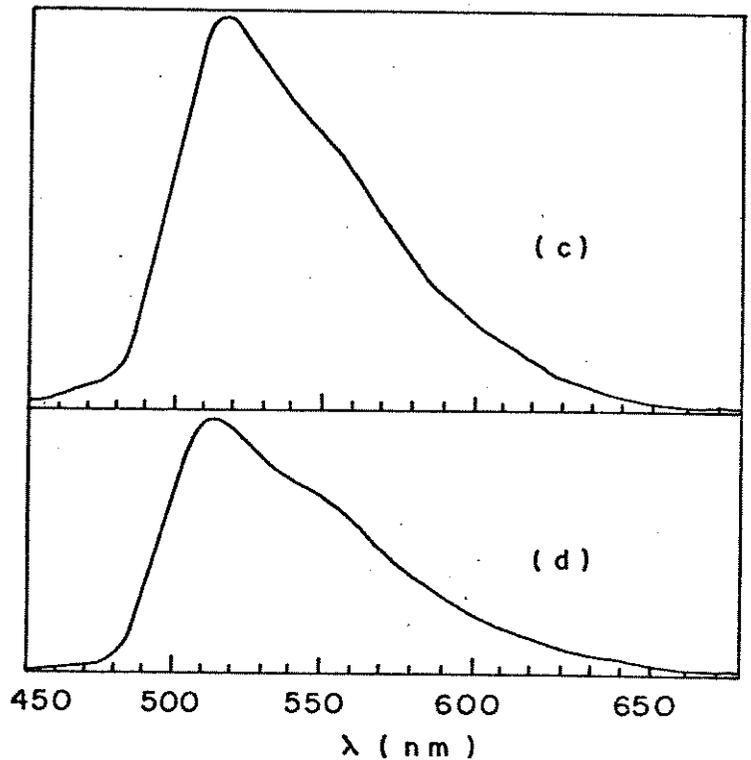
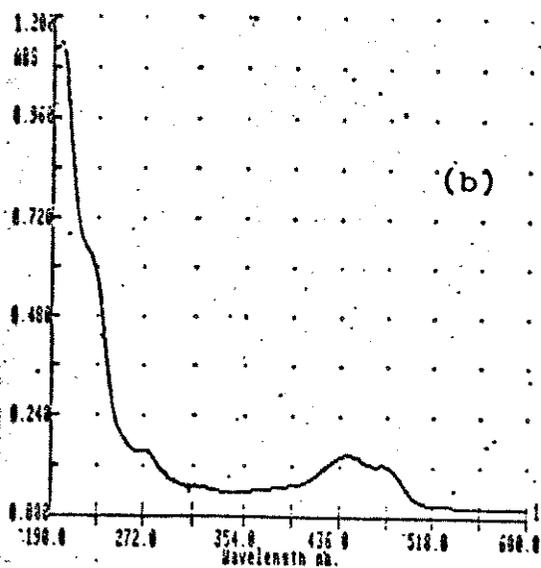
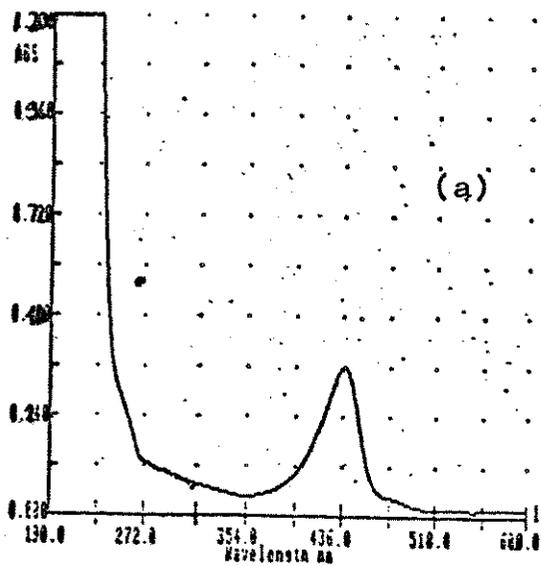


Figura 3.24: Espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência da fluoresceína em soluções aquosas saturadas, respectivamente, nos seguintes pH: (a) e (c) 2,50 (1,0); (b) e (d) 4,30 (1,0). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro utilizado.

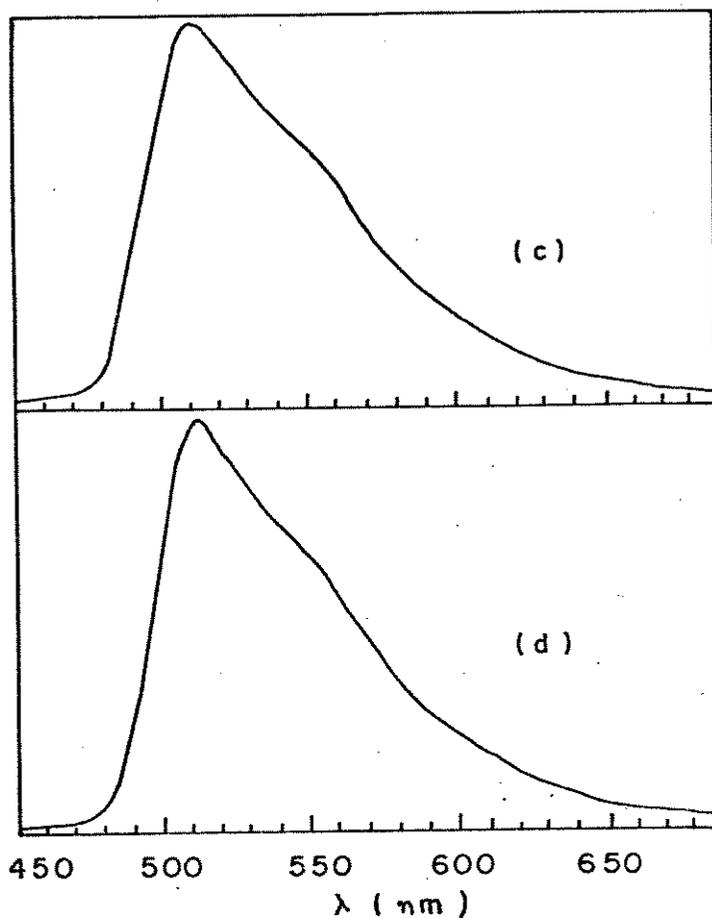
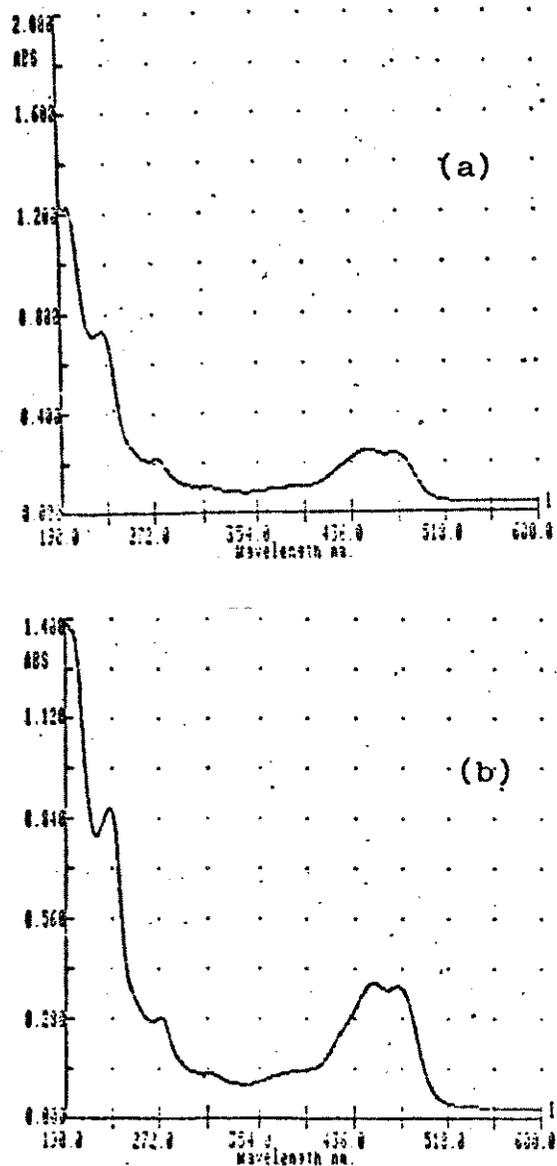


Figura 3.25: Espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência da fluoresceína em soluções aquosas saturadas, respectivamente, nos seguintes pH: (a) e (c) 4,37 (1,0); (b) e (d) 4,66 (0,3). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro utilizado.

O deslocamento para a região do vermelho nos espectros eletrônicos de absorção com o aumento do pH pode ser explicado pela formação da espécie monoaniônica (5), em equilíbrio com as espécies da molécula neutra.

O espectro eletrônico de absorção da solução com pH = 4,66 (figura 3.25b) apresenta três bandas principais na região do visível: 473,7; 451,2 e  $\approx$  390 nm, sendo as intensidades relativas  $I_{473,7} = I_{451,2}$ . O espectro eletrônico de emissão (figura 3.25d) é muito similar àquele observado anteriormente, exceto por uma menor meia largura da banda, sugerindo também um equilíbrio entre as espécies monoméricas: quinonóide (2) e monoaniônica (5).

#### D) SOLUÇÕES ÁCIDAS (pKa < 6,7):

Na solução de pH = 5,47, nota-se três bandas principais de absorção na região do visível: 474,9; 453,8 e 390,8 nm, sendo que a primeira possui uma intensidade relativa maior (figura 3.26a). O espectro de emissão apresenta uma banda com máximo em 520 nm, apresentando o ombro em 550 nm menos pronunciado (figura 3.26c). Neste caso, pode-se sugerir como hipótese o início de formação de agregados, uma vez que o máximo de emissão, que havia permanecido na mesma posição até então, se desloca 5 nm.

No pH 5,75, observa-se no espectro eletrônico de absorção, as três bandas principais em: 476,7; 455,7 e 389,9 nm, havendo um aumento na intensidade relativa da primeira

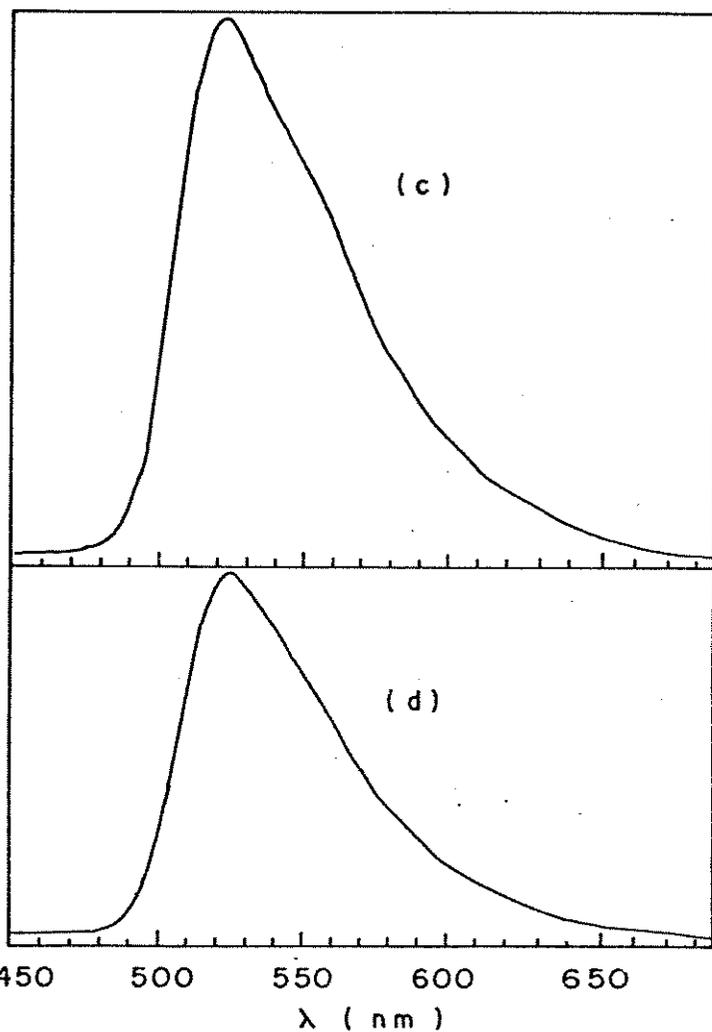
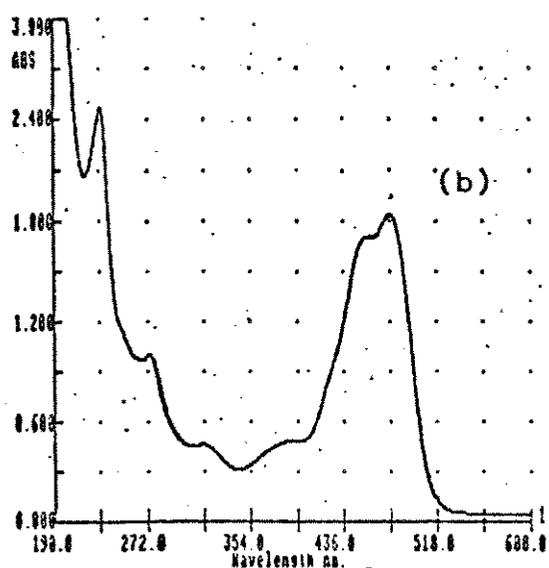
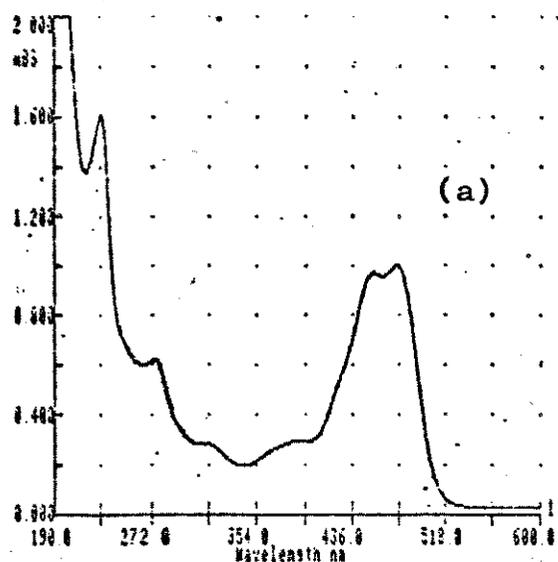


Figura 3.26: Espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência da fluoresceína em soluções aquosas saturadas, respectivamente, nos seguintes pH: (a) e (c) 5,47 (0,3); (b) e (d) 5,75 (0,1). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro utilizado.

banda. O máximo da banda de emissão se situa em 522 nm, deslocado em relação à solução diluída (figura 3.26d). Provavelmente, há formação de agregados da espécie monoaniônica (5), uma vez que o pH é maior que o correspondente ao segundo pKa (pKa = 4,4).

As modificações espectrais da solução com pH = 6,31 são significativas tanto para soluções diluídas, quanto para soluções saturadas, em relação àquelas com pH menores (figura 3.27a). A primeira banda de absorção apresenta um deslocamento ( $\lambda_{\text{max}} = 495,8 \text{ nm}$ ) e um aumento considerável na intensidade relativa, de modo que a segunda banda ( $\approx 455 \text{ nm}$ ) passa a ser um ombro. O espectro de emissão apresenta uma banda assimétrica na região do vermelho com  $\lambda_{\text{max}} = 531 \text{ nm}$  (figura 3.27c). Considerando-se esses deslocamentos espectrais e mudanças no contorno das bandas de emissão, sugere-se que ocorra formação de agregados. Os espectros eletrônicos de absorção das soluções: saturada e diluída do corante nesta faixa de pH têm contornos de banda muito parecidos, poder-se-ia sugerir como hipótese a formação de agregados, cujos monômeros consistem na espécie monoaniônica (5), conforme indicado anteriormente (item 3.1.2).

No pH = 6,49, observa-se uma diminuição significativa da meia largura da banda de absorção em 497,6 nm e diminuição da intensidade relativa do ombro em  $\approx 455 \text{ nm}$  (figura 3.27b). Em soluções diluídas, estas características indicaram um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da espécie dianiônica (6), uma vez que este pH está próximo ao terceiro pKa (pKa = 8,7). O

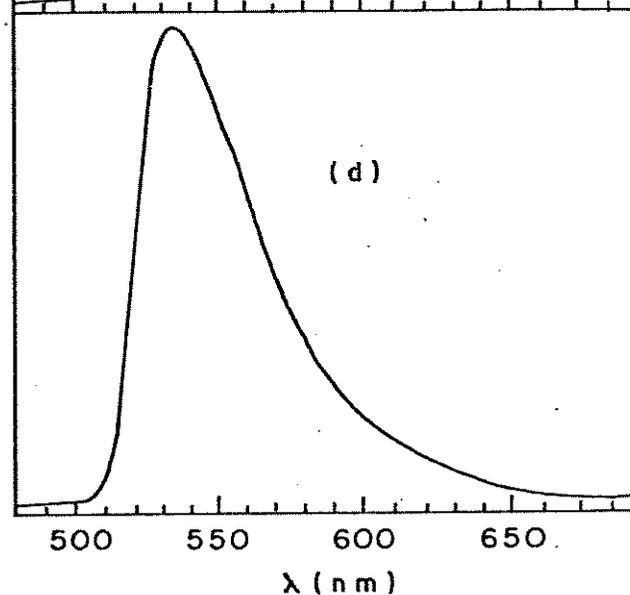
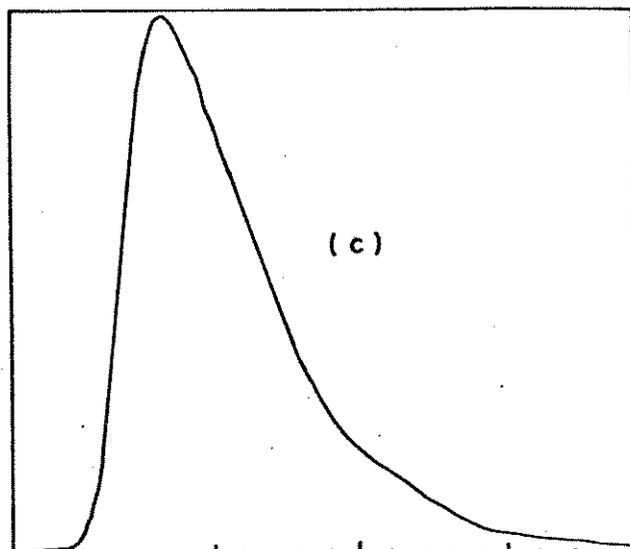
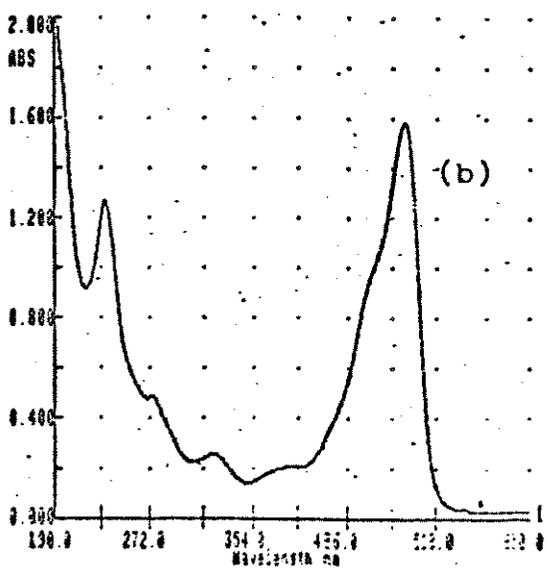
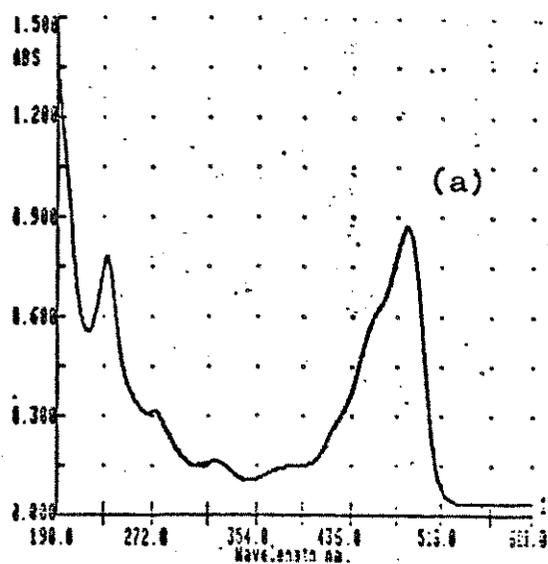


Figura 3.27: Espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência da fluoresceína em soluções aquosas saturadas, respectivamente, nos seguintes pH: (a) e (c) 6,31 (0,1); (b) e (d) 6,49 (0,1). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro utilizado.

espectro eletrônico de emissão apresenta banda larga, assimétrica na região do vermelho com  $\lambda_{\text{max}} = 535$  nm (figura 3.27d). Novamente, se propõe que este deslocamento do máximo de emissão seja atribuído à formação de agregados da espécie monoaniônica (5) e/ou da espécie dianiônica (6).

#### E- SOLUÇÕES NEUTRAS E BÁSICAS (pKa $\geq$ 6,7):

No pH = 6,67, a banda de absorção tem seu máximo em 488,5 nm, um ombro em  $\approx$  455 nm e uma banda de intensidade relativa bem menor em  $\approx$  390 nm (figura 3.28a). No espectro eletrônico de emissão, observa-se uma banda assimétrica na região do vermelho com  $\lambda_{\text{max}} = 538$  nm. Considerando-se que nesta faixa de pH, a solução saturada apresenta uma banda de emissão com máximo em 538 nm, deslocada para a região do vermelho em relação àquela da solução diluída (519 nm) (figura 3.28c) e o espectro eletrônico de absorção, além de um contorno diferente, apresenta  $I_{488,5} : I_{455} \approx 2,5$ ; sugere-se que esteja ocorrendo a formação de agregados, cuja espécie monomérica é o diânion (6).

O espectro eletrônico de absorção em pH = 7,73 apresenta duas bandas: a primeira muito intensa com o máximo de absorbância pouco resolvido em  $\approx$  478 nm, e a segunda  $\approx$  dez vezes menos intensa com máximo de absorbância em 381,7 nm (figura 3.28b). O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda assimétrica na região do vermelho com máximo situado em 542 nm. Até este pH, verifica-se

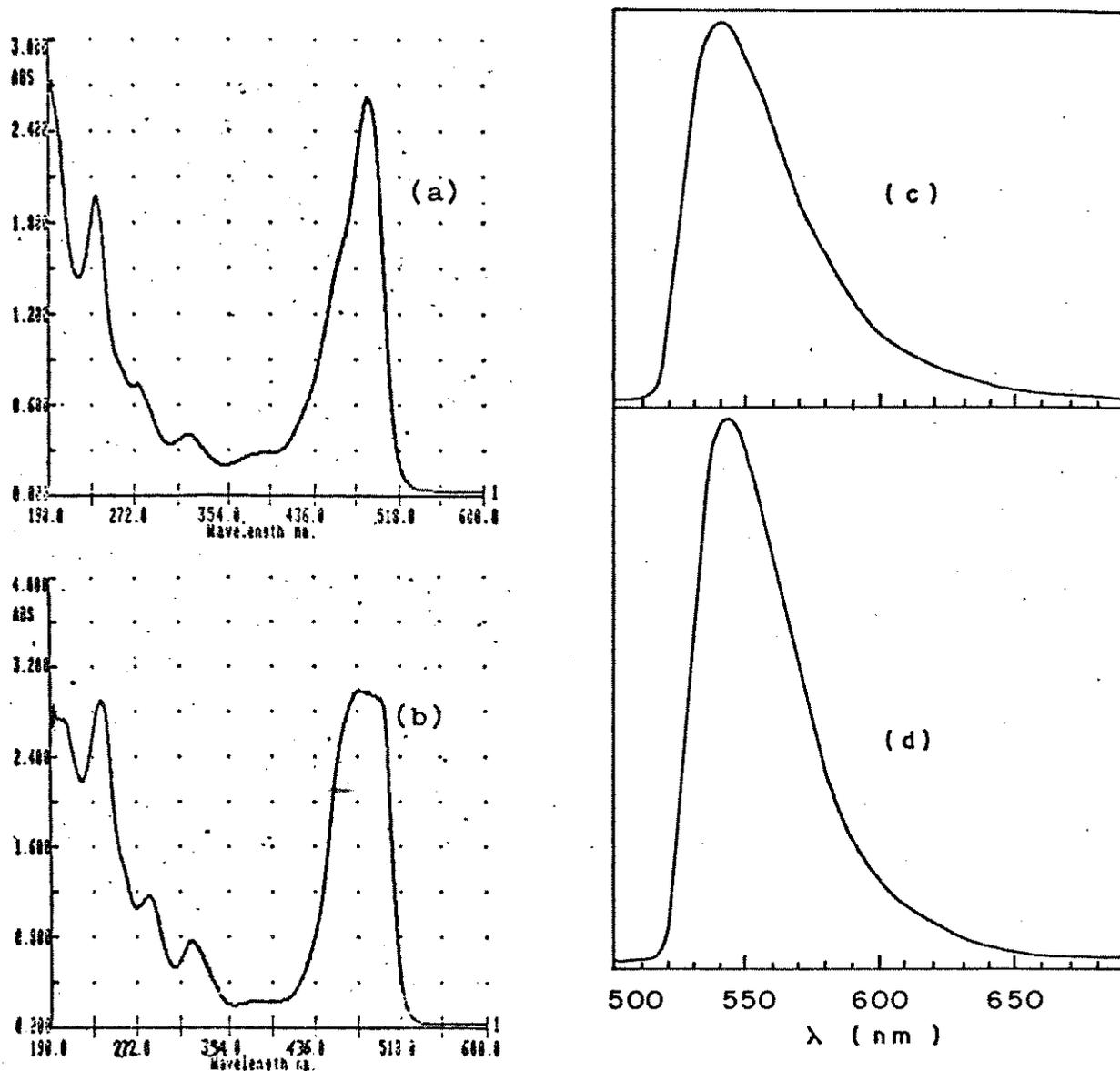


Figura 3.28: Espectros eletrônicos de absorção e de emissão de fluorescência da fluoresceína em soluções aquosas saturadas, respectivamente, nos seguintes pH: (a) e (c) 6,67 (0,1); (b) e (d) 7,73 (0,1). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro utilizado.

que os espectros de absorção do corante em soluções saturadas, são muito similares àqueles observados em soluções diluídas em faixa de pH análoga, tanto em relação à região de comprimento de onda, como em relação ao contorno da banda. Em consequência desse fato, quando da formação de agregados, foi suposto que as suas unidades monoméricas eram responsáveis pela absorção, ou seja, tanto o agregado, como o monômero, tinham cromóforos comuns. No entanto, não se observa este mesmo comportamento no pH = 7,73, uma vez que a banda mais intensa de absorção tem seu máximo em  $\approx 475$  nm, enquanto que em soluções diluídas de pH análogo, o máximo de absorção situa-se em  $\approx 489$  nm.

Visando uma melhor caracterização da emissão dos agregados da espécie dianiônica (6) da fluoresceína, obteve-se o espectro eletrônico de emissão em uma solução  $5 \times 10^{-3}$  M em meio fortemente alcalino (pH  $\approx 13$ ), observando-se a existência de uma banda assimétrica na região do vermelho, com máximo em 584 nm (figura 3.29). Conforme indicado anteriormente em soluções aquosas diluídas básicas, a fluoresceína se apresenta na forma do diânion, de modo que se propõe que neste pH estejam presentes em solução: dímeros, trímeros ou agregados de ordem maior da espécie dianiônica (6).

Os resultados dos espectros eletrônicos de absorção e de emissão de soluções concentradas de fluoresceína em diferentes pH apresentam, para as faixas de pH onde a solubilidade do corante é alta, algumas modificações espectrais que sugerem a presença de

agregados. Entretanto, dada a complexidade dos espectros não se pode, claramente, fazer as atribuições e definir os modelos de agregação.

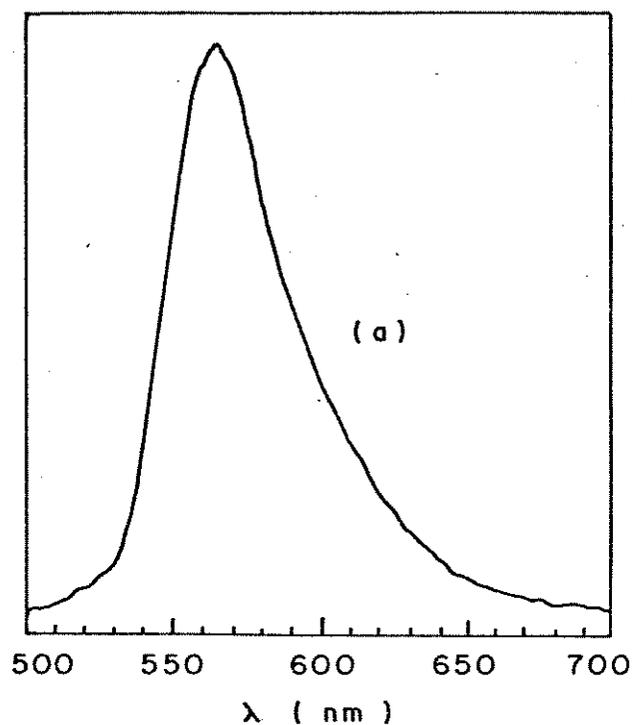


Figura 3.29: Espectro eletrônico de emissão de fluorescência da fluoresceína em uma solução aquosa  $5,0 \times 10^{-3}$  M (pH  $\cong$  13). O ganho do espectrofluorímetro é 30.

### 3.3- ANÁLISE DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE EXCITAÇÃO DA FLUORESCEINA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DILUIDAS E SATURADAS EM VÁRIOS pH:

#### 3.3.1- RESULTADOS OBTIDOS:

A espectroscopia eletrônica de excitação é uma técnica complementar à espectroscopia eletrônica de emissão, uma vez que são detectadas as espécies emissoras presentes também no estado eletrônico fundamental. Como foi descrito no item 3.2.2, as modificações espectrais pronunciadas, como deslocamento do máximo e o contorno da banda, são observadas nos espectros eletrônicos de emissão. No item 3.2.2, foi proposta a presença de agregados nas soluções saturadas aquosas, exceto na faixa aproximada de  $1 \leq \text{pH} \leq 4$ , para a qual a solubilidade da fluoresceína é pequena. A análise dos espectros eletrônicos de excitação permitirá a confirmação desta hipótese, uma vez que são detectadas as espécies estáveis do estado eletrônico fundamental e que emitem no estado eletrônico excitado.

O espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em ácido sulfúrico 10 M em baixa concentração ( $8 \times 10^{-6}$  M) apresenta uma banda larga e assimétrica na região do azul com máximo em 440 nm (figura 3.30b) ( $\lambda_{EM} = 479$  nm). No entanto, em solução saturada análoga, verifica-se uma banda estreita com máximo em 475 nm e uma outra com máximo em 384 nm e intensidade relativa bem

menor (figura 3.30a) ( $\lambda_{EM} = 500 \text{ nm}$ ). Pode-se constatar que o máximo comprimento de onda de excitação da fluoresceína, em solução diluída, se situa no "vale" existente entre as bandas observadas no espectro eletrônico de excitação do corante em solução saturada. A principal diferença entre os espectros eletrônicos de excitação e de absorção é que nesse último, há um "pacote" de bandas devidas às espécies monoméricas e diméricas que co-existem em solução, absorvendo nas mesmas regiões de comprimento de onda, enquanto que o espectro eletrônico de excitação é registrado em relação a um determinado comprimento de onda de emissão e, portanto, muito mais simples. Isto significa que o mesmo detecta as espécies que estão presentes em solução no estado eletrônico fundamental e emitem naquele comprimento de onda determinado. Pode-se supor, portanto, que o espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em solução saturada é devido ao dímero catiônico do corante, uma vez que há o desdobramento da banda monomérica de acordo com os modelos propostos no item 3.2.1.

Nos espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 M, constata-se a existência de uma banda assimétrica na região do azul, com máximo em 440 nm na solução diluída (figura 3.30d) ( $\lambda_{EM} = 480 \text{ nm}$ ), enquanto que na solução saturada aparecem duas bandas em 469 e 386 nm, sendo que a última possui uma meia largura maior e uma intensidade relativa menor (figura 3.30c) ( $\lambda_{EM} = 495 \text{ nm}$ ). Como no caso anterior, o máximo de excitação no espectro da solução diluída se situa entre as bandas de excitação

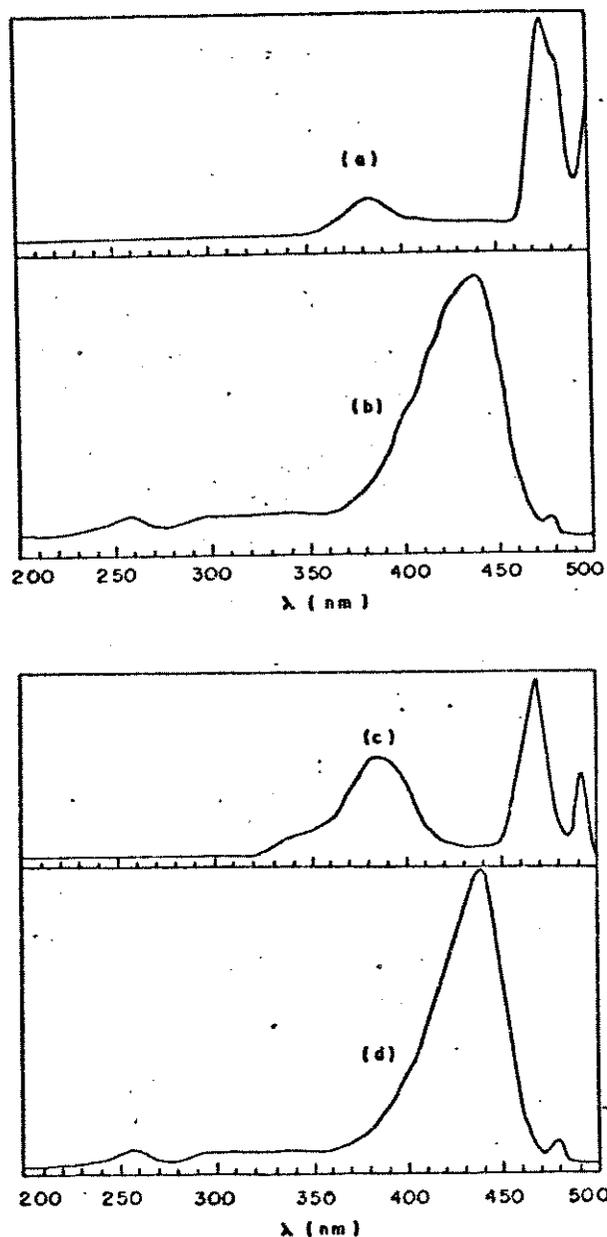


Figura 3.30: Espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína nas soluções aquosas em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 M: (a) saturada ( $\lambda_{\text{EM}} = 500$  nm, 10); (b)  $8,3 \times 10^{-6}$  M ( $\lambda_{\text{EM}} = 479$  nm, 0,3) e em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 M: (c) saturada ( $\lambda_{\text{EM}} = 405$  nm, 0,3); (d)  $8,3 \times 10^{-6}$  M ( $\lambda_{\text{EM}} = 480$  nm, 1,0). Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos das bandas de emissão e os ganhos do espectrofluorímetro.

do espectro na solução saturada. Provavelmente, há a formação do dímero catiônico da fluoresceína na solução saturada em  $H_2SO_4$  5 M.

O espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em solução diluída, pH = 1,14, apresenta uma banda assimétrica na região do azul, com máximo em 440 nm (figura 3.31b) ( $\lambda_{EM} = 515$  nm). Deve-se observar que não há deslocamento da banda de excitação em relação aos espectros eletrônicos anteriores nas soluções em  $H_2SO_4$  5 e 10 M. Como foi discutido anteriormente, nos itens 3.1.2 e 3.1.4, em pH  $\approx$  1,00, há um equilíbrio entre as espécies catiônica (1) e anfo-ion (4) da fluoresceína no estado eletrônico fundamental; mas através de uma reação no estado eletrônico excitado, ocorre uma transformação do anfo-ion (4) em uma modificação quinonóide (2), que emite em 515 nm. Uma vez que o espectro eletrônico de excitação foi registrado em relação ao máximo de emissão ( $\lambda_{EM} = 515$  nm) e este espectro é similar àqueles observados em soluções muito ácidas, este resultado confirma a existência do anfo-ion (4) no estado eletrônico fundamental e da forma quinonóide (2) no estado eletrônico excitado.

Prosseguindo o estudo da fluoresceína em soluções concentradas, verifica-se que o espectro eletrônico de excitação em solução saturada no pH = 1,02, apresenta uma banda com máximo em  $\approx$  400 nm e uma outra com menor meia largura e intensidade relativa similar à anterior, cujo máximo se situa em 480 nm (figura 3.31a) ( $\lambda_{EM} = 515$  nm). O "vale" existente entre estas duas bandas coincide com o máximo de excitação em solução diluída

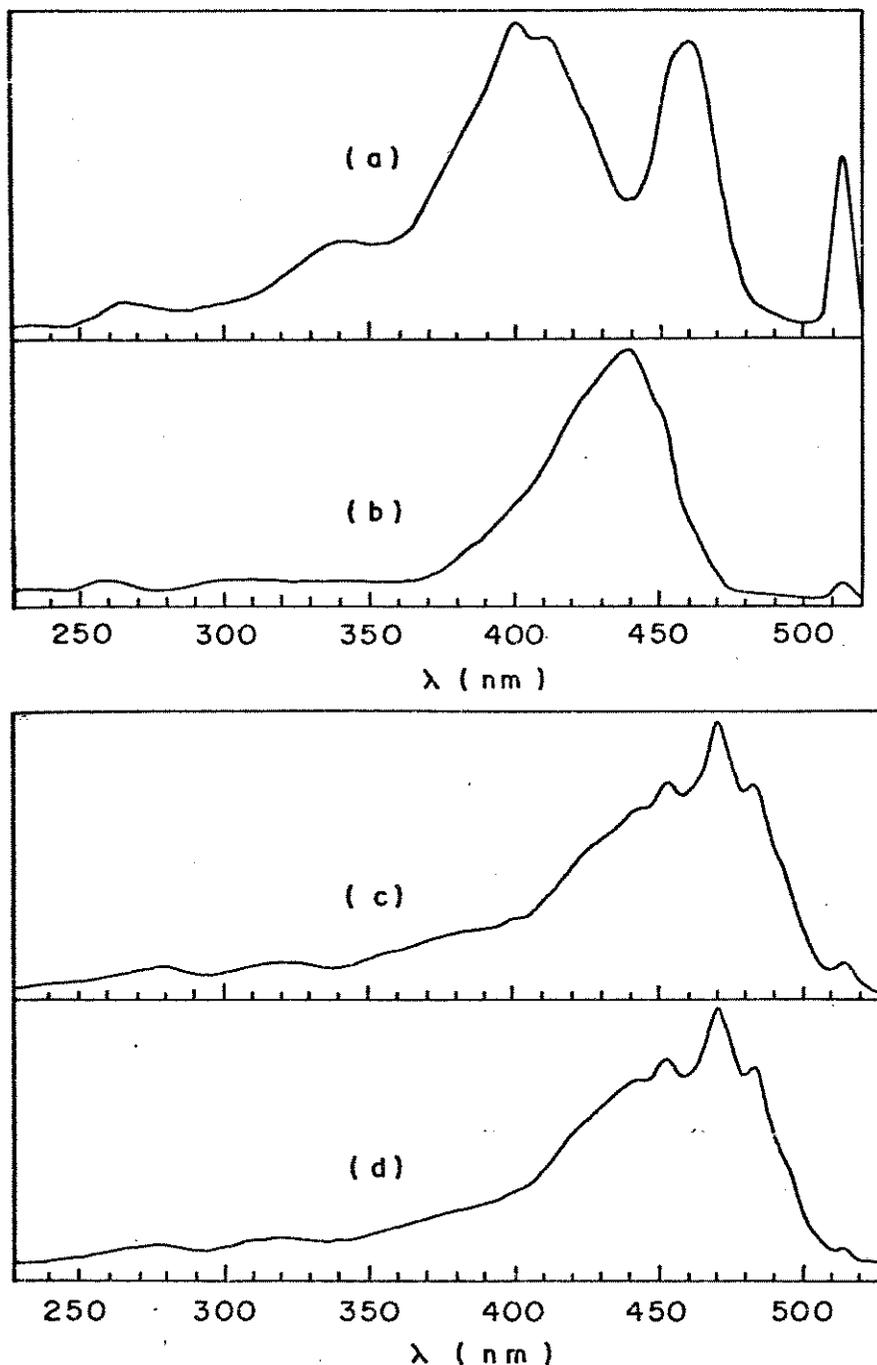


Figura 3.31: Espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína nas soluções aquosas: (a) saturada, pH = 1,02 ( $\lambda_{EM} = 515 \text{ nm}, 0,3$ ); (b)  $8,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ , pH = 1,14 ( $\lambda_{EM} = 515 \text{ nm}, 0,3$ ); (c) saturada, pH = 4,30 ( $\lambda_{EM} = 515 \text{ nm}, 0,3$ ); (d)  $8,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ , pH = 4,18 ( $\lambda_{EM} = 515 \text{ nm}, 0,3$ ). Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de emissão das bandas e os ganhos do espectrofluorímetro.

do corante. Quando se analisou os espectros eletrônicos de absorção e emissão da fluoresceína em solução saturada no pH = 1,02 (item 3.2.2b), comentou-se que os dados eram inconclusivos em relação à possibilidade de formação de dímeros, devido à baixa solubilidade do corante nesta concentração hidrogeniônica; porém, a partir do espectro eletrônico de excitação, constata-se a existência de bandas características de estruturas diméricas. É difícil determinar qual é a estrutura molecular do dímero formado, uma vez que as espécies: catiônica (1) e anfo-íon (4) estão em equilíbrio neste pH (item 3.1.2). Provavelmente, há formação de dímeros do cátion (1) e do anfo-íon (4).

Os espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína em soluções diluídas ( $\lambda_{EM} = 515 \text{ nm}$ ) nos seguintes pH: 4,18 (figura 3.31d); 5,05 e 5,41 (figuras 3.32b e 3.32d), foram muito similares aos espectros em soluções saturadas nos seguintes pH, respectivamente, 4,30; 4,66 (figura 3.31c) ( $\lambda_{EM} = 515 \text{ nm}$ ) e 5,47 (figura 3.32a e 3.32c) ( $\lambda_{EM} = 520 \text{ nm}$ ). No entanto, verifica-se que as bandas dos espectros nos pH = 4,66 e pH = 5,47, em soluções saturadas, apresentam intensidades relativas maiores em comparação aos espectros em soluções diluídas a pH próximos. Supõe-se que até o pH = 4,30, há uma pequena solubilidade do corante, havendo um equilíbrio das espécies monoméricas da forma neutra, deslocado no sentido de formação da espécie quinonóide (2). O espectro de excitação apresenta, portanto, uma sobreposição das bandas de excitação das espécies monoméricas da forma neutra do corante, com

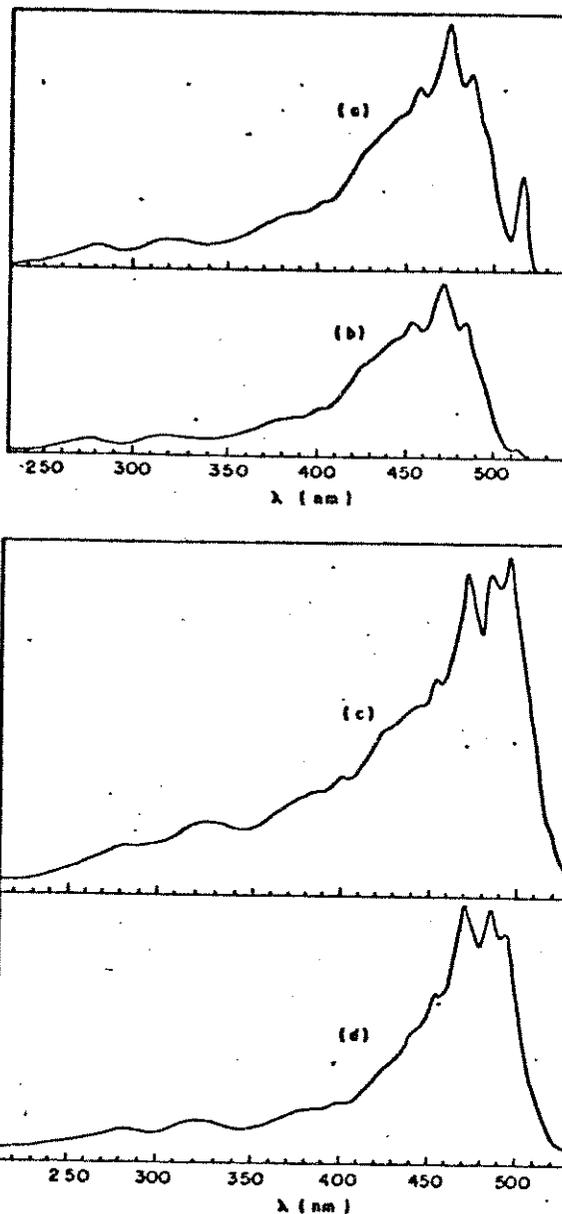


Figura 3.32: Espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína nas soluções aquosas: (a) saturada, pH = 4,66 ( $\lambda_{EM} = 515$  nm, 0,3); (b)  $8,3 \times 10^{-6}$  M, pH = 5,05 ( $\lambda_{EM} = 515$  nm, 0,3); (c) saturada, pH = 5,47 ( $\lambda_{EM} = 520$  nm, 0,3); (d)  $8,3 \times 10^{-6}$  M, pH = 5,41 ( $\lambda_{EM} = 515$  nm, 0,3). Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos das bandas de emissão e os ganhos do espectrofluorímetro.

as bandas de emissão da lâmpada de xenônio do espectrofluorímetro utilizado, uma vez que não se utilizou nenhum sistema de filtros. Nos pH = 4,66 e 5,47, a intensidade relativa maior das bandas indica um maior número de cromóforos excitados e, portanto, uma concentração maior do corante em solução saturada. Como as bandas características de formação de dímeros não são observadas, pode-se supor que mesmo a espécie monoaniônica (5), já presente nos pH citados (item 3.1.2), é melhor estabilizada em solução na forma monomérica, por formação de pontes de hidrogênio da mesma com as moléculas de água.

O espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em solução diluída ( $\lambda_{EM} = 519$  nm), pH = 6,60, apresenta uma banda, cuja estrutura vibrônica é complexa e com máximo situado na região de 495 nm (figura 3.33b). Poder-se-ia atribuir este espectro a um equilíbrio entre as espécies quinonóide (2) e monoaniônica (5), como se havia observado anteriormente através dos espectros eletrônicos de absorção (item 3.1.2). O espectro eletrônico de excitação do corante em solução saturada ( $\lambda_{EM} = 538$  nm), pH = 6,67, apresenta uma banda estreita e intensa com máximo em 525 nm, um conjunto de bandas de intensidade relativa baixa e estrutura vibrônica complexa na região de 450 a 500 nm, nos mesmos comprimentos de onda observados no espectro eletrônico de excitação em solução diluída, e uma banda intensa e larga com máximo de excitação em 348 nm e intensidade relativa similar àquela em 525 nm (figura 3.33a). Além dessa última banda, pode-se

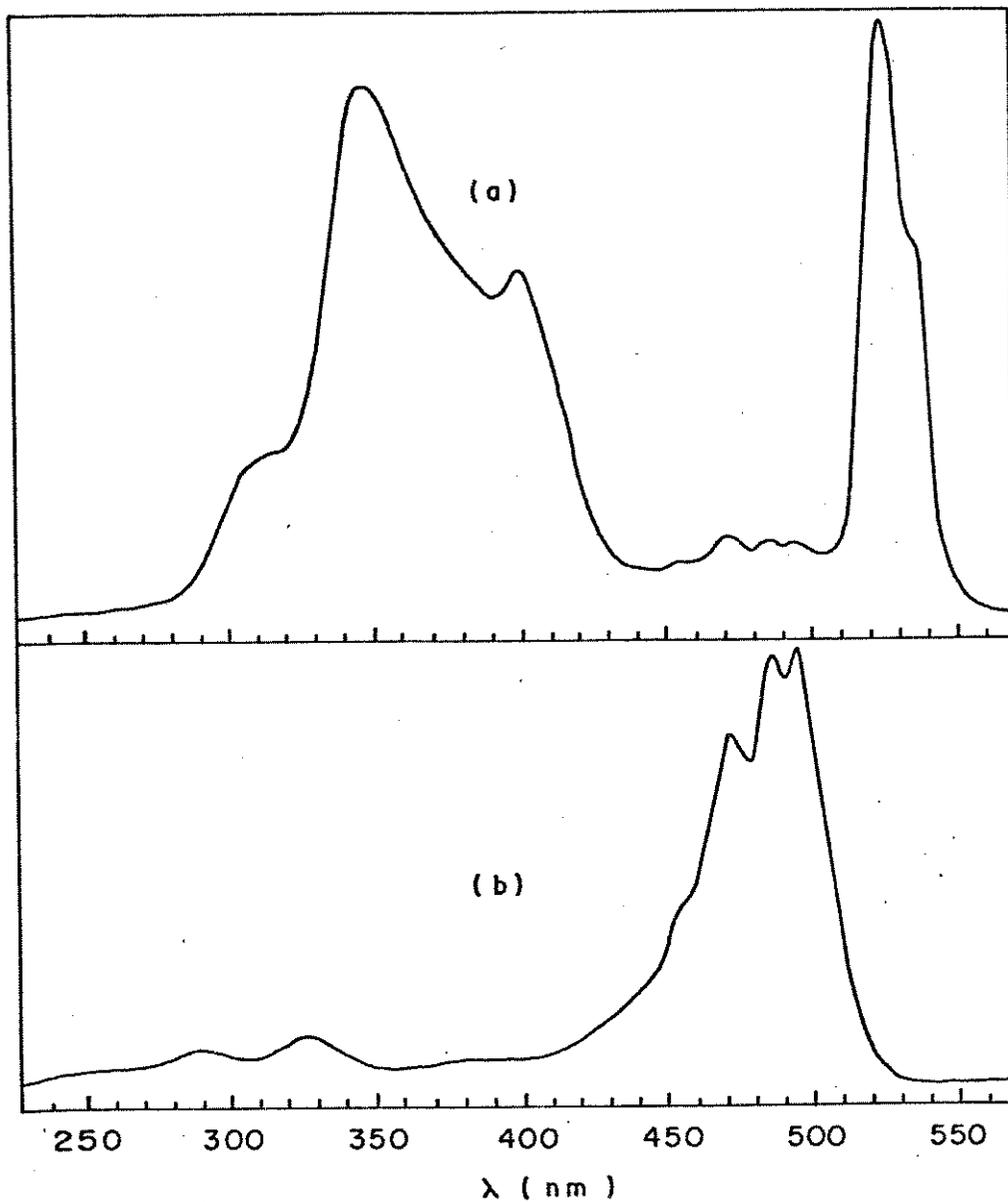


Figura 3.33: Espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína nas soluções aquosas: (a) saturada, pH = 6,67 ( $\lambda_{EM} = 538$  nm, 1); (b)  $8,3 \times 10^{-6}$  M, pH = 6,60 ( $\lambda_{EM} = 519$  nm, 0,1). Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de emissão das bandas e os ganhos do espectrofluorímetro.

observar outras duas com intensidades relativas menores e máximo em 400 nm e  $\approx$  310 nm. O fenômeno de desdobramento de bandas de excitação em relação à banda do monômero para a solução saturada (conforme discutido em 3.2.1) não é observado no espectro eletrônico de excitação em solução saturada (pH = 6,67), uma vez que o conjunto de bandas de excitação do monômero aparece na região de 450 a 500 nm. Provavelmente não há formação de dímeros, mas de agregados de ordem maior, como trímeros. Supõe-se que a banda com máximo em 348 nm seja devida à excitação de trímeros, uma vez que possui um contorno similar à banda de absorção do trímero do diânion da fluoresceína em pH = 12<sup>(11)</sup> e a banda com estrutura vibrônica complexa na região de 450 a 500 nm pode consistir de uma sobreposição da banda de excitação das espécies monoméricas do corante com as bandas de emissão da lâmpada de xenônio.

O espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em solução saturada ( $\approx 1 \times 10^{-3}$  M, pH = 7,73 ( $\lambda_{EM} = 548$  nm) apresenta as mesmas bandas, observadas no espectro do corante em pH = 6,67 (figura 3.34a). Segundo a atribuição feita anteriormente, ocorre a formação de agregados neste pH. Segundo Arbeloa<sup>(11)</sup>, há formação de agregados de ordem maior, isto é, trímeros, tetrâmeros, etc, em concentrações maiores do que  $1 \times 10^{-1}$  M, porém, todo o seu trabalho se baseou no estudo dos espectros eletrônicos de absorção do diânion da fluoresceína, técnica esta que é reconhecidamente menos sensível do que a espectroscopia eletrônica de emissão. Devido a

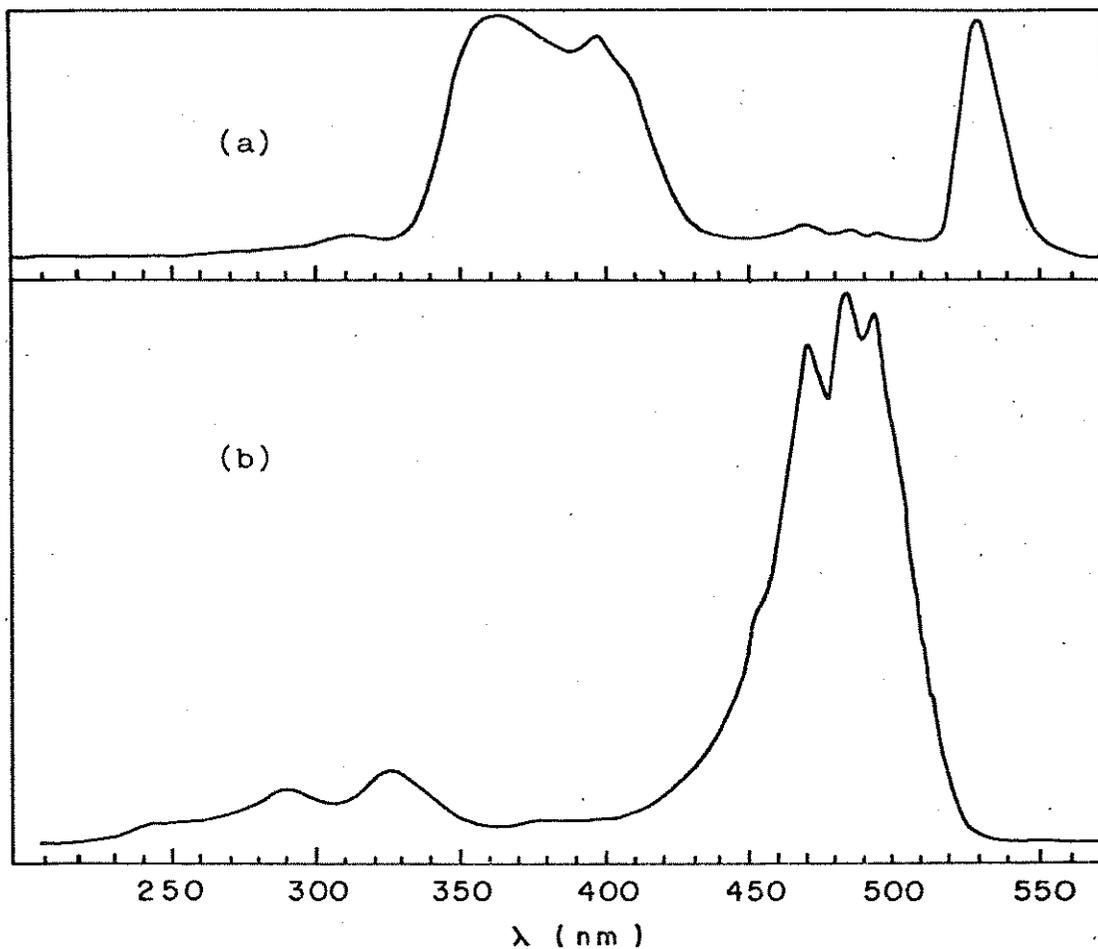


Figura 3.34: Espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína nas soluções aquosas: (a) saturada, pH = 7,73 ( $\lambda_{EM} = 542$  nm, 0,3); (b)  $8,3 \times 10^{-6}$  M, pH = 7,93 ( $\lambda_{EM} = 519$  nm, 0,1). Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de emissão das bandas e os ganhos do espectrofluorímetro.

este fato, é possível se detectar a presença de trímeros em concentrações menores do que aquela sugerida por Arbeloa, já que a concentração da fluoresceína nesta solução saturada é aproximadamente  $1 \times 10^{-3}$  M.

O espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em meio fortemente alcalino (pH  $\approx$  13) (figura 3.35) ( $\lambda_{EM} = 564$  nm) na concentração de  $5 \times 10^{-3}$  M, apresenta uma banda muito intensa e estreita em 531 nm, um conjunto de bandas pouco intensas e estrutura vibrônica complexa na região de 450 a 500 nm, análogos às bandas de excitação do monômero e, provavelmente às bandas de emissão da lâmpada de xenônio. Observa-se que a banda de excitação atribuída aos trímeros tem a sua intensidade relativa consideravelmente diminuída, em relação às bandas da espécie monomérica do diânion da fluoresceína. Uma vez que, praticamente, não se supõe a existência de trímeros em solução, conclui-se que há formação de agregados de ordem maior, dos quais poder-se-ia atribuir a banda em 531 nm. Esta banda também foi observada nos espectros eletrônicos de excitação da fluoresceína nas soluções saturadas ( $\approx 1 \times 10^{-3}$  M) nos pH = 6,67 e pH = 7,73 descritos anteriormente, com intensidades relativas bem menores, comparadas com a banda de excitação de trímeros. Isto leva a supor, que nestes pH já existiam agregados de ordem maior em solução, mas em concentrações menores.

Uma vez identificadas as bandas de excitação relativas aos monômeros, dímeros e oligômeros de diferentes formas de

dissociação da fluoresceína, que se apresentam como bandas desdobradas em relação aos monômeros, discute-se, a seguir, modelos para agregação da fluoresceína em soluções aquosas.

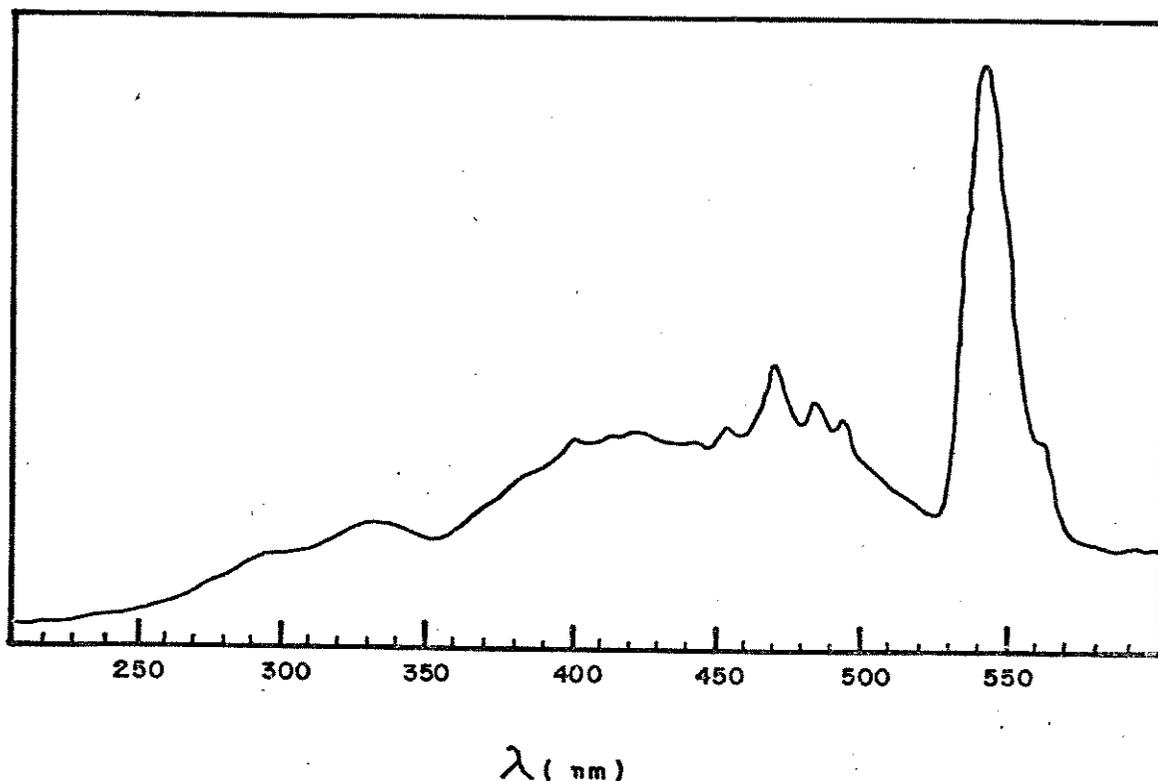


Figura 3.35: Espectro eletrônico de excitação da fluoresceína em solução aquosa  $5,0 \times 10^{-3}$  M,  $\text{pH} \approx 13$ , ( $\lambda_{\text{EM}} = 584$  nm, 10). Entre parênteses é apresentado o ganho do espectrofluorímetro.

### 3.3.2- MODELOS PARA AS ESTRUTURAS DOS AGREGADOS DA FLUORESCEÍNA:

Arbeloa e Ojeda<sup>(13)</sup> estudaram a formação de agregados da Rodamina B (RB), que é um derivado da fluoresceína e difere em estrutura molecular na substituição dos dois átomos de oxigênio do anel xantênico por grupos amina ( $-NCH_2CH_3$ ). O espectro eletrônico de absorção do dímero da RB apresentou duas bandas com máximos de absorbância em: 555 e 523 nm; sendo que a última teve intensidade relativa maior, enquanto que a banda do monômero apareceu em 559 nm<sup>(13)</sup>. Uma vez que a banda de absorção do monômero se desdobra em duas quando se tem o dímero, supõe-se que esteja havendo interação excitônica entre as moléculas do corante na estrutura dimérica. Dever-se-ia esperar que a espécie catiônica (1) da fluoresceína apresentasse o mesmo tipo de comportamento em soluções saturadas, mas como foi descrito anteriormente (conforme item 3.2.2), os espectros eletrônicos de absorção em soluções diluídas e saturadas foram muito similares.

Arbeloa<sup>(13)</sup>, Rohatgi e outros<sup>(9)</sup>, que estudaram o efeito da formação de agregados do diânion da fluoresceína em soluções saturadas, utilizaram celas do tipo RIIC com caminho ótico variável. Eles não puderam obter estes valores absolutos dos caminhos óticos utilizados, devido a diversos fatores, como paralelismo das janelas, etc. No entanto, mudanças conhecidas nos mesmos, causaram variações da densidade ótica. A partir deste

efeito determinaram a absorptividade na região do visível no espectro.

Segundo Arbeloa<sup>(13)</sup>, o contorno do espectro de fluorescência depende não só da concentração do corante, como do tipo de cela utilizada, devido ao efeito de re-absorção. Este depende do arranjo geométrico utilizado para as medidas e é devido à sobreposição espectral entre as bandas de absorção e emissão. O efeito de re-absorção produz uma diminuição de intensidade na parte mais energética do espectro eletrônico e um aumento na outra parte (re-emissão). Isto implica em um deslocamento espectral do máximo de fluorescência para energias menores (deslocamento para o vermelho)<sup>(16)</sup>.

Nos experimentos descritos anteriormente para a fluoresceína em soluções aquosas, observou-se que em determinadas faixas de pH, há um deslocamento espectral considerável das bandas de emissão para região de comprimento de onda maior (energia menor) nas soluções saturadas em relação às soluções diluídas. Além disso, os resultados obtidos utilizando-se a espectroscopia eletrônica de excitação revelaram que em algumas faixas de pH, pode-se observar a formação de dímeros, pela diferença destes espectros nas soluções saturadas quando comparadas com soluções diluídas. Pode-se, ainda, considerar como conclusão inicial, que o processo de agregação depende em algum grau da característica da solução (interação soluto-solvente), já que naqueles pH das soluções, cujas solubilidades do corante são baixas, não se

observa a formação de agregados.

Gal e outros<sup>(17)</sup> sugeriram uma disposição geométrica para o dímero catiônico da RB, que permite a formação de pontes de hidrogênio entre o grupo do ácido carboxílico de um monômero e o oxigênio em ponte do anel xantênico do outro. Esta sugestão é concordante com o modelo I, proposto por Arbeloa<sup>(11)</sup> (figura 3.36) para o dímero do diânion da fluoresceína.

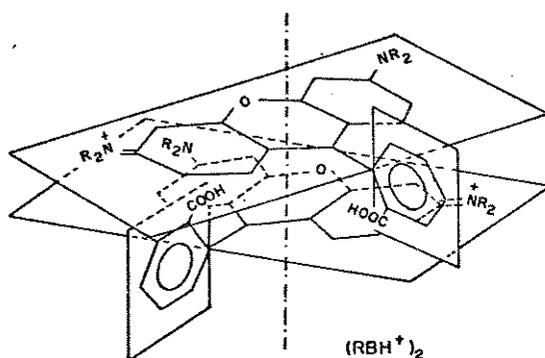


Figura 3.36: Estrutura geométrica do dímero catiônico da RB<sup>(13)</sup>.

Pode-se sugerir como hipótese que o dímero catiônico da fluoresceína tem o mesmo tipo de estrutura geométrica da RB, uma vez que os dois corantes só diferem no grupo substituinte do anel xantênico, havendo deslocalização da carga positiva nos anéis xantênicos respectivos.

Rohatgi<sup>(9)</sup> obteve o espectro eletrônico de absorção do dímero do diânion da fluoresceína através do cálculo apropriado do espectro do corante em solução em uma concentração determinada, na

qual monômeros e dímeros coexistem em equilíbrio, como mostrado a seguir.

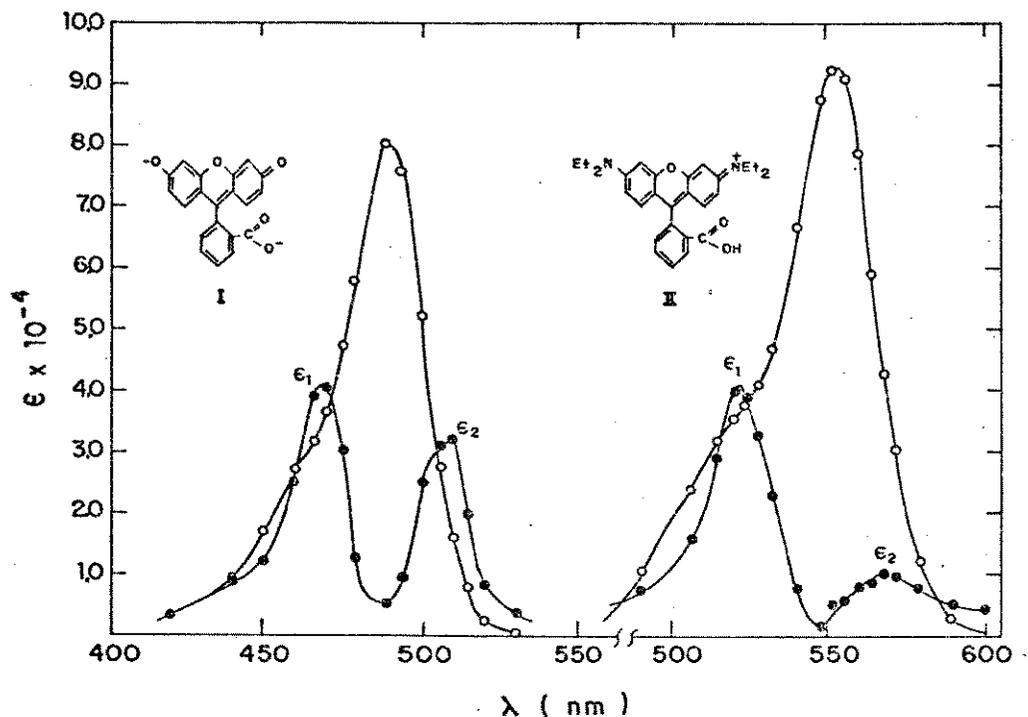


Figura 3.37: Espectros de absorção do monômero  $\text{-O-O-}$  e dímero  $\text{-}\bullet\text{-}\bullet\text{-}$  do diânion da fluoresceína (I) e do cátion da RB (II) <sup>(9)</sup>.

Rohatgi <sup>(9)</sup> e Arbeloa <sup>(11)</sup>, propuseram uma estrutura geométrica (modelo I) do dímero dianiônico da fluoresceína análoga àquela do dímero catiônico da Rodamina B. A distância intermolecular,  $R$ , foi calculada à partir da equação 6 <sup>(9)</sup>. Os dipolos de transição para a banda no visível em ambas as moléculas

são polarizados ao longo do eixo maior, isto é, perpendicular aos monómeros e permanecem no plano da molécula. Portanto, a orientação dos dipolos moleculares é dada pelo ângulo  $\theta$ , formado pelas duas moléculas componentes do dímero e é obtido pela rotação dos monómeros ao redor do eixo perpendicular aos planos das moléculas e que passa através de seus centros de simetria. O ângulo  $\theta$  foi calculado através da equação 7, descrita anteriormente (item 3.2.1)<sup>(9)</sup>.

Os valores experimentais e os calculados para os vários parâmetros são dados na tabela 3.3<sup>(9)</sup>.

Tabela 3.3: Níveis de energia em nm.

CORANTE	monómero	dímero		R em Å	ângulo $\theta$
	M	$E_1$	$E_2$		
Fluoresceína (Fl <sup>-2</sup> )	489	469	507	7,6	81

Pode-se observar na tabela 3.3 e figura 3.37, que há desdobramento da banda do monómero em uma banda de energia menor e outra de energia maior, devido à interação excitônica<sup>(9)</sup>.

A figura 3.38 mostra a estrutura mais provável para o dímero dianiônico da fluoresceína.

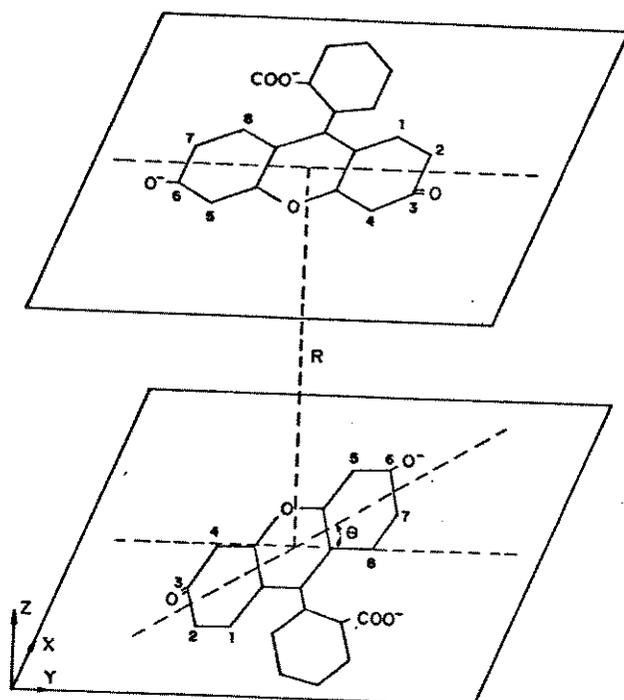


Figura 3.38: Estrutura do dímero dianiônico da fluoresceína<sup>(12)</sup>.

A fim de se estudar a natureza da ligação entre os monómeros no dímero, foram calculadas algumas funções de estado termodinâmicas de dimerização<sup>(11)</sup>. A entalpia de formação do dímero ( $\Delta H_d^\ominus$ ) foi calculada através da equação de Van't Hoff e a constante de dimerização foi obtida para várias temperaturas. As variações produzidas na energia livre padrão e entropia foram avaliadas à partir das equações mostradas a seguir.

$$\Delta G_d^\ominus = RT \ln K_d$$

$$\Delta S_d^\ominus = (\Delta H_d^\ominus - \Delta G_d^\ominus) / T$$

Os valores calculados a 20°C são<sup>(11)</sup>:

$$\begin{aligned}\Delta G_d^\theta &= -3,9 \pm 0,1 \text{ kJ.mol}^{-1} \\ \Delta H_d^\theta &= -28 \pm 1 \text{ kJ.mol}^{-1} \\ \Delta S_d^\theta &= -82 \pm 5 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}\end{aligned}\tag{10}$$

As variações de entalpia e entropia sugerem a formação de pontes de hidrogénio<sup>(11)</sup>. Como o diânion (6) da fluoresceína tem grupos hidrofílicos, é possível que uma camada de água se acomode entre o sanduíche dimérico do diânion (6) da fluoresceína e minimize a repulsão eletrostática entre as duas unidades de cargas negativas em cada molécula. Minimização adicional desta repulsão provém da orientação destas moléculas no dímero, fato que explicaria a distância intermolecular de 7,6 Å, observada entre os monómeros no dímero<sup>(9)</sup>.

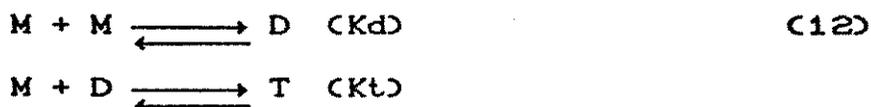
Se as concentrações do monómero e dímero são, respectivamente,  $[M] = C.x$  e  $[D] = C.(1 - x)/2$ , a constante de dimerização é fornecida pela equação (11).

$$K_d = \frac{1 - x}{2Cx^2}\tag{11}$$

onde,  $x$  é a fração molar do monómero em uma solução de concentração  $C$ . Na faixa de concentração entre  $5 \times 10^{-6}$  e  $1 \times 10^{-1}$  M, a constante de dimerização ( $K_d$ ) não apresenta grande variação. Em concentrações maiores, o valor de  $K_d$  varia devido à presença de outros agregados. A constante de dimerização a 20°C para concentrações até  $1 \times 10^{-1}$  M é  $K_d = 5,0 \pm 0,2$ <sup>(11)</sup>.

Em concentrações maiores do que  $1 \times 10^{-1}$  M, há formação de

outros agregados. O primeiro modelo proposto é a formação de trimeros, considerando-se os equilíbrios dados pela equação 12 abaixo.



onde o equilíbrio



é menos provável<sup>(11)</sup>.

Segundo Arbeloa<sup>(11)</sup> há contribuição de forças de Van der Waals aditivas para a formação de agregados de ordem maior, como trimeros, tetrameros, etc.

O tratamento excitônico do trimero é similar àquele do dímero. As energias de transição são obtidas através do determinante secular.

$$\begin{vmatrix} (H-E) & U & U' \\ U & (H-E) & U \\ U' & U & (H-E) \end{vmatrix} = 0 \quad (14)$$

onde U e U' são as integrais de ressonância entre monômeros adjacentes e não adjacente, respectivamente. Estas interações de ressonância são dadas pelas equações a seguir.

$$U = - \frac{|\vec{M}|^2}{R^3} \cdot \cos\theta \quad (15)$$

$$U' = - \frac{U \cdot \cos\theta}{8 \cdot \cos\phi} \quad (16)$$

onde os fatores de fase são escolhidos de modo que os momentos de transição dos monômeros são  $\vec{M}_u = \vec{M}_v = \vec{M}_w$  <sup>(11)</sup>.

A teoria excitônica foi aplicada considerando-se um trimero formado por três monômeros dispostos em planos paralelos, utilizando-se os parâmetros geométricos calculados para o dímero. As diferenças de energia entre os máximos no espectro do trimero e aquelas obtidas através desta teoria tiveram valores muito próximos, indicando que este modelo geométrico é razoável <sup>(11)</sup>. Segundo Rohatgi <sup>(12)</sup>, o terceiro monômero no trimero, teria um ângulo *twist*  $\theta$  em relação à molécula anterior. A constante de trimerização média calculada por Arbeloa <sup>(11)</sup> é  $K_t = 10$ , indicando que o trimero é mais estável em relação ao dímero ( $K_d = 5$ ). Agregados de ordem maior apresentaram, portanto, um arranjo helicoidal das moléculas do corante, como representado na figura 3.39. Este tipo de configuração foi denominada *Sis-Kababi* por Daudel <sup>(12)</sup>.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a fluoresceína sofre um processo de dimerização em soluções concentradas e, em faixas de pH onde predominam as formas: catiônica (1), anfo-ion (4), monoaniônica (5) e dianiônica (6), como inequivocamente estabelecido pela espectroscopia eletrônica de excitação. Por analogia, com os resultados obtidos para a RB, conclui-se que o modelo I pode ser aplicado para o agregado do corante.

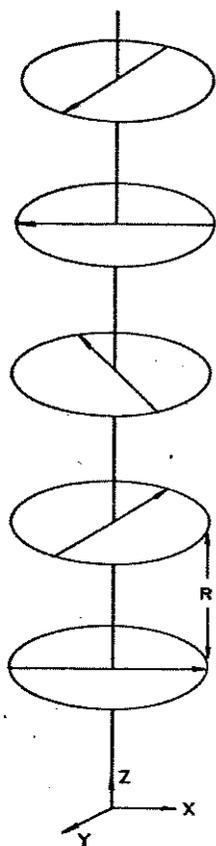


Figura 3.39: Arranjo helicoidal em modelo *sis-Kababi* para agregados de corantes<sup>(12)</sup>.

### 3.3.3- CONCLUSÃO:

Baseando-se no estudo preliminar do comportamento fotofísico da fluoresceína em soluções aquosas saturadas a vários pH, poder-se-ia supor que a solubilidade da fluoresceína em água depende da capacidade das espécies monoméricas em equilíbrio na solução formarem agregados. Segundo a literatura estes são formados por dímeros e oligômeros através de interações eletrostáticas, além das forças de Van der Waals. Em pH muito baixos predominam as espécies que possuem um gradiente de carga, isto é, as espécies catiônica (1) e anfo-íon (4), sendo possível a agregação resultando em espécies diméricas por interação eletrostática e, conseqüentemente, há uma estabilização das estruturas diméricas em solução e a solubilidade da fluoresceína é alta, principalmente nas soluções fortemente ácidas. Quando o pH da solução aumenta, o equilíbrio químico se desloca no sentido das formas neutras; tendo em vista a impossibilidade de interações eletrostáticas entre os monômeros, resultando na formação de dímeros, ocorre uma diminuição na solubilidade da fluoresceína e o aumento de concentração apenas desloca o equilíbrio, alterando as concentrações relativas das formas neutras. Quando o pH aumenta e o equilíbrio é deslocado no sentido de formação da espécie monoaniônica (5), verifica-se um aumento da solubilidade da fluoresceína, embora ainda não haja formação de estruturas diméricas, pelo menos nas formas que resultariam em desdobramento

excitônico das bandas. Esse aumento de solubilidade pode ainda ser explicado pela possibilidade de estabilização do monoânion (5) através de interações fortes com o solvente, no caso a água. Em pH maiores, a solubilidade do corante continua a aumentar, havendo, no caso da solução saturada ( $\approx 1 \times 10^{-3}$  MD), a formação de trímeros e agregados de ordem maior da espécie dianiônica (6) da fluoresceína. Infelizmente, devido à alta concentração do corante nas soluções (soluções saturadas) e ao seu alto coeficiente de extinção molar, não se detecta a formação de dímeros, que ocorrem em concentrações menores, ou predominam em concentrações intermediárias. Em meio fortemente alcalino (pH  $\approx 13$ ), observou-se, praticamente, apenas a formação de agregados mais complexos, cuja estabilização em solução possibilita um aumento na solubilidade da fluoresceína.

### 3.4- ANÁLISE DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO, EMISSÃO E EXCITAÇÃO DA FLUORESCEÍNA EM SOLVENTES APRÓTICOS:

#### 3.4.1- ACETATO DE ETILA:

A fim de se verificar o efeito da matriz, seja líquida ou rígida, sobre as propriedades espectrais da fluoresceína, realizou-se estudos comparativos do comportamento fotofísico do corante em solventes orgânicos líquidos análogos às unidades

repetitivas dos polímeros e nas respectivas matrizes poliméricas. Inicialmente, apresenta-se os resultados obtidos para a fluoresceína em solução de acetato de etila, cuja estrutura é similar à unidade repetitiva do poli(acetato de vinila) e, posteriormente aqueles obtidos com outros solventes apróticos: dioxano e acetona.

#### (A) SOLUÇÃO DILUÍDA:

O espectro eletrônico de absorção da fluoresceína em acetato de etila  $1,0 \times 10^{-5}$  M apresenta uma banda estreita com máximo em 275 nm, e outra banda intensa, cujo máximo se situa abaixo de 200 nm (figura 3.40a). Segundo Martin e Lindqvist<sup>(2)</sup>, a espécie lactônica (3) da fluoresceína, só absorve na região do ultravioleta, pois a formação da ligação lactônica quebra a conjugação eletrônica do anel xantênico. Zanker e Peter<sup>(1)</sup>, verificaram que a fluoresceína em dioxano apresentou uma banda de absorção em 277,5 nm, similar àquela obtida em acetato de etila. Propõe-se, portanto, que somente a espécie lactônica está presente neste solvente orgânico. O espectro eletrônico de emissão ( $\lambda_{\text{EXC}} = 290$  nm) apresenta uma banda fraca, larga e não estruturada vibronicamente, com máximo em 410 nm (figura 3.40e). Segundo Chen e co-autores<sup>(18)</sup>, a espécie lactônica da fluoresceína em solução não emite fluorescência. Klein e Hafner<sup>(19)</sup> verificaram que a RB em benzeno teve seu máximo de absorção em 311 nm e emite fracamente fluorescência em 447 nm. Estes autores atribuíram essa

emissão azul à espécie lactônica da RB e, que essa é fortemente dependente da polaridade do solvente, ou seja, à medida que há um aumento da polaridade, a emissão se desloca para comprimentos de onda maiores<sup>(19)</sup>. Por comparação com este trabalho, propõe-se que a emissão de fluorescência da fluoresceína em acetato de etila, com máximo em 410 nm, é devida à espécie lactônica (3). O espectro eletrônico de excitação ( $\lambda_{EM} = 410$  nm) da fluoresceína em acetato de etila  $1,0 \times 10^{-5}$  M apresenta uma banda com máximo em 290 nm, cuja estrutura vibrônica é muito similar àquela observada na banda de absorção (figura 3.40c). Pode-se concluir, portanto, que a espécie lactônica (3) é estável tanto no estado eletrônico fundamental, como no estado eletrônico excitado em soluções diluídas.

#### (B) SOLUÇÃO CONCENTRADA:

O espectro eletrônico de absorção da fluoresceína em acetato de etila  $1,0 \times 10^{-3}$  M, apresenta uma banda não estruturada vibronicamente com máximo em 444 nm. A solução inicialmente incolor, quando diluída, se torna amarelada quando concentrada (figura 3.40b). O espectro eletrônico de emissão ( $\lambda_{EXC} = 290$  nm) apresenta uma banda larga com máximo em 475 nm e um ombro na região de 420 nm (figura 3.40f). O espectro eletrônico de excitação (figura 3.40d), não apresenta bandas características de agregados, conforme os modelos descritos anteriormente.

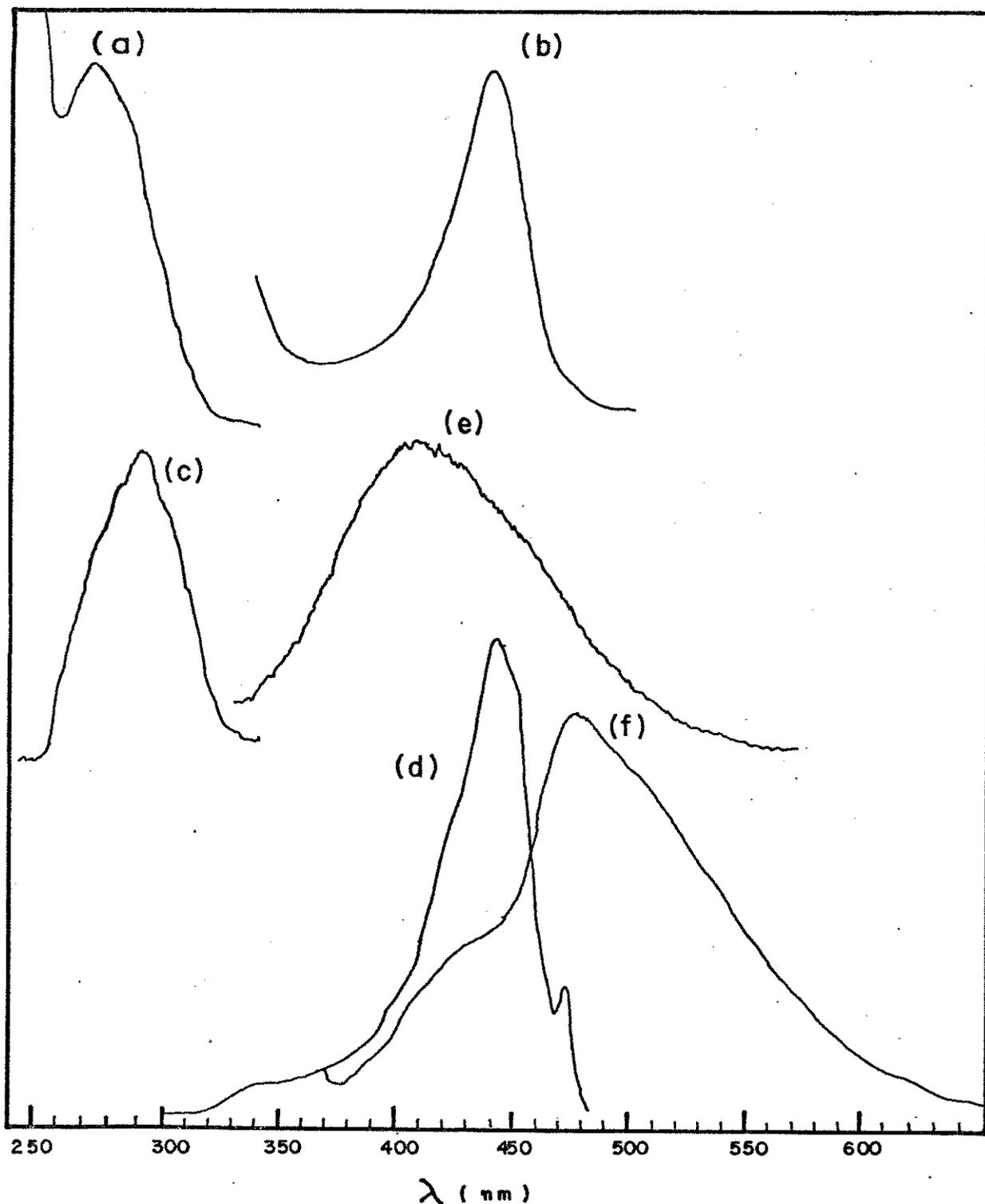


Figura 3.40: Espectros eletrônicos de: Absorção em: (a)  $1,0 \times 10^{-5}$  M (1,00); (b)  $1,0 \times 10^{-3}$  M (0,50); Excitação em: (c)  $1,0 \times 10^{-5}$  M ( $\lambda_{EM} = 410$  nm, 30); (d)  $1,0 \times 10^{-3}$  M ( $\lambda_{EM} = 475$  nm, 1); Emissão em: (e)  $1,0 \times 10^{-5}$  M ( $\lambda_{EXC} = 290$  nm, 30) e (f)  $1,0 \times 10^{-3}$  M ( $\lambda_{EXC} = 360$  nm, 3) da fluoresceína em acetato de etila. Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação, além dos ganhos dos equipamentos utilizados.

Com base nos resultados obtidos para as soluções diluídas, propõe-se que a banda de emissão em 420 nm seja devida à espécie lactônica (3) da fluoresceína. Segundo Klein e Hafner<sup>(19)</sup>, a rodamina B em solventes mais polares, como acetonitrila e di-cloro-metano, apresenta duas bandas de emissão de fluorescência, a primeira em  $\approx$  500 nm devida à forma neutra lactônica (3) e a segunda em  $\approx$  570 nm, devida à espécie quinonóide da rodamina B, cuja distribuição de carga é similar ao anfo-ion (4) da fluoresceína, ou seja, o anel xantênico é carregado positivamente e o anel benzênico dissustituído é carregado negativamente<sup>(19)</sup>.

Considerando-se que a formação de oligômeros em solução exige uma participação efetiva do solvente, se intercalando entre os planos moleculares e que isto seria difícil no caso do acetato de etila e outros solventes, como será mostrado a seguir, é pouco provável a presença destes oligômeros da forma lactônica da fluoresceína. Um aumento da concentração deve levar, portanto, a um deslocamento do equilíbrio químico de dissociação entre as diferentes formas da fluoresceína, mesmo em solventes apróticos. Com esta consideração, propõe-se que a banda de emissão em 475 nm seja atribuída ao anfo-ion (4) da fluoresceína em solventes apróticos. Como já havia sido discutido anteriormente, (item 3.1.4), o anfo-ion (4) da fluoresceína em soluções aquosas em pH baixos, sofre uma reação no estado eletrônico excitado e se transforma na espécie quinonóide (2), que emite fluorescência em

510 nm. Como o acetato de etila é um solvente aprótico, não é possível a ocorrência da reação citada, possibilitando, assim, a emissão do anfo-ion (4) que, neste caso, tem uma emissão similar à espécie catiônica (1); já que essa também possui o anel xantênico carregado positivamente. Pode-se concluir, portanto, que em soluções de fluoresceína em acetato de etila (em concentrações da ordem de  $10^{-3}$  M) há um equilíbrio entre as espécies lactônica (3) e anfo-ion (4), enquanto que em soluções diluídas, a fluoresceína está presente na forma lactônica(3).

### 3.4.2- ACETONA:

#### (A) SOLUÇÕES DILUÍDAS:

A acetona possui uma banda de absorção com máximo em  $\approx$  280 nm, pouco intensa, devida à transição  $n \rightarrow \pi^*$  da carbonila, que é proibida por simetria<sup>(20)</sup>. Consequentemente, apesar da compensação do espectrofotômetro, ocorre uma superposição desta banda da acetona com a banda de absorção na região do ultravioleta de uma solução de fluoresceína em acetona  $1,0 \times 10^{-5}$  M. Uma vez que esta solução é incolor, propõe-se que a espécie lactônica (3) está presente. O espectro eletrônico de emissão ( $\lambda_{EXC} = 290$  nm) (figura 3.41b) apresenta uma banda pouco intensa e não estruturada vibrônicamente, com máximo em 410 nm. De acordo com a proposição para o comportamento fotofísico da fluoresceína em acetato de etila a baixa concentração, propõe-se que esta banda seja devida à

emissão de fluorescência da espécie lactônica (3). O espectro eletrônico de excitação ( $\lambda_{EM} = 410 \text{ nm}$ ) (figura 3.41a) apresenta uma primeira banda estreita e intensa com máximo em 331 nm e uma segunda, com uma intensidade relativa significativamente menor, em relação à primeira, cujo máximo se situa em 368 nm. Este espectro é muito similar ao espectro eletrônico de excitação da acetona pura nas mesmas condições, podendo-se observar a superposição da banda de excitação da acetona com a banda de excitação da lactona (3). Registrando-se o espectro eletrônico de emissão e considerando o comprimento de onda de excitação igual a 330 nm, verifica-se o aparecimento da mesma banda de emissão em 410 nm, porém mais intensa (figura 3.41c). Ou seja, quando se utiliza o comprimento de onda do máximo de excitação da acetona, obtém-se uma maior eficiência quântica de emissão da espécie lactônica (3) da fluoresceína. Pode-se, desta forma, sugerir como hipótese que pela excitação eletrônica da acetona, ocorra uma transferência ressonante de energia para a espécie lactônica (3); que, por sua vez, emite fluorescência. Esta transferência de energia é mais eficiente em relação à absorção direta de energia pela espécie lactônica, uma vez que ocorre um aumento significativo na intensidade de emissão.

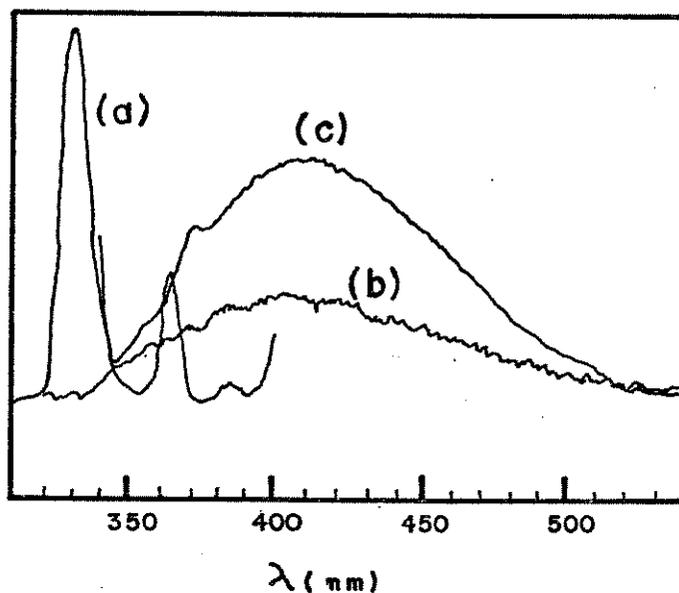
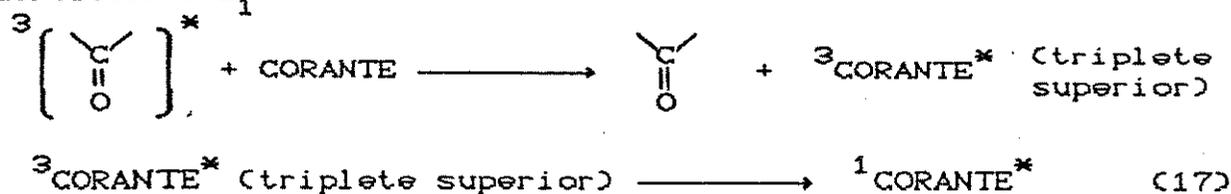


Figura 3.41: Espectros eletrônicos da fluoresceína em acetona  $1,0 \times 10^{-5}$  M de: Excitação ( $\lambda_{EM} = 410$  nm, 100); (b) Emissão de: ( $\lambda_{EXC} = 290$  nm, 100); (c) Emissão ( $\lambda_{EXC} = 330$  nm, 30). Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação, além do ganho do equipamento utilizado.

Cilento e Duran<sup>(21)(22)</sup> verificaram que a acetona triplete, gerada enzimaticamente por oxidação do isobutiraldeído possui a sua emissão de fosforescência extinta, com um aparecimento simultâneo de emissão de fluorescência de corantes xantênicos, tais como: fluoresceína, eosina e rosa de bengala, demonstrando uma ocorrência de transferência de energia. Sugeriram

que poderia haver um processo de transferência excitônica triplete-triplete, gerando um estado triplete do corante, e posterior cruzamento inter-sistema para gerar um estado fluorescente  $S_1$ .



No entanto, não se observa este processo de emissão do corante em uma solução de fluoresceína e benzofenona em acetona a temperatura ambiente. Höfert<sup>(23)</sup> e Chesneau<sup>(24)</sup>, observaram este processo de transferência de energia triplete-singlete em soluções vítreas à 77K de benzofenona e corantes xantênicos, havendo uma diminuição da emissão de fosforescência da benzofenona e emissão de fluorescência atrasada pelos corantes. Este processo será objeto de estudos futuros.

#### (B) SOLUÇÕES CONCENTRADAS:

O espectro eletrônico de emissão da fluoresceína ( $\lambda_{\text{EXC}} = 332 \text{ nm}$ ) em acetona  $8,4 \times 10^{-4} \text{ M}$  apresenta uma estrutura complexa com, basicamente, três bandas: a primeira, pouco intensa, possui seu máximo em 410 nm; a segunda, com intensidade relativa e meia largura maiores, cujo máximo se situa em 473 nm, e um ombro com máximo em  $\approx 540 \text{ nm}$  (figura 3.42b). Conforme a atribuição proposta anteriormente para a fluoresceína em acetato de etila ( $\approx 1 \times 10^{-3} \text{ MD}$ , neste caso, é provável que o aumento de concentração

resulte no deslocamento do equilíbrio químico de dissociação entre as espécies lactônica (3) e anfo-ion (4). O espectro eletrônico de excitação ( $\lambda_{EM} = 475 \text{ nm}$ ) apresenta uma banda estreita, assimétrica na região do azul, com máximo em 440 nm, muito similar àquela observada no espectro da fluoresceína em acetato de etila ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), fato que reforça a hipótese discutida acima (figura 3.42a).

O espectro eletrônico de absorção da fluoresceína em acetona  $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ , apresenta uma banda com máximo em 439 nm, assimétrica na região do azul (figura 3.42e). Do mesmo modo que para a solução em acetato de etila, a solução concentrada apresenta coloração amarelada, diferindo, portanto, da solução diluída, que é incolor. O espectro eletrônico de emissão ( $\lambda_{EXC} = 440 \text{ nm}$ ) apresenta uma banda assimétrica na região do vermelho, cujo máximo se situa em 475 nm (figura 3.42d). O espectro eletrônico de excitação ( $\lambda_{EM} = 475 \text{ nm}$ ) apresenta uma banda estreita, assimétrica na região do azul, com máximo em 440 nm (figura 3.42c). Considerando-se que não se observa a banda de emissão em 410 nm, como nas soluções diluídas e na solução de acetato de etila e que o espectro eletrônico de excitação difere daquele para a espécie lactônica, propõe-se que, nessa concentração, predomine em solução o anfo-ion (4). Uma vez que os espectros eletrônicos de excitação e emissão são, praticamente imagens especulares, conclui-se que o anfo-ion (4) está presente em solução nos estados eletrônicos fundamental e excitado.

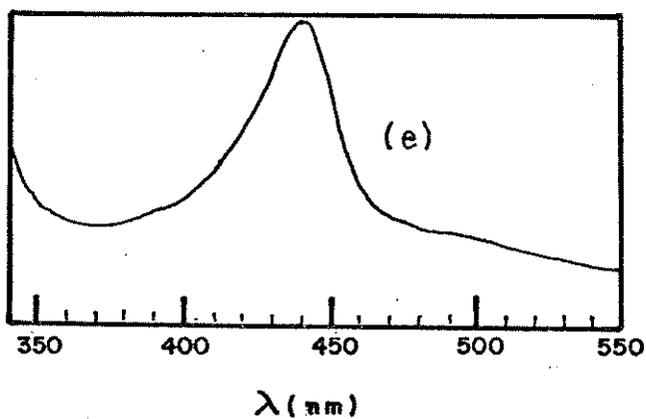
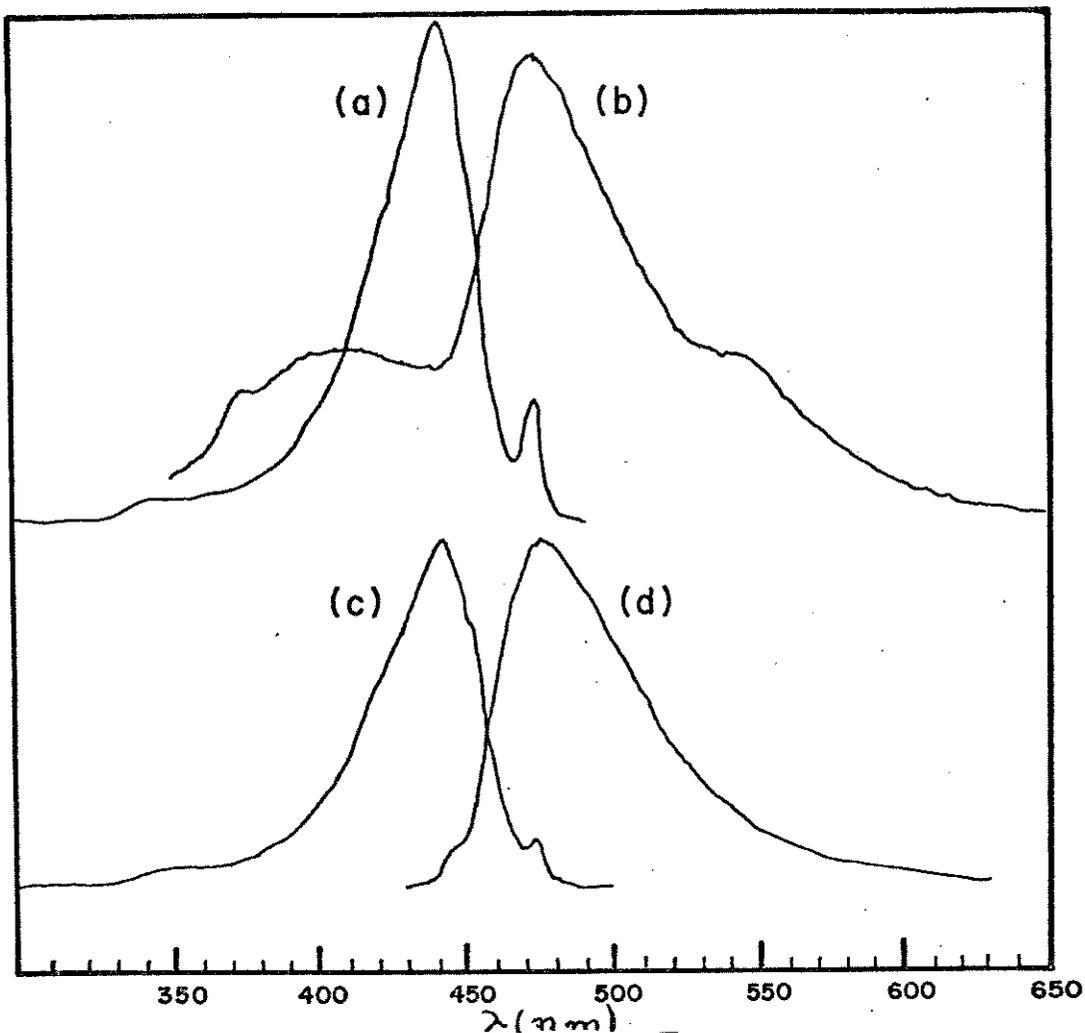


Figura 3.42: Espectros eletrônicos de: Excitação em: (a)  $8,4 \times 10^{-4}$  M ( $\lambda_{EM} = 475$  nm, 0,3); Emissão em: (b)  $8,4 \times 10^{-4}$  M ( $\lambda_{EXC} = 332$  nm, 30); (c)  $1,0 \times 10^{-3}$  M ( $\lambda_{EXC} = 440$  nm, 0,3) e (e) Absorção em:  $1,0 \times 10^{-3}$  M da fluoresceína em acetona. Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação, além dos ganhos dos equipamentos utilizados.

### 3.4.3- DIOXANO:

#### (A) SOLUÇÃO DILUÍDA:

Assim como foi observado na solução diluída de fluoresceína em acetona, em dioxano  $8,3 \times 10^{-6}$  M há uma superposição da banda de absorção do dioxano com a banda de absorção atribuída à espécie lactônica (3), na região de 220 a 280 nm. O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda fraca, larga e não estruturada vibronicamente, cujo máximo se situa em 410 nm (figura 3.43b). Como não há absorção na região do visível, pois a solução é incolor, e o espectro eletrônico de emissão é análogo àqueles da fluoresceína em acetona e acetato de etila, propõe-se, novamente, que a espécie lactônica (3) está presente em solução, tanto no estado eletrônico fundamental, como no estado eletrônico excitado.

O espectro eletrônico de emissão ( $\lambda_{\text{EXC}} = 310$  nm) da fluoresceína em dioxano  $1,0 \times 10^{-5}$  M apresenta a mesma banda descrita acima e atribuída à espécie lactônica (3) do corante (figura 3.43c).

#### (B) SOLUÇÃO CONCENTRADA:

Na concentração de  $1,2 \times 10^{-4}$  M, a fluoresceína apresenta uma banda de absorção estreita e estruturada vibronicamente com máximo em 275 nm (figura 3.43a). O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda com máximo em 410 nm atribuída à espécie lactônica (3).

O espectro eletrônico de emissão de uma solução saturada de fluoresceína em dioxano apresenta, uma banda larga com máximo em 500 nm e uma banda, com um ombro situado em  $\approx$  445 nm, largamente superposto à banda mais intensa (figura 3.43e). Supõe-se que estas bandas sejam devidas às formas: anfo-ion (4) e lactônica (3), respectivamente; observando-se, no entanto, um deslocamento espectral das duas bandas para a região do vermelho. Estes deslocamentos espectrais para comprimentos de onda maiores podem ser atribuídos ao efeito do solvente por diferença de polaridade<sup>(19)</sup>. Através do espectro eletrônico de excitação não se verifica a formação de agregados, pois não há desdobramento excitônico, indicando novamente que o aumento de concentração provoca apenas um deslocamento no equilíbrio químico de dissociação.

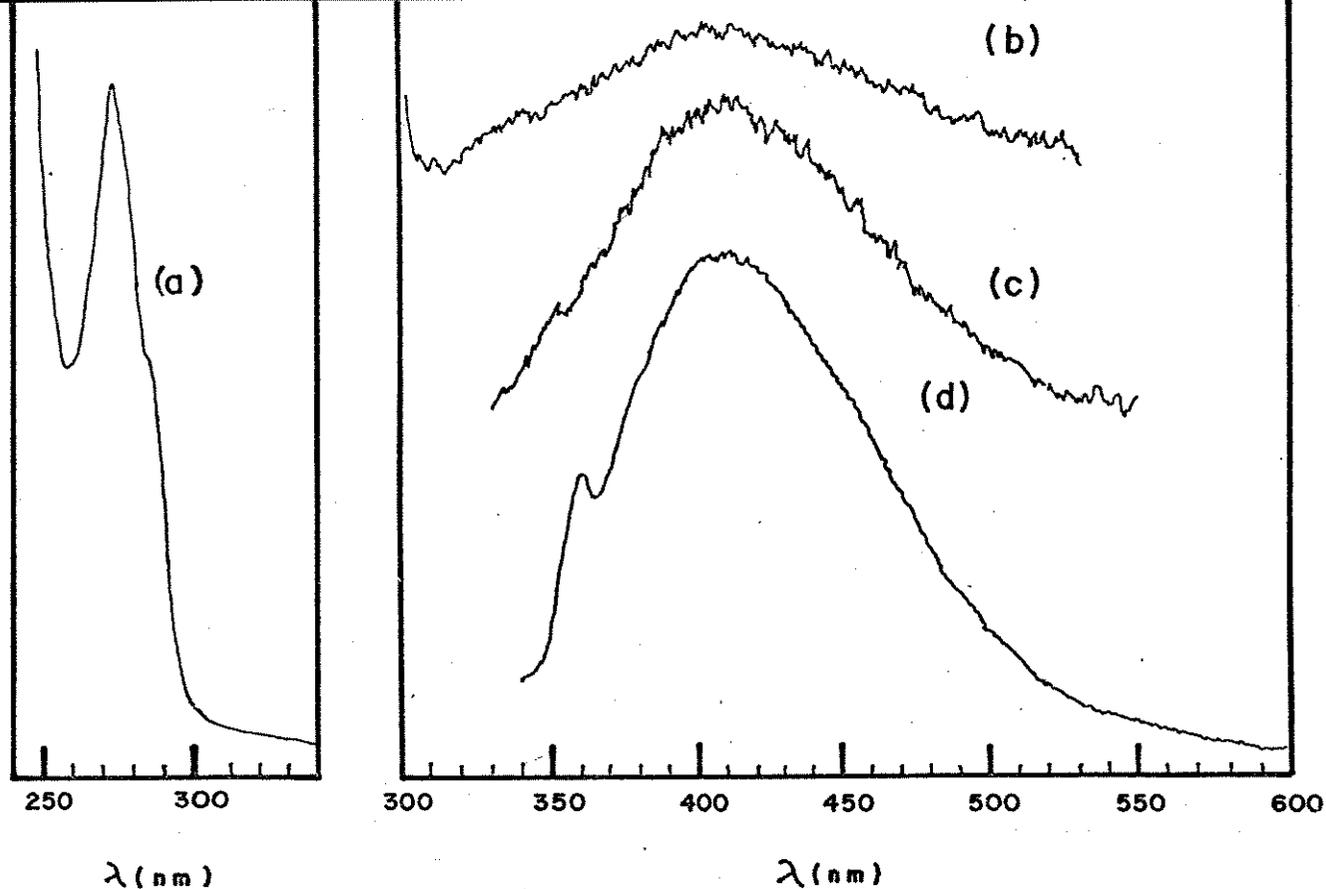


Figura 3.43: Espectros eletrônicos de Absorção em: (a)  $1,2 \times 10^{-4}$  M (1.00) e de Emissão em: (b)  $8,3 \times 10^{-6}$  M ( $\lambda_{\text{EXC}} = 290$  nm. 100); (c)  $1,0 \times 10^{-5}$  M ( $\lambda_{\text{EXC}} = 310$  nm. 100); (d)  $1,2 \times 10^{-4}$  M ( $\lambda_{\text{EXC}} = 320$  nm. 100) e (e) solução saturada ( $\lambda_{\text{EXC}} = 290$  nm. 30) da fluoresceína em dioxano. Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de excitação, além dos ganhos dos equipamentos utilizados.

### 3.4.4- CONCLUSÕES:

Em soluções diluídas de solventes apróticos como acetato de etila, acetona e dioxano, constata-se que a fluoresceína tem o mesmo comportamento fotofísico nos estados eletrônicos fundamental e excitado, ou seja, a forma lactônica (3) absorve em 275 nm e emite fluorescência em 410 nm. Propõe-se, ainda, que na solução diluída de fluoresceína em acetona, ocorra um processo de transferência de energia deste solvente para o corante, aumentando a eficiência quântica de emissão.

Em soluções concentradas, ao invés de agregação do corante, propõe-se que haja um deslocamento do equilíbrio químico de dissociação no sentido da formação da espécie anfo-ion (4), presente tanto no estado eletrônico fundamental (absorção em 440 nm), como no estado excitado (emissão em 475 nm), nos solventes apróticos estudados. Pode-se concluir, portanto, que o anfo-ion (4) não se transforma no estado eletrônico excitado, na espécie quinonóide (2); apresentando uma banda de emissão semelhante à do cátion (1), já que essa espécie também possui o anel xantênico carregado positivamente. Verifica-se, também, que a fluoresceína em uma solução concentrada de dioxano, apresenta um deslocamento espectral da banda de emissão em relação aos espectros do corante em acetato de etila e acetona, concluindo-se que este deslocamento é causado por uma mudança na polaridade do solvente.

Tabela 3. 4: Comprimentos de onda máximos das bandas eletrônicas de absorção e de emissão da fluoresceína em solventes apróticos.

(1) acetato de etila; (2) acetona e (3) dioxano.

	FORMA LACTÔNICA		ANFO-ION	
	$\lambda_{ABS}$ (nm)	$\lambda_{EM}$ (nm)	$\lambda_{ABS}$ (nm)	$\lambda_{EM}$ (nm)
(1)	275	410	444	475
(2)	-	410	439	475
(3)	275	410	-	500

Esse estudo permitiu que se identificasse, inequivocamente, as absorções e emissões do anfo-ion da fluoresceína, o que não pode ser realizado em soluções aquosas, tendo em vista a complexidade dos equilíbrio envolvidos.

### 3.5- ANÁLISE DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DA FLUORESCEÍNA EM SOLVENTES PRÓTICOS:

#### 3.5.1- ETANOL:

##### (A) SOLUÇÃO DILUÍDA:

A finalidade do estudo do comportamento fotofísico da fluoresceína em etanol e etileno glicol é compará-lo ao comportamento do corante na matriz polimérica de poliálcool vinílico), considerando-se que estes solventes possuam moléculas análogas às unidades repetitivas do polímero.

O espectro eletrônico de absorção de fluoresceína em etanol ( $7,9 \times 10^{-5}$  M) apresenta cinco bandas, sendo um ombro pouco pronunciado em  $\approx 500$  nm, duas bandas com intensidades relativas próximas com máximos nos comprimentos de onda de  $\approx 480$  e  $\approx 451$  nm, um outro ombro mais pronunciado em relação ao anterior em  $\approx 430$  nm e a última banda, pouco intensa, com máximo de absorção em 370 nm. Na região do ultravioleta, pode-se observar uma banda de absorção estreita e com estrutura vibrônica definida, com máximo em 277 nm e intensidade relativa maior em relação ao conjunto de bandas observado na região do visível (figura 3.44a). Nesse caso, supõe-se que o equilíbrio esteja deslocado no sentido preferencial de formação das formas neutras da fluoresceína, entre elas a espécie lactônica (3) e a espécie neutra quinonóide (2).

O espectro eletrônico de emissão (figura 3.44c) apresenta

uma banda em 515 nm com um ombro em  $\approx$  540 nm. Esta emissão pode ser atribuída à espécie quinonóide devendo-se, entretanto, ressaltar que dado o fato da existência de um equilíbrio químico de dissociação e dado o fato de que os  $pK^*$  são menores que os do estado eletrônico fundamental, não se pode descartar a possibilidade da presença do monoânion no estado eletrônico excitado. A ausência de emissão da espécie lactônica pode se dever a processos de transferência não-radiativa de energia.

#### (B) SOLUÇÃO CONCENTRADA:

O espectro eletrônico de absorção da fluoresceína em etanol na concentração de  $9,8 \times 10^{-4}$  M, apresenta cinco bandas na região do visível, cujos máximos se situam nos seguintes comprimentos de onda: 532, 484, 456,  $\approx$  430 e 370 nm (figura 3.44b). Comparando-se este espectro com o espectro anterior da fluoresceína em etanol, verifica-se que a banda pouco intensa em 532 nm, apresenta um deslocamento para o vermelho e que há uma inversão das intensidades relativas das bandas em 484 e 456 nm, sendo a segunda mais intensa. Não se observa a banda atribuída à espécie lactônica (3) na região do ultravioleta com o aumento da concentração do corante em solução. Esta característica também é observada nas soluções em acetona, acetato de etila e dioxano, isto é, o aumento da concentração causa um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do anfo-ion (4), nestes solventes apróticos. Nas soluções alcoólicas, propõe-se que haja

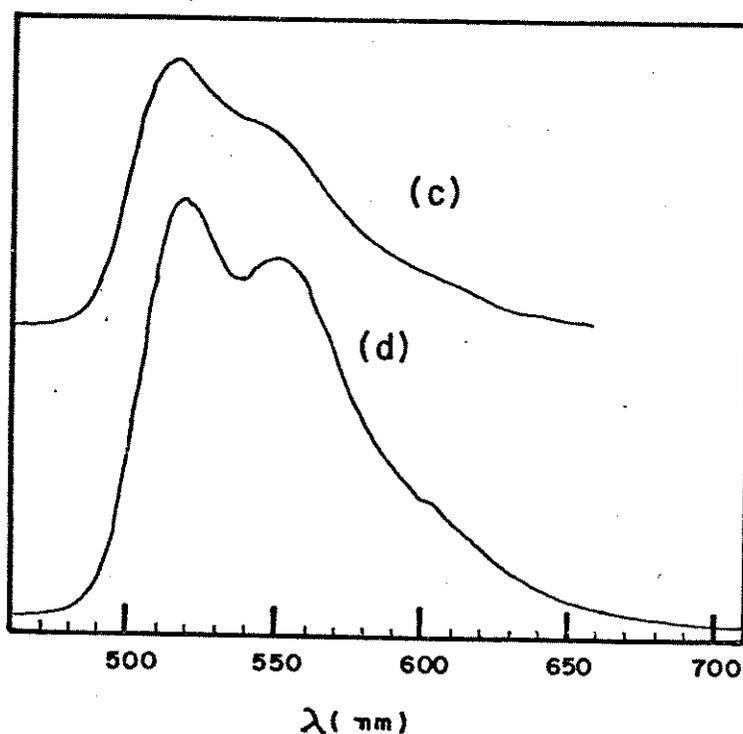
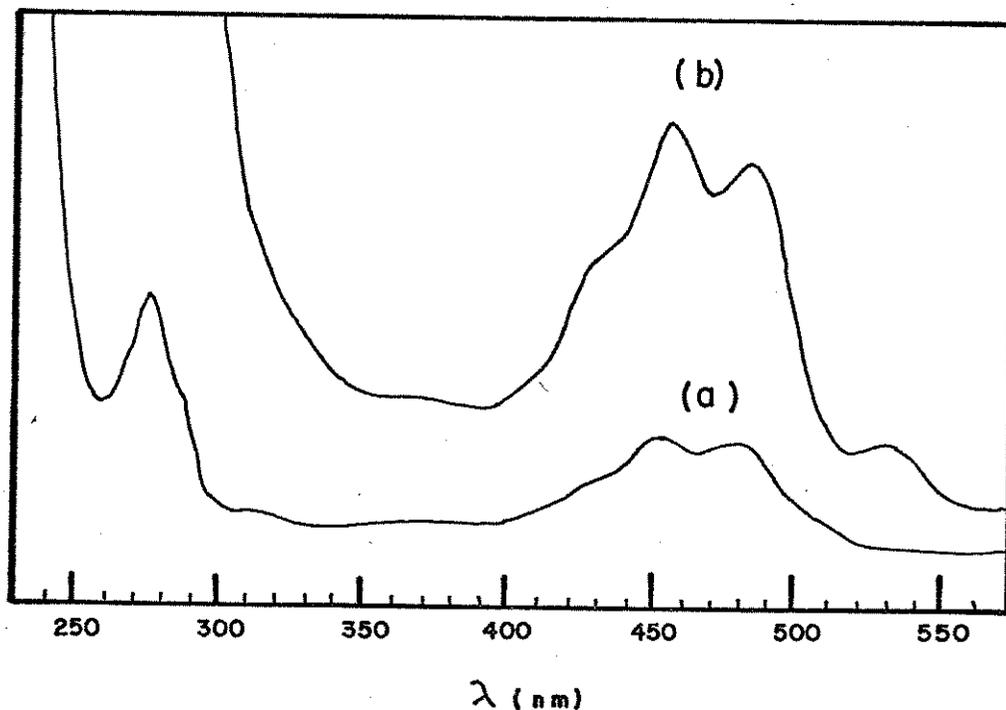


Figura 3.44: Espectros eletrônicos de: Absorção em: (a)  $7.9 \times 10^{-5}$  M (2.00); (b)  $9.8 \times 10^{-4}$  M (1.00); Emissão em: (c)  $7.9 \times 10^{-5}$  M ( $\lambda_{\text{EXC}} - 360$  nm. 0,3) e (d)  $9.8 \times 10^{-4}$  M ( $\lambda_{\text{EXC}} - 360$  nm. 0,3) da fluoresceína em etanol. Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de excitação, além dos ganhos dos equipamentos utilizados.

um equilíbrio entre as espécies quinonóide (2), monoaniônica (5) e, provavelmente, da espécie dianiônica (6).

O espectro eletrônico de emissão da fluoresceína em etanol  $9,8 \times 10^{-4}$  M apresenta uma banda estreita e mais intensa, cujo máximo se situa em 518 nm e uma outra com máximo em 551 nm (figura 3.44d). Deve-se supor que nesta concentração, haveria a possibilidade de formação de agregados, pois nas soluções aquosas saturadas, cujas concentrações são próximos a  $9,8 \times 10^{-4}$  M, verifica-se a existência de dímeros e trimeros em solução. Os espectros eletrônicos de excitação registrados em relação aos dois comprimentos de onda de emissão (518 e 551 nm), apresentam estruturas complexas e similares, diferentes daquelas características de agregados, cujos monômeros se dispõem em planos paralelos.

Segundo Arbeloa e co-autores<sup>(25)</sup>, quando a concentração de rodamina B em etanol aumenta até  $1 \times 10^{-3}$  M, ocorre um pequeno deslocamento espectral para energia menor de cerca de  $350 \text{ cm}^{-1}$  nos espectros eletrônicos de absorção e emissão de fluorescência. Segundo Ferguson<sup>(26)</sup> e Faraggi<sup>(28)</sup>, estas alterações espectrais são causadas por um deslocamento do equilíbrio químico de dissociação no sentido de formação da espécie catiônica da RB, ao contrário de outros autores, que sugeriram a possibilidade de dimerização do corante. Arbeloa e co-autores<sup>(25)</sup> propuseram que somente em concentrações acima de  $5,0 \times 10^{-3}$  M de rodamina B em etanol, ocorrem mudanças nos espectros eletrônicos de absorção

devidas à agregação do corante. Estes autores verificaram que a constante de dimerização da forma catiônica da RB em etanol é algumas ordens de magnitude do menor que a calculada em soluções aquosas. Atribuem este comportamento a interações específicas das moléculas de etanol com os grupos etileno-amino do corante<sup>(25)</sup>. Supõe-se que a fluoresceína apresente o mesmo comportamento observado para a RB, havendo formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de etanol e os grupos hidroxila do anel xantênico, dificultando a agregação. Portanto, o resultado efetivo do aumento da concentração de fluoresceína em etanol é o deslocamento do equilíbrio químico de dissociação, no sentido de formação do monoânion (5) do corante.

Provavelmente, assim como a RB, a fluoresceína forma dímeros em concentrações acima de  $1 \times 10^{-3}$  M. Arbeloa e co-autores<sup>(25)</sup> propuseram uma estrutura linear (cromóforos estão no mesmo plano) para esses dímeros da RB, uma vez que as interações entre as moléculas de etanol e os grupos etileno-amino dificultam a estrutura sanduíche observada nos dímeros em soluções aquosas. Ojeda e colaboradores<sup>(29)</sup> atribuíram o mesmo tipo de configuração linear para o dímero da rodamina 6G (R6G). Este tipo de estrutura corresponde ao modelo geométrico II, discutido no item 3.2.1.

### 3.5.2- ETILENO GLICOL:

#### (A) SOLUÇÃO DILUÍDA:

Na concentração de  $5,0 \times 10^{-5}$  M, verifica-se que o espectro eletrônico de absorção, na região do visível, apresenta: uma banda mais intensa em  $\approx 482$  nm; uma banda, mais fraca e superposta à anterior, com máximo em  $\approx 455$  nm; um ombro em  $\approx 439$  nm e uma banda bem pouco intensa com máximo em  $\approx 376$  nm (figura 3.45a). Analisando-se este espectro na região do ultravioleta, constata-se a presença de uma banda com máximo em 276 nm, que apresenta a mesma estrutura vibrônica da banda de absorção da fluoresceína em dioxano. O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda com comprimento de onda máximo em 522 nm com um ombro em  $\approx 555$  nm (figura 3.45c). Com base nestes resultados, pode-se supor que no estado eletrônico fundamental, há um equilíbrio químico de dissociação entre as espécies: quinonóide (2) e lactônica (3), porém, este se encontra deslocado no sentido de formação da primeira forma. Esta conclusão se deve ao fato de que a intensidade relativa da banda na região do visível é maior em relação àquela na região do ultravioleta. Além disso, dado o equilíbrio químico, não se pode excluir a presença da espécie monoaniônica (5). Quanto ao espectro eletrônico de emissão, duas possibilidades devem ser consideradas: (a) a forma lactônica (3) pode sofrer uma reação no estado excitado e se transformar na espécie neutra quinonóide (2) e conseqüentemente, a emissão se

deve às formas quinonóide (2) e monoaniônica (5); (b) a lactona está presente no estado excitado, porém transfere sua energia para a espécie quinonóide (2), não apresentando emissão de fluorescência. Não é possível, porém, relacionar o mecanismo mais provável, com o conjunto de informações disponíveis.

#### (B) SOLUÇÕES CONCENTRADAS:

No espectro eletrônico de absorção da fluoresceína na concentração de  $5,0 \times 10^{-4}$  M em etileno glicol, verifica-se o aparecimento de uma banda com máximo em  $\approx 530$  nm e intensidade relativa muito pequena. Há uma inversão de intensidade relativa das bandas com máximos em 481 nm e 455 nm, com uma intensificação da última quando comparada com a solução diluída. Observa-se, ainda, um ombro em  $\approx 434$  nm e uma banda muito larga e pouco intensa, cujo máximo se situa em  $\approx 376$  nm (figura 3.45b). O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda com máximo em 523 nm e um ombro pronunciado em  $\approx 545$  nm (figura 3.35d). O espectro eletrônico de excitação ( $\lambda_{EM} = 523$  nm) apresenta uma banda com estrutura vibrônica muito complexa, porém não característica de formação de dímeros. Como já havia sido discutido para a solução  $9,8 \times 10^{-4}$  M em etanol, nota-se o desaparecimento da banda de absorção em 276 nm característica da espécie lactônica (3). O fato do espectro eletrônico de excitação não ser característico dos dímeros sugere que, do mesmo modo

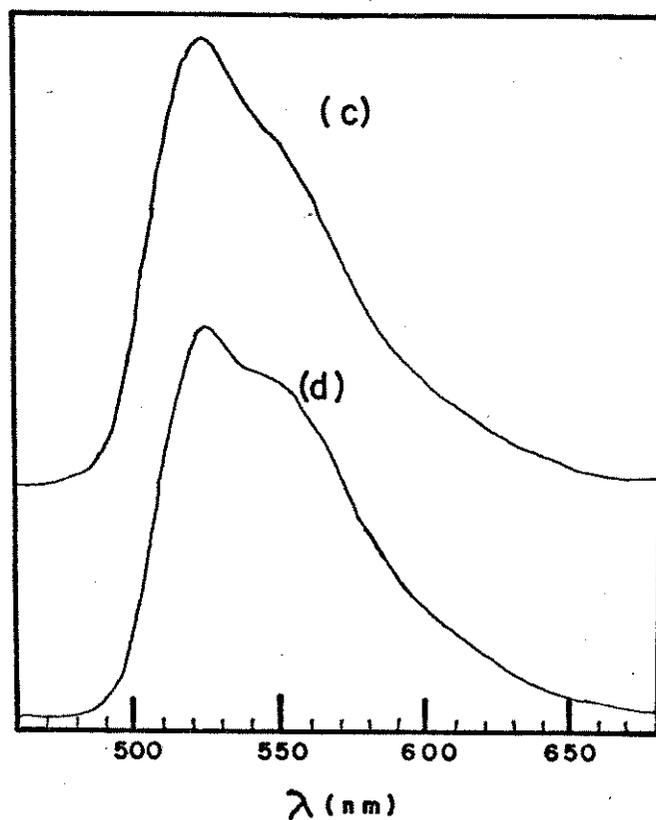
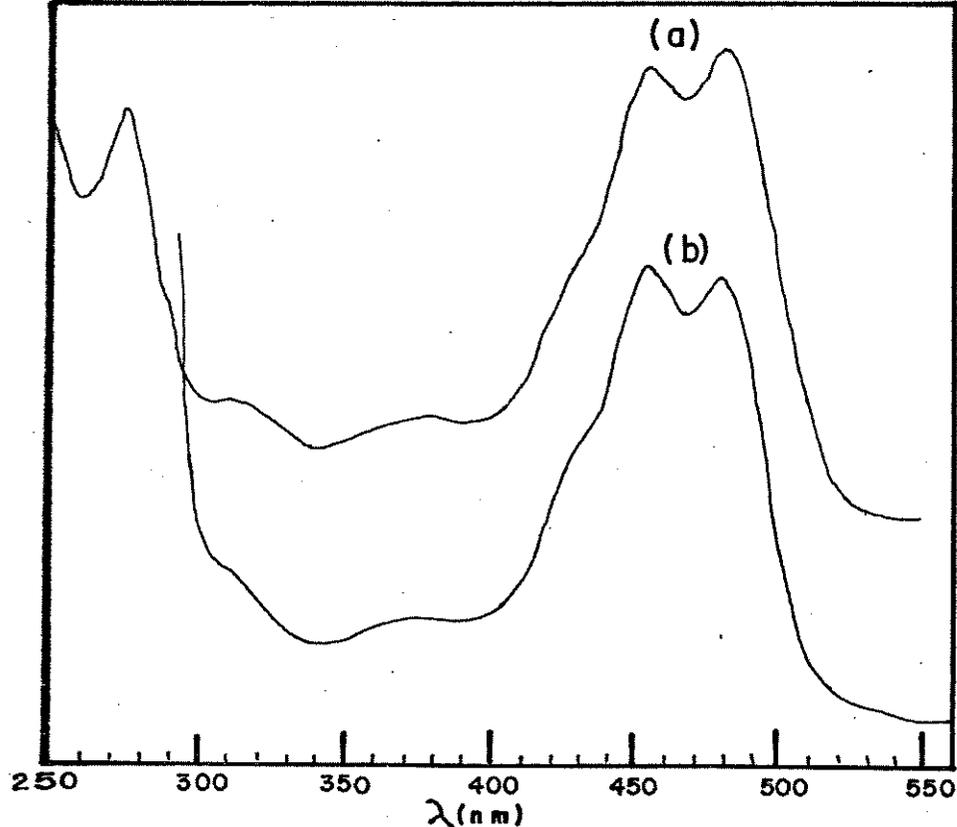


Figura 3.45: Espectros eletrônicos de: Absorção em: (a)  $5.0 \times 10^{-5}$  M (1.00); (b)  $5.0 \times 10^{-4}$  M (2.00) e Emissão em: (c)  $5.0 \times 10^{-5}$  M ( $\lambda_{\text{EXC}} - 360$  nm. 0.10) e (d)  $5.0 \times 10^{-4}$  M ( $\lambda_{\text{EXC}} - 360$  nm. 0.1) da fluoresceína em etileno glicol. Entre parênteses são apresentados os comprimentos de onda máximos de excitação, além dos ganhos dos equipamentos utilizados.

que o etanol, o etileno glicol ao interagir com a fluoresceína não o faz com uma geometria apropriada para formar uma camada de intercalação que estabilize a espécie dimérica. Com base nessa hipótese e no conjunto de bandas de absorção e de emissão, supõe-se que estão em equilíbrio as seguintes formas: neutra quinonóide (2), monoaniônica (5) e, provavelmente, a espécie dianiônica (6), nos estados eletrônicos fundamental e excitado, pois há um deslocamento para a região do vermelho da banda de emissão em relação aos espectros anteriores. Martin e co-autores<sup>(30)</sup> realizaram um estudo do comportamento da fluoresceína em meio alcoólico e obtiveram espectros muito semelhantes àqueles registrados nesse trabalho, atribuindo os mesmos a equilíbrios existentes entre as espécies indicadas anteriormente.

### 3.5.3- ESTUDO DA ESPÉCIE LACTÔNICA EM SOLUÇÕES

#### AQUOSAS DILUÍDAS:

Uma vez que é detectada a presença da espécie lactônica (3), em solventes práticos como o etanol e etileno glicol, torna-se necessário uma análise dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em soluções aquosas diluídas em diferentes pH na região do ultravioleta, para confirmar a presença ou não da espécie citada em água.

Analisando-se os espectros eletrônicos de absorção

decompostos por deconvolução de curva, verifica-se que bandas em  $\lambda$  253,  $\lambda$  230 e  $\lambda$  188 nm, não apresentam uma variação significativa do comprimento de onda máximo de absorção em relação ao aumento do pH. Esta característica não é verificada, porém, para outras bandas.

Através da figura 3.46, pode-se verificar que na faixa de pH de 2,55 a 5,05, há o aparecimento de uma banda em 284,4 nm, cujo máximo de absorbância ocorre no pH = 2,92. Observa-se, também, que nessa faixa de pH há uma diminuição da intensidade relativa da banda de absorção na região do visível, conforme comentado anteriormente. Se há um número menor de cromóforos absorvedores e a concentração do corante continua a mesma, supõe-se que devem existir espécies da fluoresceína, que absorvem na região do ultravioleta. Como todas as espécies do corante, exceto a espécie lactônica (3), absorvem na região do visível, deve-se sugerir como hipótese, que esta espécie está presente em soluções aquosas diluídas ( $\approx 1 \times 10^{-6}$  M) na faixa de pH de 2,55 a 5,05 e que haja um equilíbrio entre as três formas neutras da fluoresceína. Martin<sup>(2)</sup> e Chen<sup>(18)</sup>, sugeriram que a espécie lactônica (3) está presente em soluções aquosas em pH  $\approx$  3, valor este concordante com aquele obtido nesse trabalho, pois a absorbância máxima da banda em 285 nm ocorre na solução aquosa de pH = 2,92. Segundo Martin<sup>(2)</sup>, a molécula neutra existe em solução na seguinte proporção: 5/8 da espécie lactônica (3), 1/4 como anfo-íon (4) e 1/4 como forma quinonóide (2). Petrosyan<sup>(31)</sup>

sugeriu, também, que a espécie lactônica (3) deve estar presente em menor proporção e calculou as constantes dos equilíbrios tautoméricos mostradas a seguir.

$$t_{1/q} = \frac{[H_2FC(1)]}{[H_2FC(q)]} = 6,04 \pm 0,14$$

$$t_{1/z} = \frac{[H_2FC(1)]}{[H_2FC(z)]} = 3,08 \pm 0,17 \quad (18)$$

$$t_{z/q} = \frac{[H_2FC(z)]}{[H_2FC(q)]} = 1,96 \pm 0,10$$

onde q, l e z representam as formas neutras da fluoresceína: quinonóide (2), lactônica (3) e anfo-ion (4), respectivamente.

Segundo Martin e co-autor<sup>(2)</sup>, a espécie lactônica (3), em soluções aquosas, sofre uma reação e se transforma, assim como o anfo-ion (4), na espécie quinonóide (2) no estado eletrônico excitado, não emitindo fluorescência em solução aquosa. Os resultados apresentados para as soluções da fluoresceína em etanol e etileno glicol, para as quais também não se observou emissão da forma lactônica (3) são concordantes com as informações acima.

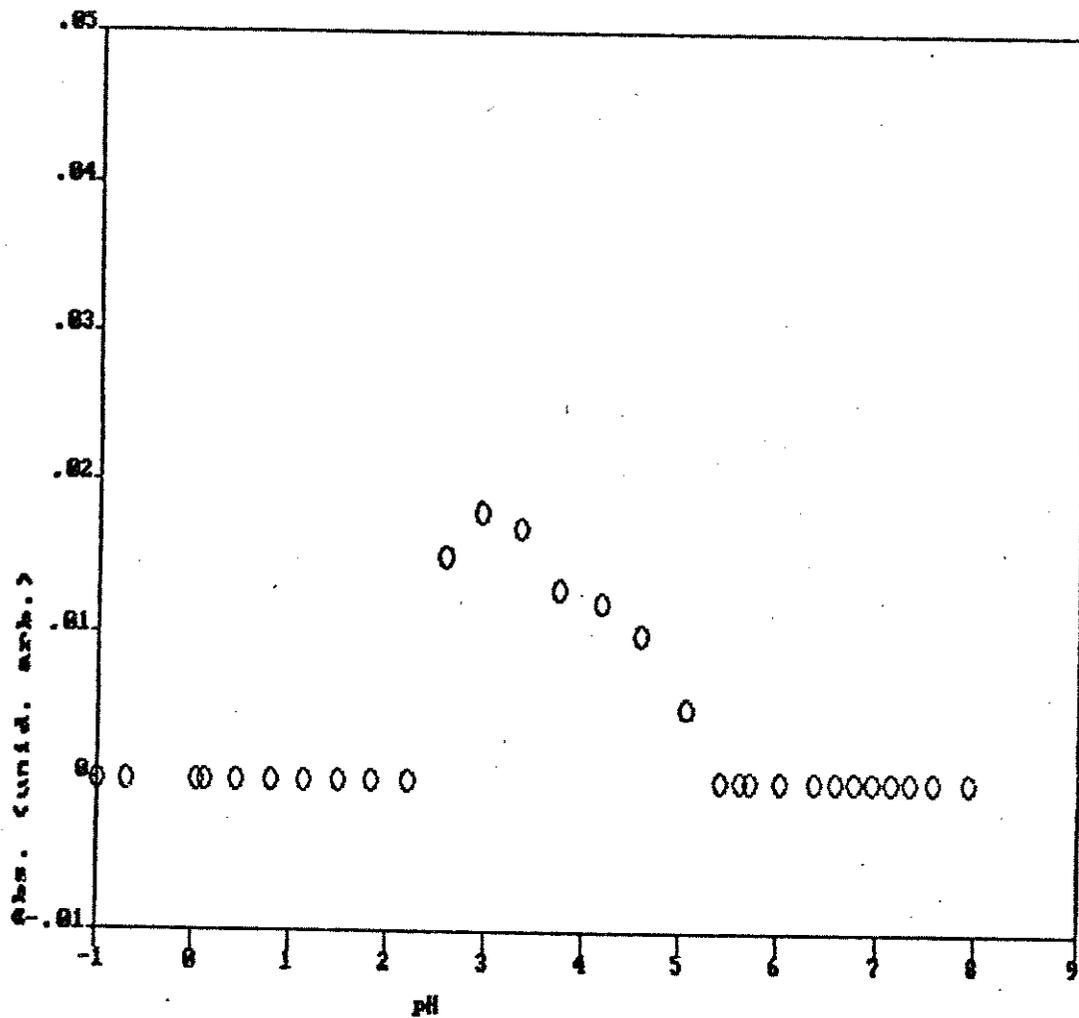


Figura 3.45: Gráfico da absorvância (unidades arbitrárias) versus pH da banda centrada em  $\approx 285$  nm.

### 3.5.4- CONCLUSÕES:

Os espectros eletrônicos de absorção de soluções diluídas de fluoresceína em etanol, apresentam cinco bandas na região do visível, sendo que as bandas em  $\approx 480$  e  $451$  nm têm intensidades relativas maiores e muito próximas entre si; observa-se ainda, uma banda com máximo em  $277$  nm, intensidade maior em relação ao conjunto de bandas na região do visível e muito similar ao espectro do corante em dioxano, atribuída à espécie lactônica (3). Deve-se propor que haja um equilíbrio entre as espécies da molécula neutra, quinonóide (2) e lactônica (3), sendo que encontra-se deslocado no sentido de formação da espécie neutra lactônica (3), no estado eletrônico fundamental. O espectro eletrônico de emissão, apresenta uma banda intensa com máximo em  $515$  nm e um ombro em  $\approx 540$  nm. A emissão característica da espécie lactônica (3) ( $\lambda_{EM} = 410$  nm), não é constatada. Pode-se concluir, portanto, que a espécie neutra quinonóide (2) e, provavelmente, o monoânion (5), estão presentes em solução no estado eletrônico excitado.

O espectro eletrônico de absorção da solução concentrada de fluoresceína em etanol, apresenta, novamente, as cinco bandas, porém há uma inversão das intensidades relativas das bandas com máximos em  $484$  e  $455$  nm, sendo que a segunda se torna mais intensa. O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda intensa com máximo em  $518$  nm e um ombro em  $\approx 551$  nm. Deve-se supor

que, tanto no estado eletrônico fundamental, como no excitado, estão em equilíbrio na solução as seguintes espécies: neutra quinonóide (2) e monoaniônica (5).

O espectro eletrônico de absorção das soluções diluídas de fluoresceína em etileno glicol, apresentam as bandas mais intensas com máximos em  $\approx 481$  e  $\approx 455$  nm, na região do visível; e uma banda com menor intensidade relativa comparada ao espectro total na região do visível, com máximo em 276 nm e atribuída à espécie lactônica (3). Propõe-se que, no estado eletrônico fundamental, há um equilíbrio entre as espécies da molécula neutra quinonóide (2) e lactônica (3), encontrando-se deslocado no sentido da formação da primeira. Provavelmente, nesse caso, a espécie monoânion (5) também está presente em solução. O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda com máximo em 522 nm e um ombro em  $\approx 555$  nm. Este perfil de banda é característico de espécies que possuam o anel xantênico com carga efetiva nula, podendo-se supor que há um equilíbrio entre as espécies neutra quinonóide (2) e monoaniônica (5).

Em soluções diluídas de fluoresceína em etanol e etileno glicol, não se constata a emissão da espécie lactônica (3). Duas hipóteses principais devem ser discutidas: a primeira supõe que a lactona, assim como o anfo-ion (4), em soluções aquosas diluídas, sofre uma reação no estado eletrônico excitado, transformando-se na espécie neutra quinonóide (2); e a segunda propõe que a espécie citada, está presente no estado excitado, porém transfere sua

energia de excitação para a espécie neutra quinonóide (2) e, conseqüentemente, não emite fluorescência. Com o conjunto de informações disponíveis, não é possível determinar qual a possibilidade mais correta.

Verifica-se que o espectro eletrônico de absorção da solução concentrada de fluoresceína em etileno glicol, apresenta uma inversão das intensidades relativas observadas no caso do etanol, sendo que as bandas têm máximos em 481 e 455 nm, havendo intensificação da última banda. O espectro eletrônico de emissão apresenta uma banda com máximo em 523 nm e um ombro em  $\approx$  545 nm. Supõe-se que nos estados eletrônicos fundamental e excitado, há um equilíbrio entre as espécies: neutra quinonóide (2), monoaniônica (5) e, provavelmente, dianiônica (6), uma vez que há um deslocamento para o vermelho da banda de emissão.

Analisando-se os espectros eletrônicos de excitação das soluções concentradas em etanol e etileno glicol, não se observa o desdobramento excitônico característico de formação de dímeros do tipo sanduíche, que é detectado em soluções aquosas saturadas. Propõe-se que as moléculas de etanol e etileno glicol não possuem geometria apropriada para se intercalarem entre as bandas monoméricas e estabilizarem as cargas negativas dos anéis xantênico e benzênico. Verifica-se que, nesses solventes práticos, há um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da espécie dianiônica (6) quando do aumento da concentração. Este deslocamento de equilíbrio também ocorre em soluções concentradas

do corante em solventes apróticos, porém em sentido inverso, isto é, no sentido de formação da espécie anfo-ion (4).

Assim como é constatada a presença da espécie lactônica (3) nos solventes próticos, etanol e etileno glicol, também é verificada a presença dessa espécie em soluções aquosas diluídas na faixa de pH de 2,55 a 5,05. Baseia-se esta conclusão no fato de que nessa faixa de pH, há o aparecimento de uma banda em  $\approx 285$  nm, cujo máximo de absorbância situa-se no pH = 2,92 e uma acentuada redução das bandas de absorção na região do visível.

Tabela 3.5: Comprimentos de onda máximos das bandas eletrônicas de absorção e de emissão da fluoresceína em solventes próticos.

	lactona		quinonóide		monoânion	
	$\lambda_{ABS}$	$\lambda_{EM}$	$\lambda_{ABS}$	$\lambda_{EM}$	$\lambda_{ABS}$	$\lambda_{EM}$
etanol (1)	277	-	480/451	515	480/451	515
	(2)	-	484/456	518	484/456	518/551
etileno glicol (1)	276	-	482/455	522	481/455	522
	(2)	-	481/455	523	481/455	523/545

Onde, (1) solução diluída e (2) solução concentrada,  $\lambda$  (nm).

### 3.8- ANÁLISE DO ESPECTRO ELETRÔNICO DE ABSORÇÃO DA FLUORESCEÍNA NA FORMA CRISTALINA:

Dada a possibilidade de cristalização do corante na matriz polimérica, além da possibilidade de deslocamento de equilíbrio entre as diversas formas da fluoresceína, bem como a possibilidade de formação de oligômeros, definiu-se como outro objetivo, conhecer o comportamento espectral da fluoresceína na forma cristalina. Para isto obteve-se o espectro eletrônico de absorção da fluoresceína dispersa em nujol, que apresenta um duplete com bandas de mesma intensidade e máximos em 272 e 279 nm, sendo que o vale, isto é, o mínimo de absorção entre as mesmas situa-se em 275 nm (figura 3.47). Observa-se, também, bandas de baixa intensidade de absorção entre 300 e 340 nm. Comparando-se este, com o espectro eletrônico de absorção da fluoresceína em dioxano  $1,0 \times 10^{-4}$  M (figura 3.43a), pode-se constatar que o máximo de absorção da banda coincide com o mínimo de absorção entre as duas bandas da fluoresceína em nujol.

Segundo a teoria excitônica descrita anteriormente na discussão sobre a formação de agregados, pode-se sugerir como hipótese que dímeros da espécie lactônica (3) da fluoresceína compõem a sua estrutura cristalina, uma vez que não se verifica nenhuma banda de absorção na região do visível. Após ter determinado a estrutura da fenolftaleína, cuja estrutura é um

tri-fenil-metano, Baeyer<sup>(32)</sup> propôs que a fluoresceína na forma cristalina, tem a estrutura de uma lactona (3).

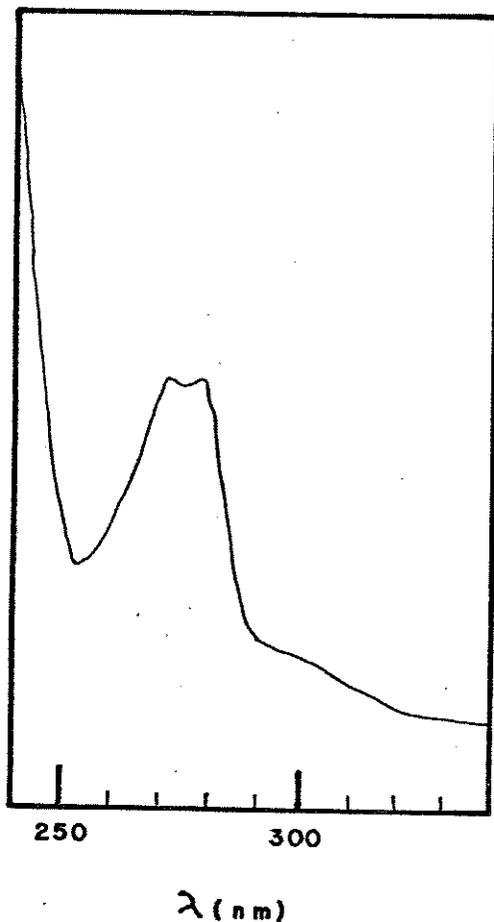


Figura 3.47: Espectro eletrônico de absorção da fluoresceína dispersa em nujol. O ganho do espectrofotômetro utilizado foi 1,00.

A hipótese sugerida anteriormente de que o cristal da fluoresceína contenha a sua forma lactônica (3) é concordante com as propostas feitas em outros trabalhos<sup>(19)(21)(22)</sup> e mais ainda, dada a ocorrência do desdobramento excitônico, sugere-se que a

cela unitária seja formada por dímeros da espécie lactônica (3) da fluoresceína.

Apesar dessa concordância de resultados experimentais, deve-se ressaltar que Diehl e co-autor<sup>(34)</sup>, propuseram que a forma cristalina vermelha da fluoresceína é composta pela estrutura quinonóide (2), enquanto que a lactona (3) apresenta-se na forma incolor. Considerando-se que neste trabalho utilizou-se fluoresceína na forma cristalina vermelha e que os resultados espectrais sugerem a presença da forma lactônica (3), entende-se que esta ainda é uma questão em aberto, a ser estudada utilizando-se técnicas adicionais, entre elas a difração de raios-X.

### 3.7- ESTUDO DO EFEITO DO SOLVENTE NA FOTOFÍSICA DAS FORMAS MOLECULARES DA FLUORESCEÍNA:

A fotofísica e as características espectrais do corante xantênico, rodamina B, tem sido largamente estudadas em função da concentração do corante, viscosidade, polaridade e polarizabilidade dos solvente, além do pH das soluções aquosas. No entanto, não se determinou uma correlação precisa entre os deslocamentos espectrais e rendimentos quânticos observados e esses parâmetros do solvente<sup>(33)</sup>.

Segundo a Teoria de Efeito de Solvente descrita no capítulo 1, Arbeloa e co-autores<sup>(33)</sup>, consideraram que as energias

de absorção  $\bar{\nu}_{\text{ABS}}$  e fluorescência  $\bar{\nu}_{\text{EM}}$  dependem de dois tipos de interações das moléculas do corante com o solvente: efeito global, que depende da constante dielétrica e do índice de refração do solvente; e interações específicas de curta distância.

É fato conhecido que o processo de relaxação do solvente, devido a mudanças no momento de dipolo no processo de excitação, causa um deslocamento para a região do vermelho do espectro eletrônico de fluorescência<sup>(19)</sup>. Esta reorientação do solvente é devida a um aumento do momento de dipolo das moléculas do corante no estado eletrônico excitado. Há um maior deslocamento para a região do vermelho no espectro de fluorescência em soluções, pois a transição eletrônica ocorre de um estado eletrônico excitado estabilizado para um estado fundamental não estabilizado<sup>(34)</sup>. Arbeloa e co-autor<sup>(19)</sup>, verificaram que há uma forte dependência do deslocamento de Stokes ( $\bar{\nu}_{\text{ABS}} - \bar{\nu}_{\text{EM}}$ ) da lactona da rodamina B em relação ao parâmetro do solvente,  $\Delta f$ , calculado através da equação abaixo:

$$\Delta f = \frac{(\epsilon - 1)}{(2\epsilon + 2)} - \frac{(n^2 - 1)}{(2n^2 + 1)} \quad (19)$$

onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica e  $n$  é o índice de refração do solvente<sup>(19)</sup>.

Tabela 3.5: Comprimentos de onda máximos das bandas eletrônicas de absorção e emissão da fluoresceína, constante dielétrica  $\epsilon$  e índice de refração,  $n^{(35)}$ .

solvente	$\lambda_{\text{ABS}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{EM}}/\text{nm}$	$\epsilon^{(35)}$	$n^{(35)}$	$\Delta f$
acetona	-	410	20,70	1,359	0,2842
acetato de etila	275	410	6,02	1,372	0,1999
dioxano	275	410	2,21	1,420	0,1483

Analisando-se a tabela 3.5, não se verifica deslocamento de Stokes ( $\bar{\nu}_{\text{ABS}} - \bar{\nu}_{\text{EM}}$ ) da forma neutra lactônica (3) da fluoresceína nos solventes estudados, apesar dos  $\Delta f$  diferentes. Não é possível, portanto, a utilização da teoria de solventes no estudo das características espectrais da espécie lactônica (3) da fluoresceína.

Arbeloa e co-autores<sup>(33)</sup> constataram que não há correlação entre o deslocamento de Stokes e o parâmetro de solvente  $\Delta f$  para o anfo-íon da rodamina B ( $\text{RB}^+$ ) em solventes próticos<sup>(33)</sup>. Há duas explicações possíveis para este comportamento.

(A) O modelo que fundamenta a teoria do efeito de solventes em espectros eletrônicos, postula as perturbações no sistema soluto-solvente causadas por interações eletrostáticas do tipo dipolo-dipolo. Deve-se considerar que em solventes próticos, ocorre a formação de pontes de hidrogênio entre o soluto e o

solvente, que são interações químicas específicas, diferindo em natureza e ordem de magnitude das interações eletrostáticas.

(B) Provavelmente, os espectros eletrônicos de absorção e emissão não são devidos à espécie isolada, ou seja, há um equilíbrio entre as espécies catiônica e anfo-ion (4) da rodamina B (RB).

Propõe-se que a fluoresceína apresenta, nos solventes práticos, etanol, etileno glicol e água, o mesmo comportamento observado no caso da RB. Nesse caso, o problema se torna mais complexo, uma vez que há um número maior de espécies presentes em solução, que absorvem na mesma região do espectro, não sendo possível o isolamento de uma determinada espécie, nos solventes citados. Além disso, ocorrem interações específicas do tipo pontes de hidrogênio, que inviabilizam a utilização da Teoria de Efeito de Solventes.

### 3.8- ANÁLISE DOS ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA EM MATRIZES DE POLIACETATO DE VINILA (PVAc) E POLIÁLCOOL VINÍLICO (PVA):

#### 3.8.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS:

##### 3.8.1A- MODELOS DE DISSOLUÇÃO DE MOLÉCULAS AROMÁTICAS EM MATRIZES POLIMÉRICAS:

O estudo do comportamento de moléculas aromáticas pequenas dispersas em matrizes poliméricas estiradas uniaxialmente, tem se revelado muito importante na determinação da orientação das cadeias poliméricas e das moléculas aromáticas dispersas na matriz. O estiramento uniaxial do polímero favorece a anisotropia do meio, diferenciando os diversos sítios ocupados pelas moléculas aromáticas. Konwerska-Hrabowska e Kryszewski<sup>(36)</sup> sugeriram, através de medidas de dicroísmo linear na região do ultra-violeta, que as moléculas de pireno seguem a reorientação dos cristalitos e se localizam nas superfícies adjacentes a estes na matriz de polietileno (PE). O ângulo entre o eixo maior da molécula do pireno e o eixo principal do cristalito é constante e independente da deformação. Há pelo menos dois tipos diferentes de sítios no polímero, passíveis de serem ocupados por moléculas, sendo que no primeiro, as interações polímero-molécula aromática são mais fortes, havendo uma orientação mais definida, e

correspondendo às superfícies adjacentes aos cristalitos; e no segundo sítio, onde as interações são mais fracas e o sistema mais desordenado<sup>(37)(38)</sup>, correspondendo à fase amorfa. Estudos de relaxação dielétrica do 1-bromo-naftaleno em polietileno (PE) estirado, mostraram que o mecanismo de orientação do soluto parece ser a adsorção nas superfícies dos cristalitos de polietileno<sup>(39)</sup>. Segundo Jang<sup>(38)</sup>, as moléculas orgânicas aromáticas não se dispersam no interior da fase cristalina.

Thulstrup e Michl<sup>(28)</sup> e outros autores, consideraram que a molécula orgânica de dois ou mais anéis benzênicos se situa no plano yz, sendo que o eixo de polarização maior se situa ao longo do eixo z e o menor se situa ao longo do eixo y. O eixo x é, então, perpendicular ao plano yz. À partir de espectros dicróicos de absorção nas regiões do infravermelho, visível ou ultravioleta polarizados paralelamente ( $A_{\parallel} \approx A_z$ ) ou perpendicularmente ( $A_{\perp} \approx A_y$ ) à direção do estiramento é possível se determinar a orientação da molécula em relação à matriz polimérica. Pode-se, portanto, determinar a polarização de transições vibracionais na região do infravermelho e eletrônicas, nas regiões do visível e ultravioleta<sup>(41)</sup>. Segundo Thulstrup e Michl<sup>(42)</sup> e Matsuoka<sup>(43)</sup>, a orientação da molécula na matriz depende do seu formato. No entanto, os resultados obtidos por Konwerska-Hrabowska<sup>(44)</sup>, não foram convenientemente explicados pelo modelo do formato da molécula, mas pelo modelo de polarizabilidade, que considera as forças repulsivas e atrativas do sistema. Há, portanto, uma certa

discussão a respeito do modelo, que explicaria adequadamente o comportamento de moléculas aromáticas em matrizes poliméricas estiradas uniaxialmente.

Moléculas fortemente polares, insolúveis em polietileno (PE), podem ser estudadas em poli(álcool vinílico) (PVA) estirado, na região do ultravioleta-visível e/ou na região do infravermelho<sup>(41)</sup>.

Al-Hassan e co-autor<sup>(45)</sup>, estudaram o comportamento fotofísico de um corante da classe das merocionaninas em soluções diluídas e em matrizes de PVA, e observaram que a emissão de fluorescência nas matrizes é dependente do comprimento de onda de excitação; o mesmo não acontecendo em soluções diluídas. Além disso, na matriz rígida à temperatura ambiente, não há um equilíbrio entre os diferentes sítios de solvatação do corante. Uma das indicações de que este equilíbrio não ocorre, é que os processos de recozimento de polímeros conduzem a uma alteração do conteúdo relativo de regiões amorfas e cristalinas.

Desse conjunto de informações, pode-se concluir que a localização de moléculas em uma matriz polimérica semicristalina envolve sítios de natureza diferentes e, conseqüentemente, com interações polímero-molécula diferentes, e que entre esses sítios devem ser excluídos aqueles situados no interior dos cristalitos.

### 3.8.1B- CARACTERÍSTICAS DOS POLÍMEROS POLIÁLCOOL

#### VINÍLICO (PVA) E POLIACETATO DE VINILA (PVAc):

O PVA possui a seguinte fórmula geral  $[-CH_2-CH(OH)-]_n$ , cuja unidade repetitiva possui estrutura análoga ao solvente não viscoso etanol. Portanto, espera-se que a fluoresceína na matriz polimérica de PVA poderá apresentar o mesmo conjunto de formas iônicas presentes em equilíbrio nas soluções de solventes não viscosos análogos.

O PVAc possui a sua unidade repetitiva  $([-CH_2-CH(OCOCH_3)-]_n)$  análoga à estrutura molecular do acetato de etila. Consequentemente, espera-se que a fluoresceína tenha o mesmo comportamento fotofísico na matriz polimérica e no solvente orgânico.

As propriedades físicas de polímeros, incluindo os valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g(PVA) = 358$  K e  $T_g(PVAc) = 301$  K) estão relacionados à força das ligações covalentes, à rigidez dos segmentos da cadeia polimérica, e à força das interações intermoleculares entre as cadeias do polímero. A força das interações intermoleculares corresponde à densidade de energia coesiva (CED), que é a energia molar de vaporização por unidade de volume. Uma vez que as atrações intermoleculares de solvente e soluto ocorrem quando há dissolução do soluto, os valores de CED podem ser utilizados para prever a solubilidade<sup>(46)</sup>.

Hildebrand demonstrou a relação entre solubilidade e pressão interna do solvente e Scatchard incorporou o conceito de CED à equação de Hildebrand, definindo o parâmetro de solubilidade na raiz quadrada de CED. Portanto, o parâmetro de solubilidade total, para solventes não-polares, é igual à raiz quadrada da diferença entre a entalpia de vaporização ( $\Delta H_v$ ) e o produto da constante ideal dos gases (R) e a temperatura Kelvin (T), dividida pelo volume molar ( $v$ ), como é mostrado na equação abaixo<sup>(46)</sup>.

$$\delta_t = \left[ \frac{\Delta E}{v} \right] = \left[ \frac{\Delta H_v - RT}{v} \right]^{1/2} \quad (20)$$

Como o calor de vaporização de polímeros sólidos, não pode ser obtido, Small utilizou os valores para as constantes molares de atração (G) para a estimativa dos parâmetros de solubilidade de polímeros não-polares<sup>(46)</sup>.

$$\delta_t = \frac{D \cdot \Sigma(G)}{M} \quad (21)$$

onde, D é a densidade e M é o peso molecular<sup>(46)</sup>.

Hansen<sup>(47)</sup> propôs uma extensão do método de Hildebrand para sistemas polares e que possuem pontes de hidrogênio. Ele considera que o parâmetro de coesão é composto por uma combinação linear de componentes relativas às interações: não-polares ou dispersivas ( $\delta_d$ ), polares ( $\delta_p$ ) e por pontes de hidrogênio ( $\delta_h$ ).

Os parâmetros de solubilidade de Hildebrand ( $\delta_t$ ) e os de

Hansen são listados abaixo para os polímeros e solvente orgânicos utilizados.

Tabela 3.6: Parâmetros de solubilidade de solventes não-viscosos e polímeros ( $\delta$  em  $\text{MPa}^{1/2}$ ) (47).

SOLVENTE	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	$\delta_t$
etanol	7,7	4,3	9,5	13,0
1,2-etileno-glicol	8,3	5,4	12,7	16,1
água	15,6	16,0	42,3	47,8
PVA	-	-	9,1	12,6
acetona	15,5	10,4	7,0	20,1
acetato de etila	15,8	5,3	7,2	18,1
1,4-dioxano	19,0	1,8	7,4	20,5
PVAc	20,9	11,3	9,6	25,6

Considerando-se que os parâmetros de solubilidade representam as forças de interações intermoleculares, procurar-se-á correlacioná-los com as características espectrais observadas para a fluoresceína nos diferentes sistemas, já que os modelos citados anteriormente para os deslocamentos espectrais por efeito do solvente, não se aplicam aos mesmos.

Algumas indicações de que se pode correlacionar as

observações espectrais com os parâmetros de solubilidade surge quando se compara os resultados obtidos para as soluções diluídas da fluoresceína em solventes apróticos (dioxano, acetona e acetato de etila), para as quais se identificou a lactona como a forma presente no estados eletrônicos fundamental e excitado. Estes três solventes têm parâmetros de solubilidade totais próximos, bastante diferentes dos solventes próticos estudados e, além disso, têm os componentes do parâmetro de solubilidade devido às pontes de hidrogênio ( $\delta_h$ ) muito semelhantes.

### 3.8.1C- INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE RECOZIMENTO NO GRAU DE CRISTALINIDADE:

A cristalinidade é definida como a fração em peso de material cristalino. Esta definição seria exata, se o polímero fosse composto apenas por duas fases distintas, isto é, uma fase perfeitamente cristalina e outra perfeitamente amorfa. No entanto, provavelmente existe uma zona intermediária, além das duas fases citadas, de modo que uma cadeia polimérica pode passar de uma fase a outra através dessa região intermediária<sup>(48)</sup>.

Há vários métodos de determinação da cristalinidade dos polímeros, tais como: difração de raios-X, densidade, espectro de absorção infravermelho, calor específico, etc<sup>(48)</sup>. Tadokoro e co-autores<sup>(48)</sup>, determinaram o grau de cristalinidade de filmes de PVA submetidos a tratamento térmico em diversas temperaturas

Cambiente, 100, 160 e 193°C). Através de medidas de densidade a 25°C, verificaram que há um aumento de densidade e da cristalinidade com o aumento da temperatura de recozimento. Além disso, observaram que a uma mesma umidade relativa, o conteúdo de água sorvida no filme polimérico diminui com o aumento da temperatura de recozimento, significando que houve um decréscimo do conteúdo amorfo e consequente aumento do conteúdo cristalino. Através do espectro infravermelho, observaram que a banda situada em  $1146 \text{ cm}^{-1}$  tem a sua intensidade aumentada com o recozimento, sendo portanto dependente do grau de cristalinidade<sup>(48)</sup>. Segundo Peppas<sup>(49)</sup>, a banda com máximo em  $916 \text{ cm}^{-1}$  diminui a sua intensidade com o recozimento, pois há uma diminuição da região amorfa.

Quando filmes de PVA são irradiados por feixe eletrônico abaixo da temperatura de transição vítrea  $T_g$ , ocorre degradação dos mesmos; no entanto, acima da  $T_g$  ocorre a formação de ligações cruzadas devido a um aumento da mobilidade das cadeias. Nesse caso, quando aumenta o grau de formação de ligações cruzadas (densidade de ligações cruzadas  $\rho = 6 \times 10^{-4}$ ) a cristalinidade não é favorecida. Em densidades de ligações cruzadas menores, há uma maior cristalização, devido ao comprimento da cadeia e ausência de defeitos, que comumente ocorrem em sistemas, cujas densidades de ligações cruzadas são altas. O grau de cristalinidade depende, portanto, da temperatura e do tempo de recozimento, ou seja, quanto maiores a temperatura e o tempo, mais eficiente será a

cristalização<sup>(50)</sup>. Essa dependência entretanto é fortemente influenciada pela forma com que se dá o resfriamento.

Os filmes de PVA aquecidos à temperaturas próximas à  $T_g$  e resfriados bruscamente têm a estrutura original restaurada uma vez que a frequência e intensidade da banda situada em  $3350\text{ cm}^{-1}$  são similares ao espectro original. Em aquecimentos acima de  $120^\circ\text{C}$ , o processo de restauração da estrutura inicial não é completo. Acima de  $190^\circ\text{C}$ , praticamente, não há restauração sendo esta característica de uma alteração irreversível na estrutura do polímero, que possivelmente está associada a uma desidratação do PVA<sup>(51)</sup>. Tadokoro e co-autores<sup>(48)</sup> já haviam verificado essas alterações químicas resultantes da decomposição do PVA quando esse é aquecido à temperaturas iguais ou maiores a  $180^\circ\text{C}$ <sup>(52)</sup>.

Para ilustrar esse processo aqueceu-se um filme pouco espesso de PVA à temperatura de  $\approx 140^\circ\text{C}$  e deixou-se resfriar lentamente, obtendo-se espectros infravermelho antes e após o aquecimento (Figura 3.48). Claramente se observa uma intensificação relativa da banda em  $1146\text{ cm}^{-1}$ , indicando dessa forma um aumento do conteúdo cristalino.

Procurar-se-á verificar se essa modificação de conteúdo cristalino e, conseqüentemente, se a alteração das características dos sítios de interação se modificam, através do estudo de amostras de PVA contendo fluoresceína..

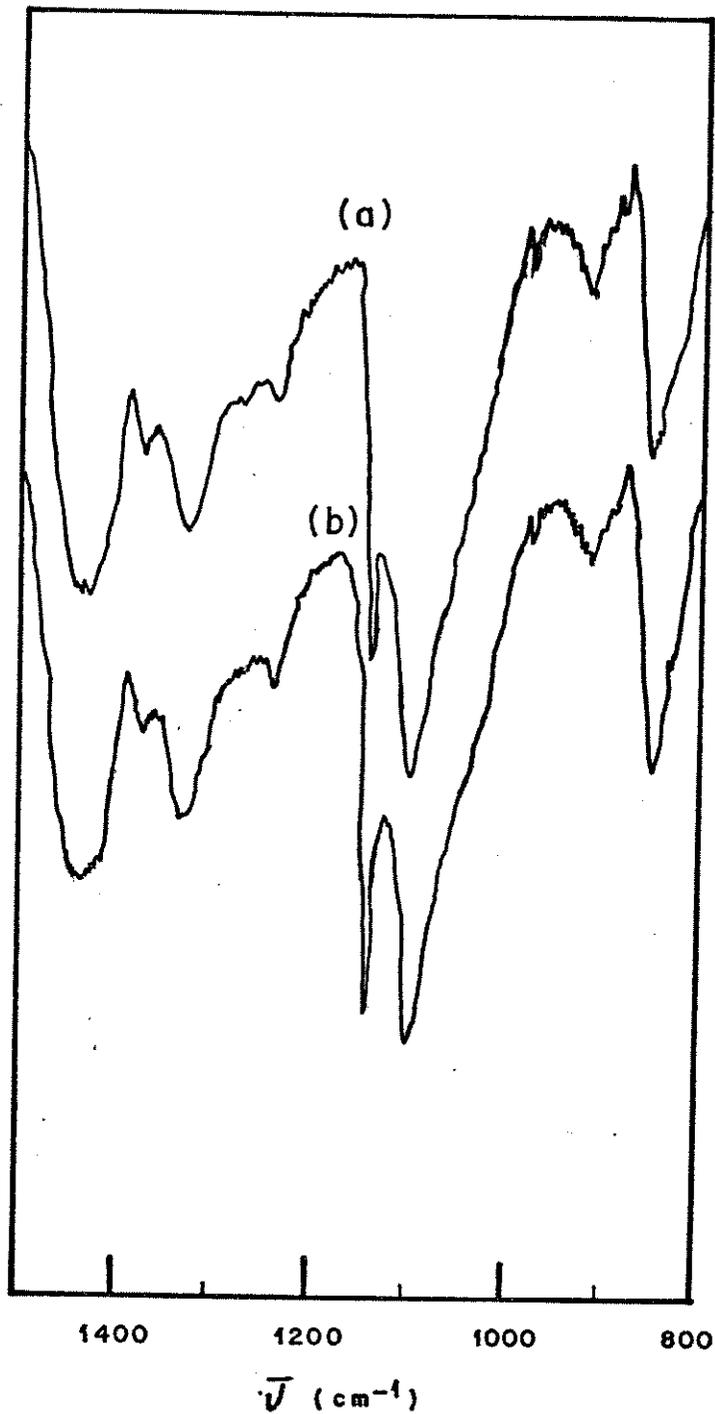


Figura 3.48: Espectros de absorção infravermelho de um filme de PVA puro de espessura  $\approx 0,025$  mm: (a) antes do recozimento a 140°C; (b) após o recozimento a 140°C e resfriamento lento.

### 3.8.2- RESULTADOS OBTIDOS:

#### 3.8.2.1- POLI (ACETATO DE VINILA) (PVAc):

##### (A) AMOSTRA DILUÍDA:

O espectro eletrônico de absorção da fluoresceína dispersa em PVAc na porcentagem em peso de 0,10, apresenta uma banda estreita, cujo máximo se situa em 276 nm (Figura 3.49a). Esta banda de absorção é muito similar àquelas observadas em soluções diluídas do corante em dioxano e acetato de etila; podendo-se supor, portanto, que somente a espécie lactônica (3) está presente no filme polimérico incolor. No espectro eletrônico de emissão (Figura 3.49c), observa-se uma banda com máximo situado em 490 nm. Em relação aos espectros eletrônicos de emissão da fluoresceína em dioxano, acetona e acetato de etila, constata-se um deslocamento espectral para a região do vermelho de 80 nm, quando comparado à banda atribuída à espécie lactônica (3) ( $\lambda_{EM} = 410$  nm) e de  $\approx 15$  nm quando comparado à banda atribuída ao anfoion (4) ( $\lambda_{EM} = 475$  nm) em soluções concentradas de solventes apróticos. Considerando-se que o filme permanece incolor, essa é uma forte indicação de que a lactona está presente no estado eletrônico fundamental, o que é reforçado pelo espectro eletrônico de absorção obtido. Entretanto, o deslocamento espectral de 80 nm na banda espectral não pode ser explicado apenas pela interação polímero-fluoresceína, já que esta magnitude é muito grande.

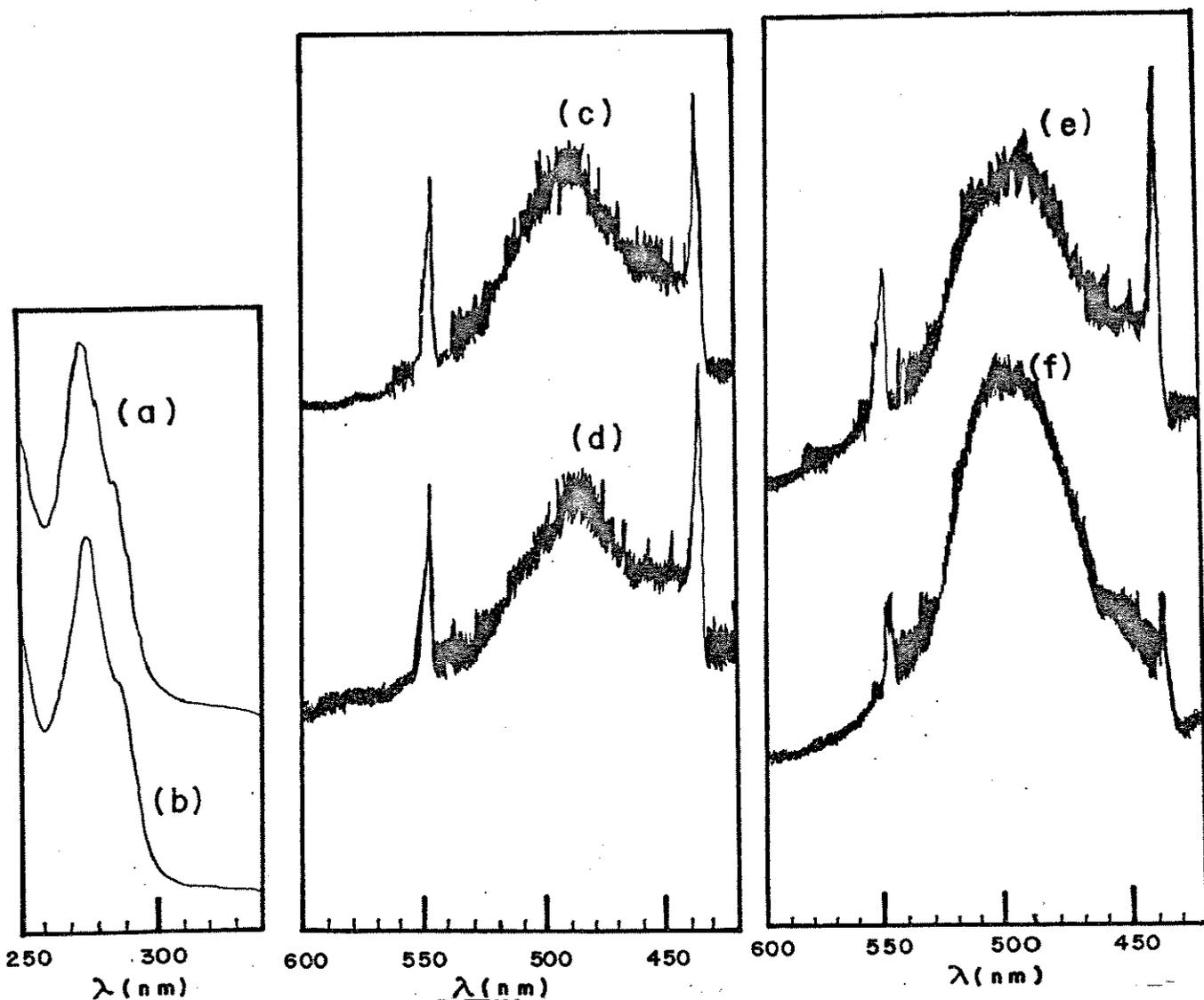


Figura 3.49: Espectros eletrônicos de: Absorção da fluoresceína dispersa em filmes de PVAc: (a) 0,10% (4,00); (b) 0,50% (4,00); Emissão do filme 0,10%: (c) antes ( $1,0 \times 10^{-8}$  A) e (d) após o recozimento a  $50^\circ\text{C}$  ( $1,0 \times 10^{-7}$  A); Emissão do filme 0,50%: (e) antes ( $1,0 \times 10^{-7}$  A) e (f) após o recozimento a  $50^\circ\text{C}$  ( $1,0 \times 10^{-7}$  A). Entre parênteses são apresentados os ganhos dos equipamentos utilizados.

Uma primeira hipótese a ser considerada para explicar o fato de que a banda de emissão aparece tão deslocada para o vermelho no caso da matriz polimérica, é que apesar da forma lactônica estar presente no estado eletrônico fundamental, a espécie responsável pela emissão é o anfo-íon (4) e, nesse caso, o deslocamento espectral tem magnitude suficiente para explicar um efeito de interação molécula-polímero.

Analisando-se os parâmetros de solubilidade  $\delta_h$  para os solventes não-viscosos apróticos (7,0-7,4) e o do PVAc (9,6), observa-se para esse último um valor maior, o que pode indicar o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do anfo-íon (4) no estado excitado, através de interações mais polares.

Kamat e Fox<sup>(53)(54)</sup> observaram que os espectros eletrônicos de absorção e emissão de corantes croconatos (violeta e azul de croconato) em etanol se deslocavam para a região do vermelho quando se acrescentava o polímero poli(4-vinil-piridina) (PVP) às soluções. Este efeito também foi observado para os derivados halogenados da fluoresceína, tais como: eritrosina B e rosa de bengala. A mesma experiência realizada com a piridina não apresentava os deslocamentos espectrais observados para o polímero. Esses autores propuseram que as cadeias poliméricas deslocam as moléculas do solvente da esfera de solvatação do corante, havendo uma diminuição da força de interação soluto-solvente<sup>(55)</sup>.

Analogamente, pode-se supor que as interações no sistema anfo-ion (4) - PVAc são mais fracas, e conseqüentemente o máximo da banda de emissão se encontra deslocado para a região do vermelho em relação àquelas do anfo-ion (4) - solventes apróticos no estado eletrônico excitado; enquanto que no estado eletrônico fundamental, as interações do sistema lactona - soluções diluídas dos solventes apróticos e lactona - PVAc são muito parecidas, uma vez que não há deslocamentos das bandas de absorção.

#### (B) INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE RECOZIMENTO:

Visando observar se a fluoresceína é sensível às interações nos sítios do polímero provocadas pelo processo de recozimento, aqueceu-se o filme anterior a 50°C (acima, portanto, da  $T_g$ ) e permitiu-se um posterior resfriamento lento.

Após esse tratamento, observa-se que não há alterações significativas no espectro eletrônico de emissão (figura 3.49d). Isto indica que a amostra é termicamente estável nesta faixa de temperatura de aquecimento e que a utilização da fluoresceína em baixa concentração como sonda luminescente, não permitiu que se identificasse possíveis alterações no grau de cristalinidade ou na natureza dos sítios de adsorção do corante, provocadas pelo processo de recozimento.

#### (C) AMOSTRA CONCENTRADA:

No estudo de um filme de PVAc contendo fluoresceína 0,50% em peso, observa-se uma banda de absorção estreita e com a mesma estrutura vibrônica do espectro do filme de PVAc 0,10% em peso, com o máximo situado em 277 nm (figura 3.49b). Uma vez que este espectro é muito similar aos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em soluções diluídas de solventes apróticos e no filme de PVAc mais diluído, atribui-se essa absorção à forma lactônica (3). O espectro eletrônico de emissão apresenta duas bandas com alto grau de superposição e intensidades relativas muito próximas, cujos máximos se situam em 490 e 500 nm (figura 3.49e).

Essas bandas de emissão estão deslocadas  $\approx 15$  nm para o vermelho, quando se compara com o espectro eletrônico de emissão da fluoresceína na forma do anfo-íon (4) nos solventes apróticos (dioxano, acetona e acetato de etila), e é bastante semelhante, a menos do desdobramento, à do filme contendo baixa concentração de fluoresceína.

#### (D) INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE RECOZIMENTO:

Ao contrário do que observa-se na amostra diluída, o espectro eletrônico de emissão da amostra concentrada após o aquecimento a 50°C com posterior resfriamento lento, apresenta uma única banda centrada em 495 nm (figura 3.49f). Supõe-se que essa banda possa ser atribuída ao anfo-íon (4) da fluoresceína do mesmo

modo que a emissão observada em soluções concentradas de solventes apróticos, apesar do fato de que o filme permanece incolor.

Quanto ao desdobramento da banda de emissão observado antes do processo de recozimento, há dois fatores a serem discutidos.

O primeiro considera que durante a formação do filme polimérico contendo a fluoresceína, ocorre a formação de sítios de adsorção do corante de naturezas distintas externamente à região cristalina. Um desses sítios consiste na região amorfa do polímero, que não possui uma estrutura definida e poderia ser comparada ao meio isotrópico existente nos solventes líquidos, tais como: acetato de etila, acetona e dioxano, onde existem interações fracas. Os outros sítios poderiam ser descritos como as superfícies laterais dos cristalitos, caracterizando interfases cristalino - amorfo e que em geral se comportam como regiões tensionadas, onde há interações mais fortes. Esse comportamento é similar àquele observado para compostos aromáticos dispersos em polietileno, para os quais se observa que as moléculas menos orientadas estão rodeadas por um meio similar ao nujol, portanto, numa região amorfa, enquanto que as mais orientadas estão sujeitas à interações mais fortes e situadas na superfícies dos cristalitos. Quando ocorre o recozimento, há um aumento do grau de cristalinidade, devido à eliminação das regiões tensionadas, que se cristalizam. Por outro lado, o processo de recozimento, permitindo uma mobilidade das cadeias, provoca uma difusão das

moléculas adsorvidas, levando a uma distribuição mais homogênea na natureza dos sítios de adsorção. Os efeitos de destruição dos sítios de adsorção tensionados e de difusão das moléculas adsorvidas somados, devem levar a interações polímero/corante de mesma natureza com conseqüente obtenção de uma única banda de emissão.

O segundo fato considera que o desdobramento da banda de emissão se deve a uma interação excitônica, decorrente da cristalização ou agregação do corante, devido ao efeito da concentração. No entanto, não é observada a estrutura excitônica no espectro de absorção no ultravioleta, fato que ocorre quando a fluoresceína é dispersa em nujol. Esta hipótese é considerada menos importante, porque após o recozimento do filme, há um aumento do conteúdo cristalino, ocorrendo uma diminuição dos sítios possíveis de adsorção. Isto deveria causar uma intensificação do desdobramento da banda de emissão, devido a uma maior agregação da fluoresceína, porém este efeito não é observado. Esta observação pode ser mais uma indicação de que a forma anfo-ion (4) seja a responsável pela emissão da fluoresceína em PVAc.

Visando complementar as informações sobre a forma da fluoresceína presente no estado eletrônico fundamental, obteve-se o espectro infravermelho de amostras contendo fluoresceína.

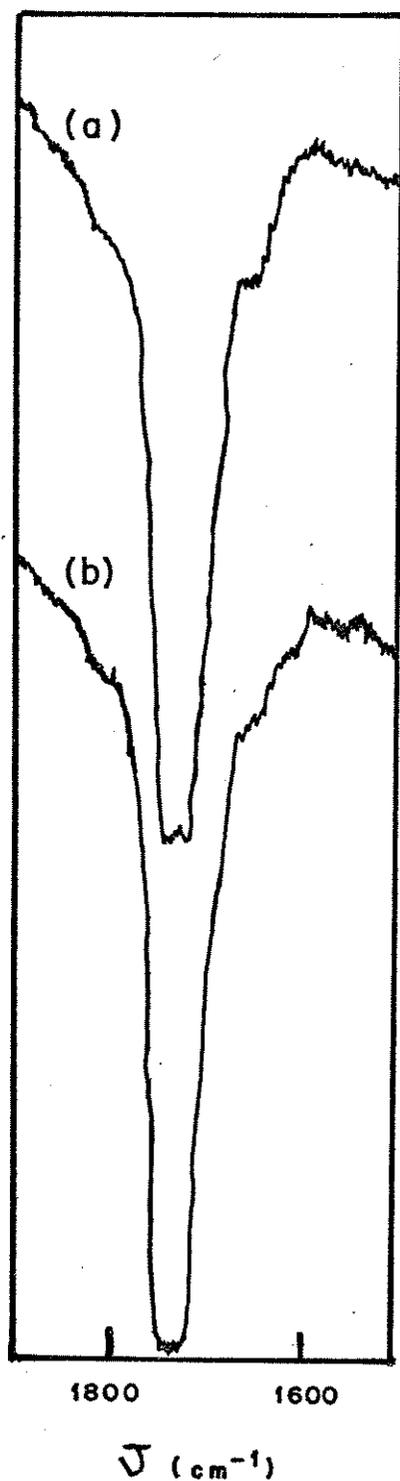


Figura 3.50: Espectros de absorção infravermelho de filmes de PVAc: (a) puro e (b) contendo 0,50% em peso de fluoresceína.

#### (E) ESPECTROS DE ABSORÇÃO INFRAVERMELHO:

O espectro de absorção infravermelho da fluoresceína em PVAc 0,50% em peso, apresenta uma banda intensa em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , resultante da superposição da absorção da carbonila (frequência de estiramento carbono-oxigênio) do grupo acetato e da carbonila da espécie lactônica (3), uma vez que não se observa absorções de grupos carbonila de ácidos carboxílicos livres e ânions carboxilato<sup>(3)</sup> (figura 3.50).

#### (F) CONCLUSÃO:

Comparando-se os espectros eletrônicos de absorção das amostras diluída e concentrada de fluoresceína dispersa em PVAc, com os espectros do corante em solventes apróticos, propõe-se que a espécie lactônica (3) está presente no estado eletrônico fundamental, no polímero apresentando, um máximo de absorção em 276 nm.

O espectro eletrônico de emissão da fluoresceína na amostra diluída do polímero, apresenta uma banda situada em 490 nm. Há um deslocamento espectral de  $\approx 15\text{ nm}$  para a região do vermelho, em relação aos espectros de emissão do corante em soluções concentradas dos solventes apróticos, atribuídos à forma neutra anfo-ion (4). Pode-se concluir que o anfo-ion (4) está presente no polímero no estado eletrônico excitado. Há dois fatores que fundamentam esta conclusão: (1) A componente do parâmetro de solubilidade  $\delta_h$  é maior para o PVAc, quando comparada

àquelas dos solventes apróticos, o que favorece as interações de natureza mais polar; (2) Como ocorre uma diminuição da constante de equilíbrio no estado excitado ( $K_2^*$ ), é facilitado o deslocamento do equilíbrio químico de dissociação no sentido de formação da espécie neutra anfo-íon (4). O deslocamento espectral de  $\approx 15$  nm para a região do vermelho indica que ocorre uma melhor estabilização do anfo-íon (4) na matriz polimérica, em relação ao solvente apróticos, devido às interações mais fracas polímero-corante, quando comparada ao sistema solvente aprótico-corante.

As duas bandas altamente superpostas do espectro de emissão da fluoresceína na amostra concentrada, sugerem a existência de sítios de adsorção diferentes no polímero. Segundo a literatura, basicamente há dois sítios de adsorção; um deles consiste nas superfícies laterais dos cristalitos, havendo interações mais fortes e o outro se situa na região amorfa, sendo as interações mais fracas.

Após o recozimento da amostra diluída, o espectro eletrônico de emissão não apresenta alterações significativas. Uma vez que a sonda fluorescente está dispersa em concentração baixa, não é possível a verificação da variação do grau de cristalinidade, em consequência do processo de recozimento.

O espectro eletrônico de emissão da amostra mais concentrada (0,50% de fluoresceína, em peso), apresenta uma única banda centrada em 495 nm após o processo de recozimento. Pode-se

concluir que há um aumento do grau de cristalinidade, ocorrendo uma eliminação das regiões mais tensionadas e nas quais as interações são mais fortes. A eliminação dos sítios mais tensionados e a mobilidade de segmentos das cadeias poliméricas com a temperatura, causam a difusão das moléculas do corante para sítios de mesma natureza, provavelmente do conteúdo amorfo, podendo-se verificar apenas uma banda de emissão. Supõe-se que as interações soluto-solvente sejam fracas nestes sítios de adsorção, o que resulta na banda de emissão deslocada para o vermelho (490 nm) em relação à observada para solução diluída da fluoresceína em acetato de etila (475 nm).

### 3. 8. 2. 2- POLICALCOOL VINÍLICO (PVA):

#### CA) AMOSTRA DILUÍDA:

Os espectros eletrônicos de absorção das amostras diluídas (0,002% e 0,007%), não permitem a atribuição das bandas do corante, tendo em vista os baixos coeficientes de extinção molar e a espessura dos filmes preparados.

O espectro eletrônico de emissão da fluoresceína dispersa em PVA 0,002% em peso, apresenta uma banda, cujo máximo se situa em 504 nm (figura 3.51a). Pode-se propor, portanto, que estão presentes em equilíbrio as formas quinonóide (2) e monoaniônica (5), cujas emissões e absorções ocorrem no polímero, como mostrado no caso dos solventes práticos, proposição essa que será confirmada através da espectroscopia de absorção infravermelho, a ser discutida a seguir.

O espectro eletrônico de emissão da fluoresceína em PVA 0,007% em peso, apresenta uma banda com máximo em 513 nm (figura 3.51b). Em relação ao espectro anterior, constata-se um deslocamento da banda de emissão de  $\approx 10$  nm para a região do vermelho. Deve-se supor que esta variação do máximo de emissão seja devida ao deslocamento do equilíbrio químico de dissociação no sentido de formação da espécie monoaniônica (5) da fluoresceína, analogamente ao que foi discutido para soluções concentradas do corante em etanol e etileno glicol, ou seja, o aumento da concentração desloca o equilíbrio químico de

dissociação no sentido de formação da espécie monoaniônica (5) nestes solventes não-viscosos.

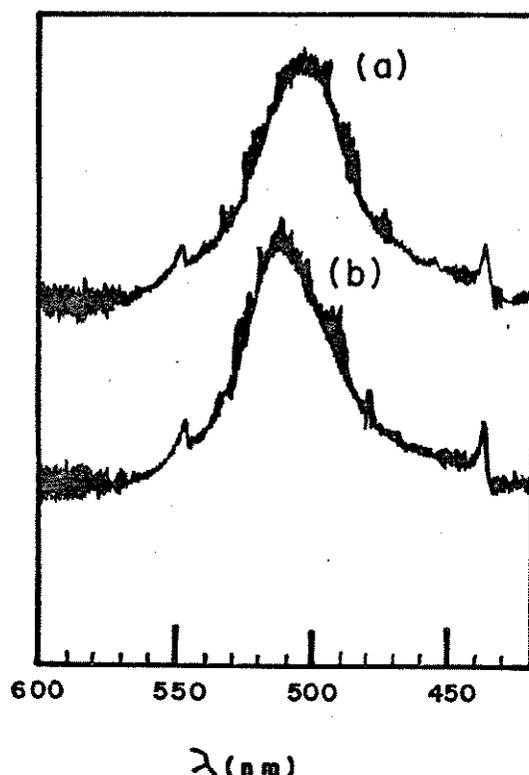


Figura 3.51: Espectros eletrônicos de emissão da fluoresceína dispersa em PVA nas seguintes porcentagens em peso: (a) 0,002% ( $1,0 \times 10^{-7}$  A); (b) 0,007% ( $1,0 \times 10^{-7}$  A). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro.

#### (B) AMOSTRA CONCENTRADA:

O espectro eletrônico de absorção de um filme contendo fluoresceína na porcentagem em peso de 0,07%, obtido por evaporação do solvente em estufa a 50°C, apresenta cinco bandas na região do visível, obtidas por deconvolução de curva nos seguintes

comprimentos de onda: 503,4; 475,9; 451,9; 427,8 e 376,5 nm (figura 3.52). Comparando-se este espectro eletrônico de absorção na região do visível, com os espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em soluções aquosas diluídas a vários pH, verifica-se que essas possuem um contorno muito similar à banda de absorção no pH = 6,37, com o máximo da banda mais intensa situado em 489 nm (figura 3.7c). Nesse pH, há um equilíbrio entre as espécies quinonóide (2), monoaniônica (5) e dianiônica (6), com a concentração do monoânion (5) maior, pois o terceiro pKa (igual a 6,7), não foi atingido. Sugere-se, então, que a espécie monoaniônica (5) também predomina no filme polimérico.

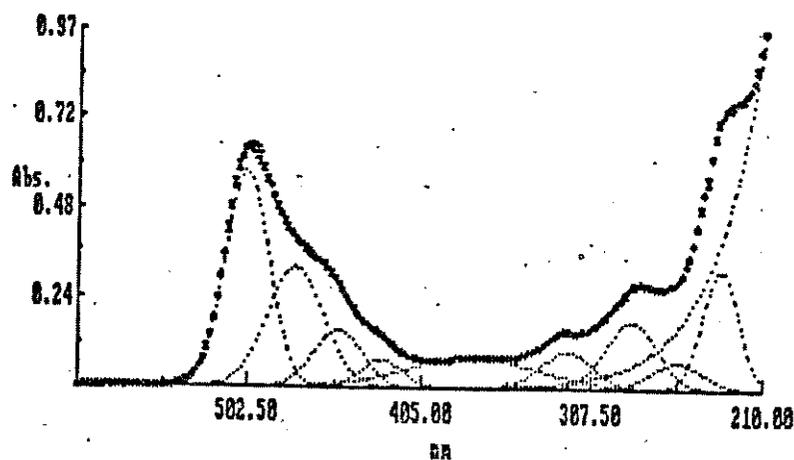


Figura 3.52: Deconvolução do espectro eletrônico de absorção da fluoresceína dispersa em PVA 0,07% em peso.

O espectro eletrônico de emissão da fluoresceína em PVA 0,07% apresenta uma banda assimétrica na região do vermelho com máximo situado em 535 nm (figura 3.53b). No entanto, a banda de emissão da fluoresceína em água, pH = 6,37, apresenta uma meia largura muito menor e máximo em 518 nm (figura 3.13f), diferindo, portanto, tanto no contorno, como no máximo de emissão em relação àquela do corante no polímero. Como resultado preliminar, sugere-se que, apesar de presente no estado eletrônico fundamental, não é o monoânion (5) que está emitindo fluorescência no polímero.

Para se interpretar com mais clareza este resultado, registrou-se os espectros eletrônicos de absorção e emissão da uranina (diânion da fluoresceína na forma do sal de sódio) em PVA nas seguintes concentrações (% em peso): 0,05 e 0,5. Pode-se verificar que os espectros eletrônicos de absorção das amostras: diluída e concentrada apresentam máximos em 495 nm e 503 nm, respectivamente (figuras 3.54a e 3.54b). Comparando-se, ainda, esses espectros com o da fluoresceína em solução aquosa diluída, no pH = 8,23, verifica-se que o máximo de absorção do diânion (6) se situa em 489 nm. Essa diferença de comprimento de onda máximo de emissão poderá ser relacionada ao deslocamento espectral por efeito do solvente.

Os espectros eletrônicos de emissão da uranina em PVA 0,05 e 0,5%, em peso, apresentam os máximos em 520 nm e 525 nm, respectivamente (figura 3.53e e 3.53a). Em relação à banda de

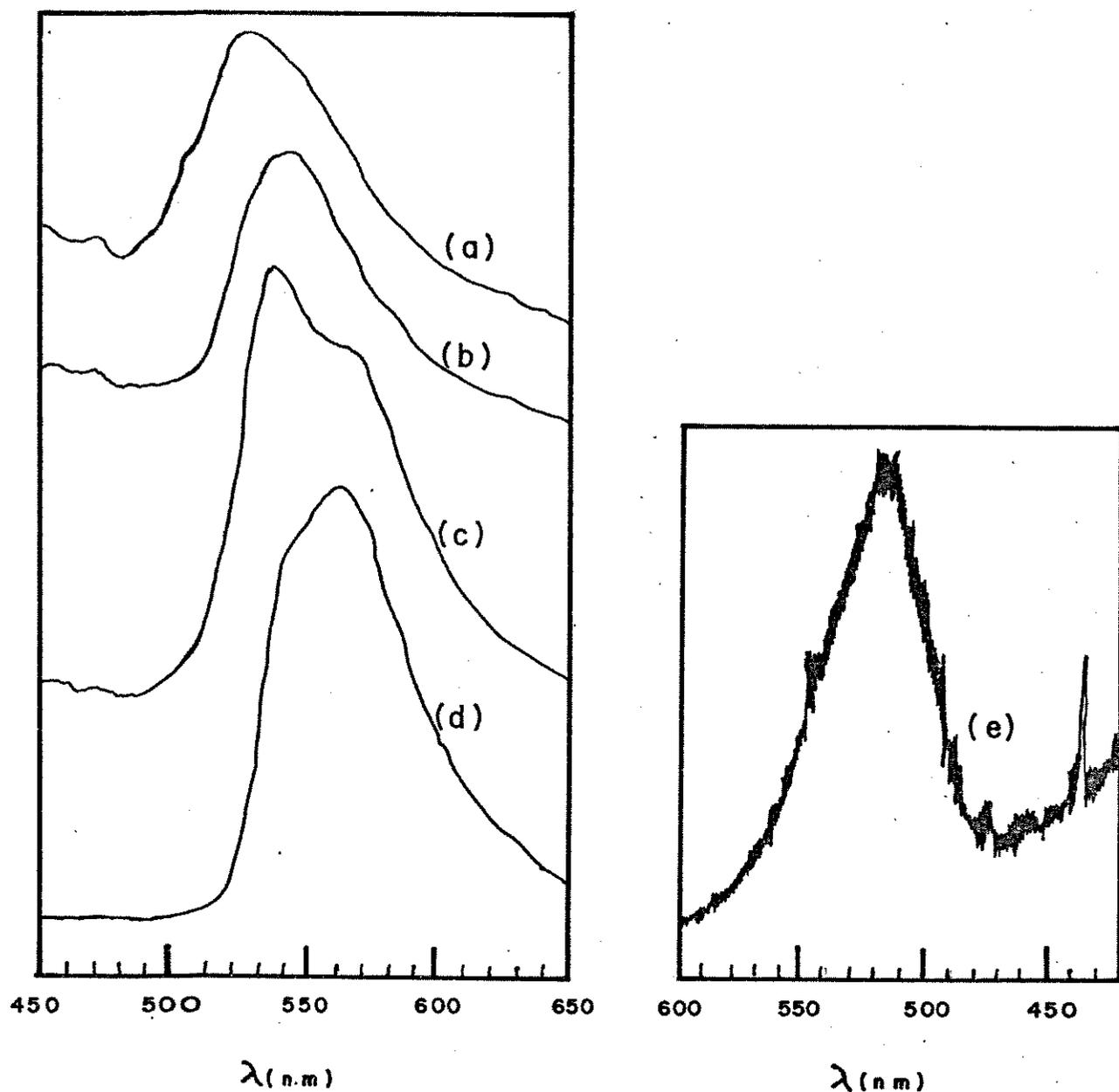


Figura 3.53: Espectros eletrônicos de emissão de: (a) uranina 0,50% (30); (b) fluoresceína 0,07% (10); (c) fluoresceína 0,84% (3); (d) fluoresceína 1,47% (10) e (e) uranina 0,05% em peso ( $1,0 \times 10^{-7}$  A) dispersas em PVA. Entre parênteses são apresentados os ganhos dos equipamentos utilizados.

emissão da fluoresceína em água no pH = 8,23, cujo máximo se situa em 520 nm, não há deslocamento espectral para a amostra diluída, havendo um deslocamento de aproximadamente 5 nm para a região do vermelho para a amostra concentrada.

Comparando-se, finalmente, os seguintes espectros eletrônicos de emissão: fluoresceína em PVA 0,07% e uranina em PVA 0,5% (registrados no mesmo espectrofluorímetro) (figuras 3.53b e 3.53a), verifica-se que possuem contornos de banda parecidos, embora o primeiro esteja deslocado 10 nm para a região do vermelho. Em relação ao espectro eletrônico de emissão do corante em água, pH = 8,23 (figura 3.15d), verifica-se que o deslocamento para a região de menor energia é de 15 nm. Através dessas comparações, pode-se propor que o diânion (6) da fluoresceína está presente no polímero no estado eletrônico excitado e é responsável pela emissão de fluorescência em PVA.

A tabela 3.7 resume as observações discutidas e tem por finalidade a análise do comportamento dos corantes fluoresceína e uranina em soluções líquidas e matrizes poliméricas.

Tabela 3.7: Comprimentos de onda máximos (em nm) das bandas eletrônicas de absorção e emissão.

	FLUORESCÉINA EM H <sub>2</sub> O, pH=8,23	FLUORESCÉINA EM PVA 0,07%	URANINA EM PVA 0,05%	URANINA EM PVA 0,50%
ABSORÇÃO	489	503 (14)	495 (7)	503 (4)
EMISSÃO	520	535 (15)	520 (0)	525 (5)

Entre parênteses são mostrados os deslocamentos espectrais para o vermelho em relação aos espectros de fluoresceína em água  $8,32 \times 10^{-6}$  M e pH = 8,23.

Analisando-se a tabela 3.7, verifica-se que o deslocamento dos espectros eletrônicos de emissão para a região do vermelho é mais acentuado no caso da fluoresceína dispersa em PVA 0,07% em comparação com a uranina em PVA nas duas porcentagens em peso. Isto significa que as interações fluoresceína-PVA são mais fracas do que as interações uranina-PVA e que ambas as interações são mais fracas do que as presentes no sistema água (pH = 8,23)-fluoresceína (ou uranina).

Segundo o que já foi discutido o comportamento fotofísico da fluoresceína em PVA 0,07% é o descrito à seguir: (1) A espécie presente no estado eletrônico fundamental é predominantemente a forma monoaniônica (5); (2) a espécie presente no estado eletrônico excitado é a dianiônica (6). Isto significa que o  $pK_a^*$  do estado excitado é menor do que o  $pK_a$  do estado fundamental, uma vez que o

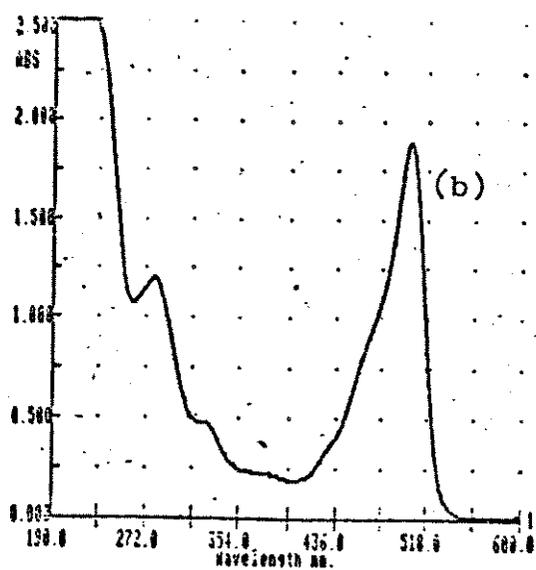
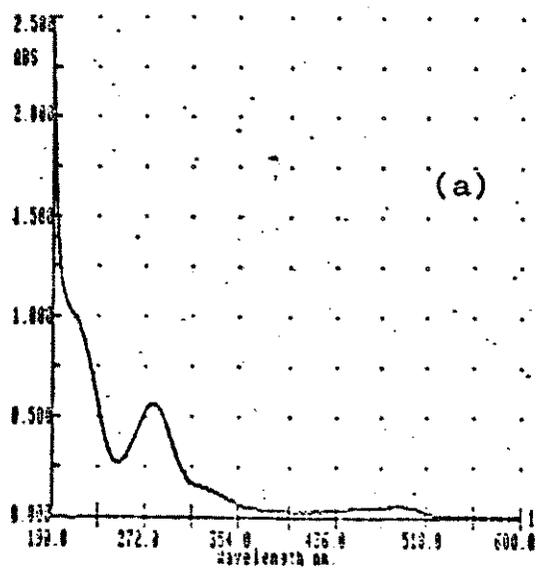
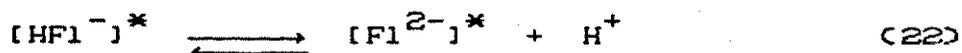


Figura 3.54: Espectros eletrônicos de absorção da uranina em PVA:  
(a) 0,05% e (b) 0,50% em peso.

espectro eletrônico de absorção do corante é similar àquele em solução aquosa diluída no pH = 6,37; havendo uma dissociação do monoânion (5) no estado excitado, representado a seguir.



Pelo menos dois fatores podem favorecer esse equilíbrio de dissociação: (A) aumento do tempo de vida do estado eletrônico excitado singlete do monoânion (5); no entanto, esta possibilidade é pouco provável, uma vez que as cadeias poliméricas teriam que estabilizar o estado excitado o que é muito difícil, pois o tempo de reorientação do polímero é maior do que um solvente não-viscoso; (2) a constante de velocidade de dissociação do monoânion (5) é muito maior do que àquela de recombinação do próton, ou seja, o tempo de recombinação é maior do que o tempo de vida do estado eletrônico excitado singlete do diânion (6), havendo, portanto, emissão de fluorescência dessa última espécie. Martin e co-autor<sup>(2)</sup> observaram que há um abaixamento do terceiro  $\text{pK}_a^*$  no estado excitado, fato que foi atribuído por Guyot e co-autores<sup>(7)</sup> a uma dificuldade de estabelecimento do equilíbrio protolítico durante o tempo de vida do estado excitado. Esse fenômeno não ocorre em soluções aquosas, porque a difusão do próton é muito rápida, facilitando a recombinação.

Se for considerado que há formação de pontes de hidrogênio entre o polímero e o monoânion (5) no estado eletrônico

fundamental, a segunda possibilidade discutida é reforçada, pois os grupos hidroxila abstraem o próton no estado excitado e favorecem a emissão do dianión (6). Portanto, propõe-se que durante a irradiação do filme polimérico, há uma transferência de carga positiva por meio dos grupos hidroxila e emissão simultânea do diânion (6). Esse fenômeno é denominado *fotocondutividade* e está sendo estudado por Kamat e Fox<sup>(55)</sup>, entre outros, para derivados halogenados da fluoresceína como: eritrosina B e rosa de bengala.

O espectro eletrônico de absorção de um filme de PVA contendo fluoresceína 0,64% obtido por evaporação do solvente em estufa a 50°C, apresenta quatro bandas nos seguintes comprimentos de onda aproximados: 495, 464, 434 e 380 nm (figura 3.55b), provavelmente uma quinta banda na faixa de 420 a 400 nm, que poderia ser realmente constatada através da deconvolução das curvas. O espectro eletrônico de emissão apresenta duas bandas sobrepostas com máximos de 535 e  $\approx$  565 nm, sendo a primeira mais intensa (figura 3.53c). Analisando-se simultaneamente os espectros eletrônicos de absorção e emissão e comparando-se com os espectros obtidos para a fluoresceína em PVA 0,07%, verifica-se que há um aumento da meia largura, e intensificação dos ombros existentes nos mesmos. Entretanto, não se verifica deslocamentos espectrais significativos. Sugere-se como hipótese preliminar, que haja uma agregação do corante nesse filme. Porém, analisando-se o espectro eletrônico de excitação

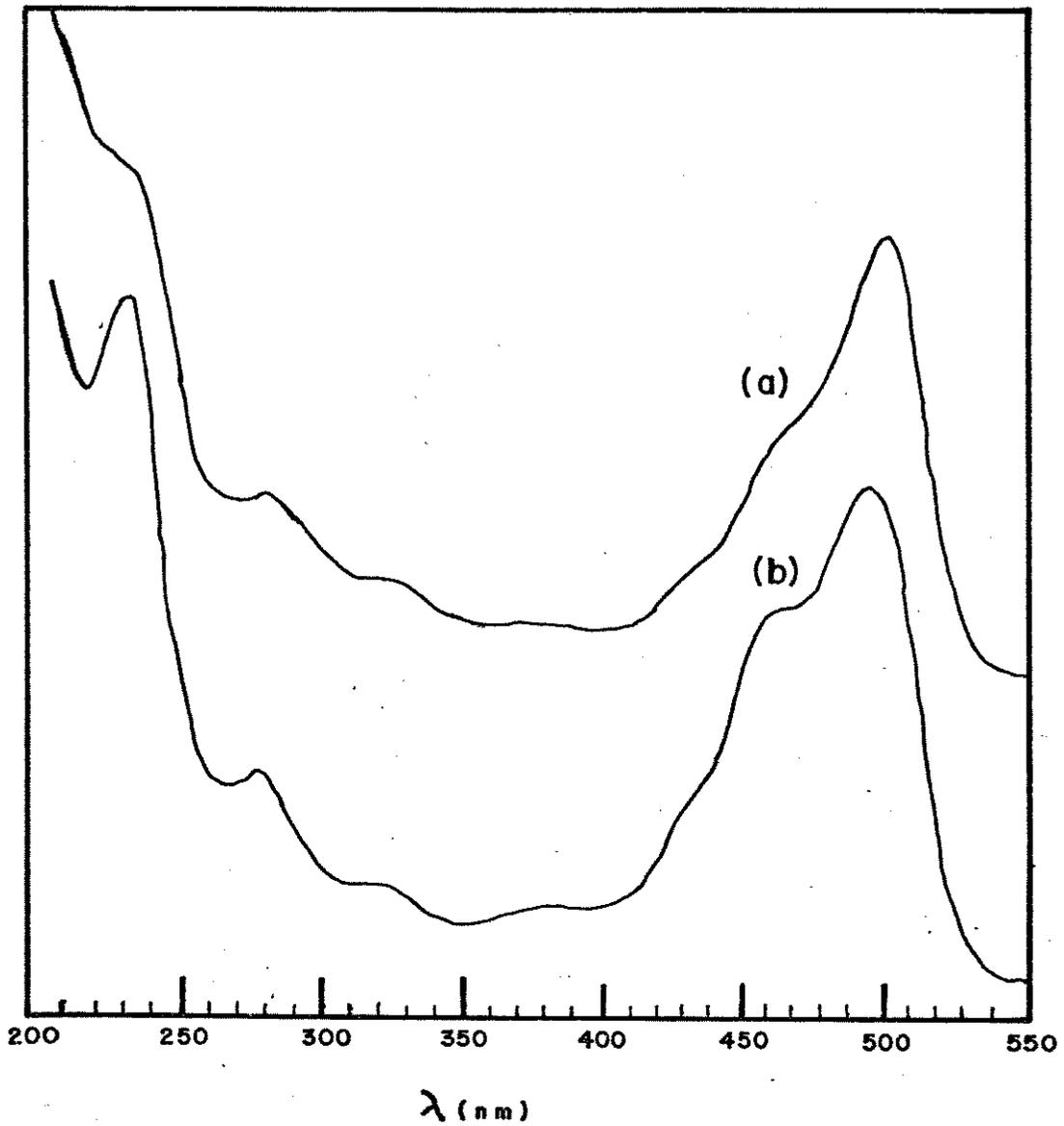


Figura 3.55: Espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína nas seguintes porcentagens em peso: (a) 0,07% (1,00) e (b) 0,54% (1,00). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofotômetro utilizado.

registrado no comprimento de onda máximo de emissão, isto é, 535 nm, não se verifica o desdobramento excitônico da banda, como observado em soluções aquosas saturadas. Propõe-se que o corante apresenta o mesmo comportamento observado nos solventes não-viscosos, etanol e etileno glicol, ou seja, o agregado tem uma estrutura linear. Como a espécie presente no polímero, provavelmente, é o monoânion (5) da fluoresceína, supõe-se que não é possível a estabilização das cargas negativas nos monômeros dispostos em planos paralelos na matriz polimérica de PVA, e conseqüentemente, só poderá ocorrer a agregação segundo um modelo linear.

Há duas hipóteses que devem ser discutidas na tentativa de se explicar a agregação da fluoresceína em PVA na concentração de 0,64% em peso. A primeira das duas considera que os sítios de adsorção na fase amorfa e nas superfícies laterais dos cristalitos não são suficientes para dispersar o corante na sua forma monomérica, havendo saturação dos mesmos, e, conseqüente agregação da fluoresceína. A segunda hipótese se baseia no modelo sugerido por Kamat<sup>(55)</sup> de encapsulamento do corante em microcavidades do polímero.

Segundo Kamat<sup>(55)</sup>, o aumento da concentração de poli (vinil piridina) (PVP) em uma solução etanólica de eosina e rosa de bengala faz com que haja um deslocamento para a região do vermelho das bandas de absorção e emissão, assim como um aumento tanto do tempo de vida dos estados eletrônicos excitados singlete,

quanto do rendimento quântico de emissão de fluorescência. O modelo propõe que as cadeias poliméricas, com o aumento da concentração, vão substituindo o solvente nas esferas de solvatação do corante até a situação limite, na qual o corante está totalmente solvatado pelo polímero. Este forma microcavidades que diminuem efetivamente as forças de interação soluto-solvente<sup>(55)</sup>. Analisando-se o procedimento de obtenção do filme polimérico com fluoresceína em 0,64% em peso, dispunha-se de uma solução do corante e PVA em água, que foi evaporada a 50°C em estufa até a formação do filme. Supõe-se que a rápida evaporação da água não possibilitou o estabelecimento de um equilíbrio, no qual o polímero iria solvatando o corante gradativamente até a formação das microcavidades, quando do aumento da concentração da solução. Por outro lado, como foi mostrado no item 3.2, a saturação de soluções aquosas leva à agregação da fluoresceína. Como nas soluções concentradas dos solventes práticos etanol e etileno glicol, ocorre a formação de agregados lineares, devido a problemas de estabilização da carga negativa; pode-se inferir a presença desse tipo de agregado na matriz polimérica de PVA. Para a confirmação dessas hipóteses discutidas, é necessária a obtenção de filmes poliméricos contendo fluoresceína em várias concentrações que possibilitarão um estudo mais profundo do comportamento do corante nessas matrizes. Esta é uma das perspectivas futuras desse trabalho.

O espectro eletrônico de emissão da fluoresceína dispersa

em PVA 1,47% em peso, apresenta duas bandas com alto grau de sobreposição e máximos situados em  $\approx 545$  e  $\approx 562$  nm, sendo que a última é mais intensa (figura 3.53d). Comparando-se esse espectro com o anterior (figura 3.53c), verifica-se que estão na mesma faixa de comprimento de onda, porém diferem no contorno e na meia largura da banda. Como a emissão ocorre na mesma região, propõe-se que haja formação de agregados no polímero.

Pode-se supor que a cristalização do corante tenha ocorrido em sítios de adsorção diferentes, resultando em duas bandas sobrepostas, como no caso do filme de PVAc contendo fluoresceína 0,5% em peso. Uma outra possibilidade a ser considerada é que a fluoresceína tenha modificado morfologicamente o polímero, devido à sua alta concentração. O estudo destas possíveis alterações morfológicas será objeto de novas propostas de trabalho.

Visando obter informações complementares, que permitam caracterizar as formas da fluoresceína no estado eletrônico fundamental, obteve-se os espectros infravermelho das amostras diluídas.

#### (C) ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO INFRAVERMELHO (IV) DA FLUORESCEÍNA EM PVA - CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES PRESENTES EM PVA:

Apesar do espectro IV da fluoresceína se sobrepor ao do PVA, a região entre  $1800 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  apresenta absorções de estiramento da carbonila (ligação C=O) presentes apenas no

corante.

O filme de PVA contendo uranina na porcentagem em peso de 0,05% apresenta, em  $1740\text{ cm}^{-1}$ , uma única banda muito intensa, atribuída aos estiramentos carbono-oxigênio da forma dianiônica (6) da fluoresceína (figura 3.56a). Esta forma da fluoresceína apresenta três grupos que poderiam ser responsáveis por estas absorções. O primeiro deles é o grupo carboxilato e segundo Markuszewski<sup>(3)</sup>, apresenta bandas de absorção em  $1596\text{ cm}^{-1}$  e  $1461-1450\text{ cm}^{-1}$ . No caso da fluoresceína, essas bandas se encontram sobrepostas a outras bandas de absorção de grupos aromáticos e que no caso específico da fluoresceína em PVA, apresenta outras agravantes de sobreposição com as absorções do polímero e, conseqüentemente, não puderam ser identificadas. O segundo grupo é composto por um anel de seis membros contendo oxigênio. Quando este grupo apresenta uma carga positiva, como nos sais de *pyrilium* e como no caso do anfo-ion (4) da fluoresceína, ocorre o aparecimento de uma banda intensa em  $1536\text{ cm}^{-1}$ . Essa banda não pode ser identificada, quer pela sua ausência, uma vez que o dianiôn (6) da fluoresceína não apresenta este anel carregado positivamente, quer pela sobreposição com as absorções do polímero. O terceiro grupo é composto pelos estiramentos C=O do anel xantênico e atribui-se a banda em  $1740\text{ cm}^{-1}$  a esta absorção.

Diferentemente do caso acima, o filme de PVA contendo fluoresceína 0,002% em peso, apresenta duas absorções na região dos estiramentos C-O e as intensidades relativas destas bandas são

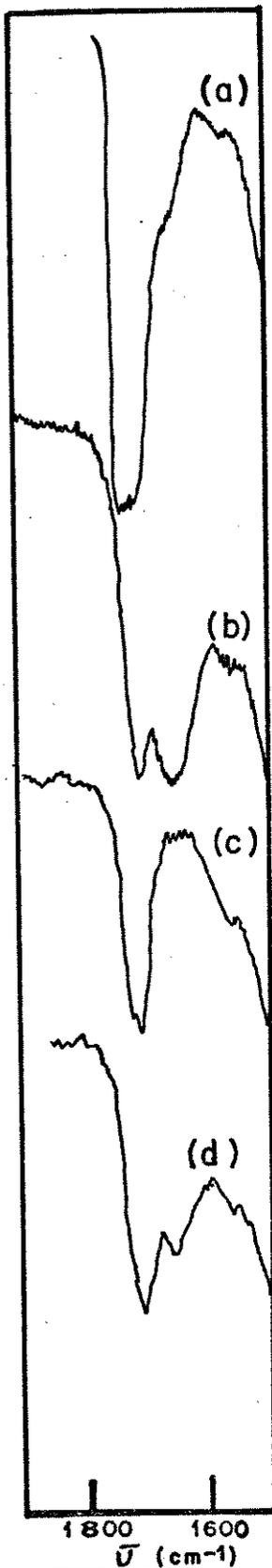


Figura 3.58: Espectros de absorção infravermelho de filmes de PVA contendo:

(a) uranina 0,05%;

(b) fluoresceína 0,002% a 30°C;

(c) fluoresceína 0,002% aquecida a 140°C (temp. de finalização do espectro:  $\approx 70^\circ\text{C}$ );

(d) fluoresceína 0,002% resfriada lentamente a  $\approx 30^\circ\text{C}$ ;

diferentes antes e após o recozimento do filme (figura 3.56b a 3.56d). A primeira banda aparece na região de 1700-1730  $\text{cm}^{-1}$ , e é composta por um dublete, com máximos em 1740 e 1710  $\text{cm}^{-1}$ . A segunda banda é observada em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , muito larga, tendo sua intensidade relativa diminuída após o recozimento. A banda em 1710  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao grupo ácido carboxílico livre e deve ser devida à absorção da estrutura *p*-quinonóide (2). Bandas nesta região são características do grupo ácido benzóico e foram observadas para a fluoresceína (1706  $\text{cm}^{-1}$ ) e rodamina B (1715-1705  $\text{cm}^{-1}$ ). Compostos do tipo quinonóide apresentam absorção devida à carbonila na região de 1685-1626  $\text{cm}^{-1}$ . Segundo Markuszewski<sup>(3)</sup>, este tipo de absorção deve se deslocar para a região de menor frequência em 1600-1590  $\text{cm}^{-1}$ , devido a alta conjugação do grupo quinona. No entanto, a banda em 1650  $\text{cm}^{-1}$  é observada no caso da fluoresceína, no filme de PVA e conduz a um questionamento do nível de conjugação eletrônica na estrutura *p*-quinonóide (2). Finalmente, a banda em 1740  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao grupo xantênico da forma monoaniônica (5), propondo-se um equilíbrio entre as duas espécies: quinonóide (2) e monoânion (5). Alguns comentários sobre esta última atribuição devem ser feitos:

(A) Uma análise das estruturas propostas para o monoânion (5) e para a forma *p*-quinonóide sugerem que a natureza do grupo xantênico seja a mesma e, conseqüentemente, que o espectro eletrônico de absorção na região do visível seja o mesmo para as

duas formas, dado que o anel benzênico dissustituído se encontra num plano perpendicular ao do anel xantênico, não participa da conjugação eletrônica e, portanto, interfere pouco nas transições eletetrônicas do cromóforo;

(B) Os espectros eletrônicos de absorção obtidos neste trabalho indicam que, apesar de não haver deslocamentos de energia para as diversas bandas observadas, ocorre uma modificação das intensidades relativas das bandas de fluoresceína em soluções de etanol e etileno glicol. Este resultado sugere que, enquanto nos solventes líquidos em soluções diluídas, o equilíbrio químico de dissociação se encontra deslocado na direção da espécie neutra, em PVA este se encontra mais deslocado no sentido de formação da espécie monoaniônica (5);

(C) O espectro eletrônico de emissão consiste de uma banda em 504 nm, e que pode ser atribuída à espécie monoaniônica (5), tendo em vista as observações em soluções de etanol e etileno glicol;

(D) O espectro IV indica a presença das duas espécies: monoânion (5) e quinonóide em equilíbrio.

#### (D) RECOZIMENTO DOS FILMES:

Um resultado experimental muito importante está relacionado ao recozimento do filme e seu efeito sobre o deslocamento do equilíbrio de dissociação das espécies: neutra quinonóide (2) e monoânion (5).

Quando um filme de PVA puro, obtido pelo processo de

evaporação do solvente, é aquecido a temperaturas abaixo de 180°C, temperatura de decomposição do polímero, ocorre um aumento significativo do seu grau de cristalinidade. Isto resulta, fundamentalmente, da remoção das regiões tensionadas nas interfaces cristalino/amorfo.

Quando o filme de PVA contendo fluoresceína é submetido ao mesmo tipo de processo, no caso do filme 0,002% em peso, o que se observa no espectro infravermelho é uma modificação nas intensidades relativas das bandas atribuídas às espécies: *p*-quinonóide (2) e monoânion (5), com um aumento na intensidade dessa última. Considerando-se os seguintes fatores:

(1) Concentração da fluoresceína dispersa é muito pequena para provocar uma alteração morfológica significativa no polímero durante a formação do filme;

(2) Adsorção do corante ocorre nas interfaces ou superfícies laterais dos cristalitos e na região amorfa;

(3) As forças de interação polímero/corante em cada um destes tipos de sítios são diferentes;

(4) Concentração do corante na forma quinonóide (2) diminui com a eliminação das interfaces tensionadas pelo processo de recozimento; propõe-se que:

(A) o recozimento diminui o conteúdo amorfo do PVA e, conseqüentemente, leva a um aumento da concentração do corante na fase amorfa. Em decorrência desse fato, observa-se um deslocamento do equilíbrio no sentido da formação da forma monoaniônica (5) da

fluoresceína. Esse comportamento é análogo ao observado para as soluções do corante em solventes práticos (etanol e etileno glicol) para os quais não se verifica agregação da fluoresceína, pelo menos não na geometria que resulte no desdobramento excitônico, e sim em um deslocamento do equilíbrio químico de dissociação;

(B) considerando-se que em um filme de PVA puro, o processo de recozimento pode dobrar o grau de cristalinidade em relação ao filme original<sup>(50)</sup>, o aumento máximo da concentração de fluoresceína na região amorfa que poder-se-ia obter nesse processo seria o dobro da concentração inicial, isto é,  $\approx 0,004\%$  em peso. Essa concentração é, sem dúvida, muito menor do que aquela necessária para a cristalização ou agregação, como mostrado anteriormente;

(C) considerando-se, ainda, que o recozimento remove as regiões interfaciais tensionadas e que, concomitantemente, observa-se uma redução na concentração da forma *p*-quinonóide (2), não se pode descartar a possibilidade de que essa espécie seja, preferencialmente, adsorvida nos sítios localizados na região interfacial ou nas superfícies dos cristalitos e que a forma monoaniônica (5) seja estabilizada na fase amorfa do polímero, preferencialmente. Esta hipótese precisa, ainda, de um estudo mais sistemático.

Admitindo-se que as pontes de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares das macromoléculas do polímero sejam mais

fracas na região amorfa em relação ao interior dos cristais e que tenham valores intermediários nas interfaces, pode-se propor que o monoânion (5) da fluoresceína é melhor estabilizado quando puder ocorrer uma interação polímero-corante forte, havendo, portanto, um processo competitivo em relação às interações específicas polímero-polímero. Desse modo, para as regiões onde as interações polímero-polímero sejam fortes (como nas interfaces) somente poderão ser estabilizadas as formas menos polares da fluoresceína, no caso da forma *p*-quinonóide (2).

Após o resfriamento da amostra, verifica-se que o equilíbrio de dissociação no sentido da formação da espécie quinonóide (2), cuja concentração relativa é menor do que a forma monoaniônica (5) não se estabelece rapidamente. Isto sugere que uma vez formada a espécie monoaniônica (5), isto é, uma vez ocorrendo a separação de cargas resultante da dissociação da forma quinonóide (2), haverá necessidade de uma difusão das espécies iônicas para a recuperação do equilíbrio. Dado que esta matriz é rígida, a velocidade de difusão das espécies é muito lenta e implica em um controle cinético por um mecanismo difusional até o restabelecimento do estado de equilíbrio. Essa não é, entretanto, a única possibilidade de mecanismo. Trabalhos recentes têm mostrado evidências de que a abstração de hidrogênio de álcoois por radicais alquila ocorre a temperaturas baixas e, portanto, em sistemas rígidos, através de um mecanismo de tunelamento<sup>(56)</sup> Considerando-se o PVA e as formas da fluoresceína

em equilíbrio de dissociação, como sendo um sistema onde ocorre transferência de prótons, o mecanismo de migração de cargas por tunelamento através da cadeia de PVA não pode ser descartado. Desta possibilidade resulta que essa transferência pode ser muito rápida, levando a um restabelecimento do equilíbrio de dissociação; quando ocorre uma ação externa. Observou-se, experimentalmente, que a forma monoaniônica (5) da fluoresceína pode ser caracterizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, pois pode ser isolada por períodos suficientemente longos e maiores do que tempo necessário para as medidas. Esta foi a primeira vez que essa forma da fluoresceína foi caracterizada independentemente.

Para explicar o fato de que a velocidade de restabelecimento do equilíbrio de dissociação da fluoresceína em PVA é lento, torna-se necessário que se considere o comportamento da matriz de PVA, no que diz respeito à sua cinética de recristalização após cessar a etapa de aquecimento, retomando-se a hipótese de que as interações entre o monoânion (5) e o polímero diferem das interações entre este e a forma p-quinonóide (2). Como a forma p-quinonóide é a única presente por um longo período de tempo, mesmo após o sistema atingir a temperatura ambiente, propõe-se que a cinética de recristalização do PVA controla o restabelecimento do equilíbrio químico de dissociação do corante. Apesar desses estudos serem preliminares e necessitarem de um acompanhamento por outros métodos, a fluoresceína parece ser um

sistema extremamente útil no acompanhamento da cinética de recristalização de polímeros.

Os espectros eletrônicos de absorção e emissão da fluoresceína dispersa em PVA, 0,07% em peso, foram obtidos antes e após o processo de recozimento da amostra (figuras 3.57 e 3.58). Baseando-se no que foi discutido no item 3.8.2.2B, supõe-se que a espécie monoaniônica (5) está presente no estado eletrônico fundamental e a dianiônica (6) no estado eletrônico excitado. De acordo com os resultados obtidos através da espectroscopia infravermelho, o monoânion (5) se dispersa em sítios de adsorção da fase amorfa, onde as interações polímero-polímero são mais fracas, favorecendo interações polímero-corante mais fortes e que estabilizam a espécie monoaniônica (5) por formação de pontes de hidrogênio. O processo de recozimento pode alterar o grau de cristalinidade no sentido de diminuir o conteúdo amorfo. Se este ainda é suficiente para dispersar o monoânion (5) na sua forma monomérica, não se espera, portanto, uma modificação nos espectros UV/visível de absorção e emissão, no recozimento, o que realmente não ocorre.

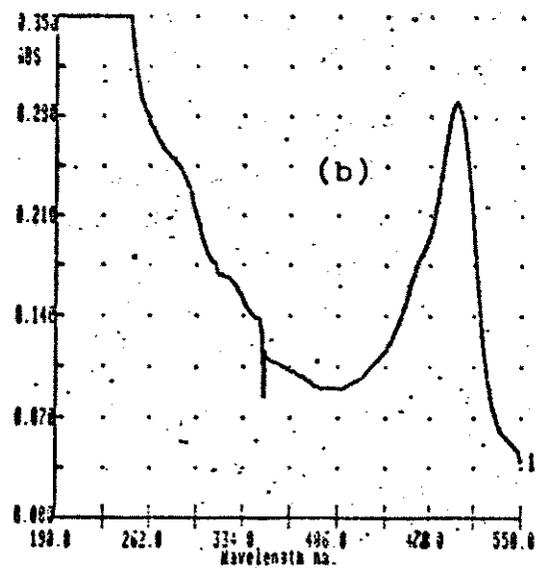
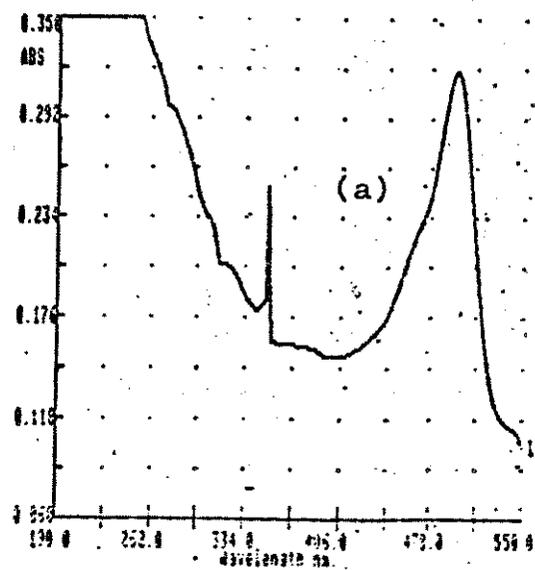


Figura 3.57: Espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína dispersa em PVA 0,07% em peso: (a) antes e (b) após o recozimento a 140°C.

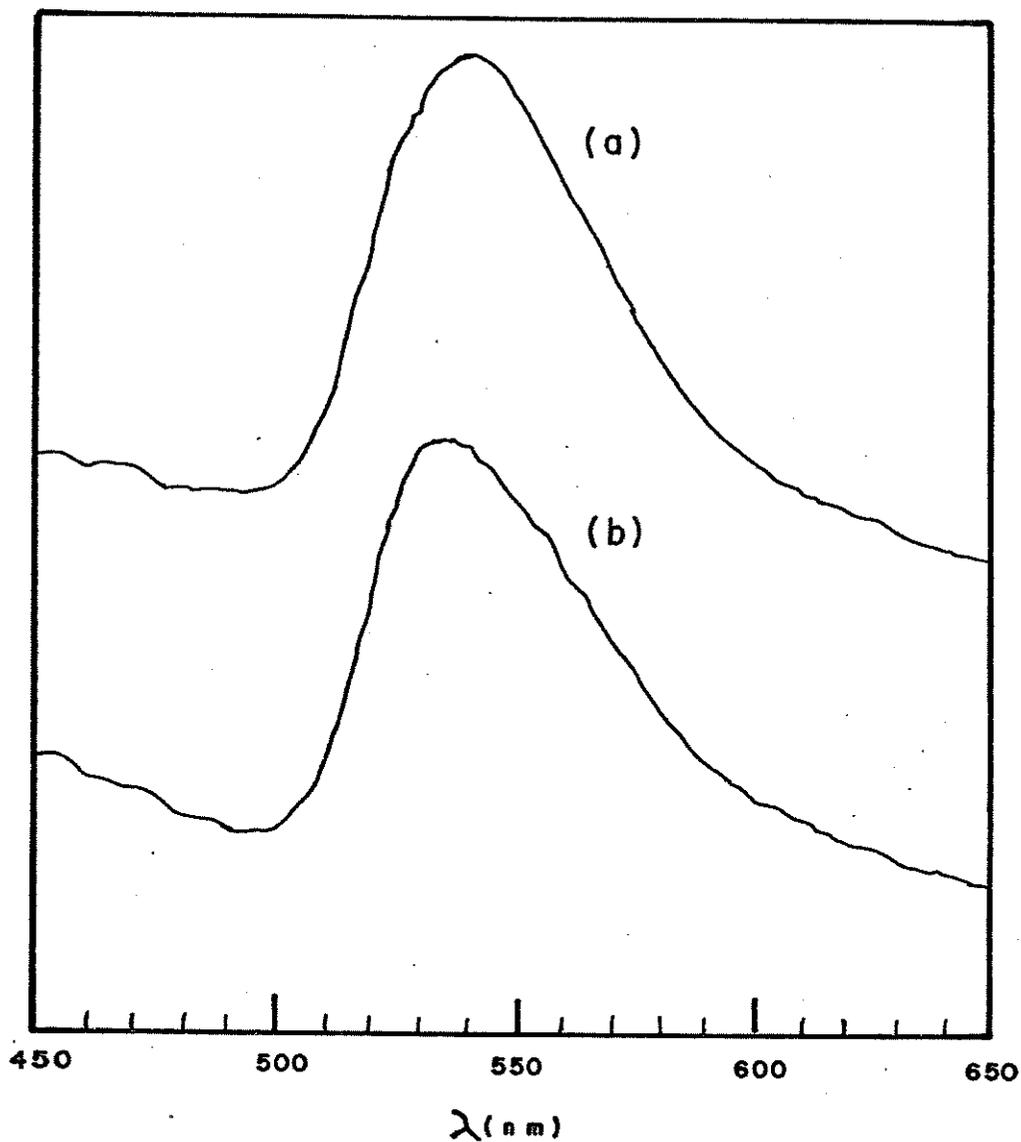


Figura 3.58: Espectros eletrônicos de emissão da fluoresceína dispersa em PVA 0,07% em peso: (a) antes (10) e (b) após recozimento a 140°C (3). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

### (E) CONCLUSÃO:

Os estudos preliminares realizados até o momento, indicam que nos filmes de PVA contendo baixas porcentagens em peso de fluoresceína (0,002 e 0,007%), os sítios de adsorção situados nas interfases dos cristalitos são ocupados, preferencialmente, pela forma quinonóide (2) e aqueles situados na fase amorfa são ocupados pela forma monoaniônica (5). Há um equilíbrio entre estas duas formas no estado eletrônico fundamental e excitado.

O recozimento do filme polimérico mais diluído (0,002%) aumenta o grau de cristalinidade, uma vez que ocorre uma eliminação das regiões tensionadas das interfases e conseqüente diminuição do conteúdo amorfo. Isto causa um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do monoânion (5). Este comportamento também foi proposto no caso dos solventes práticos não-viscosos. Este resultado é, portanto, coerente, uma vez que a redução do conteúdo amorfo implica em um aumento da concentração local do corante.

A fluoresceína dispersa no filme de PVA 0,07% está presente nas formas monoaniônica (5) e dianiônica (6) nos estados eletrônicos fundamental e excitado, respectivamente. Ocorre uma dissociação do monoânion (5) no estado excitado, formando o diânion (6) que emite fluorescência. Como as interações polímero-corante são fortes através da formação de pontes de hidrogênio, os grupos hidroxila abstraem o próton e o transferem através das cadeias poliméricas, originando um processo denominado

*fotocondutividade.*

Em filmes de PVA contendo fluoresceína mais concentrada (0,64 e 1,47%) ocorre a formação de agregados, cujos monômeros são dispostos linearmente.

Os deslocamentos espectrais para a região do vermelho observados nos espectros eletrônicos de absorção e emissão em relação àqueles observados em solventes práticos são uma indicação das forças de interação polímero-corante, mais fracas, devido à formação de pontes de hidrogênio entre as macromoléculas.

As interações que ocorrem em um filme polimérico contendo um corante são, basicamente, de três tipos: polímero-polímero, polímero-corante e corante-corante. Segundo a literatura, as forças de interação polímero-polímero são mais fortes na fase cristalina e mais fracas na fase amorfa, sendo intermediárias na interfase cristalina-amorfa. Uma vez que não há dispersão do corante na fase cristalina, supõe-se que na interfase cristalina-amorfa as interações polímero-corante devem ser mais fracas, devendo ser melhor estabilizada a forma neutra quinonóide (2) da fluoresceína. Na fase amorfa na qual as interações polímero-polímero são mais fracas, há uma maior interação polímero-corante, feita através da formação de pontes de hidrogênio. Propõe-se que nesta fase a espécie monoaniônica (5) da fluoresceína está dispersa. O terceiro tipo de interação, corante-corante, deve ser predominante quando há uma saturação dos sítios de adsorção, que pode ser causado tanto por um aumento da

concentração do corante, como por um processo de recozimento, pois há uma redução do número de sítios de adsorção, devido à eliminação das regiões tensionadas das superfícies laterais dos cristalitos.

Dado que o recozimento também altera a quantidade relativa das formas de dissociação da fluoresceína, esta molécula pode ser útil no acompanhamento da cinética de recristalização de polímeros.

Na verdade, estas conclusões são preliminares, sendo necessário um estudo sistemático do comportamento fotofísico do corante disperso no polímero em diferentes porcentagens em peso e processos de obtenção do filme polimérico. As técnicas de espectroscopia eletrônica de absorção ultravioleta, visível e infravermelho, excitação e emissão são complementares e muito importantes neste estudo. No entanto, é necessária a utilização de outras técnicas como difração de raio-X e reflectância difusa total, que fornecem informações mais específicas a respeito da morfologia e cristalinidade do polímero.

A fim de se estudar o efeito do solvente no comportamento fotofísico da fluoresceína nos solventes práticos, etanol e etileno glicol, e na matriz polimérica de PVA; propõe-se relacionar os deslocamentos espectrais observados nos diversos solventes aos parâmetros de solubilidade dos solventes puros (tabela 3.6). Através da tabela 3.7 pode-se constatar, que no filme 0,002% em peso de fluoresceína, há deslocamentos espectrais

dos máximos da bandas de emissão de  $\approx 11$  nm e  $\approx 18$  nm para a região do azul, em relação ao etanol e etileno glicol, respectivamente. Se esses deslocamentos espectrais forem comparados aos parâmetros de solubilidade totais ( $\delta_t$ ), ou mesmo com as componentes  $\delta_h$ , verifica-se que o PVA apresenta os menores valores, quando comparados com os outros solventes práticos, o que sugere uma menor magnitude de interações entre as moléculas ou macromoléculas do solvente, e conseqüentemente uma maior magnitude de interações polímero-corante.

Não se pode, porém, comparar os deslocamentos espectrais das amostras mais concentradas de PVA com as soluções mais concentradas em etanol e etileno glicol, pois ocorre a formação de agregados nos filmes poliméricos, enquanto que nos solventes práticos as formas monoméricas da fluoresceína estão em equilíbrio nas soluções.

Tabela 3.7: Comprimentos de onda máximos das bandas eletrônicas de absorção e emissão da fluoresceína nos solventes práticos e na matriz polimérica de PVA.

SOLVENTES	CONCENTRAÇÃO	FORMAS DA FLUOR.	$\lambda_{\text{ABS}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{EM}}/\text{nm}$
etanol	$7,9 \times 10^{-5}$ M	L/Q/M*	480/451	515
etanol	$9,8 \times 10^{-4}$ M	Q/M/D*	484/456	518/551
etileno glicol	$5,0 \times 10^{-5}$ M	L/Q/M*	482/455	522
etileno glicol	$5,0 \times 10^{-4}$ M	Q/M/D*	481/455	523/545
PVA	0,002 %	Q/M	-	504
PVA	0,007 %	Q/M	-	513
PVA	0,07 %	Q/M/D*	503/476	535/565
PVA	0,64 %	agregados	495/464	535/565
PVA	1,47 %	agregados	-	545/562

As formas da fluoresceína são representadas por: L = lactônica; Q = quinonóide; M = monoânion; D = diânion. O asterisco significa que, provavelmente, a forma indicada está presente em equilíbrio.

### 3.9- CONCLUSÕES:

As diferentes formas da fluoresceína têm estruturas moleculares muito similares, conseqüentemente, não é possível a identificação isolada de cada forma iônica do corante por espectroscopia eletrônica de absorção e emissão em solventes não-viscosos, exceto nos solventes apróticos estudados.

São apresentados, a seguir, as principais conclusões decorrentes do estudo da fluoresceína nos diferentes solventes líquidos não-viscosos.

Nas soluções aquosas diluídas, a fluoresceína tem o seguinte comportamento, no estado eletrônico fundamental: (a) em meios fortemente ácidos e básicos predominam em solução, respectivamente, o cátion e o diânion; (b) em pH intermediários, todas as formas da molécula neutra e o monoânion podem estar presentes em solução, dependendo do pH, devendo-se enfatizar a presença da forma neutra lactônica na faixa de pH de  $\approx 2,50$  a 5,00. No estado eletrônico excitado, todas as espécies podem estar presentes em solução, com exceção das formas neutras lactônica e anfo-íon.

A espectroscopia eletrônica de excitação é muito útil, no sentido de se identificar a estrutura dos agregados em soluções aquosas saturadas através do desdobramento excitônico das bandas eletrônicas de excitação. A agregação ocorre segundo uma estrutura do tipo sanduíche, sendo que o número de monômeros depende da

concentração do corante. Com exceção das formas neutras lactônica e quinonóide, todas as outras formas se agregam. As moléculas da água têm uma função importante no processo de agregação, pois se intercalam na estrutura sanduíche e estabilizam as unidades monoméricas, uma vez que apresentam um gradiente de carga. Os agregados são estáveis nos estados eletrônicos fundamental e excitado.

Em soluções diluídas de solventes apróticos, a forma neutra lactônica é identificada isoladamente por espectroscopia eletrônica de absorção, excitação e emissão. Como esta espécie não favorece a formação de agregados, há um deslocamento do equilíbrio químico de dissociação no sentido de formação da forma neutra anfo-ion, quando do aumento da concentração do corante. Neste caso, o anfo-ion é estável tanto no estado eletrônico fundamental, como no estado eletrônico excitado.

O equilíbrio químico de dissociação se desloca no sentido de formação da molécula neutra lactônica em soluções diluídas de solventes próticos. No entanto, no estado eletrônico excitado, ocorre um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da espécie quinonóide e, provavelmente, o monoânion da fluoresceína. Em soluções concentradas, como no caso dos solventes apróticos, ocorre um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação das espécies quinonóide, monoânion e, provavelmente, o diânion da fluoresceína.

Um estudo preliminar do comportamento da fluoresceína

dispersa em nujol mostrou, através da espectroscopia eletrônica de absorção, um desdobramento excitônico, indicando que a cela unitária é composta por duas moléculas na forma lactônica da fluoresceína.

Com base no estudo do comportamento fotofísico da fluoresceína em solventes próticos e apróticos, pode-se identificar as formas do corante dispersas nas matrizes poliméricas e os diferentes sítios de adsorção. Os resultados obtidos podem ser resumidos a seguir.

Em filmes diluídos e concentrados de PVAc, a fluoresceína se dispersa na forma neutra lactônica, no estado eletrônico fundamental. No estado eletrônico excitado, há uma transformação da forma lactônica no anfo-íon, sendo que a emissão de fluorescência é atribuída a esta espécie.

Antes do processo de recozimento, o espectro eletrônico de emissão da fluoresceína dispersa no filme concentrado de PVAc, apresenta duas bandas com alto grau de sobreposição e após o recozimento apenas uma banda é observada, apresentando um aumento da meia largura. Uma vez que o processo de recozimento aumenta o grau de cristalinidade e elimina as regiões tensionadas situadas nas superfícies dos cristalitos, pode-se concluir que ocorre uma difusão das moléculas do corante para sítios de mesma natureza, provavelmente do conteúdo amorfo.

Nos filmes de PVA contendo baixas porcentagens em peso de fluoresceína, os sítios de adsorção situados nas interfases

cristalino-amorfo são ocupados, preferencialmente, pela forma neutra quinonóide e aqueles situados na fase amorfa são ocupados pela forma monoaniônica. Há um equilíbrio entre estas duas formas nos estados eletrônicos fundamental e excitado.

Em filmes de PVA contendo porcentagens em peso intermediárias de fluoresceína, as formas monoaniônica e dianiônica estão presentes nos estados eletrônicos fundamental e excitado, respectivamente. Nos filmes concentrados de PVA contendo fluoresceína, ocorre a agregação do corante, segundo o modelo de disposição linear das moléculas.

O recozimento do filme polimérico de PVA mais diluído causa uma diminuição do conteúdo amorfo, devido à eliminação das regiões tensionadas situadas nas interfases cristalino-amorfo. A redução do conteúdo amorfo, implica em um aumento na concentração local do corante e, conseqüentemente, há um deslocamento do equilíbrio químico de dissociação no sentido de formação da forma monoaniônica, como foi observado para o caso dos solventes próticos. Essa forma pode ser isolada na matriz por períodos suficientemente longos e maiores do que o tempo necessário para as medidas; esta foi a primeira vez que essa forma foi caracterizada independentemente.

Como o equilíbrio químico de dissociação entre as formas quinonóide e monoaniônica só é restabelecido em um longo período de tempo, após o sistema ter atingido o equilíbrio térmico, propõe-se que é a cinética de recristalização do PVA que controla

o restabelecimento do equilíbrio químico de dissociação da fluoresceína.

Finalmente, deve-se ressaltar a importância dos seguintes itens:

(A) Utilização da técnica de espectroscopia eletrônica de excitação para se estudar os tipos de agregados formados;

(B) Utilização da fluoresceína, devido à grande variedade de formas de dissociação, para se estudar a natureza dos diferentes sítios de adsorção poliméricos, assim como a cinética de recristalização dos polímeros.

### 3.10- PERSPECTIVAS FUTURAS DO TRABALHO:

A seguir, serão indicadas algumas possibilidades de continuação desse trabalho.

(A) Medidas de rendimento quântico de fluorescência e fosforescência, e tempo de vida da fluoresceína nos sistemas estudados a temperaturas baixas e ambiente;

(B) Estudo do comportamento fotofísico da fluoresceína em solventes próticos e apróticos a baixa temperatura;

(C) Estudo do comportamento fotofísico do corante em matrizes poliméricas, dependente das relaxações do polímero;

(D) Aplicação da técnica de dicroísmo linear aos sistemas estudados neste trabalho, tanto à temperatura ambiente, como à baixa temperatura;

(E) Aplicação de outras técnicas como: difração de raios-X, reflectância total difusa, microscopia eletrônica a fim de se determinar a estrutura de cristais e agregados da fluoresceína;

(F) Estudo mais detalhado da fluoresceína dispersa em matrizes poliméricas através das técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho, com objetivo de se determinar: (a) natureza dos diferentes sítios de adsorção (forças de interação polímero-polímero e polímero-corante); (b) cinética de recristalização dos polímeros, no processo de recozimento.

### 3.11- REFERÊNCIAS - RESULTADOS E DISCUSSÃO

- (1) Zanker, V. e Peter, W., "Die Prototropen Formen des Fluoresceins", *Chem. Ber.* 91, 572 (1958).
- (2) Martin, M. M. e Lindqvist, L., "The pH Dependence of Fluorescein Fluorescence", *J. Lum.* 10, 381 (1975).
- (3) Markuszewski, R. e Diehl, H., "The Infrared Spectra and Structures of the Three Solid Forms of Fluorescein and Related Compounds", *Talanta* 27, 937 (1980).
- (4) Diehl, H. e Markuszewski, R., "Studies on Fluorescein. II -The Solubility and Acid Dissociation Constants of Fluorescein in Water Solution", *Talanta* 32, 159 (1985).
- (5) "Programa para Deconvolução de Espectros" adaptado pelo Prof. Pedro Muniz Vazquez (IQ-UNICAMP, 1987), a partir da referência: Pitha, J. e Jones, R. N., "Computer Programs for Infrared Spectrophotometry", *NRCC Bull (Ottawa)*, número 12 (1968).
- (6) Leonhardt, H., Gordon, L. e Livingston, R., "Acid-Base Equilibria of Fluorescein and 2',7'-Dichlorofluorescein in Their Ground and Fluorescent States", *J. Phys. Chem.* 75, 245 (1971).
- (7) Guyot, G., Arnaud, R. e Lemaire, J., "Émission des Différents Formes de la Fluorescéine en Solution Aqueuse", *J. Chim. Phys.* 72, 647 (1975).
- (8) Pant, D. D., Bhagchandami, C. L., Pant, K. C. e Verma, S. P., "Exciton Bands and Aggregate Emission in Xanthene Dyes:

- Fluorescein, Eosin and Erytrosin", *Indian J. Pure and Applied. Phys.* 9,824 (1971).
- (9) Rohatgi, K. K., "Absorption Spectra of the Dimers of Ionic Dyes", *J. Mol. Spectry.* 27,545 (1968).
- (10) Kasha, M., Rawls, H. R. e El-Bayomi, M. A., "The Exciton Model in Molecular Spectroscopy", *Pure Appl. Chem.* 75, 371 (1965).
- (11) Arbeloa, L., "Dimeric and Trimeric States of the Fluorescein Dianion. Part 1- Molecular Structure", *J. Chem., Faraday Trans II* 77,1725 (1981).
- (12) Rohatgi, K. K. e Mukhopadhyay, A. K., "Hypochromism and Exciton Interaction in Halofluorescein Dyes", *J. Phys. Chem.* 76,3970 (1972).
- (13) Arbeloa, L. e Ojeda, P. R., "Dimeric States of Rhodamine B", *Chem. Phys. Lett.* 87,556 (1982).
- (14) Pandya, M. L. Machwe, M. K., "Polarization of Fluorescence Spectrum of Fluorescein", *Indian J. Pure Applied Phys.* 14,398 (1976)
- (15) Joshi, N. B., Gangola, P. e Pant, D. D., "Internal Heavy Atom Effect on the Radiative and Non-radiative Rate Constants", *J. Lum.* 21,111 (1979).
- (16) Arbeloa, I. L., "Dimeric and Trimeric States of the Fluorescence Dianion. Part 2-Effects on Fluorescence Characteristics", *J. Chem. Soc. Faraday II.* 77,1735 (1981).
- (17) Gal, M. E., Kelly, G. R. e Kurucsev, T., "Derivation and

Interpretation of the Spectra of Aggregates. Part 2-  
Effects on Fluorescence Characteristics", *J. Chem. Soc.  
Faraday II* 69, 395 (1973).

- (18) Chen, S.-C., Nakamura, H. e Tamura, Z., "Supplemental Studies  
on Relationship between Structure and Spectrum of  
Fluorescein", *Chem. Pharm. Bull.* 27, 475 (1979).
- (19) Klein, U. K. A., Hafner, F. W., "A New Dual Fluorescence with  
Rhodamine B Lactone", *Chem. Phys. Lett.* 43, 141 (1976).
- (20) Barltrop, T. A. e Coyle, J. D. "Excited States in Organic  
Chemistry", John Wiley & Sons, 1a edição London (1975).
- (21) Cilento, G., "Generation and Transfer of Triplet Energy in  
Enzymatic Systems", *Acc. Chem. Res.* 13, 225 (1980).
- (22) Duran, N., "Long-Range Triplet-Singlet Energy Transfer from  
Enzyme Generated Triplet Acetone to Xanthene Dyes", *Photochem.  
Photobiol.* 32, 113 (1980).
- (23) Höfert, M., "Studies on Triplet-Singlet Energy Transfer in the  
System Benzophenone-Xanthene Dye", *Ber. Bunsenges Phys. Chem.*  
72, 306 (1968).
- (24) Chesneau, E. e Neckers, D. C., "Electron Transfer Sensitized  
Photobleaching of Rose Bengal Induced by Triplet  
Benzophenones", *J. Photochem. Photobiol., A. Chem.* 42, 269  
(1988).
- (25) Arbeloa, F. L., Ojeda, P.R. e Arbeloa, I. L., "On the  
Aggregation of Rhodamine B in Ethanol", *Chem. Phys. Lett.*  
148, 253 (1988).

- (26) Ferguson, J., Mau, A. W.-H., "Spontaneous and Stimulated Emission from Dyes Spectroscopy of the Neutral Molecules of Acridine Orange, Proflavine, and Rhodamine B", *Aust. J. Chem.* 26,1617 (1973).
- (27) Ferguson, J. e Mau, A. W.-H., "Absorption Studies of Acid-Base Equilibria of Dye Solutions", *Chem. Phys. Lett.* 17,543 (1972).
- (28) Faraggi, M., Peretz, P., Rosenthal, I. e Weiraub, D., "Solution Properties of Dye Lasers. Rhodamine B in Alcohols", *Chem. Phys. Lett.* 103,310 (1984).
- (29) Ojeda, P. R., Amashta, I. A. K., Ochoa, J. R. e Arbeloa, I. L., "Excitonic Treatment and Bonding of Aggregates of Rhodamine 6G in Ethanol", *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II* 84,1 (1988).
- (30) Martin, E., Pardo, A., Guijarro, M. S. e Alonso-Fernandez, J. I., "Photophysics Properties of Fluorescein in Alcoholic Medium for Different pH", *J. Mol. Struct.* 142,197 (1986).
- (31) Mchedlov-Petrosyan, N. O., "Ionization Constants of Fluorescein", *J. Anal. Chem. USSR* 34,812 (1972).
- (32) Baeyer, A., *Ann.* 202,36 (1880) citado na referência Neckers, D. C., "The Indian Happiness Wart in the Development of Photodynamic Action", *J. Chem. Educ.* 64,649 (1987).
- (33) Arbeloa, I. L. e Rohatgi-Mukherjee, K. K., "Solvent Effect on Photophysics of the Molecular Forms of Rhodamine B. Solvation Models and Spectroscopic Parameters", *Chem. Phys.*

*Lett.* 128,474 (1986).

- (34) Sah, R. E. e Baur, G., "Influence of the Solvent Matrix on the Overlapping of the Absorption and Emission Bands of Fluorescent Dyes", *Appl. Phys.* 23,369 (1980).
- (35) Weast, R. C., "CRC Handbook of Chemistry and Physics", 58a edição, CRC Press (1977-1978).
- (36) Konwerska-Hrabowska, J. e Kryszewski, M., "Molecular Indicators of the State of Crystallite Orientation of Partly Crystalline Polymers", *Bull. Acad. Pol. Sci.* XXI,673 (1973).
- (37) Konwerska-Hrabowska, J. e Eggers, J. H., "Effects of Vapour Phase Application of Compounds to Stretched Polyethylene Films", *Spectrosc. Lett.* 10,441 (1977).
- (38) Jang, Y.-T., "Behavior of Organic Solute in Oriented Polyethylene", *Diss. Abst. Int. B* 45,1795 (1984).
- (39) Jang, Y. T., Philipps, P. J. e Thulstrup, E. W., "Some Comments on the Mechanism of Orientation of Organic Solutes in Stretched Polyethylene", *Chem. Phys. Lett.* 93,66 (1986).
- (40) Thulstrup, E. W. e Michl, J., "Orientation and Linear Dichroism of Symmetrical Aromatic Molecules Imbedded in Stretched Polyethylene", *J. Am. Chem. Soc.* 104,5594 (1982).
- (41) Thulstrup, E. W., "Stretched Polyethylene as Solvent for Optical Spectroscopy", *Acta Phys. Pol.* A71,839 (1987).
- (42) Michl, J. e Thulstrup, E. W., "Ultraviolet and Infrared Linear Dichroism: Polarized Light as a Probe of Molecular and Electronic Structure", *Acc. Chem. Res.* 20,192 (1987).

- (43) Matsuoka, Y., "Film Dichroism. 4-Linear Dichroism Study of Orientation Behavior of Planar Molecules in Stretched Poly (Vinyl Alcohol) Film", *J. Phys. Chem.* 84,1361 (1980).
- (44) Konwerska-Hrabowska, J., "Physical Interpretation of the Orientation Phenomenon of the Small Molecules in a Polymeric Matrix (Model of Polarizability)", *J. Appl. Spec.* 39, 434 (1985).
- (45) Al-Hassan, K. A. e El-Bayomi, M. A., "Large Edge-Excitation Red Shift for a Merocyanine Dye in Poly (Vinyl Alcohol)", *J. Polym. Sci: Part B: Polym. Phys.* 25,495 (1987).
- (46) Seymour, R. B. e Carraher, C. E. Jr., "Polymer Chemistry - An Introduction", Marcel Dekker, Inc, New York, 2a edição (1988).
- (47) Barton, A. F. M., "CRC Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters", 3a edição, CRC Press, Florida (1985).
- (48) Tadokoro, H., Seki, S. e Nitta, I., "The Crystallinity of Solid High Polymers. I- The Crystallinity of Poly (Vinyl Alcohol) Film", *Bull. Chem. Soc. Jpan.* 28, 559 (1955).
- (49) Peppas, N. A., "Infrared Spectroscopy of Semicrystalline Poly (Vinyl Alcohol) Networks", *Makromol. Chem.* 178,595 (1977).
- (50) Peppas, N. A. e Merril, E. W., "Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels: Reinforcement of Radiation - Crosslinked Networks by Crystalization", *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Educ.* 14, 441 (1976).

- (51) Toirov, A., Saidov, D., Marupov, R. e Khabibullaev, Kh., "Vibrational Spectra of Poly (Vinyl Alcohol) under Conditions of the Simultaneous Action of Temperature and UV Radiation", *Zh. Prikl. Spekt.* 34,277 (1981).
- (52) Brandrup, J., e Immergent, E. H., "Polymer Handbook", John Wiley & Sons, London, 2a edição (1975).
- (53) Kamat, P. V. e Fox, M. A. "Enhanced Fluorescence Emission of Croconate Violet in Ethanol Containing Poly (4-Vinyl Pyridine)", *Chem. Phys. Lett.* 92,595 (1982).
- (54) Kamat, P. V. e Fox, M. A., "Triplet State Properties of Croconate Dyes in Homogeneous and Polymer - Containing Solutions", *J. Photochem.* 24,285 (1984).
- (55) Kamat, P. V. e Fox, M. A., "Photophysics and Photochemistry of Xanthene Dyes in Polymer Solutions and Films", *J. Phys. Chem.* 88,2297 (1984).
- (56) Vyazovkin, V. L., Bol'Shakov, B. V. e Tolkatchev, V. A., "H-Atom Abstraction from Alcohols by Alkyl Radicals Studies on the Limiting Stage", *Chem. Phys.* 95,93 (1985).

### 3.12 - APÊNDICE 1:

São mostrados, a seguir, as deconvoluções dos espectros eletrônicos de absorção e os espectros eletrônicos de emissão da fluoresceína em soluções aquosas diluídas, que por apresentarem contornos e intensidades muito similares àqueles discutidos no capítulo 3, não foram incluídos no mesmo.

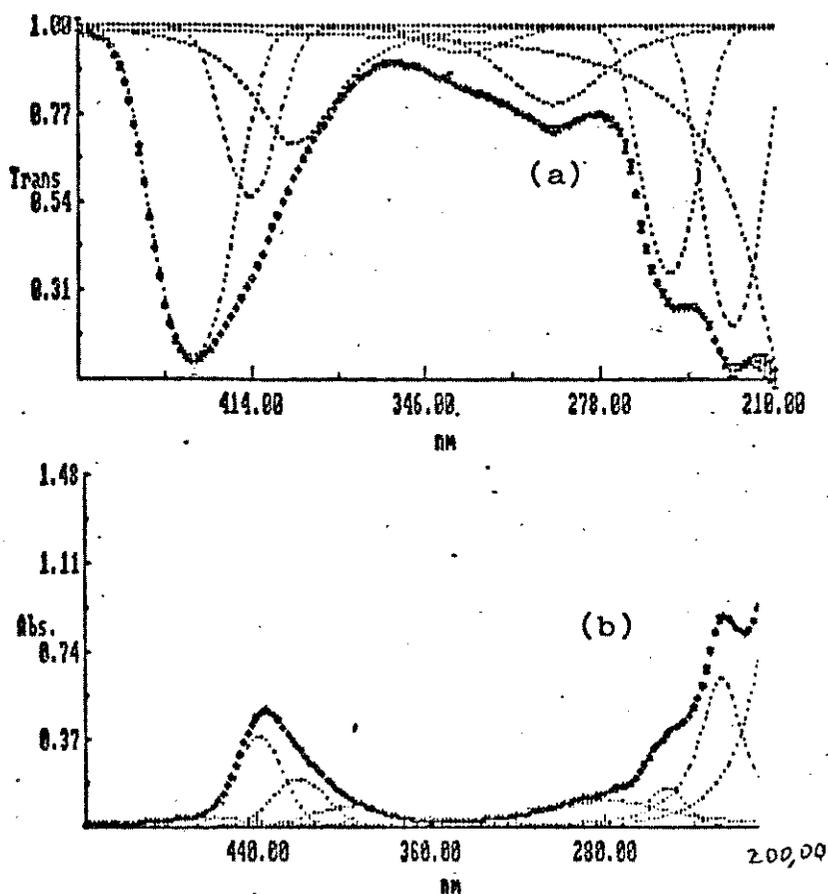


Figura A.1: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 0,12 (3); (b) 2,19 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

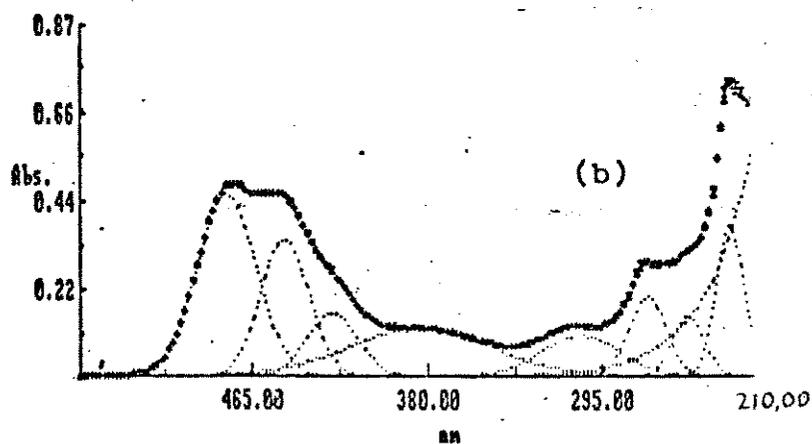
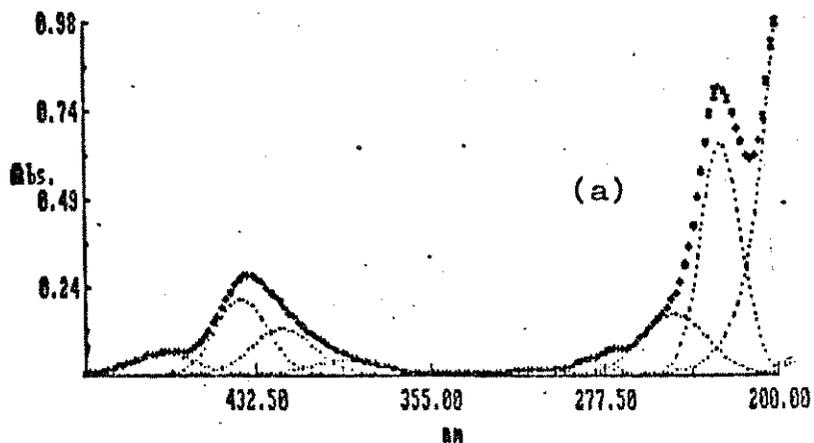


Figura A.2: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 2,92 (2); (b) 5,41 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorvância.

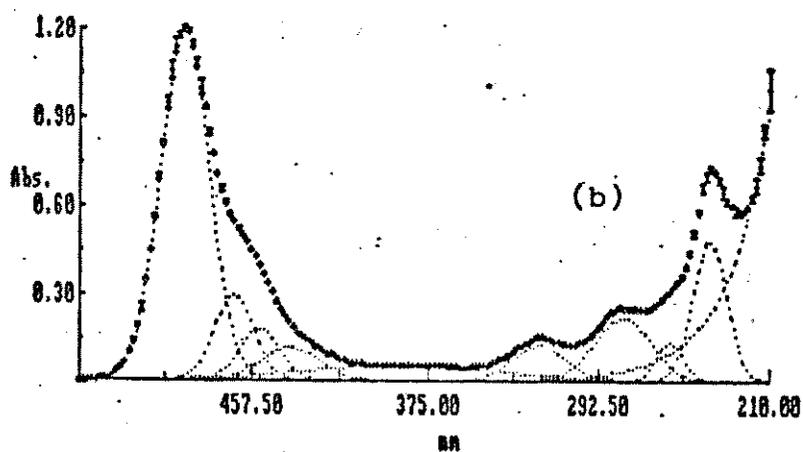
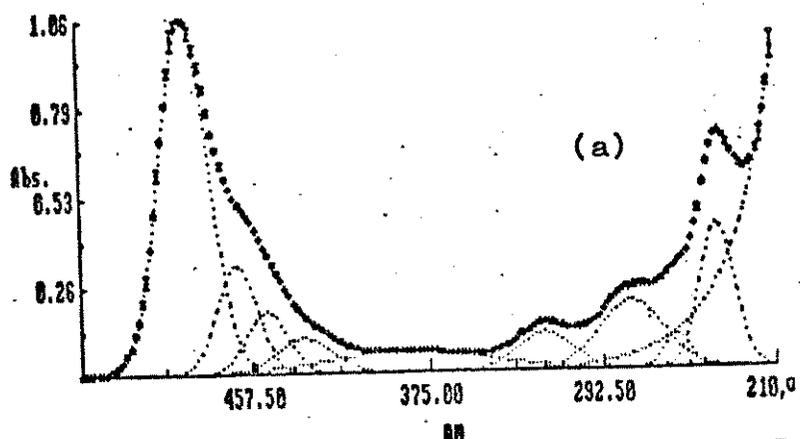


Figura A.3: Deconvolução dos espectros eletrônicos de absorção da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 6,96 (2); (b) 7,33 (2). Entre parênteses são apresentados os fatores de multiplicação dos valores de absorbância.

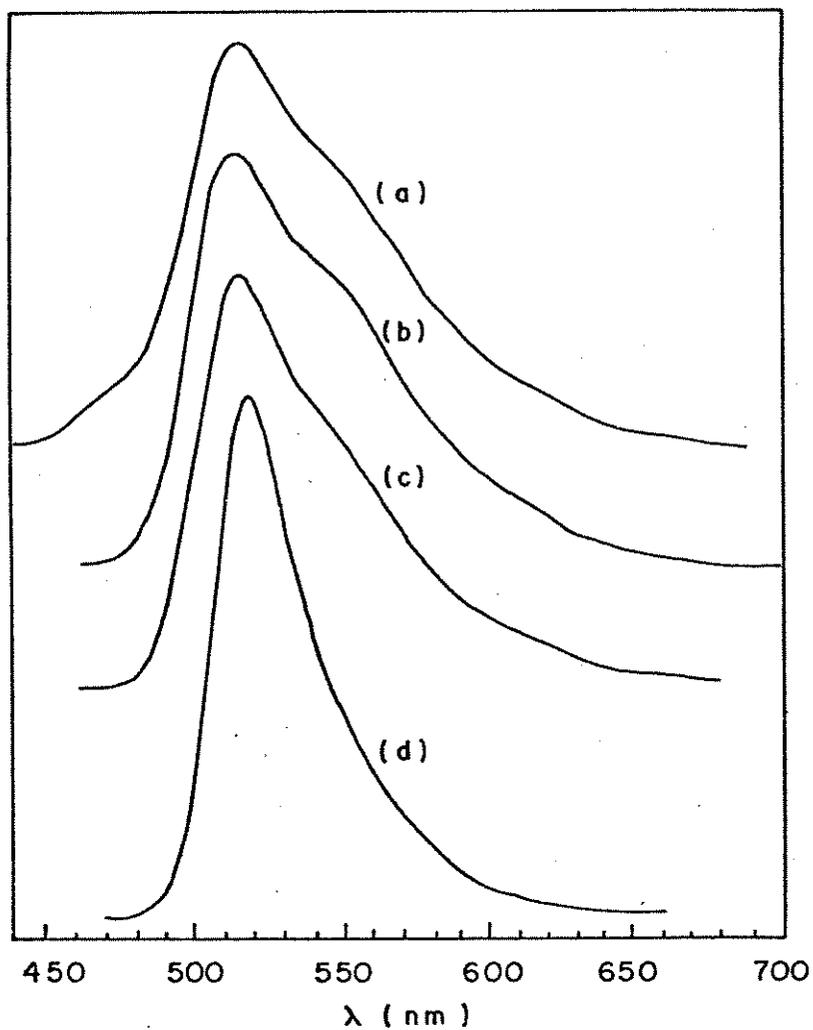


Figura A.4: Espectros eletrônicos de emissão da fluoresceína em água  $8,3 \times 10^{-6}$  M nos seguintes pH: (a) 0,79 (3); (b) 3,33 (3); (c) 5,72 (1); (d) 7,57 (1). Entre parênteses são apresentados os ganhos do espectrofluorímetro utilizado.

### 3.13 - APÊNDICE 2:

Os parâmetros calculados (*output parameters*) pelo programa de deconvolução de curva são mostrados abaixo. Especificando-se os mesmos tem-se que:

- FSM = valor da função de minimização, calculada a partir da soma dos quadrados das diferenças entre a função calculada e a função experimental (espectro eletrônico de absorção).
- DIS = discrepância na diferença de transmitância, dada pela seguinte equação:

$$DIS = (FSM / n)^{1/2}$$

onde n = número de pontos do espectro.

- FM = desvio máximo do valor de absorção.
- WFM = comprimento de onda do desvio máximo do valor de absorção.
- Intensidade (*Intensity*) = intensidade de absorção, dada em transmitância e absorbância:
- Posição (*Position*) = comprimento de onda do máximo de absorção da banda.
- Cauchy = Valor da função Cauchy - Lorentz.
- Gauss = Valor da função de Gauss.
- HW = meia-largura.
- Contorno (*Shape*) = razão Cauchy/Gauss, sendo 1,0 para Cauchy pura e 0,0 para Gauss pura.
- Linha de base (*Baseline*) = dada em valores de transmitância e de absorbância.

Output Parameters

Fl. em ácido sulfúrico 10 M.

FSM= .153455E-01 DIS= 1.0432 XT FM= 4.4132 % T WFM= 480.0

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw-1	Shape
17.23 .764	435.77	.0000	.0651	25.57	.0000
49.97 .301	413.50	-.0002	.0669	24.89	.0035
77.02 .113	392.29	.0000	.0495	33.63	.0000
65.65 .183	284.16	.0000	.0183	91.04	.0000
65.57 .183	256.43	.0000	.1519	10.96	.0000
34.26 .465	246.07	.0000	.0750	22.20	.0000
19.04 .720	225.65	.0000	.0874	19.04	.0000
1.63 1.787	194.71	.0260	.0506	29.48	.3392

Baseline = 95.63 % T .019 Abs

Output Parameters

Fl. em ácido sulfúrico 5 M

FSM= .759453E-02 DIS= .7339 XT FM= 2.5300 % T WFM= 262.0

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw-1	Shape
23.32 .632	437.56	.0000	.0630	26.43	.0000
60.99 .215	415.53	-.0013	.0639	26.06	.0207
80.13 .096	396.61	.0000	.0441	37.80	.0000
84.75 .072	299.14	.0000	.0231	72.15	.0000
42.64 .370	251.35	.0000	.0840	19.82	.0000
24.82 .605	226.46	.0000	.0730	22.81	.0000
5.76 1.240	193.07	.0322	.0539	26.81	.3736

Baseline = 98.53 % T .006 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 0,03

FSM= .352195E-02 DIS= .5108 XT FM= 3.1532 % T WFM= 276.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
15.91 .798	439.00	.0000	.0643	25.89	.0000
52.96 .276	417.94	.0000	.0657	25.35	.0000
72.01 .143	399.76	.0251	.0364	38.26	.4081
87.15 .060	321.95	.0334	.0000	59.94	1.0000
82.27 .085	292.02	.0348	.0352	34.91	.4970
90.75 .042	259.55	.0000	.2256	7.38	.0000
30.21 .520	249.25	.0000	.0643	25.89	.0000
20.51 .688	227.19	.0000	.0943	17.66	.0000
.13 2.900	186.50	.0162	.0382	40.25	.2973

Baseline = 98.35 % T .007 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 0,12.

FSM= .518908E-02 DIS= .6154 ZT FM=15.1596 % T WFM= 212.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
14.06 .852	436.97	.0000	.0612	27.20	.0000
55.76 .254	414.66	.0000	.0760	21.91	.0000
69.19 .160	397.17	.0533	.0123	35.70	.8128
93.12 .031	330.23	.0000	.0451	36.90	.0000
79.85 .098	295.59	.0377	.0197	43.37	.6570
35.59 .449	251.16	.0000	.0783	21.26	.0000
22.01 .657	227.00	.0000	.0795	20.93	.0000
.00 4.943	192.57	.1217	.0000	16.44	1.0000

Baseline = 99.73 % T .001 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 0,43.

FSM= .443018E-02 DIS= .5707 ZT FM=12.5901 % T WFM= 212.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
13.63 .865	437.67	.0000	.0618	26.94	.0000
56.95 .245	415.84	.0000	.0765	21.78	.0000
67.71 .169	399.52	.0469	.0209	36.45	.6913
94.06 .027	332.08	.0000	.0464	35.86	.0000
74.91 .125	295.28	.0360	.0079	53.06	.8205
33.40 .476	251.39	.0000	.0771	21.59	.0000
16.89 .772	226.21	.0000	.0727	22.91	.0000
.00 6.201	195.54	.1693	.0000	11.82	1.0000

Baseline = 99.03 % T .004 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 0,79.

FSM= .141322E-01 DIS= .9976 ZT FM=23.0859 % T WFM= 210.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
26.09 .584	437.45	.0000	.0632	26.34	.0000
70.22 .154	417.06	.0000	.0773	21.53	.0000
71.64 .145	403.63	.0491	.0114	38.70	.8111
96.68 .015	333.00	.0000	.0710	23.46	.0000
82.80 .082	292.85	.0222	.0248	51.60	.4718
46.49 .333	251.01	.0000	.0753	22.12	.0000
33.64 .473	226.53	.0000	.0749	22.23	.0000
.00 *****	183.26	.1538	.0000	13.00	1.0000

Baseline = 100.92 % T -.004 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 1,14.

FSM= .731631E-02 DIS= .7079 %T FM= 2.2970 % T WFM= 200.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
22.08 .656	437.94	.0000	.0606	27.49	.0000
66.13 .180	415.79	.0000	.0759	21.93	.0000
76.58 .116	399.55	.0357	.0355	34.42	.5020
85.83 .066	304.04	.0347	.0005	57.63	.9867
50.43 .297	252.52	.0000	.0878	18.96	.0000
32.31 .491	227.60	.0000	.0734	22.68	.0000
.00 8.574	188.08	.1606	.0000	12.45	1.0000

Baseline = 100.64 % T -.003 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 1,48.

FSM= .723407E-02 DIS= .7138 %T FM= 3.2850 % T WFM= 200.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
23.62 .627	436.44	.0000	.0605	27.50	.0000
70.36 .153	414.55	.0000	.0813	20.49	.0000
76.84 .114	400.26	.0211	.0441	34.22	.3237
89.31 .049	301.72	.0419	.0000	47.76	1.0000
57.60 .240	252.94	.0000	.0906	18.38	.0000
29.69 .527	227.43	.0710	.0358	23.24	.6648
.00 *****	187.56	.2276	.0000	8.79	1.0000

Baseline = 99.72 % T .001 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 1,82.

FSM= .423645E-02 DIS= .5130 %T FM= 2.1005 % T WFM= 268.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
92.40 .034	463.51	.0000	.0364	45.78	.0000
16.17 .791	438.61	.0000	.0663	25.11	.0000
49.97 .301	418.99	.0000	.0641	25.98	.0000
70.23 .153	401.27	.0098	.0411	39.38	.1926
80.82 .092	293.21	.0225	.0159	64.86	.5855
37.61 .425	251.40	.0000	.0794	20.98	.0000
15.10 .821	227.00	.0000	.0778	21.40	.0000
.00 9.931	184.86	.1093	.0182	17.82	.8570

Baseline = 100.45 % T -.002 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 2,19.

FSM= .127638E-02 DIS= .2816 ZT FM= 1.0897 % T WFM= 268.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
92.38 .034	464.53	.0000	.0335	49.75	.0000
41.22 .385	438.65	.0000	.0680	24.50	.0000
63.11 .200	420.52	.0000	.0573	29.07	.0000
83.43 .079	398.59	.0220	.0356	40.26	.3817
78.48 .105	278.37	.0269	.0095	66.86	.7391
68.81 .162	252.25	.0000	.0848	19.62	.0000
23.38 .631	227.15	.0808	.0105	24.36	.8846
.48 2.322	188.96	.0668	.0158	28.43	.8088

Baseline = 100.43 % T -.002 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 2,55.

FSM= .756486E-03 DIS= .2202 ZT FM= .6425 % T WFM= 228.0nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
91.03 .041	472.24	.0000	.0426	39.06	.0000
52.54 .280	439.31	.0000	.0659	25.29	.0000
66.94 .174	421.24	.0000	.0511	32.58	.0000
90.23 .045	394.46	.0028	.0465	35.77	.0565
95.28 .021	303.80	.0000	.0438	38.00	.0000
93.50 .029	284.88	.0000	.1101	15.12	.0000
93.53 .029	274.43	.0000	.2012	8.28	.0000
60.62 .217	248.00	.0000	.0563	29.59	.0000
22.11 .655	225.37	.0000	.0797	20.89	.0000
8.48 1.072	196.77	.0758	.0291	23.33	.7225

Baseline = 100.38 % T -.002 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 2,92.

FSM= .635421E-03 DIS= .2018 ZT FM= .5733 % T WFM= 242.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
87.54 .058	474.46	.0000	.0484	34.42	.0000
61.24 .213	439.15	.0000	.0613	27.15	.0000
74.84 .126	420.86	.0000	.0510	32.62	.0000
91.39 .039	393.24	.0161	.0427	36.56	.2744
96.55 .015	307.97	.0000	.0638	26.09	.0000
91.95 .036	284.43	.0000	.0963	17.29	.0000
93.68 .028	274.01	.0000	.1866	8.92	.0000
67.94 .168	246.87	.0000	.0479	34.74	.0000
22.54 .647	225.55	.0000	.0773	21.55	.0000
8.69 1.061	196.47	.0742	.0281	23.91	.7251

Baseline = 100.30 % T -.001 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 3,33.

FSM= .729598E-03 DIS= .2149 %T FM= .6407 % T WFM= 508.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
83.06 .081	475.67	.0000	.0500	33.30	.0000
66.12 .180	439.55	.0000	.0551	30.20	.0000
81.63 .088	421.34	.0000	.0482	34.54	.0000
92.94 .032	394.60	.0316	.0319	38.56	.4981
96.24 .017	310.03	.0000	.0712	23.40	.0000
92.74 .033	285.86	.0000	.1056	15.77	.0000
92.18 .035	274.77	.0000	.1757	9.48	.0000
69.38 .159	243.04	.0025	.0351	47.37	.0676
25.23 .598	225.76	.0000	.0765	21.76	.0000
5.13 1.290	198.62	.0766	.0263	23.58	.7443

Baseline =100.17 % T -.001 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 3,73.

FSM= .727224E-03 DIS= .2125 %T FM= 1.0146 % T WFM= 520.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
78.46 .105	476.86	.0000	.0565	29.49	.0000
67.90 .168	440.72	.0000	.0457	36.47	.0000
84.91 .071	421.66	.0000	.0407	40.94	.0000
94.06 .027	387.09	.0297	.0282	42.43	.5126
95.28 .021	309.82	.0000	.0546	30.50	.0000
94.08 .026	285.28	.0000	.1491	11.17	.0000
89.72 .047	274.70	.0000	.1571	10.60	.0000
68.38 .165	250.09	.0244	.0207	54.90	.5419
29.52 .530	226.88	.0000	.0798	20.88	.0000
2.17 1.664	194.00	.0551	.0175	33.19	.7587

Baseline = 99.05 % T .004 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 4,18.

FSM= .117294E-02 DIS= .2699 %T FM= 1.1015 % T WFM= 252.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
65.52 .184	476.37	.0000	.0552	30.18	.0000
68.41 .165	448.44	.0000	.0592	28.13	.0000
77.03 .113	428.97	.0000	.0574	29.00	.0000
86.67 .062	407.32	.0092	.0204	74.76	.3104
93.26 .030	311.00	.0000	.0561	29.70	.0000
94.56 .024	289.45	.0000	.1446	11.51	.0000
80.94 .092	274.67	.0000	.0990	16.81	.0000
73.32 .135	252.71	.0521	.0347	28.72	.6006
28.35 .547	227.76	.0000	.0806	20.65	.0000
3.85 1.415	195.01	.0532	.0216	32.85	.7108

Baseline = 99.31 % T .003 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 4,58.

FSM= .142310E-02 DIS= .2973 %T FM= 1.0484 % T WFM= 234.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
52.25 .282	474.51	.0000	.0522	31.89	.0000
62.47 .204	448.76	.0000	.0704	23.64	.0000
71.20 .147	429.80	.0000	.0579	28.77	.0000
84.43 .073	399.34	.0030	.0216	76.39	.1236
89.90 .046	310.03	.0000	.0496	33.54	.0000
95.69 .019	290.31	.0000	.1520	10.96	.0000
71.99 .143	273.23	.0000	.0877	18.98	.0000
74.61 .127	253.19	.0057	.0849	19.57	.0626
33.96 .469	229.05	.0000	.0853	19.52	.0000
2.27 1.644	185.49	.0354	.0186	46.06	.6563

Baseline = 99.86 % T .001 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 5,05.

FSM= .259158E-02 DIS= .3975 %T FM= 1.4323 % T WFM= 284.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
43.86 .358	475.94	.0000	.0530	31.42	.0000
49.60 .305	448.81	.0000	.0627	26.54	.0000
70.12 .154	426.60	.0000	.0601	27.71	.0000
83.57 .078	391.25	-.0003	.0266	62.50	.0128
89.46 .048	310.25	.0000	.0544	30.63	.0000
97.88 .009	289.99	.0000	.0881	18.90	.0000
70.79 .150	272.17	.0000	.0818	20.36	.0000
77.46 .111	252.51	.0339	.0919	17.04	.2693
39.89 .399	230.10	.0000	.0956	17.42	.0000
2.90 1.538	182.83	.0324	.0158	51.41	.6718

Baseline = 100.20 % T -.001 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 5,41.

FSM= .202016E-02 DIS= .3437 %T FM= .9522 % T WFM= 234.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
35.41 .451	477.41	.0000	.0491	33.91	.0000
45.76 .340	449.05	.0000	.0606	27.46	.0000
75.77 .121	383.93	-.0162	.0152	78.33	.5168
79.34 .101	305.96	.0000	.0367	45.37	.0000
63.77 .195	272.61	.0000	.0770	21.63	.0000
71.10 .148	252.57	.0417	.0785	18.87	.3467
42.40 .373	231.63	.0000	.1014	16.42	.0000
1.46 1.834	182.54	.0341	.0116	53.11	.7457

Baseline = 99.26 % T .003 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 5,61.

FSM= .192295E-02 DIS= .3445 %T FM= 1.0885 % T WFM= 276.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
38.04 .420	476.36	.0000	.0518	32.17	.0000
45.13 .346	448.78	.0000	.0621	26.83	.0000
70.52 .152	426.04	.0000	.0629	26.47	.0000
79.79 .098	388.79	.0029	.0233	70.97	.1115
82.09 .086	305.78	.0000	.0397	41.97	.0000
61.21 .213	272.19	.0000	.0733	22.71	.0000
68.57 .164	251.90	.0559	.0712	18.82	.4397
40.31 .395	231.27	.0000	.1019	16.33	.0000
1.35 1.871	182.90	.0338	.0117	53.41	.7423

Baseline = 99.72 % T .001 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 5,72.

FSM= .200791E-02 DIS= .3488 %T FM= 1.1080 % T WFM= 276.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
33.51 .475	480.77	.0000	.0506	32.93	.0000
42.13 .375	450.78	.0000	.0544	30.62	.0000
75.10 .124	425.16	.0000	.0625	26.66	.0000
76.53 .116	395.97	.0117	.0172	81.22	.4038
80.61 .094	308.18	.0000	.0386	43.09	.0000
66.47 .477	272.14	.0000	.0686	24.28	.0000
79.37 .100	251.44	.0262	.0946	16.98	.2167
47.72 .321	231.22	.0000	.1059	15.72	.0000
2.45 1.611	181.65	.0291	.0097	62.41	.7489

Baseline = 99.33 % T .003 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 6,02.

FSM= .205999E-02 DIS= .3533 %T FM= 1.3163 % T WFM= 296.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
31.79 .498	488.50	.0000	.0581	28.64	.0000
45.81 .339	465.57	.0000	.0563	29.56	.0000
59.94 .222	448.19	.0000	.0695	23.95	.0000
70.05 .155	428.73	.0000	.0578	28.81	.0000
78.31 .106	386.85	.0108	.0204	72.59	.3458
79.97 .097	312.12	.0000	.0361	46.15	.0000
68.01 .167	272.49	.0000	.0618	26.94	.0000
81.32 .090	252.18	.0000	.1101	15.13	.0000
48.31 .316	234.39	.0000	.1089	15.30	.0000
2.46 1.608	181.15	.0291	.0092	63.01	.7607

Baseline = 99.24 % T .003 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 6,37.

FSM= .166811E-02 DIS= .3180 %T FM= 1.1112 % T WFM= 274.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
20.80 .682	488.89	.0000	.0605	27.51	.0000
44.70 .350	465.37	.0000	.0615	27.07	.0000
62.70 .203	448.52	.0000	.0713	23.36	.0000
72.61 .139	430.02	.0000	.0543	30.64	.0000
81.62 .088	384.78	.0075	.0197	79.03	.2759
80.27 .095	316.91	.0000	.0478	34.84	.0000
67.08 .173	273.08	.0000	.0441	37.78	.0000
87.90 .056	252.05	.0000	.1154	14.43	.0000
49.14 .309	234.98	.0000	.0970	17.16	.0000
2.29 1.640	181.41	.0303	.0097	60.34	.7568

Baseline = 99.10 % T .004 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 6,60.

FSM= .193783E-02 DIS= .3406 %T FM= 1.6757 % T WFM= 210.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
14.59 .836	489.22	.0000	.0600	27.76	.0000
45.18 .345	464.95	.0000	.0646	25.76	.0000
64.34 .192	449.04	.0000	.0697	23.91	.0000
75.39 .123	430.68	.0000	.0538	30.94	.0000
83.76 .077	384.53	.0073	.0197	79.41	.2708
78.79 .104	319.56	.0000	.0516	32.30	.0000
65.04 .187	275.75	.0000	.0418	39.87	.0000
85.22 .069	253.88	.0000	.1021	16.30	.0000
44.18 .355	236.37	.0000	.0917	18.15	.0000
1.61 1.792	182.21	.0338	.0105	54.45	.7636

Baseline = 98.96 % T .005 Abs

Output Parameters

Fl. pH = 6,79.

FSM= .1213886E-02 DIS= .3600 %T FM= 1.7911 % T WFM= 212.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
11.23 .949	489.79	.0000	.0616	27.04	.0000
45.58 .341	465.55	.0000	.0706	23.57	.0000
65.35 .185	450.37	.0000	.0735	22.66	.0000
77.53 .111	432.85	.0000	.0550	30.30	.0000
85.38 .069	385.23	.0067	.0167	92.66	.2850
78.69 .104	321.18	.0000	.0543	30.68	.0000
63.21 .199	278.87	.0000	.0447	37.24	.0000
80.18 .096	256.80	.0000	.1065	15.63	.0000
40.08 .397	237.91	.0000	.0888	18.74	.0000
1.10 1.906	183.32	.0362	.0109	50.94	.7685

Baseline = 99.98 % T .004 Abs

Output Parameters.

Fl. em pH = 6,96.

FSM= .206599E-02 DIS= .3528 XT FM= 1.7799 % T WFM= 508.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
8.96 1.048	489.27	.0000	.0604	27.56	.0000
47.51 .323	464.61	.0000	.0739	22.53	.0000
65.35 .185	450.55	.0000	.0730	22.80	.0000
78.40 .106	433.06	.0000	.0527	31.59	.0000
86.61 .062	383.55	.0082	.0165	91.12	.3309
77.15 .113	320.01	.0000	.0543	30.64	.0000
62.61 .203	278.71	.0000	.0462	36.07	.0000
79.83 .098	257.09	.0000	.1118	14.89	.0000
37.35 .428	237.67	.0000	.0847	19.66	.0000
.91 2.043	183.90	.0392	.0114	47.36	.7751

Baseline = 99.29 % T .003 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 7,14.

FSM= .225563E-02 DIS= .3697 XT FM= 1.1708 % T WFM= 518.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
7.79 1.108	489.49	.0000	.0619	26.92	.0000
50.34 .298	466.01	.0000	.0754	22.09	.0000
66.41 .170	453.23	.0000	.0733	22.72	.0000
76.99 .114	437.71	.0000	.0476	34.98	.0000
86.51 .053	383.77	.0121	.0149	88.93	.4467
76.77 .115	321.24	.0000	.0569	29.26	.0000
62.79 .202	280.55	.0000	.0484	34.39	.0000
76.28 .118	257.74	.0000	.1068	15.59	.0000
35.94 .444	238.45	.0000	.0859	19.39	.0000
.62 2.210	184.44	.0427	.0115	43.90	.7876

Baseline = 98.97 % T .005 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 7,33.

FSM= .025612E-02 DIS= .4429 XT FM= 1.8668 % T WFM= 510.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
6.63 1.179	489.70	.0000	.0609	27.35	.0000
51.42 .289	465.94	.0000	.0773	21.53	.0000
66.90 .175	453.69	.0000	.0762	21.84	.0000
78.10 .107	439.27	.0000	.0493	33.76	.0000
88.98 .051	386.30	.0019	.0151	109.13	.1140
76.44 .117	320.61	.0000	.0560	29.76	.0000
61.62 .210	260.73	.0000	.0514	32.43	.0000
74.41 .128	257.93	.0000	.1072	15.53	.0000
33.50 .475	238.43	.0000	.0861	19.34	.0000
.53 2.273	184.83	.0446	.0118	42.09	.7910

Baseline = 98.79 % T .005 Abs

Output Parameters

Fl. em pH = 7,57.

FSM= .256715E-02 DIS= .3956 ZT FM= 1.4329 % T WFM= 536.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
6.08 1.216	489.91	.0000	.0629	26.48	.0000
49.16 .308	466.56	.0000	.0788	21.14	.0000
64.61 .190	454.14	.0000	.0786	21.19	.0000
79.13 .102	438.13	.0000	.0521	31.95	.0000
90.75 .042	383.76	.0116	.0079	127.84	.5963
76.33 .117	321.66	.0000	.0575	28.98	.0000
61.36 .212	281.69	.0000	.0519	32.08	.0000
71.89 .143	257.93	.0000	.1035	16.10	.0000
32.24 .492	238.50	.0000	.0876	19.01	.0000
.31 2.502	186.02	.0496	.0121	38.17	.8045
Baseline = 99.20 % T		.003 Abs			

Output Parameters

Fl. em pH = 7,93.

FSM= .333215E-02 DIS= .4467 ZT FM= 2.0102 % T WFM= 544.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
5.50 1.260	489.94	.0000	.0618	26.94	.0000
50.00 .300	466.50	.0000	.0831	20.03	.0000
64.13 .193	454.18	.0000	.0832	20.01	.0000
79.55 .099	439.26	.0000	.0538	30.97	.0000
89.40 .048	384.44	.0116	-.0044	152.66	.7270
75.33 .123	320.63	.0000	.0552	30.19	.0000
62.22 .206	281.93	.0000	.0572	29.11	.0000
71.42 .146	258.41	.0000	.1038	16.04	.0000
32.70 .485	239.05	.0000	.0900	18.49	.0000
.31 2.505	185.54	.0479	.0108	39.83	.8166
Baseline = 99.45 % T		.002 Abs			

Output Parameters

Fl. em pH = 8,23.

FSM= .418830E-02 DIS= .5023 ZT FM= 1.8652 % T WFM= 210.0 nm

Intensity	Position	Cauchy	Gauss	Hw	Shape
5.55 1.256	489.28	.0000	.0623	26.74	.0000
50.00 .301	466.39	.0000	.0795	20.95	.0000
64.14 .193	454.07	.0000	.0799	20.85	.0000
79.04 .102	438.65	.0000	.0526	32.03	.0000
91.18 .040	385.59	.0165	-.0023	118.09	.8546
75.00 .125	320.50	.0000	.0550	30.28	.0000
61.97 .208	281.55	.0000	.0571	29.15	.0000
70.05 .155	257.75	.0000	.1041	15.99	.0000
32.48 .488	238.41	.0000	.0909	18.32	.0000
.33 2.478	185.53	.0492	.0113	38.69	.8127
Baseline = 99.75 % T		.001 Abs			