Aline Monteiro Lino

Síntese, caracterização, estudos fotofísicos e acompanhamento *in situ* da reação de formação do corante (*E*)-2-[3-[4-(difenilamina)-fenil]-1-(*p*-tolil)-alilideno] malononitrila por microscopia de fluorescência

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, sem os quais eu não seria ninguém. E que eu ainda possa fazê-los se orgulharem muito das minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a força que me deu nas fases mais difíceis e por permitir que este momento chegasse.

Aos meus pais e meu irmão por todo o apoio e amor durante estes anos.

Ao meu marido Alexandre pelo apoio incondicional, por confiar no meu potencial e nunca me deixar desistir.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen pelos vários anos de orientação, oportunidades, conselhos e aprendizagem.

Ao corpo docente, discente, técnico e administrativo do IQSC-USP.

Aos amigos que fazem parte ou já fizeram do Grupo de Fluorescência Molecular: Anderson, Tiago, Milena, Carol, Jéssica e Rafael. E ao técnico Diego, pelas constantes ideias e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos B. Burtuloso, pela ajuda na interpretação de espectros, na elucidação de mecanismos de reações e por disponibilizar o Laboratório de Síntese Orgânica para purificação de algumas reações, com a ajuda da aluna Gabriela Pilli.

Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, por ajudar a interpretar espectros de RMN, pelos conselhos no desenvolvimento de alguns experimentos e por permitir o uso de seus equipamentos de HPLC para separação e caracterização do produto. Agradeço também ao Mário, aluno de pós-doutorado do Prof. Roberto, que me acompanhou nas etapas que foram feitas no Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos.

Ao Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda, pela ajuda na obtenção das nanopartículas de óxido de magnésio.

Ao Willy Glen, aluno de pós-doutorado do Grupo de Química Inorgânica e Analítica, por fazer os experimentos de espectroscopia de absorção de transientes e os cálculos teóricos, e ao Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso por permitir a utilização dos equipamentos necessários.

A todos os amigos que me apoiaram durante a execução desse projeto, em especial a Marcela e o Thiago que, mesmo com a distância, sempre estiveram presentes.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há aqueles que lutam vários anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam durante toda a vida.
Estes são imprescindíveis.”*

Berthold Brech

RESUMO

Neste trabalho foi sintetizado o corante (*E*)-2-[3-[4-(difenilamina)-fenil]-1-(*p*-tolil)-alilideno]-malononitrila (DFTAM), a partir da reação de condensação entre 4-(difenilamino)-benzaldeído e 2-[1-(4-metilfenil)-etilideno]-malononitrila, com catálise básica de piperidina. O produto obtido foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e caracterizado pelas técnicas de espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Para estudar suas propriedades fotofísicas, espectros de absorção e emissão de fluorescência, decaimento de fluorescência e espectro de absorção de transientes foram feitos em diferentes solventes, variando-se a polaridade e viscosidade do meio. Duas bandas de absorção foram observadas, uma em 303 nm e outra em cerca de 490 nm, a qual apresentou deslocamento batocrômico com o aumento da polaridade do solvente. Para essa região de excitação a banda de emissão variou entre 517 e 630 nm, com o aumento da polaridade do meio. Os decaimentos de fluorescência mostraram duas componentes, uma na ordem de picossegundos e a outra de nanossegundos. Os experimentos de absorção de transientes apresentaram três espécies, uma mais longa (maior que 10 ms) e duas outras de cerca 2 e 22 μs . Surfactantes catiônicos, não iônico, e aniônico também foram usados para produzir micelas e fazer os experimentos já citados. Pôde-se observar que o corante interagiu com as micelas, melhorando sua fluorescência e aumentando o tempo de vida do estado singleto. Por fim, acompanhou-se *in situ*, através da técnica de microscopia TIRF, a reação de formação de DFTAM a nível *single molecule* com catalise básica de nanopartículas de MgO e lamínulas de vidro funcionalizadas com piperazina. Através da intermitência de fluorescência dos filmes feitos de ambas as amostras, observou-se a formação de moléculas do corante através de ciclos de catálise da piperazina.

Palavras-chave: fluoróforo orgânico, transferência de carga intramolecular, microscopia TIRF, *single molecule*, catálise básica.

ABSTRACT

In this project the synthesis of (E) -2- [3- [4- (diphenylamine) phenyl] -1- (p-tolyl) - allylidene] -malononitrile (DFTAM) dye, from the condensation reaction between 4- (diphenylamino) benzaldehyde and 2- [1- (4-methylphenyl) ethylidene]-malononitrile using piperidine basic catalysis has been achieved. The dye was purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) and characterized by mass spectrometry, nuclear magnetic resonance ^{13}C and ^1H and Fourier Transform infrared spectroscopy techniques. To study DFTAM photophysical properties, absorption and fluorescence emission spectra, fluorescence decay and transient absorption spectrum were recorded in solvents with different polarity and viscosity. Two absorption bands of DFTAM were observed, the first one at 303 nm was solvent independent while the second one at about 490 nm, had bathochromic shift with increasing polarity of the medium. In the visible region of excitation the maximum of the dye emission band observed varied between 517 and 630 nm, upon increasing solvent polarity. Fluorescence decays showed two distinct components, a fast one in picosecond time scale and a slow one in nanoseconds. Transient absorption experiments indicated the presence of three species with different lifetimes, one longer than 10 ms and the other two with lifetimes about 2 and 22 μs . Cationic, nonionic, anionic surfactants were also used to produce micelles for easy solubilization of DFTAM. It was observed that the dye interacted with the micelles, improving its fluorescence yield and lifetime. Finally, the DFTAM formation reaction was monitored *in situ* by TIRF wide field microscopy technique at single molecule level. The basic catalysis was tested for MgO nanoparticles and glass surface functionalized with bound piperazine. Through the fluorescence intermittency time trace obtained from TIRF movies, the discrete formation of dye molecules was only observed in the case of piperazine catalytic cycles.

Keywords: organic fluorophore, intramolecular charge transfer, TIRF microscopy, single molecule, basic catalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Jablonski mostrando os níveis eletrônicos de moléculas orgânicas e as possíveis transições entre os diferentes estados singlete e triplete..	20
Figura 2 - Estruturas químicas de algumas moléculas orgânicas fluorescentes, juntamente com comprimento de onda de emissão correspondente	21
Figura 3 - Curva de energia potencial versus distância nuclear, exemplificando o Princípio de Franck-Condon, mostrando as probabilidades de transição eletrônica em função da distância entre os núcleos dos átomos.	23
Figura 4 - Níveis de energia em orbitais moleculares e possíveis transições eletrônicas comuns em moléculas orgânicas	24
Figura 5 - Diagrama de energia potencial dos estados eletrônicos LE e TCIT.	26
Figura 6 - Estrutura da 4-dimetilaminobenzonitrila (DMABN), destacando a região onde ocorre a torção..	26
Figura 7 - Esquema do processo de transferência de carga intramolecular torcida (TCIT).	27
Figura 8 - Espectros de emissão da DMABN em diferentes solventes..	27
Figura 9 - Deslocamento batocrômico e hipsocrômico do estado fundamental e excitado.	29
Figura 10 - Diagrama de energia da interação entre grupos doador/aceptor ligados num sistema π conjugado	30
Figura 11 - Estrutura química do grupo trifenilamina.	32
Figura 12 - Imagens de microscopia de campo largo (widefield) de reações de catálise em partículas de LDH. (a) e (b) são exemplos das regiões onde acontece a transesterificação, variando-se a concentração de precursores. (c) mostra regiões catalíticas que promovem hidrólise e (d) mostra a intensidade de um spot acumulado no mesmo cristal numa sequência de imagens. Escala da barra: 5 μm .	34
Figura 13 - a) Imagem de microscopia widefield de partículas de Ti-MCM-41 (indicadas pelos círculos vermelhos), na presença dos dois reagentes. A seta amarela aponta para um spot fluorescente, caracterizando um evento de turnover. b) À esquerda: Alargamento do local de emissão, representando uma	

molécula do fluorógeno. Direita: Montagem do perfil de intensidade com uma função Gaussian 2D que produz a posição central (x, y) (ponto vermelho) de uma única partícula emissora no plano focal...	36
Figura 14 - Detalhe da configuração óptica para TIRF na objetiva do microscópio.	39
Figura 15 - Esquema da reação de formação do composto DFTAM (3), partindo dos precursores 4- (difenilamino) benzaldeído (1) e 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila (2).....	42
Figura 16 - Esquema do aparato experimental usado na fluorescência resolvida no tempo.....	46
Figura 17 - Suporte montado para acompanhamento de reações em solução no microscópio, com controle de atmosfera.....	48
Figura 18 - Esquema do procedimento para funcionalização das lamínulas com piperazina. As estruturas azuis representam as lamínulas.	49
Figura 19 - Esquema óptico da configuração do microscópio widefield. BFP: distância focal traseira, CAA: conjunto óptico de acoplamento na câmera, CU: unidade de controle, DF: filtro dicróico, EXP: expensor de feixe, IR: diafragma Íris, M: espelho, MM:espelho móvel, NF:filtro notch, OB: lente objetiva, P: prisma, PFD: dubleto pré-focalizador, S: amostra, W: placas de onda, EF: filtro de excitação	51
Figura 20 - Esquema do mecanismo de reação de formação do composto DFTAM (4), partindo dos precursores 4- (difenilamino) benzaldeído (3), 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila (1) e piperidina (2).....	53
Figura 21 - Precursores usados na reação,sendo (a) 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila; (b) 4- (difenilamino) benzaldeído e (c) o produto DFTAM.....	53
Figura 22 - Estrutura química do corante DFTAM numerada para análise dos dados obtidos por RMN.....	54
Figura 23 - Espectro de RMN ^1H do produto DFTAM.....	55
Figura 24 - Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN ^1H do produto DFTAM.....	55
Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C do produto DFTAM	56
Figura 26 - Ampliação da região dos carbonos sp^2 do espectro de RMN ^{13}C do produto DFTAM.....	57

Figura 27 - Cromatograma HPLC-ELS-MS do corante. A- Cromatograma HPLC-MS; B- Cromatograma HPLC-PDA; C-Espectro de Massas.....	59
Figura 28 - Espectro de infravermelho do corante DFTAM.	60
Figura 29 - Espectros normalizados de absorção (a) e emissão (b) do corante DFTAM em EtOH (—), MCH (—), ACN (—), THF (—), 1-BuOH (—), 2-PrOH (—), MeOH (—).O círculo representa a ampliação dos máximos da banda de TCI.....	62
Figura 30 - Estrutura canônica do corante DFTAM no processo de transferência de carga total.	64
Figura 31 - Deconvolução dos espectros de emissão de fluorescência do corante DFTAM em diferentes solventes	66
Figura 32 - Decaimentos de fluorescência em (a) MCH, (b) THF, (c) 1-BuOH, (d) EtOH, (e) 2-PrOH, (f) MeOH, (g) ACN, com excitação em 400 nm	68
Figura 33 - Estrutura química dos surfactantes CTAC, CPC, Tween 20 e SDS.	71
Figura 34 - Espectros de absorção e emissão dos sistemas micelares contendo o corante DFTAM numa concentração de 10^{-5} mol L ⁻¹	72
Figura 35 - Representação da estrutura bidimensional de uma micela.	73
Figura 36 - Deconvolução dos espectros de emissão de fluorescência em meio micelar.....	75
Figura 37 - Decaimentos de fluorescência do corante DFTAM numa concentração de 10^{-5} mol L ⁻¹ em (a) CTAC, (b) CPC, (c) Tween 20, (d) SDS, com excitação de 400 nm.	76
Figura 38 - Espectros de absorção de transientes e curvas de decaimento do estado excitado triplete do corante DFTAM em (a,b) MCH, (c,d) THF, (e,f) 1-BuOH, (g,h) 2-PrOH, (i,j) EtOH, (l,m) ETG.	77
Figura 39 - Espectros de absorção de transientes e curvas de decaimento do estado excitado triplete do corante DFTAM em (a,b) CTAC. (c,d) CPC, (e,f) Tween 20, (g,h) SDS.....	81
Figura 40 - Orbitais moleculares de fronteira para o estado singlete no vácuo.	83
Figura 41 - Orbitais moleculares de fronteira para o estado triplete no vácuo..	84

Figura 42 - Densidade de spin e de elétron do estado triplete do corante DFTAM. A escala mostra o aumento na densidade de elétrons, do azul para o vermelho.....	85
Figura 43 - Correlação do vetor do momento de dipolo da estrutura do estado singlete e triplete do corante DFTAM.	85
Figura 44 - a) Difrátograma de raios X da amostra de óxido de magnésio, b) Gráfico de EDX de uma partícula de MgO.....	86
Figura 45 - Imagem média do filme para acompanhar a reação <i>in situ</i> com MgO como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm	88
Figura 46 - Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 45. O limite (<i>threshold</i>) está representado pela linha pontilhada em 3500 contagens..	88
Figura 47 - Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 45.....	88
Figura 48 - Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência (Figura 46)..	89
Figura 49 - Imagem média do filme para acompanhar a reação <i>in situ</i> com piperazina como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm	91
Figura 50 - (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 49. O limite (<i>threshold</i>) está representado pela linha pontilhada em 2300 contagens e a seta vermelha indica o momento em que os reagentes foram injetados, (b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 49.....	91
Figura 51 - Imagem média do filme para acompanhar a reação <i>in situ</i> com piperazina como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm	92
Figura 52 - (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 51. O limite (<i>threshold</i>) está representado pela linha pontilhada em 2200 contagens e a seta vermelha indica o momento em que os reagentes foram injetados, (b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a	

conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 51.....	92
Figura 53 - Imagem média do filme para acompanhar a reação <i>in situ</i> com piperazina como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm	93
Figura 54 - (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 53. O limite (<i>threshold</i>) está representado pela linha pontilhada em 2100 contagens e a seta vermelha indica o momento em que os reagentes foram injetados,(b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 53.	94
Figura 55 - Imagem média do filme para acompanhar a reação <i>in situ</i> com piperazina como catalisador e partículas de peneira molecular para absorção de água. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm	96
Figura 56 - (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 55. O limite (<i>threshold</i>) está representado pela linha pontilhada em 8500 contagens, (b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 55.....	97
Figura 57 - Imagem de super-resolução gerada pelo tratamento da sequência de imagens através do <i>software Localizer</i> . Escala em μm	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e solventes utilizados.....	41
Tabela 2 - Dados de deslocamento químico de RMN de ^{13}C e ^1H do corante DFTAM em CDCl_3	57
Tabela 3 - Propriedades fotofísicas do corante DFTAM em diferentes solventes.	61
Tabela 4 - Relação dos solventes utilizados nos estudos fotofísicos com seus respectivos valores de constante dielétrica (ϵ) e viscosidade (η).	63
Tabela 5 - Propriedades fotofísicas do corante DFTAM em diferentes surfactantes.....	72
Tabela 6 - Propriedades transientes do corante DFTAM em diferentes solventes	77
Tabela 7 - Análise elementar dos dados obtidos na Figura 44 b	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-BuOH	Butan-1-ol
2-PrOH	2-Propanol
Å	Ångström
A	Absorbância ou grupo aceptor de elétrons
ACN	Acetonitrila
B	Peso de cada componente no valor médio
BFL	Distância focal traseira
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Número de onda
cm ⁻²	Centímetro quadrado
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
CPTES	(3-Cloropropil)-Trietoxisilano
CSI	Cruzamento intersistema
CTAC	Cloreto de cetiltrimetilamônio
d	Sinal de dubleto
D	Debye, diâmetro ou grupo doador de elétrons
D/A	Sistema doador-aceptor de elétrons
DFT	Teoria de Densidade Funcional
DFTAM	(<i>E</i>)-2-[3-[4-(difenilamina)-fenil]-1-(<i>p</i> -tolil)-alilideno] malononitrila
DMABN	4-dimetilaminobenzonitrila
E	Energia potencial
EDX	Energia dispersiva de raios X

EFL	Distância focal efetiva
ELSD	Detector evaporativo com espalhamento de luz
ETG	Etilenoglicol
EtOH	Etanol
FPS	Imagens por segundo
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier
g	Grama
Hz	Hertz
HOMO	Orbital molecular de mais alta energia ocupado
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
I	Intensidade de fluorescência integrada
IRF	Função impulso-resposta
J	Constante de acoplamento
K	Escala Kelvin de temperatura
keV	Kilo elétron-volt
L	Litro
Laser	Amplificação de luz por emissão de radiação estimulada
LDH	Hidróxido de dupla camada
LE	Localmente excitado
LUMO	Orbital molecular de mais baixa energia não ocupado
m	Sinal de multiplete
m/z	Razão massa carga
MCH	Metilciclo-hexano
MeOH	Metanol
MgO	Óxido de magnésio

MHz	Megahertz
mJ	Microjoule
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Espectro de massas
ms	Milissegundo
mW	Miliwatts
n	Orbital contendo elétrons não ligantes
NA	Abertura numérica
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundo
OLED	Diodos orgânicos emissores de luz
PDA	Detector por arranjo de diodos
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Sinal de singleto
S ₀	Estado fundamental singleto
S ₁	Primeiro estado excitado singleto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S _n	Estado excitado singleto genérico
SOMO	Orbital molecular ocupado por um único elétron
SUMO	Orbital molecular não ocupado por um único elétron
T _n	Estado tripleto genérico
TCI	Transferência de carga intramolecular

TCIT	Transferência de carga intramolecular torcida
TCSPC	Contagem de fótons correlacionados no tempo
TFA	Trifenilamina
TFA ^{•+}	Forma oxidada da trifenilamina
THF	Tetrahidrofurano
Ti-MCM-41	Zeólita modificada
TIRF	Fluorescência por reflexão interna total
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
W	Watts
σ	Orbital ligante do tipo sigma
π	Orbital ligante do tipo pi
ϵ	Constante dielétrica
°C	Grau Celsius de temperatura
ΔAbs	Variação de absorção
μs	Microsegundo
μD	Momento de dipolo
ξ	Coeficiente de extinção molar
τ	Tempo de vida
χ^2	Qui quadrado
$\Delta\nu$	Variação de frequência
μL	Micro litro
μm	Micrômetro
δ	Deslocamento químico

Φ_F	Rendimento Quântico de Fluorescência
λ	Comprimento de onda
η	Índice de refração do meio ou viscosidade
σ^*	Orbital antiligante do tipo sigma
π^*	Orbital antiligante do tipo pi
ΔE	Variação de energia potencial
β	Largura total na meia altura de intensidade do pico de difração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Fluoróforos orgânicos	20
1.1.1 Princípio de Franck-Condon.....	22
1.1.2 Transições eletrônicas	23
1.1.3 Transferência de carga intramolecular	25
1.1.4 Efeito do solvente.....	28
1.1.5 Sistemas <i>Push-Pull</i>	30
1.1.6 Corantes com Trifenilamina	31
1.2 Microscopia de fluorescência de uma única molécula (<i>single molecule</i>)	32
1.2.1 Microscopia TIRF	37
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivos gerais	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Materiais	41
3.2 Procedimentos Experimentais	42
3.2.1 Síntese do corante (E)-2-[3-[4-(difenilamina)-fenil]-1-(p-tolil)-alilideno] malononitrila (DFTAM)	42
3.2.2 Purificação do produto através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	43
3.2.3 Caracterização do corante DFTAM.....	43
3.2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	43
3.2.3.2 Espectrometria de Massas.....	44
3.2.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	44

3.2.4 Estudos fotofísicos do corante	44
3.2.4.1 Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis.....	45
3.2.4.2 Fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo	45
3.2.4.3 Espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de <i>laser</i>	47
3.2.5 Cálculos teóricos	47
3.2.6 Acompanhamento <i>in situ</i> da reação de formação do corante por microscopia de fluorescência	47
3.2.6.1 Síntese de nanopartículas de MgO	49
3.2.6.2 Funcionalização das lamínulas de vidro com piperazina	49
3.2.6.3 Microscopia TIRF	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Síntese do corante: mecanismo de reação e purificação	52
4.1.1 Caracterização do produto	54
4.1.1.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	54
4.1.1.2 Espectrometria de Massas	58
4.1.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	60
4.2 Estudos fotofísicos do corante	61
4.2.1 Propriedades no estado singlete	61
4.2.1.1 Diferentes solventes	61
4.2.1.2 Micelas	70
4.2.2 Espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de <i>laser</i>	76
4.2.2.1 Diferentes solventes	77
4.2.2.2 Micelas	81
4.2.3 Cálculos teóricos	83

4.3 Acompanhamento in situ da reação de formação do corante por microscopia de fluorescência	86
5 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fluoróforos orgânicos

Atualmente, uma ampla gama de substâncias emite luz quando excitadas por radiação eletromagnética, sendo chamadas de luminóforos. Como observado no Diagrama de Jablonski, na Figura 1¹, os processos de fotoluminescência (obtidos por excitação no ultravioleta ou no visível) são diferenciados entre fluorescência e fosforescência.

Figura 1 - Diagrama de Jablonski mostrando os níveis eletrônicos de moléculas orgânicas e as possíveis transições entre os diferentes estados singlete e triplete.

Fonte: Adaptação de SAUER, M.; HOFKENS, J.; ENDERLEIN, J. **Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging**: From Single Molecules to Ensembles. Wiley-VCH, 2011, 290 p.

No processo de fluorescência, ao ser excitada com radiação de comprimento de onda específico, a molécula em questão passa do estado fundamental singlete (S₀) a um dos níveis vibracionais do estado excitado singlete (S_n). Através de relaxação vibracional o estado excitado alcança o seu nível vibracional mínimo, possibilitando a conversão interna ou emissão fluorescente a partir de S₁. Colisões entre moléculas da própria amostra levam o elétron excitado ao nível vibracional de menor energia do S₁ e, nesse momento, através de um processo espontâneo, o elétron retorna ao estado S₀, liberando um fóton com energia igual à diferença entre

S_1 e S_0 , e comprimento de onda correspondente. Já o fenômeno de fosforescência caracteriza-se por possuir maiores tempos de vida (podendo chegar a segundos), onde o elétron que foi excitado ao nível S_1 muda de orbital e orientação de spin, processo chamado de cruzamento intersistema (CIS).

Uma das primeiras moléculas orgânicas a ser especificamente identificada foi o sulfato de quinina, num trabalho desenvolvido por Herschel, em 1845². Quando excitado com luz ultravioleta, o sulfato de quinina emite radiação no azul. A partir de então, várias outras moléculas fluorescentes foram descobertas ou sintetizadas. Na Figura 2 é possível notar alguns exemplos de compostos fluorescentes comumente usados³.

Figura 2 - Estruturas químicas de algumas moléculas orgânicas fluorescentes, juntamente com comprimento de onda de emissão correspondente.

Fonte: Adaptação de TERAÍ, T.; NAGANO, T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. **Pfugers Archiv – European Journal of Physiology**, v. 465, n. 3, p. 347-359, 2013.

O estudo de compostos orgânicos fluorescentes se explica pela aplicação destes numa ampla gama de sistemas ópticos. Como exemplo tem-se corantes e pigmentos⁴⁻⁶, sensores químicos⁷, corantes para o infravermelho-próximo⁸ e semicondutores⁹.

Dentre as aplicações mais promissoras, encontram-se os diodos orgânicos emissores de luz (OLEDs), os quais podem possuir ou não a adição de dopantes^{10,11}. Esses dispositivos têm encontrado aplicações práticas em telas

pequenas, como telefones celulares, câmeras digitais, televisores de tela plana, iluminação e, atualmente, em telas flexíveis^{12,13}. Propriedades como baixo custo e consumo de energia, peso reduzido, capacidade de formar filmes finos com grande área, alto brilho e tempo de resposta rápido favorecem o investimento nesse tipo de tecnologia¹⁴.

Células solares sensibilizadas por corantes também ganharam impulso ao longo dos anos, em função da necessidade de opções de energia sustentável. A adição de um corante ao sistema fotovoltaico permite melhor absorção da porção visível da radiação solar, gerando um maior rendimento na sua conversão em energia elétrica^{15,16}.

A partir das várias estruturas orgânicas com propriedades ópticas interessantes, destacam-se as moléculas que emitem radiação no vermelho, as quais são bastante estudadas por suas aplicações em bioimagens bifotônicas, onde a autofluorescência dos tecidos (que ocorre entre 350 e 450 nm) deve ser evitada¹⁷. O trabalho desenvolvido por Rahim e colaboradores¹⁸ apresentou nanopartículas de polímero conjugado, que foram aplicadas em técnica não invasiva de mapeamento espacial por microscopia de fluorescência com excitação por dois fótons. Os resultados positivos em culturas celulares através de excitação em 780 nm mostram o potencial do material para futuras aplicações *in vitro* e possivelmente *in vivo* no diagnóstico de doenças, já que as nanopartículas ultrapassaram a limitação da hidrofobicidade e citotoxicidade em meio celular, numa técnica de baixo custo.

1.1.1 Princípio de Franck-Condon

Considerando o processo de absorção de energia entre dois estados eletrônicos, os núcleos movem-se tão lentamente em comparação aos elétrons, devido às diferenças de massa, que é possível assumir que suas configurações nucleares não se alteram durante a transição. Esse fato é chamado de Princípio de Franck-Condon, baseado na aproximação de Born-Oppenheimer para desenvolvimento da teoria dos orbitais moleculares, e está representado na Figura 3¹⁹.

Figura 3 - Curva de energia potencial *versus* distância nuclear, exemplificando o Princípio de Franck-Condon, mostrando as probabilidades de transição eletrônica em função da distância entre os núcleos dos átomos.

Fonte: Adaptação de SALZER, R.; SAUER, M.; HOFKENS, J.; EDERLEIN, J; GOLDYS, E. M. **Fluorescence Microscopy**: From Principles to Biological Applications. Germany. Wiley-Blackwell, 2013, 539 p.

Considerando-se as transições eletrônicas representadas pela linha vertical, de acordo com o Princípio de Franck-Condon, quanto mais deslocada a curva de potencial do estado excitado estiver do estado fundamental, menor é a probabilidade de transição.

1.1.2 Transições eletrônicas

As transições eletrônicas são fruto da absorção de radiação no ultravioleta-visível (UV-Vis) por uma molécula que normalmente contém elétrons presentes em orbitais do tipo σ , π e n (não-ligantes), considerando-se as ligações entre os elementos leves H, C, N, O e S²⁰. As energias dos orbitais moleculares variam significativamente e, portanto, as transições eletrônicas dependerão de energias quantizadas para que o elétron seja excitado do orbital molecular ocupado mais alto (HOMO - *highest occupied molecular orbital*) para o orbital molecular não ocupado mais baixo (LUMO - *lowest unoccupied molecular orbital*).

Conforme Figura 4, quatro tipos de transições eletrônicas são possíveis. São elas $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$.

Figura 4 - Níveis de energia em orbitais moleculares e possíveis transições eletrônicas comuns em moléculas orgânicas.

Fonte: Adaptação de ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis**: modern instrumentation methods and techniques. 2nd edition. Chichester: John Wiley, 2000. 600 p.

As transições do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ correspondem a absorções mais energéticas, já que os elétrons σ são mais fortemente atraídos, necessitando de radiação no ultravioleta distante (de 200 a 10 nm). Um exemplo dessa ocorrência são os hidrocarbonetos saturados.

Já as transições $n \rightarrow \sigma^*$ são menos energéticas que as anteriores, podendo aparecer entre 150 e 250 nm, com bandas abaixo de 200 nm. Neste caso, necessita-se de pares de elétrons não ligantes, sendo comuns, portanto, em compostos contendo O, N, S e halogênios, como alcoóis, derivados de éteres ou halogênios e aminas.

Desta forma, são principalmente os elétrons n e π que, quando excitados, aparecem no UV próximo, sendo as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ as de maior interesse na orgânica.

As transições $n \rightarrow \pi^*$ tratam-se de um par de elétrons não ligante que são excitados ao orbital π antiligante, necessitando-se de menor quantidade de energia em comparação aos dois exemplos anteriores. Normalmente se observa esse padrão em compostos com heteroátomo presente em sistema insaturado, desde que o par de elétrons isolado não se sobreponha ao sistema π ²². Essa demonstração é observada em compostos carbonílicos cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres.

Já as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ se verificam principalmente nos compostos com insaturações e anéis aromáticos, mas também podem ocorrer em moléculas carbonílicas que apresentem oxigênio ou enxofre ligados ao átomo de carbono. Quando existe conjugação entre as ligações a energia de excitação começa a diminuir, podendo-se usar comprimentos de onda maiores.

1.1.3 Transferência de carga intramolecular

Quando um fluoróforo é excitado, observa-se a movimentação de um elétron de um orbital para outro. Caso eles estejam separados espacialmente, a transição eletrônica é acompanhada por uma mudança no momento de dipolo quase instantânea. Porém, quando o fluoróforo possui um grupo doador de elétrons ligados através de um sistema π a um grupo aceptor de elétrons, o deslocamento de carga acontece na própria molécula e o aumento no momento de dipolo pode ser grande. Como consequência, logo após a absorção de radiação, o estado excitado (chamado de estado de Franck-Condon ou estado localmente excitado, LE) não está em equilíbrio com o ambiente, se este for polar. Para atingir o equilíbrio termodinâmico, se suficientemente fluidas, as moléculas de solvente rotam em volta do fluoróforo durante seu tempo de vida no estado excitado, buscando formar uma camada de solvatação. O estado mais relaxado, chamado de transferência de carga intramolecular (TCI), é então atingido²³. Isso explica a presença de dois valores máximos de emissão, geralmente presentes e melhor distintos em solventes mais polares. O que aparece primeiro (em menor comprimento de onda) é proveniente do estado singlete LE e o segundo é do estado de TCI, conforme se observa na Figura 5²³. Em bandas de TCI ao se aumentar a polaridade do meio também se observa o descolamento batocrômico (maiores valores de máximo de comprimento de onda).

Figura 5 - Diagrama de energia potencial dos estados eletrônicos LE e TCIT.

Fonte: Adaptado de VALEUR, B. **Molecular Fluorescence**: Principles and Applications. Germany. Wiley-VCH, 2001, 399 p.

A transferência de carga intramolecular também pode ser acompanhada pela rotação do fluoróforo visando maior relaxação no estado excitado, recebendo o nome de transferência de carga intramolecular torcida (TCIT). Esse fenômeno foi primeiramente observado por Lippert e colaboradores²⁴, na molécula de 4-dimetilaminobenzonitrila (DMABN), conforme Figura 6.

Figura 6 - Estrutura da 4-dimetilaminobenzonitrila (DMABN), destacando a região onde ocorre a torção.

Fonte: Autoria própria

No estado fundamental a sua estrutura é praticamente plana, o que gera máxima conjugação entre o grupo dimetilamino e o anel fenil. Porém, quando excitada, ocorre a rotação do grupo dimetilamino até formar um ângulo reto e perda da conjugação, havendo total separação das cargas, como se nota na Figura 7²³.

Figura 7 - Esquema do processo de transferência de carga intramolecular torcida (TCIT)

Fonte: Adaptado de VALEUR, B. **Molecular Fluorescence**: Principles and Applications. Germany. Wiley-VCH, 2001, 399 p.

Como resultado, duas bandas de emissão de fluorescência são observadas, uma do estado LE e outra da TCIT. Na Figura 8, têm-se os espectros de emissão da DMABN em hexano e tetrahidrofurano (THF)²³. No primeiro solvente (apolar) apenas a transição do estado LE pode ser observada. Já no THF (polar) a TCIT também aparece, com comprimento de onda mais alto.

Figura 8 - Espectros de emissão da DMABN em diferentes solventes.

Fonte: Adaptado de VALEUR, B. **Molecular Fluorescence**: Principles and Applications. Germany. Wiley-VCH, 2001, 399 p.

TCI também pode ocorrer no estado fundamental, o que gera alterações nos espectros de absorção semelhantes ao de emissão, observando-se deslocamentos batocrômicos em solventes polares, e hipsocrômicos em solventes apolares.

Vários parâmetros podem ser usados para modular o perfil da banda TCI, como o solvente (polaridade, viscosidade, constante dielétrica), temperatura, pressão²⁵, além da influência de sistemas biológicos e inorgânicos²⁶, o que vêm ajudando ao longo dos anos a entender melhor o comportamento de algumas espécies²⁷⁻³⁰.

Ishow e colaboradores³¹, em um trabalho sobre uma nova molécula com emissão no vermelho e com aplicações bem sucedidas em OLEDs³² e *laser*³³, conseguiram determinar como a dinâmica do estado excitado dessa estrutura, proveniente de uma TCI, varia em diferentes solventes. A partir dos resultados foi comprovado que a polaridade e viscosidade do meio modificam drasticamente as constantes dos processos radiativos e não radiativos.

1.1.4 Efeito do solvente

Conforme a viscosidade do solvente aumenta, a probabilidade de ocorrer um processo de relaxação não radiativo através de conversão interna diminui. Como resultado, o rendimento quântico de fluorescência é maior.

Interações intermoleculares entre soluto e solvente produzem efeito nas propriedades de absorção e emissão, levando ao deslocamento e alteração no formato das bandas como também mudanças no rendimento quântico de fluorescência. Essas interações podem ser do tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo, ligações de hidrogênio, entre outras³⁴.

O momento de dipolo e a constante dielétrica do solvente, bem como o tamanho das moléculas de soluto e a diferença de momento de dipolo entre o estado fundamental e excitado são de total importância para avaliar o efeito do solvente nas propriedades espectrais do soluto³⁵.

A variação do comprimento de onda máximo e da intensidade da banda de absorção em diferentes solventes são foco de estudos para determinar que tipo de transição está acontecendo³⁶⁻³⁸.

De acordo com a forma como o solvente estabiliza mais fortemente o estado fundamental ou o excitado, pode-se observar o deslocamento batocrômico (solvatocromismo positivo) ou hipsocrômico (solvatocromismo negativo), conforme visto na Figura 9²².

Figura 9 - Deslocamento batocrômico e hipsocrômico do estado fundamental e excitado

Fonte: Adaptação de WIETHAUS, G. **Síntese e Caracterização de Novas Iminas com Aplicação em Óptica Não-Linear**. 2010. 193 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

O deslocamento hipsocrômico, também chamado de solvatocromismo negativo, é observado quando, ao aumentar a polaridade do solvente, o valor do comprimento de onda máximo da banda diminui. O padrão observado também é chamado de *blue-shift* (deslocamento para o azul, em português), em razão dessa tendência do espectro em aparecer na região do azul.

As transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ normalmente são identificadas pelo *blue-shift* com o aumento da polaridade do meio. Isso se deve porque o par de elétrons isolado é mais bem estabilizado antes da excitação por solventes polares, principalmente os próticos sendo, portanto, mais energeticamente difícil de excitar. Energias maiores de excitação se traduzem em menores comprimentos de onda.

Já no deslocamento batocrômico ou solvatocromismo positivo, o aumento na polaridade do solvente vai refletir em maiores valores de máximo de comprimento de onda, ou *red-shift* (deslocamento para o vermelho, em português).

Esse tipo de deslocamento é característico de transições $\pi \rightarrow \pi^*$, onde o composto é menos polar no estado fundamental e, ao ser excitado, tem o seu momento de dipolo intensificado. Como resultado, o estado excitado é melhor solvatado por solventes polares.

Portanto, a escolha do solvente em estudos fotofísicos deve considerar a transparência deste na região espectral em estudo, como também o efeito que esse solvente produzirá no soluto.

1.1.5 Sistemas *Push-Pull*

Grupos doadores (D) e aceptores (A) de elétrons se baseiam no efeito indutivo, de natureza eletrostática, para repelir ou atrair densidade de carga negativa, respectivamente³⁹. Quando um sistema D/A é excitado por radiação adequada, ocorre o deslocamento de um elétron entre um orbital ligante do doador (proveniente de um radical catiônico) para um orbital não ocupado do aceptor (resultante de um radical aniônico). No espectro gerado, a banda de absorção terá sua posição como função do potencial de ionização do doador e a eletroafinidade do aceptor²². Na Figura 10 é possível observar o diagrama de energia da interação doador/aceptor²¹.

Figura 10 - Diagrama de energia da interação entre grupos doador/aceptor ligados num sistema π conjugado.

Fonte: Adaptação de ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques**. 2nd edition. Chichester: John Wiley, 2000. 600 p.

Quando um grupo doador e um aceptor de elétrons estão presentes na cadeia principal de uma molécula, ligados por um sistema de conjugação π (ligações duplas e simples alternadas) têm-se uma estrutura fortemente acoplada, a qual é chamada de *push-pull* (empurra-puxa, em português). Ao excitar-se essa molécula, o fenômeno de transferência de carga intramolecular (já descrito anteriormente) é observado, com o deslocamento do elétron do grupo doador ao aceptor por meio

das insaturações alternadas, o que faz esse tipo de sistema ser foco de vários estudos⁴⁰⁻⁴².

Essas moléculas possuem interações intermoleculares, principalmente do tipo *Van der-Waals*, dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio. Devido a sua planaridade, essas estruturas favorecem a mobilidade dos elétrons π , o que aumenta sua polarizabilidade induzida, beneficiando as propriedades ópticas não lineares^{43,44}. Esse efeito também pode ser contrário caso os grupos D e A torçam a estrutura molecular, o que diminui a mobilidade dos elétrons π e, por consequência, as propriedades ópticas não lineares²².

Para aplicações já citadas anteriormente, como OLEDs e biomarcadores, a reabsorção de radiação emitida é um fator que deve ser minimizado. E compostos com grupos doadores e aceptores ligados através de duplas ligações conjugadas são boas opções, já que possuem grande deslocamento de Stokes pela significativa diferença entre o estado fundamental e o excitado observado na transferência de carga intramolecular, promovendo alto rendimento quântico de fluorescência mesmo com relaxações internas não radiativas⁴⁵.

1.1.6 Corantes com Trifenilamina

Compostos contendo o grupamento trifenilamina (TFA), exemplificado na Figura 11, são promissores em sistemas com transferência de carga para aplicações ópticas⁴⁶⁻⁴⁸. Isso se deve às propriedades que essa estrutura apresenta como sua forte natureza doadora de elétrons, alta mobilidade de lacunas e grande rigidez estrutural⁴⁵. Além disso, a sua forma oxidada (TFA^{•+}), é um radical catiônico altamente estabilizado, o que impede a recombinação de carga⁴⁹. O volume grande desse tipo de substituinte e sua não coplanaridade também evitam a agregação, facilitando a solubilidade do composto. Essas propriedades proporcionaram a confecção de filmes finos amorfos e sem defeitos de espalhamento^{50, 51}.

Figura 11 - Estrutura química do grupo trifenilamina

Fonte: Autoria própria

Dentre os sistemas recentemente desenvolvidos com TFA, os dispositivos eletrocromicos merecem destaque. Xu e colaboradores⁵² conseguiram desenvolver novos polímeros conjugados derivados de TFA com potencial em aplicações eletrocromicas. Estes apresentaram larga mudança de transmitância no infravermelho próximo e tempo de comutação na ordem de um até alguns segundos quando submetidos a uma diferença de potencial.

Em meio aos corantes compostos por TFA, trabalhos recentes estão focando na síntese de moléculas contendo também o grupo ciano ($-C\equiv N$) por meio de sistemas conjugados^{45,53,54}. Isso se deve porque esta estrutura é um dos aceptores de elétrons com maior eletroafinidade, o que promove um processo de TCI mais eficiente e, por consequência, um perfil solvatocromico maior.

Conforme é possível observar, portanto, existe uma grande variedade de compostos dessa classe que ainda podem ser explorados modificando-se a conjugação da cadeia principal ou a posição e o tipo de substituintes, buscando desenvolver novos dispositivos emissores de luz com baixo custo e de fácil síntese e purificação.

1.2 Microscopia de fluorescência de uma única molécula (*single molecule*)

Estudos cinéticos macroscópicos são realizados para um grande conjunto de moléculas, gerando informações sobre a taxa média catalítica, especificidade de substrato, entre outros. Porém, esses dados não revelam propriedades de moléculas individuais (*single molecule*), o que pode variar consideravelmente⁵⁵. Em contraste, as técnicas de detecção *single molecule* podem levar a observação de flutuações inesperadas, como oscilações ou comportamento estocástico. É possível aferir informações sobre a contribuição efetiva dos indivíduos dentro da cinética global. O

ambiente em que a molécula está inserida também altera suas propriedades físicas e químicas e sua influência pode ser mais bem compreendida estudando-se apenas uma molécula⁵⁶.

Além disso, pode ser determinado como moléculas individuais diferem umas das outras (heterogeneidades estáticas) e como as propriedades de uma única molécula mudam ao longo do tempo (heterogeneidades dinâmicas). Isto pode ser utilizado para decidir se as propriedades dessa estrutura isolada ao longo do tempo são iguais ao valor médio de todo o conjunto em um determinado momento⁵⁷.

A partir 1989 com desenvolvimento inicial de métodos criogênicos para detecção óptica de uma única molécula absorvente⁵⁸ e sua emissão por fluorescência⁵⁹ por Moerner e Orrit, respectivamente, foi possível chegar hoje à microscopia de fluorescência *single molecule*, que permite estudar o movimento e interações de várias espécies de moléculas em temperatura e pressão ambientes e com alta resolução espaço-temporal. A aplicação de técnicas microscópicas de emissão na detecção da fluorescência de uma única molécula de fluoróforo gera, portanto, dados de alta sensibilidade e seletividade⁶⁰, que podem ser interpretados tanto qualitativa quanto quantitativamente⁶¹. Esses resultados vão desde a medição do tempo de vida do estado excitado, espectros, rendimento quântico, distância entre dois fluoróforos, imagens, orientações de momentos de dipolo, intensidade de fluorescência, grau de transferência de energia como também correlação de fótons, obtendo assim a média do conjunto e permitindo a exploração da heterogeneidade dos sistemas estudados⁶².

Trabalhos abordando o estudo de uma única enzima em processos catalíticos impulsionaram a detecção *single molecule*⁶³⁻⁶⁵ e continuam sendo aprimorados recentemente⁶⁶⁻⁶⁹, o que melhorou os conhecimentos biofísicos e bioquímicos nessa área. A detecção da reação é feita por meio de um produto fluorescente *in situ* a partir de um substrato e, acompanhando-se a geração de tais moléculas fluorescentes durante os ciclos enzimáticos consecutivos, tem-se descoberto uma riqueza de informações no nível de uma única enzima e sua eficiência catalítica⁷⁰. O uso de microscopia de fluorescência de uma única molécula mostrou grandes diferenças entre a atividade catalítica das enzimas individuais dentro de uma população (“desordem estática”) e que a constante de velocidade da reação de uma molécula de enzima particular pode variar fortemente ao longo do tempo (“desordem dinâmica”)⁷¹.

Outros sistemas observados recentemente nesse escopo se baseiam em sólidos em micro e nanoescala⁷²⁻⁷⁵, como zeólitas e óxidos, estudados num único cristal e até mesmo no nível de uma única molécula⁷⁶⁻⁷⁹. Roeffaers e colaboradores, através de microscopia de campo largo (*widefield*) mapearam a distribuição espacial da atividade catalítica sobre um cristal de hidróxido de dupla camada imerso em solução reagente por meio das moléculas formadas, definindo contagens únicas de *turnover* do catalisador. Como resultado, descobriu-se que diferentes faces do sólido catalisavam diferentes tipos de reação, conforme visto na Figura 12⁸⁰.

Figura 12 - Imagens de microscopia de campo largo (*widefield*) de reações de catálise em partículas de LDH. (a) e (b) são exemplos das regiões onde acontece a transesterificação, variando-se a concentração de precursores. (c) mostra regiões catalíticas que promovem hidrólise e (d) mostra a intensidade de um *spot* acumulado no mesmo cristal numa sequência de imagens. Escala da barra: 5 μm .

Fonte: Adaptação de ROEFFAERS, M. B. J.; SELS, B. F.; UJI-I, H.; SCHRYVER, F. C.; JACOBS, P. A.; VOS, D. E.; HOFKENS, J. Spatially resolved observation of crystal-face-dependent catalysis by single turnover counting. **Nature**, v. 439, p. 572-575, 2006

Reações em cadeias poliméricas também podem ser mais bem compreendidas em estudos *single molecule*. Através do trabalho pioneiro de Esfandiari e Blum foi possível desenvolver uma técnica analítica que permitiu diferenciar microscopicamente por meio do crescimento do polímero se a catálise é homogênea, heterogêneas ou ambas. Moléculas de dicitlopentadieno foram polimerizadas com catalisador de Grubbs II na presença de um fluoróforo que serviu como sonda. Devido à alta sensibilidade da técnica, quantidades mínimas desse

foram necessárias, não influenciando, portanto na reação, e permitindo localizar espacialmente e no tempo a atividade catalítica⁸¹.

Além dos exemplos citados anteriormente, outra grande aplicação de microscopia de fluorescência *single molecule* consiste em estudo de moléculas de DNA genômico^{82, 83} e sua reparação⁸⁴ e no imageamento de células vivas por espectroscopia através de sondas fluorescentes⁸⁵⁻⁸⁸.

A proposta de estudo de sistemas a partir de uma única molécula apresenta uma série de vantagens, portanto. A título de técnica analítica, as reações podem ser observadas rapidamente, necessitando de ultra-baixas concentrações, o que gera quantidades mínimas de resíduos. Outro fator importante é a inovação que esses dados podem trazer na literatura pela contribuição numa área que ainda pode ser mais bem explorada.

A maior limitação existente no emprego da microscopia de fluorescência reside no fato de se necessitar de moléculas fortemente fluorescentes que possam ser acompanhadas ao longo do processo. Uma opção de abordagem interessante nesse contexto são reações para formação de compostos orgânicos que sejam fluorescentes dentro do comprimento de onda de excitação usado⁸⁹.

Cremer e colaboradores desenvolveram um trabalho inovador no acompanhamento de uma reação de epoxidação catalisada *in situ* numa zeólita modificada do tipo Ti-MCM-41, adicionando-se os dois precursores e observando a formação de um fluoróforo, que foi estudado ao longo do tempo por microscopia de fluorescência *widefield*, conforme se observa na Figura 13. Analisando os processos de difusão e reação como eventos separados foi possível obter valores de parâmetros como o Módulo de Thiele, constante de reação e difusão, além do coeficiente de difusão efetivo dos reagentes nas partículas de zeólita. Os dados obtidos foram analisados e tratados através de um *software*, o que permitiu definir com precisão os *spots* de fluorescência provenientes do corante formado, os quais definem os eventos de *turnover* do catalisador⁹⁰.

Figura 13 - a) Imagem de microscopia *widefield* de partículas de Ti-MCM-41 (indicadas pelos círculos vermelhos), na presença dos dois reagentes. A seta amarela aponta para um *spot* fluorescente, caracterizando um evento de *turnover*. b) À esquerda: Alargamento do local de emissão, representando uma molécula do fluorógeno. Direita: Montagem do perfil de intensidade com uma função Gaussian 2D que produz a posição central (x, y) (ponto vermelho) de uma única partícula emissora no plano focal.

Fonte: Adaptação de CREMER, G.; ROEFFAERS, M. B. J.; BARTHOLOMEEUSEN, E.; LIN, K.; DEDECKER, P.; PESCARMONA, P. P.; JACOBS, P. A.; VOS, D. E.; HOFKENS, J.; SELS, B. F. High-Resolution Single-Turnover Mapping Reveals Intraparticle Diffusion Limitation in Ti-MCM-41-Catalyzed Epoxidation. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 5, p. 908-911, 2010.

Algumas limitações são observadas para que a investigação *single molecule* possa fornecer informações sobre o mecanismo de uma reação. A maioria dos estudos que foram realizados foi com moléculas imobilizadas num substrato em meio aquoso. Portanto, promover reações em outros meios finda sendo um desafio. Em segundo lugar, o uso de lentes com altas aberturas numéricas são muitas vezes indispensáveis devido ao seu maior campo de aquisição, o que dificulta grandes variações de temperatura em relação a ambiente. Em terceiro lugar, a reação deve apresentar alguma seletividade. O fluoróforo formado deve exibir algumas propriedades fotofísicas para aplicações *single molecule*: seções com alta absorção, alto rendimento quântico de fluorescência, baixo cruzamento intersistema, alta fotoestabilidade e emissão na parte visível ou no infravermelho próximo do espectro eletromagnético.

Os estudos em questão também são ferramentas úteis no entendimento de reações secundárias, já que estas podem gerar intermediários reativos e de vida curta, que acabam sendo mascarados em estudos macroscópicos. Tais estruturas

transitórias aparecem como espécies que podem ou não emitir. O ganho desses estudos na biocatálise, isto é, reações mediadas por macromoléculas, é ainda maior já que os efeitos de memória, as características de fluorescência, ou alterações na seletividade de enzimas podem ser abordadas.

1.2.1 Microscopia TIRF

Dentre as técnicas de microscopia de fluorescência, uma das que se destaca em experimentos *single molecule* entre outros, é a microscopia de campo evanescente, ou TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), que se baseia no fenômeno de reflexão interna total. Considerando-se que a luz está viajando de um meio com índice de refração alto, como o vidro, para outro com índice de refração menor, como água ou células, ao atingir essa superfície com certo ângulo de incidência, será observado que a luz não se propaga através da amostra, sendo totalmente refletida. Esse ângulo é dito ângulo crítico e, sob essas condições, a luz penetrará no meio da amostra somente algumas centenas de nanômetros, decaindo exponencialmente com a distância. A excitação de fluoróforos acontecerá em uma área com espessura de menos de 100 nm e, esse confinamento de energia numa seção tão pequena gera um campo eletromagnético evanescente e, como consequência, uma relação sinal / contagem de fundo alta. Trata-se de uma montagem experimental simples e muito útil quando se deseja estudar fenômenos que acontecem em uma superfície muito próxima da lamínula do microscópio, com sensibilidade suficiente para observação da fluorescência de uma única molécula.

Para a determinação do ângulo correto aplica-se a Lei de Snell equação (1):

$$\eta_1 \cdot \sin \theta_1 = \eta_2 \cdot \sin \theta_2 \quad (1)$$

Onde η_1 é o índice de refração de maior valor (vidro, no caso), θ_1 é o ângulo de incidência da radiação, perpendicular a interface, η_2 é o índice de refração de menor valor e θ_2 é o ângulo do feixe de luz refratado. Quando θ_1 é grande o suficiente, a radiação refratada se torna paralela à interface, fazendo 90° com a direção normal a interface vidro-amostra. Essa é a condição limite para a reflexão interna total. Portanto, resolvendo a Lei de Snell (equação 1) para $\theta_2 = 90^\circ$ é possível determinar

um valor mínimo para o ângulo de incidência que responda as necessidades da técnica.

Algumas condições devem ser respeitadas para se obter TIRF:

I. Utilização de uma objetiva com abertura numérica maior do que 1.4. É necessário que a objetiva suporte ângulos do feixe de excitação na interface lamínula / meio da amostra maiores que o ângulo crítico para a reflexão total interna. Utilizando-se uma lâmina de microscopia convencional, $n \sim 1.52$, e no caso de o meio da amostra ser água, $n \sim 1.33$, o ângulo crítico é da ordem de 61° ;

II. Introdução de uma leve inclinação no espelho posicionado antes do dubleto, fazendo com que a pré-focalização formada no BFL (*Back Focal Length* ou distância focal traseira) da objetiva se desloque do eixo óptico para a borda. Assim, o feixe de excitação poderá atingir a interface lamínula / meio da amostra com ângulos maiores que o ângulo crítico.

III. Além disso, para garantir a telecentricidade da excitação, a distância entre o espelho de ajuste e o dubleto, d , deve ser igual ao EFL (distância focal efetiva) do dubleto. Desta forma, quando o ângulo do espelho é ajustado para TIRF, evita-se efeitos indesejáveis nas bordas das lentes da objetiva.

Na Figura 14 é apresentado um esquema de como a radiação incide na região da objetiva do microscópio para que haja TIRF⁹¹.

Figura 14 - Detalhe da configuração óptica para TIRF na objetiva do microscópio.

Fonte: LENCIONE, D. Layout óptico da configuração dos microscópios de fluorescência presentes no GFM. São Carlos, 2014. Relatório Técnico-Científico.

Portanto, como foi evidenciada, a síntese e investigação fotofísica de moléculas orgânicas fluorescentes é de grande interesse em função de suas várias aplicações, principalmente no ramo da óptica. E as técnicas de microscopia de fluorescência *single molecule* são uma interessante ferramenta para a compreensão dos mecanismos de reação, através de uma abordagem inovadora que permite observar heterogeneidades do sistema que são mascaradas por resultados obtidos macroscopicamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Esse projeto teve como objetivo trabalhar com uma reação orgânica para formação de um corante fluorescente, estudando suas propriedades fotofísicas e acompanhando a reação em termos microscópicos de poucas moléculas, através de catálise *single molecule*, buscando determinar aspectos físico-químicos como também os mecanismos de reação numa abordagem cinética não convencional.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e caracterizar adequadamente um composto orgânico fluorescente;
- Estudar suas propriedades fotofísicas através de técnicas de espectroscopia de absorção (UV-Vis), de fluorescência (estacionária e resolvida no tempo) e fotólise por pulso de laser, variando-se o solvente e em meio micelar;
- Desenvolver, através de métodos computacionais, cálculos de modelagem molecular;
- Acompanhar a reação *in situ* através de microscopia TIRF a nível *single molecule*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Na Tabela 1 encontram-se listados os reagentes e solventes que foram utilizados no desenvolvimento dos experimentos. Para preparo das micelas optou-se por água deionizada Milli-Q (Millipore; 18,2 MΩ. a 25 °C).

Tabela 1 - Reagentes e solventes utilizados.

Reagente ou Solvente	Pureza (%)	Procedência
(3-Cloropropil)-Trietoxisilano	95	Aldrich
Butan-1-ol (1-BuOH)	99,9	Sigma-Aldrich
2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila	-	Aldrich
4- (difenilamino) benzaldeído	97	Aldrich
Acetato de Magnésio Tetrahidratado	99	Sigma
Acetona	99,9	Panreac
Acetonitrila (ACN)	99,9	Panreac
Ácido Oxálico Dihidratado	99	Sigma-Aldrich
Brometo de Potássio	99	Vetec
Cloreto de Cetilpiridínio (CPC)	99	Sigma-Aldrich
Cloreto de Cetiltrimetilamônio (CTAC)	-	Aldrich
Clorofórmio Deuterado	99,8	CIL
Diclorometano	99,9	JTBaker
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	98,5	Sigma-Aldrich
Etanol Absoluto (EtOH)	99,9	Panreac
Éter Dietílico	98	Panreac
Etilenoglicol (ETG)	99,8	Sigma-Aldrich
Isopropanol (2-PrOH)	99,9	Panreac
Metanol (MeOH)	99,9	Panreac
Metilciclo-hexano (MCH)	99	Sigma-Aldrich
Piperazina	99	Aldrich
Piperidina	-	-
Sílica Gel 230-400 mesh	-	Machery-Nagel

Continua

Continuação		
Solução Piranha	-	Sintetizada
Tetrahidrofurano (THF)	99,9	Panreac
Tolueno	99,9	Panreac
<i>Tween</i> -20	99,9	Sigma-Aldrich

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Síntese do corante (*E*)-2-[3-[4-(difenilamina)-fenil]-1-(*p*-tolil)-alilideno] malononitrila (DFTAM)

A síntese do corante DFTAM foi feita com base num procedimento já executado⁴⁵. O esquema da reação é representado na Figura 15. Para tanto, 4 mmol de 4- (difenilamino) benzaldeído e 4 mmol de 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila foram adicionadas em 25 mL de etanol absoluto. Piperidina foi acrescentada em quantidade catalítica (0,1 mL) e a reação foi agitada sob refluxo por 6 horas. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica usando sílica gel como fase estacionária e tolueno como eluente, sendo acompanhado por cromatografia em camada delgada, através de placas de sílica.

Figura 15 - Esquema da reação de formação do composto DFTAM (3), partindo dos precursores 4-(difenilamino) benzaldeído (1) e 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila (2).

3.2.2 Purificação do produto através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para aumentar a pureza do produto, realizou-se sua separação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, no Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, no Instituto de Química de São Carlos, IQSC. Inicialmente, definiu-se o número de produtos para separar e a melhor composição de fase móvel. Essa etapa foi feita num equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (*Separation module* - Waters® 2695), acoplado aos detectores *Photodiode Array Detector* (Waters® 2996), *Evaporative Light Scattering Detector* (Waters® 2424) e o espectrômetro de massas com analisador hexapolo *Micromass ZQ* (Waters®). A coluna usada foi do tipo C₁₈-4 *InertSustain*, 5 µm 10x250 mm, com modo de eluição em gradiente. A amostra foi diluída em metanol com 0,1% de ácido fórmico.

Após definido os parâmetros, usou-se para separação um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (*Separation module* - Waters® 2695), acoplado a um detector UV (*Dual λ Absorbance Detector*, Waters® 2489). A coluna usada foi do tipo C₈-4 *InertSustain*, 5 µm 10x250 mm, com eluição isocrática, sendo composta de 45% de metanol, 38% de acetonitrila e 17% de água.

3.2.3 Caracterização do corante DFTAM

Para caracterizar o produto extraído da separação por HPLC utilizou-se as técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹³C e ¹H, espectrometria de massas e espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), usando equipamentos da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI), no IQSC.

3.2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A amostra foi solubilizada em clorofórmio deuterado, usando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. O equipamento usado foi um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Marca *Agilent Technologies* Modelo: 500/54 *Premium Shielded*, operando a 500,00 MHz para o núcleo de ¹H, e para ¹³C em 125,00 MHz.

3.2.3.2. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos também no Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos. Para tanto, utilizou-se o equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (*Separation module* - Waters® 2695), acoplado aos detectores *Photodiode Array Detector* (Waters® 2996), *Evaporative Light Scattering Detector* (Waters® 2424) e o espectrômetro de massas com analisador hexapolo *Micromass ZQ* (Waters®). A coluna foi do tipo C₁₈-4 Inertsil, 5 µm 10x250 mm, operando em modo gradiente com metanol e água.

3.2.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram feitas no espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier, marca *Shimadzu*, modelo *IRAffinity 1*. Os espectros foram obtidos no modo transmitância, com faixa de medição de 400 a 4000 cm⁻¹. A amostra foi preparada em pastilha de brometo de potássio.

3.2.4 Estudos fotofísicos do corante

Para obter informações sobre o comportamento fotofísico do corante DFTAM estudos foram feitos em diferentes solventes e em meio micelar, todos em temperatura ambiente (25°C).

Os solventes usados foram tetrahidrofurano, metilciclo-hexano, butan-1-ol, etanol, acetonitrila, metanol e isopropanol. Todos os experimentos foram feitos com soluções recém-preparadas.

Já os sistemas micelares foram feitos com os seguintes surfactantes: *Tween* 20 (não-iônico), SDS (aniônico), CPC e CTAC (catiônicos). As amostras foram preparadas da seguinte forma: adicionou-se o surfactante em água Milli-Q numa concentração de 0,05 mol L⁻¹, acima da concentração micelar crítica de cada surfactante (CTAC – 1,3 mmol L⁻¹; CPC – 0,9 mmol L⁻¹; *Tween* 20 – 0,06 mmol L⁻¹; SDS – 8,3 mmol L⁻¹; dados referentes a 25°C em água)¹⁰². Quantidades do corante foram adicionadas de forma a obter uma concentração de 10⁻⁵ mol L⁻¹ e o sistema foi sonificado por 5 minutos. Após mais 5 minutos de descanso fez-se as análises seguintes. Devido à baixa solubilidade do corante DFTAM em água, foi necessário

solubilizá-lo em quantidades mínimas de metanol para poder adicioná-lo ao surfactante. Para tanto, uma solução padrão foi preparada numa concentração de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e alíquotas de 3 μL desta foram adicionadas ao surfactante em meio aquoso, chegando a concentração de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Para cálculos de rendimento quântico de fluorescência usou-se como padrão de referência o corante Rosa Bengala ($\Phi = 0,05$ em etanol)⁹².

3.2.4.1 Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis

Espectros de absorção no UV-Vis foram feitos para as amostras em diferentes solventes e com surfactante. Para o primeiro caso variou-se a concentração de corante com o objetivo de calcular o coeficiente de extinção molar, não ultrapassando 1 de absorbância. E para o rendimento quântico de fluorescência, utilizaram-se amostras com absorção abaixo de 0,05 para obtenção do espectro de emissão.

As análises foram feitas no espectrofotômetro da marca *Shimadzu*, modelo *UV-1800*, com varredura na região de 200 a 800 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

3.2.4.2 Fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo

Espectros de fluorescência no estado estacionário foram feitos nas amostras em diferentes solventes para cálculo de rendimento quântico de fluorescência e também nas amostras micelares. Para tanto, utilizou-se um Espectrofluorímetro da marca *Shimadzu*, modelo *RF-5301 PC*.

Para determinação do rendimento quântico de fluorescência usou-se a equação (2):

$$\Phi = \Phi_f \frac{I}{I_f} \frac{A_f n^2}{A n_f^2} \quad (2)$$

Onde,

Φ = rendimento quântico de fluorescência;

I = Intensidade de fluorescência integrada;

A = Absorbância;

η = Índice de refração do solvente.

O subscrito f na equação 2 indica que os valores são referentes aos dados da molécula de referência (padrão) e que os valores da amostra devem ser obtidos nas mesmas condições que os do padrão.

Já as medidas de decaimento de fluorescência das amostras foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico com excitação pulsada em 400 nm, dobrando-se a frequência da radiação proveniente de um *laser Ti* (Coherent, Mira 900) sintonizado em 800 nm (Coherent, Verdi SW) em um cristal não linear. Um detector MCP-PM (R3809U-50, Hamamatsu) é responsável por coletar os fótons emitidos. Um esquema do aparato experimental é apresentado na Figura 16⁹¹.

Para a determinação do tempo de vida médio do estado singlete foi utilizada a técnica de contagem de fótons correlacionados no tempo (TCSPC - *Time-Related Single Photon Counting*). Nas amostras em diferentes solventes, usaram-se concentrações com absorção menor que 0,05 na região de excitação.

Figura 16 - Esquema do aparato experimental usado na fluorescência resolvida no tempo.

3.2.4.3 Espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de *laser*

Espectros de absorção do transiente foram obtidos no Grupo de Química Inorgânica e Analítica, usando um espectrômetro de transientes – *laser flash photolysis (LFP-112 Luzchem)*. A excitação das amostras foi efetuada com o segundo harmônico (532 nm) de um *laser Brilliant Easy Nd-YAG*, com pulsos de 5,2 ns de duração. Análises cinéticas foram feitas com o *software* da *Luzchem*.

As soluções livres de oxigênio foram colocadas em uma célula de quartzo quadrada (10 x 10 mm). A absorbância das soluções foi ajustada para 0,1 para minimizar os efeitos de filtro interno e a presença de agregados. Para estes experimentos, além dos sete solventes usados anteriormente, utilizou-se também etilenoglicol.

3.2.5 Cálculos teóricos

Cálculos teóricos foram feitos utilizando a teoria de densidade funcional para modelar as geometrias moleculares e energias dos estados fundamental e excitados, e o contorno dos orbitais HOMO e LUMO. Todos os cálculos foram realizados com o programa *Gaussian 03* usando a Teoria de Densidade Funcional (DFT) com o método B3LYP, base 6-31G (d, p). Todos os cálculos foram feitos para moléculas isoladas em vácuo. Todas as moléculas simuladas mostram frequência vibracional positiva.

3.2.6 Acompanhamento *in situ* da reação de formação do corante por microscopia de fluorescência

Para acompanhar a reação de formação do corante DFTAM a nível *single molecule* propôs-se duas formas de catálise básica de Lewis: nanopartículas de óxido de magnésio (MgO) ativadas e funcionalização de lamínulas de microscopia com piperazina. Em ambos os casos, soluções dos precursores (4- (difenilamino) benzaldeído e 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila) foram preparadas em etanol absoluto numa concentração de 10^{-3} mol L⁻¹. Quantidades equimolares de cada reagente foram misturadas para serem adicionadas sobre os catalisadores.

Para poder monitorar a reação acontecendo em solução, um suporte foi desenvolvido. A lamínula de vidro de 22x22 mm foi colada num cilindro vazado de vidro, o que permitiu adicionar alíquotas dos reagentes sobre as lamínulas já no microscópio.

Para o caso do MgO, após ativar o óxido, alguns cristais foram rapidamente depositados sobre o suporte com a lamínula limpa e, rapidamente, submetidos a atmosfera de argônio, como é possível ver na Figura 17. Após alguns segundos, o sistema foi isolado, garantindo atmosfera inerte durante a adição de uma alíquota da mistura dos precursores (50 μL).

Figura 17 – Suporte montado para acompanhamento de reações em solução no microscópio, com controle de atmosfera.

Já as lamínulas funcionalizadas com piperazina (como será descrito adiante) foram primeiramente funcionalizadas e depois fixadas no cilindro de vidro para poder receber os 50 μL de solução.

3.2.6.1 Síntese de nanopartículas de MgO

Para obter nanopartículas de MgO, dentre vários métodos testados, optou-se por uma síntese via sol-gel⁹³. Acetato de magnésio (5,4223 g) foi dissolvido em 15 mL de etanol anidro, sob constante agitação magnética. O pH da solução foi então ajustado com adição vagarosa de solução de ácido oxálico 1 mol L⁻¹ até chegar a 5. A mistura continuou sendo agitada até formar um gel branco, que continuou sob agitação por uma noite. Após esse tempo, o produto foi seco a 100°C por 24 horas. O sólido obtido foi transformado em pó fino com auxílio de pistilo e almofariz, e submetido ao processo de calcinação por 950°C durante 36 horas. Para caracterizar o produto, análises de energia dispersiva de raios X (EDX) foram feitas na CAQI. O microscópio de varredura usado foi do tipo *Zeiss Leo 440* com detector *Oxford*. Além disso, experimentos de difração de raios X do pó obtido também foram realizados no equipamento de marca *Bruker*, modelo *D8 Advance*.

Para ativação do MgO antes dos experimentos no microscópio, o óxido foi aquecido por 2 horas a 180 °C.

3.2.6.2 Funcionalização das lamínulas de vidro com piperazina

Para limpeza, lamínulas de vidro foram inicialmente sonicadas em acetona por 10 minutos, secas no vácuo e depois lavadas em solução piranha previamente preparada⁹⁴, por 30 minutos a 50°C. Após esse tempo, elas foram lavadas com água Milli-Q e secas no vácuo, onde foram mantidas até o momento de funcionalizá-las.

Na Figura 18 tem-se um esquema do processo feito para ligar a piperazina às lamínulas.

Figura 18 - Esquema do procedimento para funcionalização das lamínulas com piperazina. As estruturas azuis representam as lamínulas.

Primeiramente as lamínulas foram adicionadas em solução de (3-Cloropropil)-Trietoxisilano (CPTES) em etanol absoluto numa proporção de 1:9, com volume suficiente para cobrir as lamínulas. Esse sistema foi mantido por 12 horas sob leve agitação. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas com água Milli-Q e etanol e secas em jato de argônio. E, por fim, foram aquecidas a 120°C por 3 horas e armazenadas em vácuo.

O último passo foi adicionar as lamínulas em solução de tolueno (15 mL) contendo piperazina (0,1g), cobrindo as lamínulas e deixando-as sob leve agitação por 6 horas. Para remover os resíduos que não foram ligados, as lamínulas foram lavadas com etanol absoluto, secas no vácuo e mantidas em temperatura ambiente até o momento de montar os suportes.

3.2.6.3 Microscopia TIRF

As sequências de imagens obtidas nos experimentos de acompanhamento da reação de formação do DFTAM foram feitos com um microscópio invertido, *IX71 - Olympus*, opticamente adaptado para operar no modo campo largo (*widefield*). As amostras foram excitadas em 473 nm através de um *laser CW* modelo *Cobalt Blues*, com polarização circular do feixe de *laser* devidamente ajustada usando placas de onda de $\lambda/2$ e $\lambda/4$, modelos AHWP05M-600 e AQWP05M-600 - da *Thorlabs*. Para separar o sinal de fluorescência da luz de excitação utilizou-se um filtro dicróico Z470rd - *Chroma* e um filtro notch do tipo ZET 473-NF, da *Chroma*, eliminando, assim, todos os fótons dispersos gerados no trajeto de excitação. As amostras foram focadas com uma objetiva com aumento de 100X e NA = 1,49, modelo UAPON 100X - *Olympus*, operando com óleo de imersão, $\eta = 1,515$, Tipo DF - *Cargille Laboratories*. As sequências de imagem de fluorescência foram gravadas com um EMCCD (*electron-multiplying charge-coupled device* – dispositivo de carga acoplada com multiplicador de elétrons) com câmera refrigerada por *cooler Peltier*, modelo *Evolve 512* – *Photometrics*. A câmera foi acoplada na porta do lado esquerdo do microscópio usando um sistema óptico com uma ampliação de 1,9x, modelo 25-71-52 - *Best Scientific*. Ao calibrar a ampliação óptica verificou-se que um *pixel* do sensor de imagem representa 84 nm, no plano da amostra. A irradiância de excitação foi variada de 28 a 115 W cm⁻² por meio do ajuste da potência óptica do *laser*, medida com um medidor de potência e energia, modelo *Nova* - *Ophir Optics*. A

disposição óptica da configuração microscopia *widefield* é ilustrada na Figura 19⁹¹. Através de uma leve inclinação no espelho posicionado antes do dubleto, foi possível fazer com que a pré-focalização formada no BFL da objetiva se deslocasse do eixo óptico para a borda, atingindo a condição de TIRF.

Figura 19 - Esquema óptico da configuração do microscópio *widefield*. BFP: distância focal traseira, CAA: conjunto óptico de acoplamento na câmera, CU: unidade de controle, DF: filtro dicroico, EXP: expensor de feixe, IR: diafragma Íris, M: espelho, MM:espelho móvel, NF:filtro notch, OB: lente objetiva, P: prisma, PFD: dubleto pré-focalizador, S: amostra, W: placas de onda, EF: filtro de excitação

Fonte : LENCIONE, D. Layout óptico da configuração dos microscópios de fluorescência presentes no GFM. São Carlos, 2014. Relatório Técnico-Científico.

Todos os componentes na configuração experimental foram montados numa mesa óptica com isolamento de vibração evitando impactos mecânicos externos que pudessem causar desalinhamento durante o processo de aquisição de imagens. Para tratar as sequências de imagens, foi desenvolvido um *software* com interface gráfica, que foi programado em *MATLAB*[®] e desenvolvido no Grupo de Fluorescência Molecular (GFM), no IQSC, cujo propósito é de ser uma plataforma de análises de fenômenos relacionados com a intermitência da fluorescência ao longo do tempo, utilizando-se microscopia TIRF.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do corante: mecanismo de reação e purificação

A síntese descrita anteriormente para formação do corante DFTAM teve como rendimento após purificação na coluna, 57%. Trata-se de uma reação de condensação, do tipo Knoevenagel⁹⁵. Nesse tipo de processo ocorre uma adição nucleofílica de um carbânion a um grupo carbonila (proveniente de uma cetona ou aldeído, como nesse caso), seguido da eliminação de uma molécula de água. Para tanto, a piperidina atua como catalisador, uma base relativamente fraca, que irá desprotonar um hidrogênio da 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila. Esse hidrogênio deve ser deficiente de elétrons para que seja retirado pela base. Conforme observado no mecanismo proposto na Figura 20, o hidrogênio presente no grupo metila, ligado ao carbono sp^2 da dupla ligação na qual estão as nitrilas, sente a eletronegatividade deste carbono somado ao efeito retirador de elétron das duas nitrilas, o que promove sua abstração pelo catalisador. O intermediário formado ataca o aldeído e, como produto final, obtêm-se o corante e uma molécula de água como subproduto.

Figura 20 - Esquema do mecanismo de reação de formação do composto DFTAM (4), partindo dos precursores 4- (difenilamino) benzaldeído (3), 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila (1) e piperidina (2).

A partir da purificação feita em coluna cromatográfica, observou-se através da técnica de RMN que o produto ainda continha impurezas. Portanto, foi feita a purificação por HPLC, o que resultou num rendimento de 42% do corante com alto grau de pureza. Na Figura 21 é possível observar a mudança nítida de cor entre os precursores e o produto purificado, caracteristicamente vermelho.

Figura 21 - Precursores usados na reação, sendo (a) 2- [1- (4- metilfenil) etilideno]-malononitrila; (b) 4- (difenilamino) benzaldeído e (c) o produto DFTAM.

4. 1.1 Caracterização do produto

A seguir, encontram-se os resultados obtidos para a caracterização do corante.

4.1.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

Na Figura 22 tem-se a estrutura do corante DFTAM devidamente numerada para melhor interpretação dos dados de RMN.

Figura 22 - Estrutura química do corante DFTAM numerada para análise dos dados obtidos por RMN.

Fórmula Química: $C_{31}H_{23}N_3$

Foram observados os seguintes sinais no espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz): 2,46 (s, 3H); 6,83 (d, 1H, $J = 15,4$); 6,96 (d, 2H, $J = 7,9$); 7,15 (m, 6H); 7,27 (d, 2H, $J = 8,1$); 7,34 (m, 8H); 7,42 (d, 1H, $J = 15,4$). Como é possível observar, os 21 hidrogênios presentes na molécula foram encontrados. O sinal com menor deslocamento químico é condizente com o único carbono sp^3 , resultante da metila 32, conforme numeração da Figura 22, e que está em posição *para* em relação ao carbono 26. Outro aspecto muito importante foram os sinais com constante de acoplamento de 15,4 Hz, provenientes das posições 1 e 8. Em função desse alto valor característico é possível comprovar um acoplamento vicinal entre hidrogênios na posição *trans*.

A seguir, nas Figuras 23 e 24 encontram-se o espectro geral de ^1H e a ampliação da região dos hidrogênios presentes em insaturações, respectivamente.

Figura 23 - Espectro de RMN ^1H do produto DFTAM

Figura 24 - Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN ^1H do produto DFTAM

Foram observados os seguintes sinais no espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 21,5; 79,1; 113,6; 114,2; 120,6; 120,6; 121,7; 124,8; 124,8; 126,0; 126,0; 126,0; 126,9; 126,9; 129,0; 129,0; 129,5; 129,5; 129,6; 129,6; 129,6; 129,6; 130,3; 130,3; 130,6; 141,4; 146,2; 148,8; 151,2; 171,5. Em 77,0 ppm observa-se um sinal triplo, proveniente do solvente CDCl_3 . Os 31 carbonos presentes na molécula foram identificados, portanto. O valor de menor deslocamento químico pertence à metila. Já o sinal observado em 79,1 ppm provem de um carbono sp^2 (posição 23), apresentando um valor consideravelmente baixo para presença das duas nitrilas que o blindam. Em contrapartida, o carbono vizinho (posição 22) tem alto valor de deslocamento químico (171,5 ppm) por ser desblindado. O restante dos carbonos aparece em sinais esperados pela sua posição.

Nas Figuras 25 e 26 têm-se os espectros de ^{13}C geral e a ampliação na região dos carbonos sp^2 .

Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C do produto DFTAM

Figura 26 - Ampliação da região dos carbonos sp^2 do espectro de RMN ^{13}C do produto DFTAM

Na Tabela 2 estão contidos todos os deslocamentos químicos obtidos, com as posições de carbono e hidrogênio relacionadas de acordo com a Figura 22.

Tabela 2 - Dados de deslocamento químico de RMN de ^{13}C e 1H do corante DFTAM em $CDCl_3$

Posição	^{13}C (ppm)	1H (ppm)
1	126,9	6,83 (d, $J = 15,4$ Hz)
2	130,6	-
3	130,3	7,27 (d, $J = 8,1$ Hz)
4	120,6	6,96 (d, $J = 7,9$ Hz)
5	151,2	-
6	120,6	6,96 (d, $J = 7,9$ Hz)
7	130,3	7,27 (d, $J = 8,1$ Hz)
8	121,7	7,42 (d, $J = 15,4$ Hz)
9	-	-
10	148,8	-
11	126,0	7,15 (m)
12	129,6	7,34 (m)
Continua		

Continuação		
13	129,5	7,15 (m)
14	129,6	7,34 (m)
15	126,0	7,15 (m)
16	146,2	-
17	126,0	7,15 (m)
18	129,6	7,34 (m)
19	129,5	7,15 (m)
20	129,6	7,34 (m)
21	126,0	7,15 (m)
22	171,4	-
23	79,1	-
24	113,6	-
25	114,2	-
26	126,9	-
27	129,0	7,34 (m)
28	124,8	7,34 (m)
29	141,4	-
30	124,8	7,34 (m)
31	129,0	7,34 (m)
32	21,5	2,46 (s)

4.1.1.2 Espectrometria de Massas

A seguir, na Figura 27, são apresentados os resultados obtidos através do equipamento HPLC-PDA-ELSD-MS, operando em modo positivo.

Figura 27 - Cromatograma HPLC-ELS-MS do corante. A- Cromatograma HPLC-MS; B- Cromatograma HPLC-PDA; C-Espectro de Massas.

Na Figura 27 A tem-se o cromatograma HPLC-MS, onde é possível observar um pico único de eluição proveniente do produto, próximo a 25 minutos e com alto grau de pureza. Como será descrito mais adiante, o corante possui um dos máximos

de absorção por volta de 300 nm, o que é confirmado pelo cromatograma HPLC-PDA (Figura 27 B).

E com relação ao espectro de massas, Figura 27 C, observa-se claramente a presença do íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 437,9, correspondente à fórmula molecular $C_{31}H_{23}N_3$. O íon molecular diprotonado $[M+2H]^{2+}$ em m/z 438,9 também está presente. Outros íons são visíveis e, por se tratar de uma amostra pura, devem ser fruto da alta fragmentação da molécula.

4.1.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro adquirido no infravermelho do corante encontra-se na Figura 28.

Figura 28 - Espectro de infravermelho do corante DFTAM

Em 2218 cm^{-1} observa-se um sinal agudo característico do grupo nitrila ($C\equiv N$). Já em 1579 cm^{-1} e em 696 cm^{-1} são encontradas transições intensas dos anéis aromáticos. É possível notar um sinal relativo à ligação C-N em 1282 cm^{-1} . E, em 970 cm^{-1} , verifica-se o sinal atribuído ao C-H *trans*-vicinal. Se o composto apresentasse isomeria *cis*, o sinal visto seria forte e entre $730\text{-}665\text{ cm}^{-1}$ ⁹⁶, o que não

acontece nesse o caso. Usando como referência os sinais obtidos no espectro de uma molécula similar⁴⁵, os resultados estão em boa concordância e são coerentes.

4. 2 Estudos fotofísicos do corante

4.2.1 Propriedades no estado singlete

4.2.1.1 Diferentes solventes

Os dados obtidos dos espectros de absorção no UV-Vis, emissão de fluorescência e tempo de vida em diferentes solventes são reportados na Tabela 3.

Tabela 3 - Propriedades fotofísicas do corante DFTAM em diferentes solventes

Solventes	λ_{abs}^1 (nm)	λ_{abs}^2 (nm)	λ_{em}^2 (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	τ_1 (ns)	B ₁ (%)	τ_2 (ns)	B ₂ (ns)	τ_m^a (ns)	χ^2	ξ^2 (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ_F
ACN	302	481	630 ^b	4917	0,006	28,0	2,74	72,0	1,97	1,54	38731	0.0001
MeOH	302	485	587 ^b	3582	0,001	98,1	5,16	1,9	0,10	1,90	31810	0.0005
EtOH	302	489	591 ^b	3529	0,01	89,4	0,54	10,6	0,06	1,39	27725	0.0059
2-PrOH	302	490	590 ^b	3459	0,02	66,6	0,23	33,4	0,09	1,06	38210	0.0041
1-BuOH	303	490	590 ^b	3459	0,02	78,1	0,24	21,9	0,07	1,19	37426	0.0044
THF	304	484	600 ^b	3994	0,01	3,9	1,35	96,1	1,29	1,00	37880	0.0216
MCH	304	480	517	1448	0,08	88,6	0,27	11,4	0,10	1,02	30562	0,0159
			538	2202	0,08	84,4	0,30	15,6	0,11	1,02		

^a $\tau_m = B_1\tau_1 + B_2\tau_2$, onde B corresponde ao peso de cada componente no valor médio (τ_m)

^b valores de comprimento de onda de emissão médios da banda, considerando todas as contribuições de bandas vibrônicas na curva gaussiana.

¹ transição $\pi \rightarrow \pi^*$.

² transição TCI.

λ = comprimento de onda; $\Delta\nu$ = variação de frequência; τ = tempo de vida; χ^2 = Qui Quadrado; ξ = coeficiente de extinção molar; Φ_F = rendimento quântico de fluorescência.

Na Figura 29 estão os espectros de absorção e emissão em diferentes solventes.

Figura 29 - Espectros normalizados de absorção (a) e emissão (b) do corante DFTAM em EtOH (—), MCH (—), ACN (—), THF (—), 1-BuOH (—), 2-PrOH (—), MeOH (—). O círculo representa a ampliação dos máximos da banda de TCI.

Para ajudar na interpretação dos resultados obtidos, na Tabela 4 estão contidas informações sobre os solventes usados.

Tabela 4 – Relação dos solventes utilizados nos estudos fotofísicos com seus respectivos valores de constante dielétrica (ϵ) e viscosidade (η).

Solvente	* ϵ	* η (cP)
MCH	2.02	0.67
THF	7.58	0.55
1-BuOH	18.8	3.00
2-PrOH	19.9	2.30
EtOH	24.5	1.20
MeOH	32.7	0.60
ACN	37.5	0.37
ETG	37.7	16.10

*Valores obtidos na literatura¹⁰⁸ a 298 K

De acordo com os espectros de absorção é possível observar duas bandas distintas, a primeira localizada próxima a 300 nm, proveniente de transição $\pi \rightarrow \pi^*$, e outra em aproximadamente 500 nm, devido a TCI. Estes resultados estão em coerência com o observado para composto análogo na literatura⁴⁵. A banda $\pi \rightarrow \pi^*$ não tem o comprimento de onda máximo de absorção alterado com a variação do meio, apesar de mostrar melhor absorção em solventes menos polares. Já a banda de TCI é sensível com a mudança de polaridade e viscosidade do solvente.

Para compreender melhor o processo de transferência de carga que acontece na molécula de DFTAM, na Figura 30 tem-se o esquema do mecanismo observado.

Figura 30 - Estrutura canônica do corante DFTAM no processo de transferência de carga total

No estado fundamental, a molécula de DFTAM já apresenta uma separação de cargas natural. Porém, ao se excitar a molécula, a densidade eletrônica da trifetilamina se desloca ao longo das conjugações π até as nitrilas de forma mais efetiva. A combinação de um grupamento não planar como a trifetilamina ligada às nitrilas, através do sistema π conjugado, permite à molécula não se agregar facilmente, diminuindo a supressão de fluorescência por agregação. Alguns estudos^{24, 45} revelam que em compostos desse tipo pode ocorrer uma torção na molécula por conta da trifetilamina (a qual possui liberdade nos seus anéis para girar e estabilizar melhor a molécula), de forma a promover uma separação de cargas ainda maior, permitindo uma intensa reorganização estrutural para atingir maior estabilidade. Essa eficiência do processo de separação de cargas faz com que o momento de dipolo do estado excitado aumente consideravelmente em relação ao fundamental. E essa observação é confirmada pelo solvatocromismo positivo (*red-shift*) que os espectros de absorção apresentam com o aumento de polaridade. O aumento no momento de dipolo observado no estado excitado faz com que o estado fundamental seja menos polar e os solventes polares estabilizem melhor o estado excitado, necessitando de menor energia para que o processo de absorção aconteça, o que se traduz em maiores comprimentos de onda. Esse comportamento é consistente com o processo de transferência de carga intramolecular⁹⁷.

Nos espectros de emissão de fluorescência também ocorre *red-shift* e aumento do deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) ao se aumentar a polaridade do meio. Esse fato indica que a separação de cargas aumenta no estado excitado, o que resulta no alto momento dipolar e explica a sensibilidade do composto aos solventes

de diferentes polaridades. Quando o estado excitado é formado num solvente polar (como acetonitrila, por exemplo), as moléculas de solvente vão se reorganizar de forma a solvatar o estado excitado, estabilizando-o melhor e diminuindo sua energia. Dessa forma, o *gap* entre estado fundamental e estado excitado diminui e causa um solvatocromismo positivo.

Alguns outros fatos devem ser considerados sobre a influência da natureza do solvente sobre os espectros de emissão. Quando um solvente polar solvata o estado excitado de uma TCl, a diminuição do *gap* de energia deste com o estado fundamental favorece a processos de relaxação não radiativos, o que diminui o rendimento quântico de fluorescência. Além disso, o uso de solventes polares próticos permite a formação de ligações de hidrogênio entre solvente e estado excitado, o que acaba comprometendo a fluorescência do composto. E a viscosidade que o solvente apresenta também influencia no fenômeno de fluorescência. Quando maior sua viscosidade, maior a restrição de movimentos que este causa na molécula excitada, e essa rigidez estrutural favorece a relaxação por fluorescência. Dessa forma, é possível entender o padrão observado para os comprimentos de onda máximos de emissão e os rendimentos quânticos de fluorescência. Como seria de se esperar, a acetonitrila tem o maior *red-shift* e o menor rendimento quântico de fluorescência, já que se trata de um solvente bastante polar e com baixa viscosidade (0,37 cP). O tetrahidrofurano também aparece num alto comprimento de onda, mas com rendimento quântico significativamente maior que a acetonitrila e os alcoóis, pois apesar de ser um solvente polar aprótico, ele possui uma baixa constante dielétrica (7,6) tendo baixo poder de solvatação, portanto. Dentre os alcoóis, as variações nos máximos de emissão são pequenas assim como para os rendimentos quânticos. Apenas o metanol tem um valor de rendimento menor uma ordem de grandeza que o restante, já que se trata do álcool mais polar e menos viscoso (0,60 cP) em comparação as demais. E o metilciclo-hexano é o solvente com banda de emissão em menor comprimento de onda e rendimento quântico dentro do esperado para um solvente apolar e média viscosidade (0,67 cP). Em função do ombro que aparece em 538 nm, esses dois comprimentos de onda foram analisados para decaimento de fluorescência. Outro ponto observado é que, nos espectros de acetonitrila e metanol, é possível notar componentes vibrônicas na banda principal que não aparecem nos outros solventes. Na Figura 31 tem-se a deconvolução dos espectros de emissão

aplicando como ajuste curvas gaussianas, as quais deram os melhores resultados para os dados experimentais.

Figura 31 - Deconvolução dos espectros de emissão de fluorescência do corante DFTAM em diferentes solventes

De acordo com os dados de simulação é possível ver várias contribuições vibrônicas para cada curva de emissão. Exceto para acetonitrila e metanol, existem três contribuições distintas que compõem os espectros de emissão. Já para acetonitrila e metanol notam-se transições vibrônicas no espectro, de menor intensidade.

Na Figura 32 estão os decaimentos de fluorescência obtidos para o corante em diferentes solventes. A curva com círculos não preenchidos se refere ao decaimento de emissão. A linha vermelha é o ajuste exponencial e os quadrados pretos são o IRF (*impulse-response function*, ou função impulso-resposta).

Figura 32 – Decaimentos de fluorescência em (a) MCH, (b) THF, (c) 1-BuOH, (d) EtOH, (e) 2-ProOH, (f) MeOH, (g) ACN, com excitação em 400 nm.

Os parâmetros relativos aos decaimentos foram analisados por modelos biexponenciais, com convolução com a resposta instrumental, de acordo com a equação (3):

$$I(t) = \sum_i B_i \exp\left[-\frac{t}{\tau_i}\right] \quad (3)$$

Em que $I(t)$ é a intensidade de fluorescência, I_0 é a intensidade de fluorescência no tempo zero, τ é o tempo de vida da espécie emissiva, t é o tempo de aquisição e B é o peso da componente dentro do tempo de vida médio.

Como é possível observar na Tabela 3, o tratamento dos dados resultou em duas componentes de tempo de vida, uma curta que é da ordem de picossegundos (ps) e outra mais longa, na ordem de nanossegundos (ns). E, conforme já discutido anteriormente, a polaridade e a viscosidade do meio influenciaram no padrão de fluorescência. Para ACN, MeOH e EtOH, a aquisição dos decaimentos foi mais difícil pela baixa contagem de fótons, já que o corante possui pouca absorção em 400 nm e baixo rendimento quântico em meios polares. Esse fato é confirmado pelo decaimento muito próximo ao IRF. Em solventes mais polares, a componente mais rápida tem um peso maior no valor de tempo de vida médio. Em MeOH, por exemplo, τ_1 é de 1ps, possuindo um peso de 98,1% no tempo médio e τ_2 é de 5,16 ns, o que representa apenas 1,9% do valor médio. Já em THF, que mostrou ser o melhor solvente para observar fluorescência, a componente rápida é de 10 ps, e tem um peso de 3,9%, e a componente mais longa é de 1,35 ns, com influencia no tempo de decaimento médio de 96,1%. Portanto, em meios mais polares o que predomina basicamente é o perfil de decaimento mais rápido.

Para analisar se o comprimento de onda de emissão influenciaria no decaimento de fluorescência, escolheram-se dois valores para acompanhar o processo em MCH (517 e 538 nm). E, conforme visto na Tabela 3, a diferença é muito pequena entre os dois conjuntos de dados. τ_1 é o mesmo em ambos os casos, 80 ps, variando apenas o peso de cada componente no valor médio (88,6% em 517 nm e 84,4% em 538 nm). E τ_2 é de 0,27 ns em 517 nm (com peso de 11,4%) e 0,30 ns em 538 nm, representando 15,6% do valor médio. Dessa forma, só o decaimento obtido em 538 nm de emissão está representado na Figura 32.

4.2.1.2 Micelas

Os experimentos feitos em diferentes surfactantes tiveram por objetivo entender como as propriedades de absorção e emissão do corante variavam em meio catiônico, não iônico e aniônico, através das possíveis interações de carga destes com os grupos doador e aceptor do DFTAM. Para tanto, utilizou-se o CTAC e CPC (catiônicos), *Tween* 20 (não iônico) e SDS (aniônico). Na Figura 33 estão representadas as estruturas químicas desses reagentes.

Figura 33 - Estrutura química dos surfactantes CTAC, CPC, Tween 20 e SDS

CTAC

CPC

Tween 20

SDS

Os dados obtidos dos estudos feitos em micelas contendo o corante DFTAM em meio aquoso estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades fotofísicas do corante DFTAM em diferentes surfactantes

Surfactante	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	τ_1 (ns)	B_1 (%)	τ_2 (ns)	B_2 (ns)	τ_3 (ns)	B_3 (%)	τ_m^a (ns)	χ^2	Φ_F
CTAC	493	619	4129	0,01	25,4	0,64	16,4	4,58	58,2	2,77	1,48	0.0179
CPC	480	583	3680	0,04	28,8	0,34	37,2	1,19	34,0	0,54	1,30	0.0090
Tween 20	493	568	2678	0,09	11,5	0,71	61,5	3,64	27,0	1,43	1,10	0.0160
SDS	501	590	3010	0,06	12,3	0,51	64,2	1,59	23,5	0,71	1,02	0.0110

^a $\tau_m = B_1\tau_1 + B_2\tau_2 + B_3\tau_3$, onde B corresponde ao peso de cada componente no valor médio (τ_m)

λ = comprimento de onda; $\Delta\nu$ = variação de frequência; τ = tempo de vida; χ^2 = qui quadrado; Φ_F = rendimento quântico de fluorescência.

Os espectros de absorção e emissão do corante nas micelas estão contidos na Figura 34.

Figura 34 - Espectros de absorção e emissão dos sistemas micelares contendo o corante DFTAM numa concentração de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Para compreender melhor a interação do corante com o surfactante é necessário comparar os resultados obtidos em meio micelar e em diferentes solventes. Como a água é altamente polar, se não houvesse a presença do surfactante, o corante teria um comportamento semelhante ao observado em solventes polares próticos, como o etanol, com baixo rendimento quântico (0,0059). Porém, para todos os surfactantes testados, os valores são expressivamente maiores, de forma que é possível concluir que a molécula do corante está interagindo com a micela. Considerando a estrutura micelar representada na Figura 35⁹⁸, pode-se perceber que ela é composta por diferentes camadas: núcleo hidrofóbico contendo as caudas apolares de hidrocarbonetos das moléculas de surfactante, a região das cabeças dos surfactantes (camada de Stern) e a região mais ampla onde estão os contra-íons em meio aquoso (camada de Gouy-Chapman).

Figura 35 - Representação da estrutura bidimensional de uma micela.

Fonte: MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

O corante pode estar contido entre as cadeias hidrofóbicas do surfactante ou mais próximo do centro da estrutura. O núcleo da micela normal é hidrofóbico e proporciona um microambiente de baixa polaridade, o que comparado aos solventes, resultaria em um comportamento análogo ao visto em MCH, por exemplo, com deslocamento hipsocrômico de absorção e emissão. Já se estivesse presente entre as cadeias hidrofóbicas, uma região moderadamente polar pelas cabeças dos surfactantes e pelo contato com o meio aquoso, o resultado seria semelhante aos solventes polares próticos (tais como etanol), com deslocamento batocrômico⁹⁸. Ainda assim, o rendimento quântico é maior do que o observado em solventes polares, pois o sistema micelar provoca restrição de movimentos na molécula excitada, de forma a favorecer a relaxação por fluorescência⁹⁹.

Observando os espectros de absorção, e comparando-os com a curva obtida em etanol, verifica-se um deslocamento batocrômico, com exceção do CPC. Como já discutido, esse comportamento corrobora a proposta de o corante estar localizado na camada de Stern. Dentre eles, para o SDS que possui cabeça polar negativa e que tem o maior comprimento de onda de absorção, pode estar havendo a interação entre a parte hidrofílica da cadeia e o grupo doador do corante (que fica deficiente de elétrons pela TCI) de forma a estabilizá-lo melhor, favorecendo processos de relaxação não radiativos. Ou ainda, o corante pode estar ocupando também a camada de Gouy-Chapman e sendo estabilizado pela água. Em ambos os casos, o espectro de emissão também se deslocou para o vermelho e o rendimento quântico, que foi de 0,011, foi menor que em CTAC e *Tween* 20, 0,018 e 0,016, respectivamente. Para esses dois surfactantes, os resultados estão bastante parecidos, tanto nos espectros de absorção e emissão quanto no rendimento quântico, o que sugere que o grupamento positivo do CTAC não alterou de forma significativa o comportamento do corante. Já o CPC, apesar de ser um surfactante catiônico, assim como o CTAC, mostrou perfil de absorção e emissão diferente dos casos, com considerável *blue-shift* e menor rendimento quântico (0,009). O menor rendimento quântico de emissão é coerente com o menor tempo de vida médio de fluorescência, evidenciando que o surfactante age como supressor, através de transferência reversível de elétrons⁹⁹.

A seguir, na Figura 36 está a deconvolução dos espectros de emissão aplicando como ajuste curvas gaussianas.

Figura 36 - Deconvolução dos espectros de emissão de fluorescência em meio micelar

Como se pode perceber, em todos os surfactantes existem duas componentes de emissão, diferente do caso dos solventes em que esse número variou de acordo com a polaridade do meio. E um padrão interessante foi observado. Em SDS e *Tween* 20 existe um ombro por volta de 600 nm (após o máximo de emissão) que corresponde a componente mais expressiva do espectro total. Já no caso dos surfactantes catiônicos esse ombro está à esquerda do máximo da curva, sendo menos intenso que a outra componente.

O tempo de vida do estado singleto excitado em meio micelar é um indicador sensitivo do ambiente local que o envolve. Conforme visto na Tabela 5, três componentes de estado excitado estão presentes nos diferentes surfactantes. Comparando os resultados em etanol, onde duas componentes aparecem, 10 ps e 0,54 ns, os resultados obtidos em surfactantes podem ser interpretados da seguinte forma: os tempos em τ_1 e τ_2 são semelhantes aos vistos no solvente, de forma que o valor de τ_3 deve ser associado ao efeito da interação corante-surfactante.

Com relação à influência dos surfactantes nos tempos de vida, o que se pode concluir é que, como já tinha sido observado pelos espectros de absorção e emissão, o CTAC é o que promove um maior ganho no tempo de vida médio (2,77ns), seguido pelo *Tween* 20 (1,43 ns), SDS (0,71 ns) e CPC que, como já explicado, suprime a fluorescência, tendo um valor médio de 0,54 ns.

Os dados de decaimento também foram tratados da mesma forma que em diferentes solventes, usando a equação (3) e os resultados obtidos estão na Figura 37.

Figura 37 – Decaimentos de fluorescência do corante DFTAM numa concentração de 10^{-5} mol L⁻¹ em a) CATC, (b) CPC, (c) *Tween* 20, (d) SDS, com excitação em 400 nm.

4.2.2 Espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de laser

4.2.2.1 Diferentes solventes

Os experimentos de absorção transiente, feitos nos diferentes solventes, estão tabulados na Tabela 6.

Tabela 6 - Propriedades transientes do corante DFTAM em diferentes solventes

Solvente	λ_1 (nm)	τ_1 (ms)	λ_2 (nm)	τ_2 (μ s)
MCH	480	>10	-	-
THF	480	>10	660	21.90
1-BuOH	480	>10	660	23.20
2-PrOH	480	>10	660	22.80
EtOH	480	>10	-	-
MeOH	-	-	-	-
ACN	-	-	-	-
ETG	-	-	660	24.40

Os espectros de absorção de transientes e as curvas cinéticas de decaimento em diferentes solventes encontram-se a seguir, na Figura 38.

Figura 38 - Espectros de absorção de transientes e curvas de decaimento do estado excitado tripleto do corante DFTAM em (a,b) MCH, (c,d) THF, (e,f) 1-BuOH, (g,h) 2-PrOH, (i,j) EtOH, (l,m) ETG.

Os decaimentos foram monitorados a 480 e 660 nm com pulsos de *laser* de 10 mJ cm^{-2} em 532 nm (20 ns) em solução saturada de argônio.

Em solvente THF, o corante apresenta três espécies transientes, as quais duas estão em aproximadamente 450 nm com diferentes escalas de decaimento. Uma delas possui tempo de vida menor que 2 μ s (que não aparece na Figura 38), a qual é mascarada pela espécie com decaimento longo (maior que 10 ms) e que aparece no mesmo comprimento de onda. As componentes transientes com menor e maior tempo de vida são atribuídas à absorção T-T (triplete-triplete) e uma espécie radicalar, respectivamente.

A presença de uma espécie longa e a baixa absorção da componente rápida em 450 nm dificulta a detecção correta da espécie rápida em 450nm. Com um ou dois *shots* de *laser* é possível ver a espécie rápida na curva de decaimento. Acima de quatro, apenas a longa é vista. De fato, a espécie transiente longa apresenta um

pequeno incremento com a menor componente ($\tau = 1\text{-}2 \mu\text{s}$), o que sugere uma dependência entre ambas.

Já a terceira componente identificada no espectro é observada em 650 nm e mostra clara dependência com o número de *shots*, indicando a formação de uma nova espécie depois da irradiação com *laser*. O decaimento do tempo de vida desta não mostra dependência com as estruturas em 450 nm, tendo um valor de aproximadamente 22 μs . Essa espécie aparece apenas em solventes próticos de baixa e média polaridade, o que indica a presença de elétrons solvatados¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. A posição desta banda em regiões do espectro de menor energia dá suporte ao maior tempo de 22 μs observado para esta espécie, quando comparado com a espécie triplete de 2 μs em 450 nm. E elétrons solvatados geralmente têm tempos de decaimento que vão de poucos microssegundos a nanossegundos¹⁰³. Outro ponto interessante é que em solventes onde a espécie de 650 nm é mais bem observada, também se observa uma diminuição da intensidade de absorção das espécies em 450 nm, indicando que podem ser processos competitivos. Para estudos futuros, a comprovação de que a espécie em 650 nm provém de elétrons solvatados pode ser feita através da adição de um capturador de elétrons (chamado de “*scavenge*”), como NO_2 (gerando N_2) ou H_3O^+ (pela alta sensibilidade desta banda a variações de pH, gerando hidrogênio radicalar e água), os quais farão a supressão desta banda¹⁰⁴.

O que se pode perceber entre os resultados obtidos é que as espécies transientes dependem fortemente da polaridade e viscosidade do solvente. Em um meio de baixa viscosidade, como o EtOH, somente as espécies localizadas em 450 nm são observadas. Quando a viscosidade aumenta (isto é, $\text{THF} \rightarrow 2\text{-PrOH} \rightarrow 1\text{-BuOH}$) a componente em 650 nm é favorecida. Já em alta viscosidade, como é o caso do ETG, somente o transiente em 650 nm ocorre no espectro.

Em solventes de baixa polaridade (MCH) somente as duas espécies de 450 nm aparecem, não se observando a formação de elétrons solvatados, como seria de se esperar pra esse solvente. Entretanto, em solventes altamente polares (MeOH e ACN) não se observa variações de absorção na faixa de 300 a 800 nm, indicando que estado excitado singlete nesses meios não promovem processos de cruzamento intersistema.

4.2.2.2 Micelas

A seguir, na Figura 39 estão os espectros de absorção de transientes e as curvas de decaimento do estado excitado tripleto do corante DFTAM em diferentes surfactantes.

Figura 39 - Espectros de absorção de transientes e curvas de decaimento do estado excitado tripleto do corante DFTAM em (a,b) CTAC, (c,d) CPC, (e,f) *Tween* 20, (g,h) SDS.

Os decaimentos foram monitorados a 480 e 660 nm com pulsos de *laser* de 10 mJ cm^{-2} em 532 nm (20 ns) em solução saturada de argônio. Como já discutido anteriormente, para os solventes THF, 1-BuOH e 2-PrOH, existem três espécies transientes, duas próximas a 450 nm (das quais uma é maior que 10 ms e a outra é menor que 2 μ s, sendo mascarada pela primeira) e uma espécie em 660 nm, com decaimento em cerca de 22 μ s. Dentre os quatro surfactantes, apenas o *Tween* 20 apresenta esse mesmo comportamento, já que se trata de uma molécula não iônica, a qual oferece um perfil semelhante aos solventes próticos citados por possuir grupos alcoóis em sua estrutura. Inclusive o número de *shots* de *laser* influencia no aparecimento da estrutura em 660 nm. Dessa forma, os elétrons solvatados são formados.

Para os outros três surfactantes acontece um fenômeno diferente. Apenas as espécies observadas em 450 nm aparecem nesse caso. Este fato pode ser explicado pela limitação que a micela promove da interação do corante com o meio

aquoso, gerando um potencial de superfície que dificulta a ejeção dos elétrons para o solvente.

Através dos experimentos feitos em diferentes solventes e em micelas, é possível concluir que a espécie curta (1-2 us) é de uma banda T-T que não sofre influências de ligações de hidrogênio, a espécie com maior tempo de vida (>10 ms) é de um radical, e a espécie em 650nm é da formação de elétrons solvatados.

4.2.3 Cálculos teóricos

Para completar os resultados experimentais, alguns cálculos foram feitos acerca do estado fundamental, e excitado singlete e tripleto. Na Figura 40, estão os orbitais moleculares de fronteira do corante DFTAM para o estado singlete.

Figura 40 - Orbitais moleculares de fronteira para o estado singlete no vácuo

Cálculos da teoria de densidade funcional dependem do tempo do processo de excitação singlete e mostram três processos distintos. Considerando o HOMO, é possível ver a concentração de densidade de carga na parte da trifenilamina, o grupo doador da TCI. Entre HOMO e LUMO essa carga se desloca ao longo da molécula se concentrando fortemente na região do grupo aceitor das nitrilas, o que

não acontece em LUMO+1 e LUMO+2. Portanto, a transição referente à TCl é atribuída a HOMO→LUMO. As outras duas componentes de absorção, HOMO→LUMO+2 e HOMO→LUMO+1, são associadas à transição $\pi\rightarrow\pi^*$ e consistentes com essa banda onde não existe um deslocamento de cargas como no caso da TCl.

Na Figura 41 estão os orbitais moleculares de fronteira para o estado tripleto do corante.

Figura 41 - Orbitais moleculares de fronteira para o estado tripleto no vácuo

Para átomos ou radicais onde o HOMO é ocupado por um único elétron tem-se o SOMO (Singly Occupied Molecular Orbital) e o SUMO (Singly Unoccupied Molecular Orbital), que se trata do orbital molecular não ocupado por um só elétron. De forma análoga ao que foi observado no caso anterior, é possível ver a transferência de carga ao longo da estrutura, na direção dos grupos doador-aceptor, consistente com os resultados vistos na espectroscopia de absorção de transientes.

A seguir, na Figura 42 estão as imagens de densidade de spin e elétron do estado tripleto do corante DFTAM.

Figura 42 - Densidade de spin e de elétron do estado triplete do corante DFTAM. A escala mostra o aumento na densidade de elétrons, do azul para o vermelho.

Como é possível perceber, a densidade de elétrons do estado triplete é concentrada na região das nitrilas (representada pela cor avermelhada), deixando a parte da trifenilamina com deficiência de carga, conforme cor azul. A partir disso, na distribuição de densidade de spin, aparecem duas regiões azuis próximas às nitrilas que representam os spins do estado excitado.

Por fim, calcularam-se os valores do momento de dipolo do estado singlete e triplete, correlacionando o vetor com a estrutura da molécula. Os resultados são reportados na Figura 43.

Figura 43 - Correlação do vetor do momento de dipolo da estrutura do estado singlete e triplete do corante DFTAM

Entre os estados singlete e triplete existe uma grande mudança estrutural da molécula, já que no segundo caso há maior coplanaridade dos anéis da trifenilamina do que no primeiro, o que muda a direção do vetor. Para ambos os casos o momento de dipolo é alto, confirmando a TCI, sendo um pouco mais intenso no

estado triplete. De forma geral, os cálculos obtidos corroboram os resultados experimentais.

4.3 Acompanhamento *in situ* da reação de formação do corante por microscopia de fluorescência

Os experimentos de acompanhamento *in situ* da reação de síntese do DFTAM usaram como catalisador as nanopartículas de MgO e a piperazina funcionalizada nas lamínulas de vidro.

A seguir, na Figura 44 estão o difratograma de raios X e os resultados de EDX obtidos para amostra de MgO.

Figura 44 - a) Difratograma de raios X da amostra de óxido de magnésio, b) Gráfico de EDX de uma partícula de MgO.

Na Tabela 7 estão os dados obtidos no experimento de EDX.

Tabela 7 - Análise elementar dos dados obtidos na Figura 44 b.

Elemento	Quantidade Elementar (%)
Mg	57.43
O	42.57

Como é possível ver, picos de difração aparecem em (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) e (2 2 2), os quais correspondem a estrutura cúbica do MgO, com parâmetro de rede constante $a = 0,421 \text{ nm}^{100}$. O padrão de difração visto indica boa

cristalinidade do cristal, sem a presença de picos de impureza. Através da equação (4), a fórmula de Scherrer:

$$D = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (4)$$

Onde λ é o comprimento de onda utilizado (1,54060 Å), β (em radianos) é a largura total na meia altura de intensidade do pico de difração localizado em 2θ , e θ é o ângulo de *Bragg*, foi possível calcular o tamanho médio dos cristais, que foi de 42 nm.

A partir dos dados obtidos com EDX, foi confirmado que as partículas são de MgO, com uma proporção de elementos de 1:1 de Mg:O. Vale resaltar que, dentre várias rotas de síntese adotadas para produzir as menores e mais homogêneas partículas, a que foi descrita nesse projeto foi a que mostrou melhores resultados, revelando a dificuldade em preparar o óxido.

Utilizando as partículas de MgO devidamente ativadas, sequências de imagens foram feitas com a seguinte configuração: resolução de 250x250 *pixels*, 10 mW de potência do *laser*, diâmetro do feixe de excitação de 12 mm, condições da câmera de 2 de ganho analógico e 1 de Gamma, ganho da fotomultiplicadora de 300 vezes, profundidade de captura de 16 Bit, tempo de integração de 100 ms, taxa de aquisição de imagens de 7.7 FPS, total de 500 imagens e velocidade de transferência de dados de 10 MHz.

O que foi notado na obtenção das sequências é que as partículas de MgO são grandes quando observadas no microscópio e altamente fluorescentes. Esse último fato pode estar correlacionado a presença de impurezas na estrutura do óxido ou falhas na sua estrutura, como centros de cor F (causados pela ausência de átomos de O no cristal). Dessa forma, a observação da possível fluorescência da formação do produto ficou prejudicada. Na Figura 45 está a imagem média de uma das sequências obtidas para catálise com MgO.

Figura 45 - Imagem média do filme para acompanhar a reação *in situ* com MgO como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm

Os resultados relativos à intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 45 são representados nas Figuras 46 a 48.

Figura 46 - Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 45. O limite (*threshold*) está representado pela linha pontilhada em 3500 contagens.

Figura 47 - Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 45.

Figura 48 - Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência (Figura 46).

O objetivo desse experimento era observar uma região ativa de catálise que promovesse a formação do corante DFTAM com excitação em 473 nm (comprimento de onda no qual a molécula absorve radiação) de forma que, através da intermitência de fluorescência, fosse possível observar aumentos de contagem momentâneos ao longo do tempo, o que seria relacionado à formação de poucas moléculas de corante ou somente uma sobre o óxido que emitissem radiação e rapidamente se difundisse no meio ou se degradassem, de forma a deixar de se observar valores altos de contagem. Dessa forma, um único sítio catalítico geraria várias moléculas ao longo de tempo, mostrando um perfil de intermitência com momentos de emissão durante o periódico analisado. E o *threshold* serviria para determinar o limite no qual o sistema está ON (onde o corante está fluorescendo) e OFF (onde o corante está se difundindo no meio e outra molécula está se formando). O decaimento visto na Figura 46 mostra a presença de uma espécie fluorescente que decai rapidamente ao longo do tempo e não volta a emitir, o que é típico do descoramento (*photobleaching*) de muitas moléculas de corante. O resultado alcançado é diferente do esperado, portanto, o que pode ser explicado por alguns fatores, como a baixa eficiência do catalisador na formação da reação, a adsorção do corante na superfície do óxido após sua formação ou a desativação dos seus sítios catalíticos. Como se sabe, essa reação trata-se de uma condensação, de forma que moléculas de água fazem parte do produto obtido e o MgO, para atuar como boa base de Lewis, precisa estar isento de água.

Assim, o que se nota na Figura 47 é apenas a distribuição de Poisson, consistente com o ruído atribuído ao sistema (entre 2000 e 3000 contagens). Nas

demais regiões, onde as contagens são maiores, basicamente não se observa eventos. E, dessa forma, a distribuição de ON-OFF da Figura 48, que deveria apresentar várias alterações entre 1 e 0 ao longo do tempo, possui atividade apenas nos primeiros segundos, ficando em OFF no restante do experimento.

As limitações apresentadas no uso do MgO, portanto, levaram a necessidade de se encontrar outra forma de catálise básica. A imobilização da molécula de piperazina foi escolhida por se tratar de uma base orgânica, sem emissão na região de excitação (473 nm), e com a estrutura mais próxima do catalisador original (piperidina). Dessa forma, ligando-se um dos seus átomos de N na lamínula, o outro estaria disponível com seu par de elétrons para ajudar na formação do corante. Além desses motivos, a fixação do catalisador numa superfície garantiria um ponto fixo para ser analisado usando microscopia TIRF, permitindo os experimentos em solução.

Assim como para o MgO, uma série de sequências foram feitas usando as mesmas condições experimentais e os mesmos parâmetros de configuração do sistema para que os dados fossem comparáveis: resolução de 250x250 *pixels*, 10 mW de potência do laser, diâmetro do feixe de excitação de 12 mm, condições da câmera de 2 de ganho analógico e 1 de Gamma, ganho de 300 vezes na fotomultiplicadora, profundidade de captura de 16 Bit, tempo de integração de 100 ms, taxa de aquisição de imagens de 7.7 FPS, total de 500 imagens e velocidade de transferência de dados de 10 MHz.

Várias sequências de imagens foram tratadas, apresentando o mesmo padrão de resultados. Para exemplificar o que foi observado dentro desse conjunto de dados, alguns centróides de diferentes lamínulas são apresentados a seguir. Nas Figuras 49 e 50 estão os resultados obtidos para o primeiro centróide.

Figura 49 - Imagem média do filme para acompanhar a reação *in situ* com piperazina como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm

Figura 50 – (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 49. O limite (*threshold*) está representado pela linha pontilhada em 2300 contagens e a seta vermelha indica o momento em que os reagentes foram injetados, (b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 49.

Nas Figuras 51 e 52 estão os resultados obtidos para o segundo centróide.

Figura 51 - Imagem média do filme para acompanhar a reação *in situ* com piperazina como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm

Figura 52 – (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 51. O limite (*threshold*) está representado pela linha pontilhada em 2200 contagens e a seta vermelha indica o momento em que os reagentes foram injetados, (b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 51.

Nas Figuras 53 e 54 estão os resultados obtidos para o terceiro centróide.

Figura 53 - Imagem média do filme para acompanhar a reação *in situ* com piperazina como catalisador. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm

Figura 54 – (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 53. O limite (*threshold*) está representado pela linha pontilhada em 2100 contagens e a seta vermelha indica o momento em que os reagentes foram injetados, (b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 53.

Nos resultados reportados anteriormente é possível notar que para cada centróide existe um comportamento de intermitência definido por períodos de ON e OFF. Nestes se observa um tempo inicial de baixa contagem (ruídos do equipamento) que foi adquirido antes da injeção dos reagentes (identificado em cada gráfico de intermitência pela seta vermelha) justamente com o objetivo de mostrar que não havia espécies emissivas na lamínula. Após a adição dos precursores, a intensidade de contagem começou a aumentar. Como já explicado anteriormente, a emissão observada é associada à formação do corante, sendo sucedido por um tempo sem fluorescência para recomposição do sítio catalítico. Ensaios feitos com lamínulas sem funcionalização pela piperazina não mostram emissão, de forma que é possível concluir que a piperazina se ligou ao vidro. E, já que os precursores não

absorvem radiação em 473 nm, a única espécie que pode estar emitindo nessa região é o corante DFTAM. A relação sinal-ruído é de cerca de 2:1 o que, apesar de ser baixa, pode ser explicada pelo fato de que se trata de poucas moléculas fluorescentes, somada ao fato de que o corante por si só tem baixo rendimento quântico em meios polares. Portanto, esse resultado é consistente com o sistema.

Para o centróide destacado na Figura 49, 21 ciclos de ON-OFF se repetiram, o que sugere que um mesmo sítio catalítico obteve um número de *turnover* de 21, produzindo no mínimo 21 moléculas de corante, o que resulta numa taxa de conversão mínima de 0,31 moléculas/s. Essa observação é consistente com os tempos de OFF, os quais nessa amostra são, em média, de 0,58 s (descartando o intervalo anômalo entre 35 e 49 s), não sendo menor que 0,28 s. Considerando os tempos de vida observados no experimentos de absorção de transientes, três valores foram vistos, de aproximadamente 10 ms, 2 μ s e 22 μ s, os quais somados resulta em 10 ms, já que este valor é muito maior que 2 μ s e 22 μ s. Dessa forma, os tempos de OFF observados não pertencem a moléculas de DFTAM que, quando excitadas, apresentaram cruzamento intersistema e alcançaram o estado triplete, mas sim ao período de dissociação das moléculas de corante e reposição do sítio catalisador. Vale a pena destacar que existe grande perda de sinal entre o que é produzido pela amostra e o que chega ao detector, o que pode justificar a pequena quantidade de tempos de ON observados.

Para o centróide destacado em Figura 51, o número de ciclos ON-OFF é de 15 (com uma taxa de conversão mínima de 0,21 moléculas/s) e média de tempo OFF de 0,80 s, e o centróide evidenciado em Figura 53, o número de ciclos ON-OFF é de 38 (resultando numa taxa de conversão mínima de 0,54 moléculas/s) e com média de tempo OFF de 0,26 s. De forma geral, o mesmo padrão é observado.

Nos histogramas de contagem, duas distribuições são vistas, a primeira tem formato de gaussiana (distribuição de Poisson), consistente com o ruído atribuído ao sistema e a segunda, menos intensa e associada aos sinais emitidos pela amostra.

A partir de certo tempo não se nota mais sinais de emissão. Como já dito anteriormente, a reação observada produz água como subproduto, o que pode estar eliminando a atividade do catalisador após alguns ciclos de catálise, já que ainda existe grande quantidade de moléculas de reagentes disponíveis para serem consumidas. E, por se tratar de um meio volátil e com pequenos volumes, grandes tempos de aquisição de imageamento não puderam ser captados. Em filmes

excedendo 60 segundos o solvente evaporava. E volumes maiores que 50 μL , ao serem injetados no sistema, prejudicavam a estabilidade do suporte e aquisição das imagens.

Para melhorar os resultados obtidos, algumas partículas de peneira molecular (marca *JTBaker*, com tamanho de poro de 4 Å e dimensão de 8-12 mesh) foram ativadas em aproximadamente 300 °C em mufla, durante 5 horas e colocadas sobre as lamínulas funcionalizadas antes da adição dos reagentes, com o objetivo de capturar moléculas de água formadas pela reação de formação do DFTAM e prolongar a atividade catalítica. Além disso, 1 mL de solução equimolar dos precursores em etanol a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi colocada nos suportes, ao invés do 50 μL , como no caso anterior e a injeção foi feita e logo em seguida o suporte foi levado ao microscópio. Várias sequências de imagens foram adquiridas com os mesmos parâmetros de configuração do sistema: resolução de 150x150 *pixels*, 55 mW de potência do laser, diâmetro do feixe de excitação de 12 mm, condições da câmera de 2 de ganho analógico e 1 de Gamma, ganho de 200 vezes na fotomultiplicadora, profundidade de captura de 16 Bit, tempo de integração de 20 ms, taxa de aquisição de imagens de 22.7 FPS, total de 3000 imagens e velocidade de transferência de dados de 10 MHz.

Dentre as sequências obtidas, a seguir estão os resultados alcançados para análise do centróide destacado na Figura 55.

Figura 55 - Imagem média do filme para acompanhar a reação *in situ* com piperazina como catalisador e partículas de peneira molecular para absorção de água. Centróide em destaque com círculo branco. Barra de escala: 2 μm

Os resultados relativos à intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 55 são representados na Figura 56.

Figura 56 – (a) Evolução temporal da intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 55. O limite (*threshold*) está representado pela linha pontilhada em 8500 contagens, (b) Diagrama ON (1)-OFF (0) obtido após a conversão binária da evolução temporal da intermitência de fluorescência, (c) Histograma de contagens obtido para a evolução de intermitência de fluorescência do centróide destacado na Figura 55.

Como é possível notar, durante todo o período de aquisição o sistema continua emitindo, com um padrão de intermitência maior e mais homogêneo do que nos casos anteriores. Dessa forma, o gráfico de ON-OFF apresentou 166 ciclos, com uma média de tempo de OFF de 0,17 s. Esse valor consiste numa taxa de conversão mínima de 1,26 moléculas/s, significativamente maior do que nos sistemas sem a peneira molecular. Esses resultados permitem concluir que a presença do dessecante melhorou a atividade catalítica da piperazina pela possível eliminação das moléculas de água. Para complementar esses dados, a mesma

sequência de imagens em questão foi tratada através do *software* de super-resolução *Localizer*¹⁰¹, uma ferramenta bastante útil para tratar de estruturas com tamanho reduzido, já que permite trabalhar abaixo do limite de difração da luz (considerado por aproximação como metade do comprimento de onda de excitação), conseguindo resolvê-las espacialmente. Na Figura 57 está a imagem de super-resolução da sequência após tratamento no *Localizer*.

Figura 57 – Imagem de super-resolução gerada pelo tratamento da sequência de imagens através do *software Localizer*. Escala em μm .

Os pontos observados nessa imagem são os que apresentaram intermitência de fluorescência ao longo da sequência, se tratando dos sítios que realizaram catálise. O sistema, portanto, se mostra funcional para detecção da reação de formação do composto DFTAM, mostrando várias possibilidades de estudos futuros na melhoria dos resultados obtidos e no emprego dessa metodologia em outras reações orgânicas similares.

Certamente o uso do sistema microscópico de campo largo com TIRF conjuntamente com um sistema de microfluídica possibilitaria observar melhor a reatividade catalítica de reações de condensação com formação de produtos fluorescentes.

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, foi sintetizado o corante (*E*)-2-[3-[4-(difenilamina)-fenil]-1-(*p*-tolil) alilideno] malononitrila (DFTAM), via reação de condensação entre 4-(difenilamino)-benzaldeído e 2-[1-(4-metilfenil)-etilideno]-malononitrila, com catálise básica de piperidina. Para conseguir purificar o produto, optou-se por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e sua caracterização foi feita pelas técnicas de espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Através desses processos foi possível obter um corante de alta pureza e com estrutura molecular bem definida.

Nos estudos fotofísicos, espectros de absorção e emissão de fluorescência, decaimento de fluorescência e espectro de absorção de transientes foram feitos em diferentes solventes, variando-se a polaridade e viscosidade do meio. Duas bandas de absorção foram notadas, uma em 303 nm (a qual não se alterou em diferentes solventes) e outra em aproximadamente 490 nm, com deslocamento batocrômico em relação ao aumento da polaridade do meio. Por tanto, essa segunda banda foi atribuída à transferência de carga intramolecular (TCI) que a molécula de DFTAM possui e que é característica de compostos dessa classe (sistemas contendo grupos doadores e aceptores de elétrons ligados através de duplas ligações conjugadas). Usando o comprimento de onda de excitação da banda de TCI, foi possível monitorar o espectro de emissão de fluorescência do corante, o qual também apresentou *red shift* com o aumento da polaridade, variando entre 517 e 630 nm. Os decaimentos de fluorescência mostraram a presença de duas componentes, a primeira na ordem de picossegundos e a outra em nanossegundos. Para solventes mais polares ou menos viscosos a componente mais rápida teve um maior peso dentro da composição do sistema. Já os valores de rendimento quântico de fluorescência variaram entre 0,0001 (para acetonitrila) até 0,02, no caso do tetrahidrofurano. Isso comprova a sensibilidade do corante a variações no solvente e confirma a presença da TCI.

Os experimentos de espectroscopia de absorção de transientes permitiram comprovar a existência do estado triplete do DFTAM nas amostras analisadas, exceto acetonitrila e metanol. E, variando-se a polaridade e viscosidade do meio,

observou-se até três espécies transientes com tempo de vida entre 2 μ s e mais de 10 ms (em 450 nm) e 22 μ s em 650 nm.

Utilizando os surfactantes CTAC, CPC, *Tween* 20 e SDS, os mesmos experimentos foram repetidos. O deslocamento batocrômico nos espectros de absorção e emissão e o aumento no rendimento quântico indicam a interação entre micelas e o corante, de forma a favorecer a fluorescência, exceto no caso do CPC, onde houve efeito de supressão. Para complementar os resultados experimentais, cálculos foram feitos para obter os orbitais moleculares de fronteiras dos estados singlete e triplete, além dos valores de momentos de dipolo e as densidades de elétrons e spin. Ambos os dados convergiram.

Por fim, os ensaios feitos para acompanhar a reação de formação do DFTAM *in situ* com catálise básica por microscopia TIRF se mostraram desafiadores e permitiram obter bons resultados. O uso do MgO como catalisador foi menos adequado para a técnica em questão, já que o óxido possui auto fluorescência, inviabilizando a detecção *single molecule* (ou de poucas moléculas). A opção de funcionalizar lamínulas de vidro com piperazina através de uma metodologia adaptada se mostrou eficiência e a formação do DFTAM foi comprovada. A adição de partículas de peneira molecular para absorção das moléculas de água permitiu prolongar o tempo de análise do processo e observar mais ciclos de formação do corante, com aumento na taxa de conversão do produto em comparação aos sistemas sem o dissecante. A partir desse estudo inicial, outros projetos devem ser desenvolvidos para aprimorar a técnica e alcançar novas informações tanto para essa reação quanto para outras que gerem produtos orgânicos fluorescentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. SAUER, M.; HOFKENS, J.; ENDERLEIN, J. **Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging**: from single molecules to ensembles. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. 290 p.
2. HERSCHEL, J. F. W. On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colorless. **Philosophical Transactions of the Royal Society London**, v. 135, p. 143–145, 1845.
3. TERAU, T.; NAGANO, T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. **Pfugers Archiv – European Journal of Physiology**, v. 465, n. 3, p. 347-359, 2013.
4. GHELARDI, E.; DEGANO, I.; COLOMBINO, M. P.; MAZUREK, J.; SCHILLING, M.; KHANJIAN, H.; LEARNER, T. A multi-analytical study on the photochemical degradation of synthetic organic pigments. **Dyes and Pigments**, v. 123, p.396-403, 2015.
5. DAI, X.-X.; FENG, H.-I.; CHEN, W.-J.; YANG, Y.; NIE, L.-B.; WANG, L. Synthesis and photovoltaic performance of asymmetric di-anchoring organic dyes. **Dyes and Pigments**, v. 122, p. 113-21, 2015.
6. FUKUDA, M.; KOMODA, K.; YAMAMOTO, H.; MITO, K. Evaluation of new organic pigments as laser-active media for a solid-state dye laser. **Dyes and Pigments**, v. 63, n. 2, p. 115-125, 2004.
7. HAUCK, M.; SCHONHABER, J.; ZUCCHERO, A.J.; HARDCASTLE, K.I.; MULLER, T. J. J.; BUNZ, U. H. F. Phenothiazine cruciforms: synthesis and metallochromic properties. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 18, p. 6714-6725, 2007.

8. ESCOBEDO, J. O.; RUSIN, O.; LIM, S.; STRONGIN, R. M. Near-IR fluorescent dyes for biological applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 1, p. 64-70, 2010.
9. FACCHETTI, A. Organic Semiconductor: Made to order. **Nature Materials**, v. 12, p. 598-600, 2013.
10. KAMINO, B. A.; CHANG, Y.-L.; LU, Z.-H.; BENDER, T. P. Phthalonitrile based fluorophores as fluorescent dopant emitters in deep-blue OLEDs: Approaching the NTSC standard for blue. **Organic Electronics**, v. 13, n. 8, p. 1479-1485, 2012.
11. LIU, J. Pure white OLED based on an organic small molecule: 2,6-Di(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)pyridine. **Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.149, p.48-53, 2015.
12. TSAI, Y.-S.; CHITTAWANI, A.; JUANG, F.-S.; LIN, P.-C.; HONG, L.-A.; TSAI, F.-Y.; TSENG, M.-H.; WANG, C.-C.; CHEN, C.-C.; LIN, K.-L.; CHEN, S.-H. Flexible fluorescent white organic light emitting diodes with ALD encapsulation. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 83, p. 135-139, 2015.
13. HAN, T.-H.; LEE, Y.; CHOI, M.-R.; WOO, S.-H.; BAE, S.-H.; HONG, B. H.; AHN, J.-H.; LEE, T.-W. Extremely efficient flexible organic light-emitting diodes with modified graphene anode. **Nature Photonics**, v. 6, p. 105-110, 2012.
14. AHN, S.; KIM, J. N.; KIM, Y. C. Solid state solvation effect of a donor-acceptor type fluorescent molecule and its application to white organic light-emitting diodes. **Current Applied Physics**, v. 15, p. S42-S47, 2015.
15. HAN, L.; ZU, X.; CUI, Y.; WU, H.; YE, Q.; GAO, J. Novel D-A- π -A carbazole dyes containing benzothiadiazole chromophores for dye-sensitized solar cells. **Organic Electronics**, v. 15, n. 7, p. 1536-1544, 2014.

16. LI, S.-S.; JIANG, K.-J.; ZHANG, F.; HUANG, J.-H.; LI, S.-G.; CHEN, M.-G.; YANG, L.-M.; SONG, Y.-L. New diketopyrrolopyrrole-based organic dyes for highly efficient dye-sensitized solar cells. **Organic Electronics**, v. 15, n. 7, p. 1579-1585, 2014.

17. MARGINEANU, A.; HOFKENS, J.; COTLET, M.; HABUCHI, S.; STEFAN, A.; QU, J.Q.; KOHL, C.; MULLEN, K.; VERCAMMEN, J.; ENGELBORGHES, Y.; GENSCH, T.; SCHRYVER, F.C. Photophysics of a water-soluble rylene dye: comparison with other fluorescent molecules for biological applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 32, p. 12242-12251, 2004.

18. RAHIM, N. A. A.; MCDANIEL, W.; BARDON, K.; SRINIVASAN, S.; VICKERMAN, V.; SO, P. T. C.; MOON, J. H. Conjugated polymer nanoparticles for two-photon imaging of endothelial cells in a tissue model. **Advanced Materials**, v. 21, p. 3492–3496, 2009.

19. SALZER, R.; SAUER, M.; HOFKENS, J.; EDERLEIN, J; GOLDYS, E. M. **Fluorescence microscopy**: from principles to biological applications. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2013. 539 p.

20. WARDLE, B. **Principles and Applications of Photochemistry**. Manchester: Wiley, 2009. 266 p.

21. ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis**: modern instrumentation methods and techniques. 2. ed. Chichester: John Wiley, 2000. 600 p.

22. WIETHAUS, GUILHERME. **Síntese e caracterização de novas iminas com aplicação em óptica não-linear**. 2010. 193 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

23. VALEUR, B. **Molecular Fluorescence**: Principles and Applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. 399 p.

24. LIPPERT, E.; RETTIG, W.; BONANIC-KOUTECKY, V.; HEISEL, F.; MIEHE, J. Photophysics of Internal Twisting. **Advances in Chemical Physics**, v.68, p. 1-173, 1987.
25. ZHU, A.; WANG, B.; WHITE, J. O.; DRICKAMER, H. G. The effect of the pressure on the twisted intramolecular charge transfer of 2-(4-dimethylaminonaphthalen-1-ylmethylene)malononitrile. **Chemical Physics Letters**, v. 321, n. 5, p. 394-398, 2000.
26. MUTHUSUBRAMANIAN, S.; SAHA, S. K. Exploration of twisted intramolecular charge transfer fluorescence properties of trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]benzothiazole to characterize the protein–surfactant aggregates. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 8, p. 216-2177, 2012.
27. PEREIRA, R.; FERREIRA, A. P. G.; GEHLEN, M. H. Excited-State Intramolecular Charge Transfer in 9-Aminoacridine Derivative. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 109, n. 27, p. 5978-5983, 2005.
28. PEREIRA, R.; GEHLEN, M. H. H-bonding Assisted Intramolecular Charge Transfer in 1-Aminopyrene Derivatives. **Chemical Physics Letters**, v. 426, n. 4, p. 311-317, 2006.
29. PAUL, B. K.; SAMANTA, A.; KAR, S.; GUCHHAITN, N. Evidence for excited state intramolecular charge transfer reaction in donor–acceptor molecule 5-(4-dimethylamino-phenyl)- penta-2,4-dienoic acid methyl ester: experimental and quantum chemical approach. **Journal of Luminescence**, v. 130, n. 7, p. 1258-1267, 2010.
30. PHUKAN, S.; SAHA, M.; PAL, A. K.; BHASIKUTTAN, A. C.; MITRA, S. Intramolecular charge transfer in coumarin based donor-acceptor systems: Formation of a new product through planar intermediate. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 303, p.67-79, 2015.

31. ISHOW, E.; GUILLOT, R.; BUNTINX, G.; POIZAT, O. Photoinduced intramolecular charge transfer dynamics of a red-emitting dicyanoovinyl-based triarylamine dye in solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 243, p.27-36, 2012.
32. FORGET, S.; CHENAIS, S.; TONDELIER, D.; GEFFROY, B.; GOZHLYK, I.; LEBENTAL, M.; ISHOW, E. Red-emitting fluorescent organic light emitting diodes with low sensitivity to self-quenching. **Journal of Applied Physics**, v. 108, n. 6, p. 1-20, 2010.
33. RABBANI-HAGHIGHI, H.; FORGET, S.; CHÉNAIS, S.; SIOVE, A.; CASTEX, M. C.; ISHOW, E. Laser operation in non-doped thin films made of a small-molecule organic red-emitter. **Applied Physics Letters**, v. 95, n. 3, p.1-4, 2009.
34. OLIVEIRA, GUEDMILLER SOUZA. **Caracterização espectroscópica e por modelagem mecânico-quântica, de compostos com potencial aplicação em dispositivos ópticos não-lineares**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
35. KRASOVITSKII, B. M.; BOLOTIN, B. M. **Organic Luminescent Materials**. New York: Wiley-VCH, 1988. 340 p.
36. PATIL, S. K.; WARI, M. N.; PANICKER, C. Y.; INAMDAR, S. R. Determination of ground and excited state dipole moments of dipolar laser dyes by solvatochromic shift method. **Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 123, p. 117-126, 2014.
37. HIGUCHI, H.; KOYAMA, H.; YOKOTA, H.; OJIMA, J. Solvent effect on the bathochromic shifts of push-pull dihexylbithiophenes with head-to-head and head-to-tail orientations. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 10, p. 1617-1620, 1996.

38. MIRKOVIĆ, J. M.; BOŽIĆ, B. Đ.; MUTAVDŽIĆ, D. R.; UŠĆUMLIĆ, G. S.; MIJIN, D. Ž. Solvent and structural effects on the spectral shifts of 5-(substituted phenylazo)-3-cyano-6-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)-4-methyl-2-pyridones. **Chemical Physics Letters**, v. 615, p. 62-68, 2014.
39. CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica**. São Paulo: LCT, 2008. 499 p.
40. NANDY, R.; SANKARARAMAN, S. Donor - acceptor substituted phenylethynyl-triphenylenes – excited state intramolecular charge transfer, solvatochromic absorption and fluorescence emission. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 6, p. 992-1001, 2010.
41. MOHAMMADI, A.; KHALILI, B.; TAHAVOR, M. Novel push–pull heterocyclic azo disperse dyes containing piperazine moiety: Synthesis, spectral properties, antioxidant activity and dyeing performance on polyester fibers. **Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 799-805, 2015.
42. CARMONSA, T.; CAÑEQUE, T.; CUSTODIO, R.; CUADRO, A. M.; VAQUERO, J. J.; MENDICUTI, F. Cucurbit[n]urils as a potential fine-tuned instrument for modifying photophysical properties of D- π -A⁺- π -D “push-pull” chromophores. **Dyes and Pigments**, v. 103, p. 106-117, 2014.
43. TELORE, R. D.; SATAM, M. A.; SEKAR, N. NLOphoric studies in thiazole containing symmetrical push–pull fluorophores – Combined experimental and DFT approach. **Optical Materials**, v. 48, p. 271-280, 2015.
44. KITYL, I. V.; LIU, J.; GAOB, W.; KITYKC, I.; LIUA, X.; ZHENA, Z. Optimization of polycyclic electron-donors based on julolidinyl structure in pushpull chromophores for second order NLO effects. **Dyes and Pigments**, v. 122, p. 74-84, 2015.

45. GUPTA, V. D.; TATHE, A. B.; PADALKAR, V. S.; UMAPE, P. G.; SEKAR, N. Red emitting solid state fluorescent triphenylamine dyes: Synthesis, photo-physical property and DFT study. **Dyes and Pigments**, v. 97, n. 3, p. 429-439, 2013.
46. THANGTHONG, A.; PRACHUMRAK, N.; SUDYOADSUK, T.; NAMUANGRUK, S.; KEAWIN, T.; JUNGSTUTTIWONG, S.; KUNGWAN, N.; PROMARAK, V. Multi-triphenylamine – functionalized dithienylbenzothiadiazoles as hole-transporting non-doped red emitters for efficient simple solution processed pure red organic light-emitting diodes. **Organic Electronics**, v. 21, p. 117-125, 2015.
47. ROQUET, S.; CRAVINO, A.; LERICHE, P.; ALÉVÊQUE, O.; FRÈRE, P.; RONCALI, J. Triphenylamine-Thienylenevinylene Hybrid Systems with Internal Charge Transfer as Donor Materials for Heterojunction Solar Cells. **Journal of The American Chemical Society**, v. 128, n. 10, p. 3459-3466, 2006.
48. WU, F.; ZHAO, S.; LEE, L. T. L.; WANG, M.; CHEN, T.; ZHU, L. Novel D- π -A organic sensitizers containing diarylmethylene-bridged triphenylamine and different spacers for solar cell application. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 10, p. 1223-1238, 2015
49. WU, F.; LEE, L. T. L.; LIU, J.; ZHAO, S.; CHEN, T.; ZHONG, C.; ZHU, L. Novel organic dyes based on diarylmethylene-bridged triphenylamine for dye-sensitized solar cells. **Synthetic Metals**, v. 205, p. 70-77, 2015.
50. CHEN, C.-T. Evolution of red organic light-emitting diodes: materials and devices. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 23, p. 4389–4400, 2004.
51. SHIROTA, Y.; KAGEYAMA, H. Charge carrier transporting molecular materials and their applications in devices. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 4, p. 953-1010, 2007.

52. MI, S.; WU, J.; LIU, J.; ZHENG, J.; XU, C. Donor– π -bridge–acceptor fluorescent polymers based on thiophene and triphenylamine derivatives as solution processable electrochromic materials. **Organic Electronics**, v. 23, p. 116-123, 2015.
53. CANON, K. K. Toshe Miyaji; Hajime Miyazaki; Hideyuki Takai; Shintetsu Go,; Kazufumi Inai. **Electrophotographic photoreceptor using a charge-transporting compound as a charge-generating substance**. JP 03031850A, 29 Jun. 1989, 12 Feb. 1991.
54. HOU, C.-J.; HOU, Q.-F.; LI, Z.-F.; YAN, C.; QI, M.-Y. Synthesis and spectra properties of two triphenylamine derivatives. **Guangzhou Huagong**, v.42, n.8, p. 50-51, 2014.
55. WALT LABORATORY – OPTICAL SENSING ARRAYS. **Single Molecule Enzymology**. Disponível em <<http://ase.tufts.edu/chemistry/walt>>. Acesso em: 23 jun. 2015.
56. MOERNER, W. E.; FROMM, D. P. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. **American Institute of Physics**, v. 74, n. 8, p. 3597-3619, 2003.
57. WÖLL, D.; BRAEKEN, E.; DERES, A.; SCHRYVER, F. C.; UJI-I, H.; HOFKENS, J. Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn? **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 313-328, 2009.
58. MOERNER, W. E.; KADOR, L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. **Physical Review Letters**, v. 62, n. 21, p. 2535-2538, 1989.
59. ORRIT, M.; BERNARD, J. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-Terphenyl crystal. **Physical Review Letters**, v. 65, n. 21, p. 2716-2719, 1990.

60. OBERHAUSER, A. F. **Single-molecule studies of proteins**. New York: Springer, 2013. v. 2, 274 p.
61. PALACIOS, M. A.; LACY, M. M.; SCHUBERT, S. M.; MANESSE, M.; WALT, D. R. Assessing the stochastic intermittency of single quantum dot luminescence for robust quantification of biomolecules. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 14, p. 6639-6645, 2013.
62. RIGLER, R.; VOGEL, H. **Single molecules and nanotechnology**. Berlin: Springer, 2008. v. 12, 317 p.
63. EDMAN, L.; FOLDES-PAPP, Z.; WENNMALM, S.; RIGLER, R. The fluctuating enzyme: a single molecule approach. **Chemical Physics**, v. 247, n. 1, p. 11-22, 1999.
64. VELONIA, K.; FLOMENBOM, O.; LOOS, D.; MASUO, S.; COTLET, M.; ENGELBORGH, Y.; HOFKENS, J.; ROWAN, A. E.; KLAFTER, J.; NOLTE, R. J. M.; SCHRYVER, F. C. Single enzyme kinetics of CALB-catalyzed hydrolysis. **Angewandte Chemie**, v. 117, n. 4, p. 566-570, 2005.
65. ENGLISH, B. P.; MIN, W.; OIJEN, A. M. V.; LEE, K. T.; LUO, G.; SUN, H.; CHERAYIL, B. J.; KOU, S. C.; XIE, X. S. Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited. **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 87-94, 2005.
66. CEBOLLADA, J. A.; JIMENEZ, R. P.; KOSURI, P.; FERNANDEZ, J. M. Single-molecule force spectroscopy approach to enzyme catalysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 18961-18966, 2010.
67. LIEBHERR, R. B.; GORRIS, H. H. Enzyme Molecules in Solitary Confinement. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14417-14445, 2014.

68. JANSSEN, K. P. F.; CREMER, G.; NEELY, R. K.; KUBAREV, A. V.; LOON, J. V.; MARTENS, J. A.; VOS, D. E.; ROEFFAERS, M. B. J.; HOFKENS, J. Single molecule methods for the study of catalysis: from enzymes to heterogeneous catalysts. **Chemical Society Reviews**, v. 43, p. 990-1006, 2014.
69. TERENCEVA, T. G.; HOFKENS, J.; KOMATSUZAKI, T.; BLANK, K.; LI, C. B. Time-Resolved Single Molecule Fluorescence Spectroscopy of α -Chymotrypsin Catalyzed Reaction. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 5, p. 1252-1260, 2013.
70. AMELOOT, R.; ROEFFAERS, M.; BARUAH, M.; CREMER, G.; SELS, B.; VOS, D.; HOFKENS, J. Towards direct monitoring of discrete events in a catalytic cycle at the single molecule level. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 453-456, 2009.
71. ROEFFAERS, M. B. J.; CREMER, G.; UJI-I, H.; MULS, B.; SELS, B. F.; JACOBS, P. A.; SCHRYVER, F. C.; VOS, D. E.; HOFKENS, J. Single-molecule fluorescence spectroscopy in (bio)catalysis. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 31, p. 12603-12609, 2007.
72. SAKAMOTO, M.; TACHIKAWA, T.; FUJITSUKA, M.; MAJIMA, T. Photoreactivity of As-fabricated Au clusters at the single-cluster level. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 1, p. 6-7, 2009.
73. TACHIKAWA, T.; MAJIMA, T. Exploring the spatial distribution and transport behavior of charge carriers in a single titania nanowire. **Journal of the American Chemical Society**, v.131, n. 24, p. 8485-8495, 2009.
74. XU, W.; SHEN, H.; LIU, G.; CHEN, P. Single-molecule kinetics of nanoparticle catalysis. **Nano Research**, v. 2, p. 911-922, 2009.

75. XU, W.; KONG, J. S.; YEH, Y.-T. E.; CHEN, P. Single-molecule nanocatalysis reveals heterogeneous reaction pathways and catalytic dynamics. **Nature Materials**, v. 7, p. 992-996, 2008.
76. ROEFFAERS, M. B. J.; SELS, B. F.; UJI-I, H.; BLANPAIN, B.; L'HOËST, P.; JACOBS, P. A.; SCHRYVER, F. C.; HOFKENS, J.; VOS, D. E.. Space- and time-resolved visualization of acid catalysis in ZSM-5 crystals by fluorescence microscopy. **Angewandte Chemie**, v. 119, n. 10, p. 1736-1739, 2007.
77. ROAFFAERS, M. B. J.; AMELOOT, R.; BONNS, A.-J.; MORTIER, W.; CREMER, G.; KLOE, R.; HOFKENS, J.; VOS, D. E.; SELS, B. F. Relating pore structure to activity at the subcrystal level for ZSM-5: An electron backscattering diffraction and fluorescence microscopy study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 41, p. 13516-13517, 2008.
78. SOKOLOV, D. A.; MOROZOV, Y. V.; MCDONALD, M. P.; VIETMEYER, F.; HODAK, J. H.; KUNO, M. Direct observation of silge layer graphene oxide reduction through spatially resolved, silge sheet absorption/emission microscopy. **Nanoletters**, v. 14, n. 6, p. 3172-3179, 2014.
79. SHIN, H.-J.; JUNG, J.; MOTOBAYASHI, K.; YANAGISAWA, S.; MORIKAWA, Y.; KIM, Y.; KAWAI, M. State-selective dissociation of a single water molecule on na ultrathin MgO film. **Nature Materials**, v. 9, p. 442-447, 2010.
80. ROEFFAERS, M. B. J.; SELS, B. F.; UJI-I, H.; SCHRYVER, F. C.; JACOBS, P. A.; VOS, D. E.; HOFKENS, J. Spatially resolved observation of crystal-face-dependent catalysis by single turnover counting. **Nature**, v. 439, p. 572-575, 2006.
81. ESFANDIARI, N. M.; BLUM, S. A. Homogeneous vs Heterogeneous Polymerization Catalysis Revealed by Single-Particle Fluorescence Microscopy. **Journal of The American Chemical Society**, v. 133, n. 45, p. 18145-18147, 2011.

82. SONG, L.; SHAN, D.; ZHAO, M.; PINK, B. A.; MINNEHAN, K. A.; YORK, L.; GARDEL, M.; SULLIVAN, S.; PHILLIPS, A. F.; HAYMAN, R. B.; WALT, D. R.; DUFFY, D. C. Direct detection of bacterial genomic DNA at sub-femtomolar concentrations using single molecule arrays. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 1932-1939, 2013.
83. JUNGSMANN, R.; STEINHAUER, C.; SCHEIBLE, M.; KUZYK, A.; TINNEFELD, P.; SIMMEL, F. C. Single-Molecule Kinetics and Super-Resolution Microscopy by Fluorescence Imaging of Transient Binding on DNA Origami. **Nanoletters**, v. 10, n. 11, p. 4756-4761, 2010.
84. UPHOFF, S.; KAPANIDIS, A. N. Studying the organization of DNA repair by single-cell and single-molecule imaging. **DNA Repair**, v. 20, p. 32-40, 2014.
85. HAAS, B. L.; MATSON, J. S.; DIRITA, V. J.; BITEEN, J. S. Imaging Live Cells at the Nanometer-Scale with Single-Molecule Microscopy: Obstacles and Achievements in Experiment Optimization for Microbiology. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12116-12149, 2014.
86. LORD, S. J.; LEE, H. D.; MOERNER, W. E. Single –molecule spectroscopy and imaging of biomolecules in living cells. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2192-2203, 2010
87. XIA, T.; LI, N.; FANG, X. Single-Molecule Fluorescence Imaging in Living Cells. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 64, p. 459-480, 2013.
88. LEE, J.; MIYANAGA, Y.; UEDA, M.; HOHNG, S. Video-Rate Confocal Microscopy for Single-Molecule Imaging in Live Cells and Superresolution Fluorescence Imaging. **Biophysical Journal**, v. 103, n. 8, p. 1691-1697, 2012
89. CORDES, T.; BLUM, S. Opportunities and challenges in single-molecule and single-particle fluorescence microscopy for mechanistic studies of chemical reactions. **Nature Chemistry**, v. 5, p. 993-999, 2013.

90. CREMER, G.; ROEFFAERS, M. B. J.; BARTHOLOMEEUSEN, E.; LIN, K.; DEDECKER, P.; PESCARONA, P. P.; JACOBS, P. A.; VOS, D. E.; HOFKENS, J.; SELS, B. F. High-Resolution Single-Turnover Mapping Reveals Intraparticle Diffusion Limitation in Ti-MCM-41-Catalyzed Epoxidation. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 5, p. 908-911, 2010.
91. LENCIONE, DIEGO. **Layout óptico da configuração dos microscópios de fluorescência presentes no GFM**. São Carlos, 2014. 10 p. (Relatório Técnico).
92. LINDEN, S. M.; NECKERS, D. C. Type I and type II sensitizers based on rose bengal onium salts. **Photochemistry and Photobiology**, v. 47, p. 543-550, 1988.
93. MASTULI, M. S.; KAMARULZAMAN, N.; NAWAWI, M. A.; MAHAT, A. M.; RUSDI, R.; KAMARUDIN, N. Growth mechanisms of MgO nanocrystals via a sol-gel synthesis using different complexing agents. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 134, p.1-9, 2014.
94. KAMISETTY, N. K.; PACK, S. P.; NONOGAWA, M.; DEVARAYAPALLI, K. C.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Development of an efficient amine-functionalized glass platform by additional silanization treatment with alkylsilane. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 1649-1655, 2006.
95. VOSKRESSENSKY, L. G.; FESTA, A. A.; VARLAMOV, A. V. Domino reactions based on Knoevenagel condensation in the synthesis of heterocyclic compounds. Recent advances. **Tetrahedron**, v. 70, n. 3, p. 551-572, 2014.
96. SILVERTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X. KKIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2007. 490 p.
97. REICHARDT, C.; WELTON, T. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**. 4. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. 692 p.

98. MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
99. MORISHIMA, Y.; MIZUSAKI, M.; YOSHIDA, K; DUBIN, P. L. Interactions of micelles with fluorescence-labeled polyelectrolytes. **Colloids and Surfaces**, v.147, p. 149-159, 1999.
100. HADIA, N. M. A.; MOHAMED, H. A.-H. Characteristics and optical properties of MgO nanowires synthesized by solvothermal method. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 29, p. 238-244, 2015.
101. DEDECKER, P.; DUWÉ, S.; NEELY, R. K.; ZHANG, J. Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for superresolution microscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n.12, p. 126008-1 – 126008-5, 2012.
102. MUKERJEE, P.; MYSELS, K. J. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. **National standard reference data system**. Washington: Wiley, 1971. 222 p.
103. NEVES-PETERSEN, M.T., KLITGAARD, S.; PASCHER, T.; SKOVSEN, E.; POLIVKA, T.; YARTSEV, A.; SUNDSTRÖM, V.; PETERSEN, S. B. Flash photolysis of cutinase: identification and decay kinetics of transient intermediates formed upon UV excitation of aromatic residues. **Biophysical Journal**, v. 97, p. 211-226, 2009.
104. EL-AGAMEY, A.; FUKUZUMI, S. Laser flash photolysis study on the retinol radical cation in polar solvents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 6437-6446, 2011.
105. BOYLE, J. W.; GHORMLEY, J. A.; HOCHANADEL, C. J.; RILEY, J. F. Production of hydrated electrons by flash photolysis of liquid water with light in the first continuum. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 73, n. 9, p. 2886-2890, 1969.

106. DEVONSHIRE, R.; WEIS, J. J. Nature of the transient species in the photochemistry of negative ions in aqueous solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 72, n. 11, p. 3815-3820, 1969.
107. DHENADHAYALAN, N.; SELVARAJU, C. Role of photoionization on the dynamics and mechanism of photoinduced electron transfer reaction of Coumarin 307 in micelles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, p. 4908-4920, 2012.
108. SIGMA ALDRICH. General information — **Physical properties of solvents**. Disponível em: < <https://www.sigmaaldrich.com> >. Acesso em: 10 out. 2015.