Carolina Aparecida Sabatini

**Modulação de Fluorescência de Amino coumarinas e Acridinas por
Nanopartículas de Prata**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências (Físico-
Química).**

Orientador: Prof. Dr Marcelo Henrique Gehlen

São Carlos

2007

Dedicatória

*Aos meus pais Maria José e Gilberto, minha avó Joanna,
meu irmão Jaime e ao meu namorado Tom
por estarem sempre presentes apoiando e auxiliando-me
a superar as dificuldades encontradas.*

Agradecimentos

A Deus pelo presente de viver.

Ao Prof. Marcelo, pela orientação, confiança, paciência e ensinamentos.

Aos amigos Manu, Ana, Robson pela amizade e por estarem sempre presentes.

Aos amigos Suzana, Janildo, Sidney (*Puff*), Denis (MP), Josy, Bia, Marins, Glauco, Guilherme, Maira e Lívia.

Ao Mauro, pelo auxílio e paciência.

Ao pessoal da Seção de Informática, pelo auxílio e paciência.

Ao Instituto de Química, pela estrutura e facilidades oferecidas.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

*“Um pensamento que não resulta em ação
não é muita coisa,
mas uma ação que não provém de um pensamento
não é coisa nenhuma.”*
(George Bernamos)

Resumo

Nanopartículas de prata foram preparadas pela redução química de íons prata (AgNO_3) por borohidreto de sódio (NaBH_4) na presença de poli-(N)-vinil-2-pirrolidona em solução de álcoois de cadeia curta. As nanopartículas de prata apresentaram maior estabilidade em 2-propanol, e o diâmetro aproximado das nanopartículas Ag^0 obtidas neste solvente é de aproximadamente 6 nm. As propriedades fotofísicas dos corantes coumarinas e derivados de acridina, em 2-propanol, são afetados pela presença das nanopartículas de prata. A interação das nanopartículas de prata com os derivados de acridina leva a uma mudança espectral da banda de absorção de transferência de carga intramolecular “ICT – *intramolecular charge transfer*”. Para dois dos derivados de acridina, há um aumento significativo de emissão com a adição inicial de nanopartículas de Ag^0 . Mas em altas concentrações de nanopartículas de prata, ocorre supressão estática de fluorescência, com uma progressiva diminuição da eficiência de fluorescência. A intensidade de fluorescência das amino coumarinas é somente suprimida pela presença de nanopartículas de prata em solução.

Palavras chave: nanopartículas de prata, corantes, fluorescência, ressonância de plasmon, transferência de carga intramolecular (ICT).

Abstract

Silver nanoparticles were synthesized by chemical reduction of silver ions by sodium borohydride in the presence of poly-(N)-vinyl-2-pyrrolidone in solution of short chain alcohols. The nanoparticles are stable in 2-propanol, and the average diameter of the Ag colloid obtained in this solvent is about 6 nm. The photophysical properties of acridinium and coumarin dyes in 2-propanol are affected by the presence of silver nanoparticles. The interaction of silver nanoparticles with acridinium derivative leads to a spectral change of its intramolecular charge transfer (ICT) absorption band. The dye emission increases suddenly with the initial addition of the Ag metal nanoparticles, but at a high concentration of the colloid, static fluorescence quenching occurs with a progressive decrease of the fluorescence efficiency. Amino coumarin fluorescence is only quenched by the silver nanoparticles in solution in the concentration range used.

Keywords: *silver nanoparticles, dyes, fluorescence, plasmon resonance, ICT.*

SUMÁRIO

I – Lista de Símbolos	08
II – Lista de Abreviaturas	09
III – Lista de Figuras	11
1 – Introdução	15
1.1 – Fundamentos	20
2 – Objetivos	26
3 – Parte Experimental	28
3.1 – Reagentes utilizados	28
3.2 – Procedimento Experimental	28
3.3 – Equipamentos e Técnicas utilizadas	30
4 – Resultados e Discussão	35
4.1 – Preparação das nanopartículas de prata	35
4.2 – Influência das Nanopartículas de Prata na Fotofísica de Amino-couamrinas e Derivados de 9-aminoacridina	35
4.2.1 – Amino-coumarinas	41
4.2.2 – Derivados de 9-aminoacridina	51
5 – Conclusão	66
6 – Referências Bibliográficas	68

I – Lista de Símbolos:

Γ – Taxa de emissão do fluoróforo

k – Taxa de desativação por decaimento radiativo

Q – Fração do fluoróforo que decai

k_f – Constante de velocidade de fluorescência

k_{nr} – Constante de velocidade de desativação não radiativa

Σk_i – Somatório das constantes de velocidade não radiativas

τ - Tempo de vida de fluorescência

$\Delta\omega_{1/2}$ – largura de meia altura com relação ao máximo de absorção

v_F – velocidade de Fermi ($1,39 \times 10^8 \text{ cm s}^{-1}$)

R – Raio calculado pela Teoria de Mie-Drude

K_{sv} – Constante de Stern-Volmer

k_q – Constante de velocidade de supressão bimolecular

λ – Comprimento de onda

λ_{exc} – Comprimento de onda de excitação

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão

I_0/I – Intensidade relativa

Rel (%) – Porcentagem relativa dos tempos de vida

II – Lista de abreviaturas:

u.a. – Unidades arbitrárias

Em – Emissão

Abs – Absorção

F – Fluorescência

P – Fosforescência

S₂ – Segundo estado eletrônico excitado singlete

S₁ – Primeiro estado eletrônico excitado singlete

S₀ – Estado eletrônico fundamental

T₁ – Primeiro estado eletrônico excitado triplete

T₂ – Segundo estado eletrônico excitado triplete

I – Intensidade de Fluorescência

ICT – Transferência de carga intramolecular (*Intramolecular charge transfer*)

TICT – Transferência de carga intramolecular com rotação interna (*Twist intramolecular charge transfer*)

LE – Excitação localizada (*Locally excited*)

IC – Conversão interna (*Internal conversion*)

ISC – Cruzamento intersistemas (*Intersystem crossing*)

SPW – Onda de superfície de plasmon (*Surface plasmon wave*)

SEF – Aumento do sinal de fluorescência (*Surface enhanced fluorescence*)

IRF – Função de resposta instrumental (*Instrument response function*)

(Ag⁰)_n – nanopartículas de prata

PVP – poli-(N)-vinil-2-pirrolidona

CN – grupo nitrila

C=O – grupo carbonila

C1 – Coumarina 1 (7-dietilamino-4-metilcoumarina)

C120 – Coumarina 120 (7-amino-4-metilcoumarina)

C151 – Coumarina 151 (7-amino-4-trifluoro metilcoumarina)

C500 – Coumarina 500 (7-etilamino-4-trifluoro metilcoumarina)

Acridina I – 9-aminoacridina metileno dietil malonato

Acridina II – 9-aminoacridina metileno ciano etilacetato

Acridina III – 9-aminoacridina metileno malonitrila

III – Lista de figuras:

Figura 1: Esquema dos estados eletrônicos LE e ICT e suas conversões [25].....	18
Figura 2: Estrutura molecular do DMABN.....	19
Figura 3: Diagrama de Jablonski, onde A: absorção, F: fluorescência e P: fosforescência, S: estados singlete, T: estados triplete.....	21
Figura 4: Esquema do efeito plasmon em (A) partículas metálicas e (B) superfícies metálicas. Adaptado de [35].....	22
Figura 5: Diagrama de Jablonski sem e com a presença de superfície metálica próxima ao fluoróforo [2].....	23
Figura 6: Esquema de preparação das nanopartículas de prata em 2-propanol.....	29
Figura 7: Estruturas moleculares derivados de 9-aminoacridina e amino-coumarinas.....	30
Figura 8: Esquema dos espectromêtros utilizados.....	32
Figura 9: Espectros de absorção das nanopartículas de prata em EtOH, BuOH e t-BuOH.....	36
Figura 10: Comparação dos espectros de absorção normalizados das nanopartículas de prata preparadas em água, 2-propanol e metanol.....	37
Figura 11: Imagens de campo claro das nanopartículas de prata em 2-propanol obtidas por microscopia eletrônica de transmissão: escala de comparação em (A) 50 nm (B) 200 nm.....	39
Figura 12: Espectro de EDX das nanopartículas de prata.....	40
Figura 13: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C1.....	42
Figura 14: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C120.....	42
Figura 15: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C151.....	43

Figura 16: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C500.....	43
Figura 17: Espectro de fluorescência e curva de Stern-Volmer (inserida) para a C120 em 2-propanol ($\lambda_{exc} = 350$ nm), com adição de nanopartículas de prata. $[Ag^0]$ 0 – $9,2 \times 10^{-5}$ M).....	44
Figura 18: Curvas de Stern-Volmer das amino-coumarinas em 2-propanol, (C1 ▲), (C151 ■), (C500 ●).....	45
Figura 19: Decaimento de fluorescência da amino-coumarina C120 em 2-propanol, $\tau = 4,1$ ns ($\lambda_{exc} = 401$ nm e $\lambda_{em} = 425$ nm).....	46
Figura 20: Decaimento de fluorescência da amino-coumarina C500 em 2-propanol, $\tau = 5,7$ ns ($\lambda_{exc} = 401$ nm e $\lambda_{em} = 490$ nm).....	46
Figura 21: Decaimentos de fluorescência das amino-coumarinas C151 (■) ($\lambda_{em} = 475$ nm), $\tau = 5,3$ ns e C1 (▲) ($\lambda_{em} = 445$ nm) $\tau = 3,5$ ns, em 2-propanol ($\lambda_{exc} = 401$ nm).....	47
Figura 22: Ilustração do acoplamento dipolar da nanopartícula de prata com a molécula de corante.....	48
Figura 23: Espectros de normalizados das amino-coumarinas, onde (A) C500, (B) C151, (C) C120 e (D) C1.....	49
Figura 24: Espectros normalizados para os derivados de 9-aminoacridina, onde (A) acridina I, (B) acridina II e (C) acridina III.....	50
Figura 25: Espectros normalizados de absorção e emissão do derivado acridina I.....	52
Figura 26: Espectros normalizados de absorção e emissão do derivado acridina II.....	52
Figura 27: Espectros normalizados de absorção e emissão do derivado acridina III.....	53
Figura 28: Espectros de absorção do corante acridina I em 2-propanol com adição de nanopartículas de Ag^0 . $[Ag^0]$: 0 – $2,5 \times 10^{-4}$ M.....	54

- Figura 29:** Diminuição de intensidade de fluorescência, supressão de fluorescência, da acridina I com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: $0 - 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$55
- Figura 30:** Curva de Stern-Volmer para acridina I com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: $0 - 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$55
- Figura 31:** Decaimento de fluorescência do corante acridina I, $\tau_1 = 2,2 \text{ ns}$ e $\tau_2 = 6,3 \text{ ns}$ ($\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$), em 2-propanol ($\lambda_{\text{exc}} = 401 \text{ nm}$).....56
- Figura 32:** Espectros de absorção da acridina II em 2-propanol com adição de nanopartículas de Ag^0 . $[\text{Ag}^0]$: $0 - 1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$57
- Figura 33:** Espectros de absorção da acridina III em 2-propanol com adição de nanopartículas de Ag^0 . $[\text{Ag}^0]$: $0 - 8,0 \times 10^{-5} \text{ M}$57
- Figura 34:** Aumento de intensidade de fluorescência (A) e supressão (B) da acridina II com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: (A) $0 - 1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ e (B) $1,2 \times 10^{-5} - 1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$59
- Figura 35:** Aumento de intensidade de fluorescência (A) e supressão (B) da acridina III com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: (A) $0 - 6,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ e (B) $6,4 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-4} \text{ M}$60
- Figura 36:** Comparação do aumento da eficiência de fluorescência entre os compostos acridina II (■), acridina III (▲) e diminuição da acridina I (●).....61
- Figura 37:** Comparação das curvas de Stern-Volmer entre os compostos acridina II (■) e acridina III (▲).....62
- Figura 38:** Decaimento de fluorescência do corante acridina II $\tau_1 = 1,4 \text{ ns}$ e $\tau_2 = 8,0 \text{ ns}$ ($\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$), em 2-propanol ($\lambda_{\text{exc}} = 401 \text{ nm}$).....63
- Figura 39:** Decaimento de fluorescência do corante acridina III $\tau_1 = 1,4 \text{ ns}$ e $\tau_2 = 8,5 \text{ ns}$ ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$), em 2-propanol ($\lambda_{\text{exc}} = 401 \text{ nm}$).....63

1 – INTRODUÇÃO

1 – Introdução

Nanopartículas metálicas têm atraído significativa atenção devido às suas propriedades ópticas e eletrônicas, que têm resultado num grande número de aplicações no campo da química e da bioquímica [1-6].

Em geral, a preparação das nanopartículas pode ser realizada pela redução química de íons metálicos, tais como íons prata, por um agente redutor como, por exemplo, o borohidreto de sódio em fase aquosa [7].

Alguns métodos avançados de preparação transferem as nanopartículas para solventes orgânicos com a finalidade de aumentar a estabilidade das mesmas, devido ao fato de que em fase aquosa há uma tendência de formação de agregados. Desta forma, métodos alternativos têm sido desenvolvidos, onde nanopartículas são transferidas da fase aquosa para a fase orgânica. Em geral, a transferência de fase necessita de dois aditivos: um agente estabilizante e um agente de transferência de fase [8,9]. Entretanto, estes métodos apresentam desvantagens por requererem procedimentos elaborados, como a complexação com cadeias longas de aminas, a modificação da superfície da nanopartícula pela adsorção de alcanotióis ou moléculas de ácidos graxos, além de utilizarem aditivos como aminas e tióis que podem atuar como supressores de fluorescência de muitos corantes [9].

Uma alternativa para estabilizar nanopartículas são os polímeros. Estes, em solução, têm sido reconhecidos como excelentes suportes para a formação de dispersões coloidais estáveis de metais tais como paládio, platina, prata e ouro. A ação dos polímeros sobre as nanopartículas pode ser dar de diversas formas: por meio de adsorção, influenciando na aproximação de outras partículas, ordenação através do encaixe ao longo da cadeia polimérica e até mesmo ordenação da nucleação das nanopartículas, o que pode acarretar uma mudança na forma das mesmas.

Um dos polímeros que pode ser aplicado como estabilizante é o poli-(N)-vinil pirrolidona (PVP). Este tem sido extensivamente utilizado como macroligante estabilizando colóides de diferentes tamanhos. Entretanto, ainda se conhece pouco sobre a natureza da interação química entre o PVP e as nanopartículas metálicas [37].

Existem inúmeras aplicações para as nanopartículas metálicas. Dentre elas estão a deposição em superfícies, para serem utilizadas em espectroscopia Raman com a finalidade de obtenção de uma maior resolução espectral das transições de absorbatos pelo efeito de superfície / interações eletrodinâmicas [15,16]. E além desta, o emprego em sistemas contendo fluoróforos. Neste caso, um efeito similar tem sido observado para as intensidades de fluorescência de fluoróforos orgânicos adsorvidos sobre superfícies contendo nanopartículas ou filmes finos de metais como ouro e prata [7, 16]. A presença de nanopartículas metálicas nestes sistemas pode influenciar as propriedades fotofísicas dos fluoróforos, ou seja, influenciar a taxa radiativa dos mesmos, aumentando ou diminuindo-a, dependendo da sua distância em relação ao fluoróforo [3,10]. Este efeito provocado pela superfície metálica é denominado de efeito de ressonância de plasmon.

Particularmente, o efeito de ressonância de plasmon nas propriedades fotofísicas de fluoróforos orgânicos é ainda um fenômeno intrigante [11]. O tipo, tamanho e forma das nanopartículas podem influenciar na intensidade de fluorescência de fluoróforos próximos à superfície metálica. O aumento da intensidade pode ser devido ao acoplamento eletrônico do momento de dipolo da transição eletrônica com a superfície de plasmon. Para fluoróforos que possuem baixo rendimento quântico de fluorescência em meios moleculares, este efeito é desejado já que, em média, pode-se aumentar a intensidade de fluorescência significativamente [10, 12-14].

O aumento de sinal de fluorescência (SEF, *surface enhanced fluorescence*) ou rendimento quântico de emissão depende de um balanço entre as taxas de emissão e da transferência de energia da molécula excitada para a superfície. O rendimento quântico é dado pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos e, pode ser considerado unitário quando a taxa de decaimento radiativo for muito maior que a taxa de desativação não radiativa ($\Gamma \gg k$) [17].

A fração de fluoróforo que decai com a emissão é dada pela equação abaixo:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k} \quad (1)$$

onde Γ = taxa emissão fluoróforo; k = taxa de desativação decaimento radiativo.

Quando o rendimento quântico de fluorescência do fluoróforo é baixo, os efeitos de plasmon podem levar a um aumento significativo na intensidade de fluorescência. Por outro lado, fluoróforos com rendimento quântico elevado são mais susceptíveis à supressão de fluorescência. Mas é importante ressaltar que nem todos os fluoróforos são suprimidos, a supressão dependerá de um mecanismo, que por sua vez depende das propriedades fotofísicas da molécula [19].

Esta característica de aumento de sensibilidade, importante para sistemas com rendimentos quânticos baixos, tem sido explorada na elaboração de técnicas analíticas e de sensores químicos por emissão de fluorescência [20,21].

Embora existam muitos trabalhos no qual o efeito do aumento de sinal de fluorescência (SEF) é verificado por medidas fotoestacionárias (medidas de intensidade do espectro de emissão), poucos são os dados resolvidos no tempo para este fenômeno (espectroscopia de emissão resolvida no tempo) [22].

Recentemente em nosso grupo, estudou-se o efeito de partículas metálicas sobre a fotofísica e fotoquímica de corantes fluorescentes (acridina, azul do Nilo, e auramina) em fase líquida contendo nanoesferas e nanoprismas de prata estabilizados por polímeros [23]. Outros corantes que apresentam características interessantes para o estudo desta natureza são os derivados de acridina e as amino-coumarinas. As propriedades fotofísicas destes corantes na presença de nanopartículas de prata têm sido estudadas devido às suas aplicações em vários campos. Estes corantes apresentam transferência de carga intramolecular (ICT – *intramolecular charge transfer*) conforme descrito na literatura [25].

Sistemas que apresentam transferência de carga podem apresentar emissão de fluorescência gerada a partir de dois estados de eletrônicos diferentes. Um estado pode ser devido à excitação da molécula, que consiste na emissão do estado singlete LE (*locally excited*) e o outro gerado a partir do estado LE e que possui um momento de dipolo maior (estado ICT). Na figura 1 está representado um esquema dos estados eletrônicos LE e ICT, ilustrando a possível conversão de um estado para o outro [25].

Figura 1: Esquema dos estados eletrônicos LE e ICT e suas conversões [25].

Um dos compostos mais estudados na literatura que apresenta transferência de carga intramolecular (ICT) é o 4-dimetilamino benzonitrila (DMABN), ilustrado na figura 2. Nesta

molécula, a transferência de carga ocorre do grupo $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (doador de elétrons) para o grupo CN (retirador de elétrons) [25].

Figura 2: Estrutura molecular do DMABN.

Os processos de transferência de carga intermolecular (entre duas moléculas) e intramolecular (em uma mesma molécula) geram estados energéticos denominados de transferência de carga (CT) e de transferência de carga intramolecular (ICT), respectivamente. Estes processos são observados em moléculas excitadas e freqüentemente competem com processos de desativação radiativa [26]. Os processos de transferência de carga são extensivamente estudados na literatura. Em um trabalho publicado recentemente [27], tais processos (ICT) foram observados em derivados de 9-aminoacridina.

1.1 – Fundamentos

As propriedades fotofísicas das nanopartículas metálicas têm sido amplamente estudadas. Efeitos de espalhamento e absorção de radiação eletromagnética ocorrem de forma crítica em alguns sistemas. Por exemplo, um hidrosol de prata coloidal de raio de 20 nm terá uma coloração amarela devido à absorção centrada em 400 nm da luz incidente. Quando esses colóides estão associados à fluoróforos (corantes, por exemplo) podem apresentar fenômenos como aumento de fluorescência, ao serem excitados eletronicamente. Neste caso, quando a molécula é excitada, ela é promovida a um estado vibracional e eletrônico de maior energia.

A molécula excitada pode perder o excesso de energia na excitação por vários processos: conversão interna (IC), cruzamento intersistemas (ISC), fluorescência (F), fosforescência (P), supressão por solvente, auto-supressão, transferência de energia, entre outros. Estes processos podem ser radiativos ou não radiativos. Os radiativos envolvem emissão de um fóton pela molécula e os não radiativos convertem parte da energia em calor, como a conversão interna e o cruzamento intersistemas. Na figura 3 está representado o diagrama de Jablonski que ilustra os processos radiativos e não radiativos [17].

Figura 3: Diagrama de Jablonski, onde A: absorção, F: fluorescência e P: fosforescência, S: estados singlete, T: estados triplete.

A absorção de fótons por nanopartículas metálicas, em uma determinada frequência, gera um movimento coletivo do gás de elétrons da partícula, denominado de plasmon. O plasmon é uma onda de densidade de carga na superfície metálica (SPW, *surface plasmon wave*), que produz um campo elétrico perpendicular à superfície. O plasmon pode ser gerado pela irradiação de nanopartículas metálicas (colóides metálicos) dispersas em um meio, ou pela luz polarizada incidente em ângulo de máxima atenuação de reflectância quando o substrato metálico é depositado como um filme ultrafino sobre uma superfície óptica transparente. Na figura 4 pode-se observar a densidade de carga distribuída na superfície de partículas metálicas gerada pela incidência de luz.

Figura 4: Esquema do efeito plasmon em (A) partículas metálicas e (B) superfícies metálicas. Adaptado de [35].

Considerando que um fluoróforo adsorvido nas proximidades de uma nanopartícula irradiada que gera SPW, o grau de acoplamento entre o adsorbato (corante fluorescente) e o SPW dependerá da sobreposição espectral das transições eletrônicas do fluoróforo e da nanopartícula metálica (acoplamento de frequência em fase), bem como da distância entre superfície e o fluoróforo.

Como resultado, a absorvidade molar pode ter um aumento significativo e pode ocorrer um deslocamento espectral da banda de absorção. O aumento na absorção tem então uma variação de similar proporção na taxa de transição $S_1 - S_0$ por emissão de fóton (emissão espontânea), ou no valor da constante de fluorescência (k_f). Contudo, a emissão de radiação pela molécula (fluorescência) é em parte refletida e refratada pela partícula metálica que se encontra em sua vizinhança, e este acoplamento pode gerar um segundo efeito do tipo de emissão estimulada e decaimento radiativo. Por outro lado, se o acoplamento entre SPW e

dipolo molecular ocorrer a uma distância muito reduzida ($r \leq R_0$, raio de Foster para acoplamento dipolar), tem-se um efeito contrário com indução de modos de relaxação não radiativa (supressão de emissão) e aumento da taxa de desativação não radiativa, (k_{nr}). Em resumo, o rendimento quântico de um fluoróforo pode ser expresso pela equação (2) que segue abaixo, sendo uma função do efeito de SPW.

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + \sum_i k_i} \quad (2)$$

onde k_f = constante de fluorescência; $\sum k_i$ = somatório das constantes não-radiativas que desativam o estado excitado.

Entretanto, a presença de uma partícula ou superfície metálica num sistema contendo um fluoróforo pode ser representada pelo diagrama de Jablonski ilustrado abaixo, adaptado de [2].

Figura 5: Diagrama de Jablonski sem e com a presença de superfície metálica próxima ao fluoróforo [2].

E neste caso o rendimento quântico de um fluoróforo próximo à superfície metálica pode ser expresso pela equação (3):

$$\phi = \frac{k_f + k_{f,m}}{k_f + k_{f,m} + k_{nr}} \quad (3)$$

onde k_f = constante de fluorescência, $k_{f,m}$ = constante fluorescência, considerando o efeito do metal, k_{nr} = constante não radiativa [2].

Medidas fotoestacionárias possibilitam ter somente uma informação da razão entre valores de rendimentos quânticos do sistema em diferentes condições, porém medidas resolvidas no tempo propiciam a avaliação do tempo de vida (ou de distribuição de tempos de vida) e, portanto, permitem uma análise dos processos de relaxação do fluoróforo no estado excitado na presença de nanopartículas metálicas. O tempo de vida de fluorescência é expresso pela equação (4).

$$\tau = \left(k_f + \sum_i k_i \right)^{-1} \quad (4)$$

2 – OBJETIVOS

2 – Objetivos

2.1 – Preparar nanopartículas de prata em solventes orgânicos.

2.2 – Estudar a influência de nanopartículas de prata sobre as propriedades fotofísicas de duas classes de corantes, ambos com características de transferência de carga intramolecular: derivados de 9-aminoacridina (acridina I, acridina II e acridina III) e amino-coumarinas (C1, C120, C151 e C500).

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3 – Parte experimental

3.1 – Reagentes utilizados:

Borohidreto de sódio – Vetec (95%)

Nitrato de prata – J.T. Baker

Poli-(N)-vinil-2-pirrolidona (PVP) – Aldrich Co

Coumarina 120 (7-amino-4-metilcoumarina) – Sigma Co

Coumarina 151 (7-amino-4-trifluoro metilcoumarina) – Acros Organics (laser grade – 99%)

Coumarina 500 (7-etilamino-4-trifluoro metilcoumarina) – Acros Organics (laser grade – 98%)

Coumarina 1 (7-dietilamino-4-metilcoumarina) – Acros Organics (laser grade)

3.2 – Procedimento experimental:

As nanopartículas de prata foram preparadas em uma série de álcoois (metanol, etanol, n-propanol, 2-propanol, butanol, t-butanol) pela redução química de íons prata (AgNO_3) por borohidreto de sódio (NaBH_4), na presença de poli-(N)-vinil-2-pirrolidona (PVP) ($M_w = 1300 \text{ kg mol}^{-1}$), sob agitação e em baixa temperatura (banho de gelo). Na preparação, 10 mL de AgNO_3 1,0 mM foram adicionados em 10 mL de NaBH_4 5,0 mM, ambos em solução alcoólica, sob agitação vigorosa. Previamente à adição do AgNO_3 , foram adicionados 100 μL de solução de PVP 1300 kg mol^{-1} , usado como agente estabilizante, com concentração equivalente a 5 mg L^{-1} ao NaBH_4 . A preparação foi realizada em banho de gelo e com proteção à luz, como ilustrado na figura 6.

Figura 6: Esquema de preparação das nanopartículas de prata em 2-propanol.

A formação das nanopartículas de prata foi detectada pela formação de uma solução amarela obtida durante a adição de AgNO_3 e, posteriormente, confirmada através de espectroscopia de absorção e microscopia eletrônica de transmissão.

Os derivados de 9-aminoacridina (figura 7) foram sintetizados em nosso grupo segundo procedimentos descritos na literatura [27,28]. Os corantes amino-coumarinas (C1, C151, C500) foram obtidas da Acros Organics, e a C120 da Sigma Co. Todos os álcoois foram secos em peneira molecular antes do uso.

Figura 7: Estruturas moleculares dos derivados de 9-aminoacridina e das amino-coumarinas

As soluções dos corantes utilizados, amino-coumarinas e derivados de 9-aminoacridina, foram preparadas em concentrações da ordem de 10^{-5} M, para realização dos experimentos.

3.3 – Equipamentos e técnicas utilizados:

As medidas de absorção e fluorescência estacionária foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI). Os espectros de absorção foram obtidos no espectrofotômetro Cary 5G Varian e as medidas de emissão de fluorescência foram obtidas usando um espectrofluorímetro Hitachi F – 4500. Os decaimentos de fluorescência foram medidos em solução, pela técnica de contagem de fótons resolvida no tempo, usando um espectrofotômetro Edinburgh Instruments CD-900 equipado com acessórios de polarização e com fotomultiplicadora, resfriada por sistema Peltier ou um segundo espectrômetro que

possui detector mais rápido do tipo MCP-PMT (R3809U-50, Hamamatsu) resfriado por sistema Peltier. A fonte de excitação do espectrômetro é um sistema Laser constituído de Laser Verdi/Coherent 5W bombeando um Ti-Safira (Coherent Mira Modelo XW) gerando pulsos de 200 fs na região de 700 - 900 nm. Utilizando-se de um dobrador de frequência para geração de segundo harmônico tem-se pulsos para excitação na região de 380 - 420 nm, que é a região onde se encontram os comprimentos de onda de excitação das amostras estudadas. Um esquema dos espectrofotômetros está ilustrado na figura 8.

Figura 8: Esquema dos espectrômetros utilizados.

Os decaimentos de fluorescência foram analisados pelo procedimento de reconvolução, usando modelos de decaimentos exponenciais. Todas as medidas de fluorescência foram feitas usando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm em modo front-face.

As medidas de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas no Instituto de Química de Araraquara – UNESP, no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Para tais medidas foi utilizado um microscópio eletrônico Philips CM200, com tensão de aceleração de 200 kV e uma resolução em linha de 0,144 nm, capaz de fornecer imagens de campo claro, campo escuro, alta resolução e difração de elétrons. Para análise, as nanopartículas de prata foram impregnadas em uma grade de cobre recoberta por uma camada de polímero e por carbono. Em paralelo com a medida de microscopia foi realizada uma análise dispersiva de raio-X (EDX – Detector EDX Princeton Gamma Tech PGT Prism) para que se confirmasse que as partículas analisadas era de prata.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – Resultados e discussão:

4.1 – Preparação das nanopartículas de prata:

As nanopartículas de prata foram obtidas pela redução química do nitrato de prata (AgNO_3) por borohidreto de sódio (NaBH_4), em meio alcoólico. A redução do íon prata (Ag^+) pelo borohidreto de sódio ocorre segundo a equação abaixo.

As nanopartículas de prata foram preparadas em metanol, etanol, n-propanol, 2-propanol, butanol e t-butanol. A preparação em álcoois de cadeias maiores não foi possível devido à baixa solubilidade dos reagentes nos mesmos.

O monitoramento da estabilidade coloidal das nanopartículas de prata foi realizado por espectroscopia de absorção. A partir deste monitoramento, observou-se que as nanopartículas de prata se mantinham mais estáveis em 2-propanol do que nos demais álcoois.

Na figura 9 estão representados os espectros de absorção das nanopartículas de prata em etanol, butanol e t-butanol referente a um período de quatro dias.

Figura 9: Espectros de absorção das nanopartículas de prata em etanol, butanol e t-butanol.

Quando as nanopartículas de prata preparadas em álcoois são comparadas com as preparadas em meio aquoso verifica-se que há um deslocamento do máximo de absorção para a região do vermelho, ou seja, para a região de menor energia. Este deslocamento é de aproximadamente de 10 a 12 nm. A comparação dos espectros em meio aquoso e em álcoois está representada na figura 10.

Figura 10: Comparação dos espectros de absorção normalizados das nanopartículas de prata preparadas em água, 2-propanol e metanol.

As possíveis causas deste deslocamento podem ser atribuídas à presença de partículas assimétricas, como esferóides e cilindros, ou também ao maior índice de refração dos álcoois quando comparados com o índice de refração da água [26].

A partir do espectro de absorção, ainda foi possível estimar o tamanho das nanopartículas de prata. Para esta estimativa foi utilizada a Teoria de Mie-Drude [31], a qual diz que o raio médio é dado pela relação entre a velocidade de Fermi e a largura de meia altura da banda de absorção, com relação ao máximo de absorção.

$$R = \frac{v_F}{\Delta\omega_{1/2}} \quad (6)$$

onde $\Delta\omega_{1/2}$ é a largura de meia altura com relação ao máximo de absorção (em unidade de energia, cm^{-1}) e v_F é a velocidade de Fermi ($1,39 \times 10^8 \text{ cm s}^{-1}$).

O tamanho médio das nanopartículas de prata calculado pela teoria de Mie-Drude em 2-propanol foi estimado em 6 nm e para as preparadas em meio aquoso foi de 11 nm.

O raio médio das nanopartículas de prata foi ainda confirmado pela imagem obtida por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Com isso, tem-se que o raio estimado pelo cálculo, usando a teoria de Mie-Drude, está coerente com o da imagem obtida.

As imagens obtidas das nanopartículas de prata por meio de microscopia eletrônica de transmissão estão apresentadas na figura 11, onde (A) possui uma escala de 50 nm e (B) de 200 nm. Estas figuras consistem em imagens de campo claro, ou seja, obtidas pela seleção de somente um feixe direcionado de elétrons [36]. Nestas imagens é possível observar que as nanopartículas consistem em partículas globulares e polidispersas.

(A)

(B)

Figura 11: Imagens de campo claro das nanopartículas de prata em 2-propanol obtidas por microscopia eletrônica de transmissão: escala de comparação em (A) 50 nm e (B) 200 nm.

A presença das nanopartículas de prata foi ainda confirmada por meio da análise dispersiva de raio-X (EDX), representado na figura 12.

Figura 12: Espectro de EDX das nanopartículas de prata.

A energia característica entre os planos de Bragg para a prata é de aproximadamente 3 keV ($L\alpha_1$), coerente com o valor obtido no espectro da figura 12. Neste espectro também é possível observar um pico em 8 keV que é atribuído ao cobre, metal do qual é constituída a grade de análise.

4.2 – Influência das nanopartículas de prata na fotofísica de amino-coumarinas e derivados de 9-aminoacridina:

As propriedades fotofísicas de diferentes amino-coumarinas (C1, C120, C151, C500) e derivados de 9-aminoacridina (acridina I, acridina II, acridina III), corantes que apresentam transferência de carga, são moduladas pela presença de nanopartículas de prata em 2-propanol. Estes sistemas foram estudados por meio de medidas de emissão de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Neste estudo, nanopartículas de prata foram adicionadas aos corantes em concentração da ordem de micromolar (10^{-6} M).

4.2.1 – Amino-coumarinas:

A concentração de nanopartículas de prata adicionada às amino-coumarinas está no intervalo de 0 a 200 μ M, com relação à concentração analítica de prata.

Os espectros de absorção e fluorescência estacionária, com intensidades normalizadas, para as amino-coumarinas estão representados nas figuras 13, 14, 15 e 16.

Figura 13: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C1.

Figura 14: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C120.

Figura 15: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C151.

Figura 16: Espectros normalizados de absorção e fluorescência estacionária da amino-coumarina C500.

A adição das nanopartículas de prata resultou na redução da intensidade de fluorescência das amino-coumarinas estudadas. Na figura 17 está ilustrado um típico espectro deste efeito para o caso da C120.

Figura 17: Espectro de fluorescência e curva de Stern-Volmer (inserida) para a C120 em 2-propanol ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$), com adição de nanopartículas de prata. $[\text{Ag}^0]$: $0 - 9,2 \times 10^{-5} \text{ M}$.

A análise de Stern-Volmer para a coumarina C120 indica uma constante de supressão (K_{sv}) equivalente a 8810 M^{-1} e constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q) de $2,2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (calculada usando o tempo de vida de fluorescência da C120). A constante de velocidade de supressão bimolecular foi obtida segundo a equação abaixo:

$$K_{\text{SV}} = k_q \tau_0 \quad (7)$$

Para as outras amino-coumarinas C1, C151 e C500 também observou-se supressão de fluorescência, porém as curvas de Stern-Volmer não apresentaram caráter linear. Assim sendo, foram feitos ajustes polinomiais seguindo um modelo de função $y = A + B_1 x + B_2 x^2$, onde x equivale à concentração de nanopartícula de prata.

Figura 18: Curvas de Stern-Volmer das amino-coumarinas em 2-propanol, (C1 ▲), (C151 ■), (C500 ●).

As constantes de Stern-Volmer para estes corantes foram calculadas considerando somente o parâmetro B_1 , porque o parâmetro B_2 pode conter efeito de filtro de espalhamento. Este efeito se deve a ocorrência de absorção de emissão.

Os valores das constantes de Stern-Volmer (no caso valores de B_1) para as amino-coumarinas C1, C151 e C500 são 12600 M^{-1} , 11400 M^{-1} e 5800 M^{-1} , respectivamente.

Medidas de decaimentos de fluorescência das amino-coumarinas C120, C151, C500 e C1 estão representados nas figuras 19, 20 e 21.

Figura 19: Decaimento de fluorescência da amino-coumarina C120 em 2-propanol, $\tau = 4,1$ ns

($\lambda_{\text{exc}} = 401$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 425$ nm), (■) IRF, (O) decaimento, (—) ajuste exponencial.

Figura 20: Decaimento de fluorescência da amino-coumarina C500 em 2-propanol, $\tau = 5,7$ ns

($\lambda_{\text{exc}} = 401$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 490$ nm), (■) IRF, (O) decaimento, (–) ajuste exponencial.

Figura 21: Decaimentos de fluorescência das amino-coumarinas C151 (□) ($\lambda_{\text{em}} = 475$ nm),

$\tau = 5,3$ ns e C1 (▲) ($\lambda_{\text{em}} = 445$ nm) $\tau = 3,5$ ns, em 2-propanol ($\lambda_{\text{exc}} = 401$ nm), (■) IRF, (–) ajuste exponencial.

Todas as amino-coumarinas apresentaram comportamento monoexponencial. Os valores dos tempos de vida referentes aos corantes estão apresentados na tabela I e estão de acordo com os valores descritos na literatura [22, 33].

Os valores dos tempos de vida para as amino-coumarinas permaneceram constantes com a adição de nanopartículas de prata, o que é um indicativo de que a supressão observada é considerada estática [19]. Além disso, os valores das constantes de velocidades de supressão bimolecular calculadas são $3,6 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $2,2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para C1, C151 e C500, respectivamente, ou seja, são da ordem de $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, estando acima do limite difusional.

A supressão estática pode ser descrita pela associação da amino-coumarina com a nanopartícula de prata, por meio da complexação do metal com o grupo amino. Neste caso, uma única nanopartícula de prata pode estar complexada com mais de uma molécula de corante e desta forma a fração remanescente de moléculas de corante livres na solução diminui com o aumento da concentração de nanopartículas de prata.

Entretanto, se a distribuição das moléculas de corante na superfície das nanopartículas de prata seguir uma estatística ideal de Poisson, tal como no particionamento clássico e na supressão de fluorescência em micelas [32], a intensidade relativa I_0 / I apresentará comportamento linear com a variação da concentração de nanopartícula de prata.

Quando ligados na superfície metálica, os corantes apresentam supressão de fluorescência praticamente completa devido à rápida transferência de energia para a nanopartícula produzindo uma supressão estática. Contudo, este modelo ainda não explica a curvatura observada e tal efeito pode ser relacionado à ação de uma esfera de supressão maior [19], que pode ser devido à forte interação dipolo-dipolo da nanopartícula metálica com alguns corantes próximos à superfície, mas não totalmente associados. Desta forma, podemos

dizer que as amino-coumarinas geram um estado de transferência de carga intramolecular. Além disso, o estado de ICT possui um momento de transição dipolar relativamente alto, o que pode favorecer ao acoplamento dipolar com a supressão por transferência de energia.

Figura 22: Ilustração do acoplamento dipolar da nanopartícula de prata com a molécula de corante.

Por outro lado, a capacidade das amino-coumarinas em fazer ligações de hidrogênio aliada com a rápida desativação do estado ICT, em ambientes polares próticos, pode contribuir também para a supressão estática.

A interação das nanopartículas de com as amino-coumarinas está apresentada na figura 23.

Figura 23: Espectros de normalizados das amino-coumarinas, onde (A) C500, (B) C151, (C) C120 e (D) C1.

Nesta figura é possível observar a sobreposição da banda de absorção das nanopartículas de prata com a banda de emissão das amino-coumarinas, denotando que a supressão pode ser causada pela transferência de energia não radiativa. Fazendo uma comparação entre as amino-coumarinas, observa-se que a sobreposição das bandas é maior para as amino-coumarinas C120 e C1 do que para as C151 e C500. Porém, não se pode correlacionar esta mesma analogia com a intensidade de supressão, ou seja, os valores das constantes de Stern-Volmer não obedecem esta mesma ordem.

Para os derivados de 9-aminoacridina também se observou uma interação entre a banda de absorção da nanopartícula de prata com a banda de emissão dos derivados de 9-aminoacridina, que está ilustrado na figura 24.

Figura 24: Espectros normalizados para os derivados de 9-aminoacridina, onde (A) acridina I, (B) acridina II e (C) acridina III.

Comparando a interação da banda de absorção da nanopartícula de prata com a banda de emissão dos corantes estudados observa-se que há uma maior sobreposição das bandas para as amino-coumarinas do que para os derivados de 9-aminoacridina. Este efeito, neste caso, pode estar relacionado com a intensidade de supressão, que é maior para as amino-coumarinas.

Na tabela I estão listados os valores dos tempos de vida de fluorescência, com as respectivas porcentagens relativas, as constantes de Stern-Volmer e os comprimentos de onda de emissão para os corantes estudados em 2-propanol. Os tempos de vida são referentes a uma média dos valores obtidos das medidas realizadas, sem e com adição de nanopartículas de prata, uma vez que estes valores não apresentaram mudança significativa.

Tabela I: Constantes de Stern-Volmer (Ksv), tempo de vida (τ) e máximos de emissão de fluorescência dos corantes em 2-propanol / Ag⁰.

Corantes	Ksv (M ⁻¹)	τ_1 (ns)	Rel (%)	τ_2 (ns)	Rel (%)	λ_{em} (nm)
C1	12600	3,5	100	-	-	445
C120	8810	4,1	100	-	-	425
C151	11400	5,3	100	-	-	475
C500	5800	5,7	100	-	-	490
acridina I	6690	2,2	97	6,3	3	470
acridina II	825	1,4	94	8,0	6	525
acridina III	660	1,4	91	8,5	9	520

Concentração dos derivados de acridina: $2,0 \times 10^{-5}$ M e das coumarinas: $3,7 \times 10^{-5}$ M ($\lambda_{exc} = 401$ nm).

4.2.2 – Derivados de 9-aminoacridina:

Para os derivados de 9-aminoacridina também foi estudada a modulação das propriedades fotofísicas devido à presença de nanopartículas de prata em solução de 2-propanol.

Os espectros de absorção e de emissão de fluorescência estacionária, com intensidades normalizadas, estão ilustrados nas figuras 25, 26 e 27.

Figura 25: Espectros normalizados de absorção e emissão do derivado acridina I.

Figura 26: Espectros normalizados de absorção e emissão do derivado acridina II.

Figura 27: Espectros normalizados de absorção e emissão do derivado acridina III.

Para o corante acridina I, a adição de nanopartículas de prata não afeta o perfil espectral de absorção. O que se observa é apenas o aumento da intensidade de absorção na região da absorção da nanopartícula de prata devido à adição da mesma.

Figura 28: Espectros de absorção do corante acridina I em 2-propanol com adição de nanopartículas de Ag^0 . $[\text{Ag}^0]$: $0 - 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Para a acridina I observou-se supressão de fluorescência, com a adição de nanopartícula de prata em 2-propanol, como ilustrado na figura 29. A curva de Stern-Volmer, que está ilustrada na figura 30, apresentou comportamento linear. A constante de Stern-Volmer calculada para a acridina I é igual a 6690 M^{-1} . Este valor apresenta ordem de grandeza dentro da escala dos valores encontrados para as amino-coumarinas.

Figura 29: Diminuição de intensidade de fluorescência, supressão de fluorescência, da acridina I com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: 0 – $2,5 \times 10^{-5}$ M.

Figura 30: Curva de Stern-Volmer para acridina I com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: 0 – $2,5 \times 10^{-5}$ M.

O estudo de fluorescência resolvida no tempo para a acridina I foi realizado com a adição de nanopartículas de prata, em 2-propanol. Este corante apresentou comportamento biexponencial, $\tau_1 = 2,2$ ns e $\tau_2 = 6,3$ ns, como ilustrado na figura 31.

Figura 31: Decaimento de fluorescência do corante acridina I, $\tau_1 = 2,2$ ns e $\tau_2 = 6,3$ ns ($\lambda_{em} = 470$ nm), em 2-propanol ($\lambda_{exc} = 401$ nm), (■) IRF, (O) decaimento, (–) ajuste exponencial.

O composto acridina I não apresentou variação do tempo de vida com a adição de nanopartículas de prata. Desta forma, pode-se dizer que a supressão apresentada é considerada estática. Contrastando com o comportamento apresentado pela acridina I, os compostos acridina II e acridina III têm seu espectro de absorção afetado pela adição de nanopartículas de prata. Os espectros de absorção dos compostos acridina II e III estão ilustrados nas figuras 32 e 33, respectivamente.

Figura 32: Espectros de absorção da acridina II em 2-propanol com adição de nanopartículas de Ag^0 . $[\text{Ag}^0]$: $0 - 1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Figura 33: Espectros de absorção da acridina III em 2-propanol com adição de nanopartículas de Ag^0 . $[\text{Ag}^0]$: $0 - 8,0 \times 10^{-5} \text{ M}$.

É possível observar a presença de um ponto isosbético, em ambos espectros, que está localizado aproximadamente em 458 nm, para os dois compostos estudados. O ponto isosbético indica a presença de duas espécies em equilíbrio. Essas espécies, neste caso, podem ser atribuídas ao derivado livre de 9-aminoacridina na solução (com banda de ICT óptico com máximo em 480 nm) e ao corante deprotonado adsorvido na superfície da nanopartícula de prata (que neste caso teria sua absorção deslocada para a região do azul). Esta distribuição pode ser feita considerando dados citados na literatura de que a associação do corante derivado de 9-aminoacridina com nanopartículas de prata ocorre pela forte interação do N endocíclico do cromóforo com a deprotonação do corante [34].

Os compostos acridina II e acridina III mostraram comportamentos diferentes da acridina I, com relação à intensidade de fluorescência quando adicionado nanopartículas de prata. A princípio, a intensidade de fluorescência destes compostos sofre um aumento. E, com a adição sucessiva de nanopartículas de prata, aumento da concentração de prata, começa a ocorrer supressão de fluorescência, como ilustrado na figura 34 e 35, para a acridina II e III, respectivamente. Este comportamento dual também é observado quando a excitação é realizada no ponto isosbético, onde a densidade óptica permanece constante.

Figura 34: Aumento de intensidade de fluorescência (A) e supressão (B) da acridina II com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: (A) 0 – $1,2 \times 10^{-5}$ M e (B) $1,2 \times 10^{-5}$ – $1,4 \times 10^{-4}$ M.

Figura 35: Aumento de intensidade de fluorescência (A) e supressão (B) da acridina III com adição de Ag^0 em 2-propanol. $[\text{Ag}^0]$: (A) $0 - 6,4 \times 10^{-5}$ M, e (B) $6,4 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-4}$ M.

A comparação do efeito dual para estes dois compostos está ilustrada na figura 36, onde as intensidades relativas integradas estão como função da concentração das nanopartículas de prata. O aumento inicial da intensidade relativa de fluorescência para os compostos acridina II e acridina III ocorre por um fator de 6,0 e 2,5 vezes, respectivamente.

Figura 36: Comparação do aumento da eficiência de fluorescência entre os compostos acridina II (■), acridina III (▲) e diminuição da acridina I (●).

Como o rendimento quântico destes compostos é baixo, em torno de 0,1 [28], o aumento de fluorescência pode ser devido ao efeito de ressonância de plasmon sobre o estado excitado ICT, promovendo um aumento da taxa radiativa (efeito plasmon metálico acoplado com emissão) e conseqüentemente o aumento de eficiência de fluorescência. Entretanto o estudo de fluorescência resolvido no tempo realizado indicou componentes de tempo de

decaimento praticamente constantes com a adição de nanopartículas de prata, ou seja, o tempo de vida médio foi constante. Assim, se o efeito plasmon ocorre, ele deve ser mínimo.

Em altas concentrações de nanopartículas de prata ocorre a diminuição da intensidade de fluorescência, ou seja, supressão de fluorescência. As curvas de Stern-Volmer para estes compostos estão representados na figura 37 e os valores das constantes estimadas são de 825 M^{-1} e 660 M^{-1} para a acridina II e acridina III, respectivamente.

Figura 37: Comparação das curvas de Stern-Volmer entre os compostos acridina II (■) e acridina III (▲).

Os compostos acridina II e III apresentaram comportamento biexponencial, com os valores dos tempos de vida equivalentes a $\tau_1 = 1,4 \text{ ns}$ e $\tau_2 = 8,0 \text{ ns}$ para acridina II e $\tau_1 = 1,4 \text{ ns}$ e $\tau_2 = 8,5 \text{ ns}$ para acridina III.

Figura 38: Decaimento de fluorescência do corante acridina II $\tau_1 = 1,4$ ns e $\tau_2 = 8,0$ ns ($\lambda_{em} = 525$ nm), em 2-propanol ($\lambda_{exc} = 401$ nm), (■) IRF, (□) decaimento, (—) ajuste exponencial.

Figura 39: Decaimento de fluorescência do corante acridina III $\tau_1 = 1,4$ ns e $\tau_2 = 8,5$ ns ($\lambda_{em} = 520$ nm), em 2-propanol ($\lambda_{exc} = 401$ nm), (■) IRF, (Δ) decaimento, (—) ajuste exponencial.

Os três derivados de 9-aminoacridina também apresentaram decaimento biexponencial em solvente puro (2-propanol). Este comportamento é atribuído a uma interconversão entre um único estado excitado e o estado ICT [27,28]. A formação do estado ICT ocorre pela presença de grupos retiradores de elétrons como CN e CO, localizados nos substituintes aminovinílicos do fluoróforo 9-aminoacridina.

Um efeito inesperado apresentado no estudo estacionário, ilustrado pela figura 34, é que a banda LE apresentou supressão (banda estruturada fraca em torno de 400 nm) em todo o intervalo de concentração de nanopartícula de prata. Considerando isto, pode-se dizer que o aumento da intensidade de fluorescência pode estar relacionado a uma rápida interconversão do estado S_1 para o estado excitado ICT, o que não resultaria numa apreciável mudança do tempo de vida do estado ICT, mas sim no aumento da população deste estado, promovendo uma maior intensidade da banda de emissão observada na região do vermelho.

Existe ainda outro ponto a ser considerado na influência que as nanopartículas de prata provocam nos corantes estudados, mais especificamente nos compostos acridina II e acridina III. A solução de nanopartícula de prata, que é adicionada aos corantes, é ligeiramente básica devido à presença de um produto lateral remanescente da preparação que é o borohidreto / borato ($BH_4^- / B(OH_3)^-$). Estes ânions podem associar-se parcialmente com o polímero PVP e então assistir a deprotonação do corante próximo à nanopartícula de prata, como foi discutido.

5 – CONCLUSÃO

5 – Conclusão:

Obteve-se sucesso na preparação da nanopartículas de prata em álcoois. Onde estas apresentaram maior estabilidade em 2-propanol, na presença de PVP 1300 kg mol^{-1} . Em uma segunda etapa estudou-se as propriedades fotofísicas dos corantes amino-coumarinas e derivados de 9-aminoacridina na presença de nanopartículas de prata.

As amino-coumarinas e derivados de 9-aminoacridina apresentaram mudança na intensidade de fluorescência devido à presença de nanopartículas de prata, em 2-propanol.

Para as amino-coumarinas observou-se supressão de fluorescência, sendo que os tempos de vida de fluorescência não apresentaram variação com a adição das nanopartículas de prata, indicando portanto supressão estática. A supressão apresentada pode ser devido à interação das moléculas de corante com as nanopartículas de prata, promovendo uma rápida e eficiente desativação não-radiativa do estado excitado.

O composto acridina I apresentou comportamento semelhante às amino-coumarinas, ou seja, supressão estática de fluorescência. Os compostos acridina II e acridina III apresentaram comportamento dual, ou seja, em baixa concentração de nanopartículas de prata observou-se um aparente aumento da eficiência de fluorescência de aproximadamente 6 e 2,5 vezes para a acridina II e III, respectivamente. E, em alta concentração de nanopartículas de prata observou-se supressão de fluorescência. O aparente aumento pode ser atribuído a uma maior formação do estado ICT e não somente ao acoplamento plasmon-estado excitado.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – Referências Bibliográficas:

- [1] KAMAT, P.V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, p. 7729-7744, 2002.
- [2] LAKOWICZ, J.R. Radiative decay engineering. **Analytical Biochemistry**, v. 298, p. 1-24, 2001.
- [3] LAKOWICZ, J.R.; SHEN, Y.; D'AURIA, S.; MALICKA, J.; FANG, J.; GRZYCZYNSKI, Z.; GRZYCZYNSKI, I. Radiative decay engineering: 2: Effects of silver islands films on fluorescence intensity, lifetimes, and resonance energy transfer. **Analytical Biochemistry**, v. 301, p. 261-277, 2002.
- [4] LAKOWICZ, J.R. Radiative decay engineering 3: Surface plasmon-coupled directional emission. **Analytical Biochemistry**, v. 324, p. 153-169, 2004.
- [5] ASLAN, K.; GRZYCZYNSKI, I.; MALICKA, J.; LAKOWICZ, J.R.; GEDDES, C.D. Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. **Current Opinion Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 55 – 62, 2005.
- [6] ASLAN, K.; HOLLEY, P.; DAVIES, L.; LAKOWICZ, J.R.; GEDDES, C.D. Angular-ratiometric plasmon-resonance based light scattering for bioaffinity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 12115 – 12121, 2005
- [7] MACHULEK, A.J.; OLIVEIRA, H.P.M.; GEHLEN, M.H. Preparation of silver nanoprisms using poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) as a colloid stabilizing agent and the effect of silver nanopartilces on the photophysical properties of cationic dyes. **Photochemical and Photobiology Science**, v. 2, p. 921-925, 2003.
- [8] ZHAO, S.Y.; CHEN, S.H.; LI, D.G.; YANG, X.G.; MA, H.Y. A convenient phase transfer route for Ag nanoparticles. **Physica E**, v. 23, p. 92-96, 2004.
- [9] KUMAR, A.; JOSHI, H.; PASRICHA, R.; MANDALE, A.B.; SASTRY, M. Phase transfer of silver nanoparticles from aqueous to organic solutions using fatty amine molecules. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 264, p. 396-401, 2003.
- [10] CORRIGAN, T.D.; GUO, S.; PHANEUF, R. J.; SZMACINSKI, H. Enhanced Fluorescence from Periodic Arrays of Silver Nanoparticles. **Journal of Fluorescence**, v. 15 n. 5, p. 777-784, 2005.

- [11] ASLAN, K.; MALYN, S.N.; GEDDES, C.D. Metal-enhanced fluorescence from gold surfaces: Angular dependent emission. **Journal of Fluorescence**, v. 17, p. 7-13, 2007.
- [12] ZHANG, J.; MATVEEVA, E.; GRYCZYNSKI, I.; LEONENKO, Z.; LAKOWICZ, J.R. Metal-enhanced fluoroimmunoassay on a silver film by vapor deposition. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 7969-7975, 2005.
- [13] ZHANG, J.; MALICKA, J.; GRYCZYNSKI, I.; LAKOWICZ, J.R. Surface-enhanced fluorescence of fluorescein-labeled oligonucleotides capped on silver nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 7643-7648, 2005.
- [14] HAES, A.J.; STUART, D.A.; NIE, S.; VAN DUYN, R.P. Using solution-phase nanoparticles, surface-confined nanoparticle arrays and single nanoparticles as biological sensing platforms. **Journal of Fluorescence**, v. 14, p. 355-367, 2004.
- [15] AROCA, R.; KOVACS, G.J.; JENNINGS, C.A.; LOUTFY, R.O.; VICENT, P.S. Fluorescence enhancement from Langmuir-Blodgett monolayers on silver island films. **Langmuir**, v. 4, p. 518-521, 1988.
- [16] JIN, R.; CAO, Y.W.; MIRKIN, C.A.; KELLY, K.L.; SCHATZ, G.C.; ZHENG, J.G. Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms. **Science**, v. 294, p. 1901-1903, 2001.
- [17] LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1986.
- [18] COTTON, T. M.; UPHAUS, R. H.; MOBIUS, D. J. Distance dependence of surface-enhanced resonance Raman enhancement in langmuir-blodgett dye multilayers. **Journal of Physical Chemistry**, v. 90, p. 6071-6073, 1986.
- [19] LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2. ed., New York: Kluwer Academic/Plenum Press, 1999. cap. 8.
- [20] KIM, S. H.; HAN, S.K.; JANG, G.S.; KOH, K.N.; KANG, S.W.; KEUM, S.R.; YOON, C.M. Surface plasmon resonance study on the interaction of a dithiosquarylium dye with metals ions. **Dyes and Pigments**, v. 44, p. 169-173, 2000.
- [21] FRUTOS, A. G.; CORN, R. M. SPR of ultrathin organic films. **Analytical Chemistry**, v. 70, n.13, p. 449A-455A, 1998.

- [22] CONSTANTINO, C.J.L.; AROCA, R. F.; MENDONÇA, C.R.; MELLO, S.V.; BALOGH, D.T.; OLIVEIRA JR, O.N. Surface enhanced fluorescence and Raman imaging of Langmuir-Blodgett azopolymer films. **Spectrochimica Acta Part A – Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 57, p. 281-289, 2001.
- [23] MACHULEK, A. J. Fluorescência de corantes por interação de ressonância de plasmon, 2002. 91 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [24] BARIK, A.; KUMBHAKAR, M.; NATH, S.; PAL, H. Evidence for the TICT mediated nonradiative deexcitation process for the excited coumarin-1 dye in high polarity protic solvents. **Chemical Physics**, v. 315, p. 277-285, 2005.
- [25] PEREIRA, R. V. Transferência de carga e ligação de hidrogênio intramolecular em derivados de 9-aminoacridina, 2006. 102 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [26] GRABOWSKI, Z. R.; ROTKIEWICZ, K. Structural Changes Accompanying Intramolecular Charge Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge Transfer State and Structures. **Chemical Review**, v. 103, p. 3899-4031, 2003.
- [27] PEREIRA, R.V.; FERREIRA, A.P.G.; GEHLEN, M.H. Excited-state intramolecular charge transfer in 9-aminoacridine derivative. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 109, p. 5978-5983, 2005.
- [28] PEREIRA, R.V.; GEHLEN, M.H. Photoinduced intramolecular charge transfer in 9-aminoacridinium derivatives assisted by intramolecular H-bond. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, p. 7539-7546, 2006.
- [29] HAO, E.; SCHATZ, G.C.; HUPP, J.T. Synthesis and optical properties of anisotropic metal nanoparticles. **Journal of Fluorescence**, v. 14, p. 331-341, 2004.
- [30] SÖNNICHSEN, C.; GEIER, S.; HECKER, N.E.; VON PLESSSEN, G.; FELDMANN, J.; DITLBACHER, H.; LAMPRECHT, B.; KRENN, J.R.; AUSSENEGG, F.R.; CHAN, V.Z-H; SPATZ, J.P.; MÖLLER, M. Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 77, p. 2949-2951, 2000.

[31] HAYKAWA, T.; SELVAN, S.T.; NOGAMI, M. Enhanced fluorescence from Eu⁺³ owing to surface plasma oscillation of silver particles in glass. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 259, p. 16-22, 1999.

[32] GEHLEN, M.H.; DE SCHRYVER, F.C. Time resolved fluorescence quenching in micellar assemblies. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 199-221, 1993.

[33] DAS, H.; JAIN, B.; PATEL, H.S. Hydrogen bonding properties of coumarin 151, 500 and 35: the effect of substitution at 7-amino position. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, p. 1698-1704, 2006.

[34] RIVAS, L.; MURZA, A. SÁNCHEZ-CORTÉS, S. GARCÍA-RAMOS, J.V. Adsorption of acridine drugs on silver surface-enhanced resonance Raman evidence of the existence of different adsorption sites. **Vibrational Spectroscopy**, v. 25, p. 19-28, 2001.

[35] LAKOWICZ, J. R. Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 2, p. 171-194, 2005.

[36] WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. Transmission Electron Microscopy, Imaging III. Plenum Press, New York, vol. 3, 1996.

[37] BORODKO, Y.; HUMPHREY, S. M. TILLEY, T. D.; FREI, H. SOMORJAI, G. A. Charge-Transfer Interaction of Poly(vinylpyrrolidone) with Platinum and Rhodium Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 6288-6295, 2007.