

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

CF



INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO
DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS
POR ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA E DE FLUORESCÊNCIA

Marinônio Lopes Cornélio

Tese apresentada ao Instituto de Física e Química
de São Carlos, para a obtenção do título de:
Doutor em Ciências (Física Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Sanches

Departamento de Física e Ciência dos Materiais

São Carlos - 1994

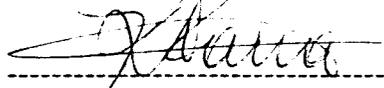
IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E
INFORMAÇÃO

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MARINÔNIO LOPES CORNELIO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 25/04/1994

COMISSÃO JULGADORA:

R. Sanches

Prof.a.Dra. Rosemary Sanches



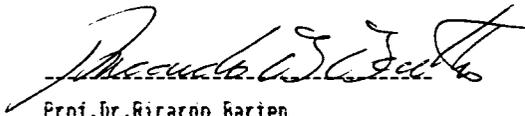
Prof.Dr.Roberto Mendonça Faria



Prof.Dr.Luis Antonio de Oliveira Nunes



Prof.Dr.Amando Siuti Ito



Prof.Dr.Ricardo Barten

ÍNDICE GERAL

Índice de Assuntos	ii
Índice de Figuras	iv
Agradecimentos	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix

Índice de Assuntos

Introdução	1
Capítulo I - Transferência de Elétrons Fotoinduzida	6
Referências	12
Capítulo II - Espectroscopia Fotoacústica	13
1. O Efeito Fotoacústico	13
2. Geração do Sinal Fotoacústico em Sólidos	14
3. Modelo Rosencwaig-Gersho	15
Referências	20
Capítulo III - Espectroscopia de Fluorescência	22
1. Princípios Básicos de Fluorescência	22
2. Supressão de Fluorescência	24
2.1 Modelo do Kaneko	25
2.2 Modelo do Perrin	26
Referências	31
Capítulo IV - Materiais e Métodos	33
1. Preparação das Amostras	33
2. Instrumentação	35
2.1 Espectrômetro Fotoacústico	35
2.1.1 Câmara Fotoacústica	36
2.2 Espectrofluorímetro	37
Referências	43
Capítulo V - Resultados e Discussão	44
1. Resultados da Amostra Preparadas com Clorofórmio	45
5.1.1 Resultados da Amplitude do Sinal Fotoacústico	46
5.1.1.a Análise dos dados segundo o Modelo do Perrin	50
5.1.1.b Análise dos dados segundo o Modelo do Kaneko	50

5.1.2 Resultados de Fluorescência	51
2. Resultados da Amostra Preparadas com Tolueno	61
5.2.1 Resultados da Amplitude do Sinal Fotoacústico	61
5.2.2 Resultados de Fluorescência	62
5.2.3 Resultados da Fase do Sinal Fotoacústico	63
Referências	69
Capítulo VI - Conclusões	70
Referências	74

Índices de Figuras

FIG-1.1 Ilustração do aumento de atividade de redução por fotoexcitação.	10
FIG-1.2 Curvas de energia potencial que representam a transferência de elétrons.	10
FIG-1.3 Curvas de energia potencial mostrando o efeito do <i>driving force</i> .	11
FIG-2.1 Ilustração dos mecanismos de geração do sinal fotoacústico. (a) difusão térmica ...	19
FIG-2.2 Geometria de uma câmara fotoacústica convencional.	19
FIG-3.1 Diagrama de Jablonski.	31
FIG-3.2 Excitação e emissão de fluorescência.	31
FIG-4.1 Molécula de H ₂ OEP	40
FIG-4.2 Molécula de DDQ	40
FIG-4.3 Molécula de DQ	41
FIG-4.4 Esquema do espectrômetro fotoacústico	41
FIG-4.5 Esquema da câmara fotoacústica	42
FIG-4.6 Esquema do espectrofluorímetro	42
FIG-5.1 Espectro fotoacústico de um filme de porfirina	52
FIG-5.2 Espectro de absorção convencional da porfirina em clorofórmio.	52
FIG-5.3 Sequência de medidas de fotoacústica de um filme de porfirina.	53
FIG-5.4 Amplitude em 400 nm em função da frequência de modulação, para um filme de H ₂ OEP.	53
FIG-5.5 Amplitude em 400 nm em função da frequência de modulação, para um filme de H ₂ OEP+30DDQ.	54
FIG-5.6 Dependência da amplitude com o coeficiente de absorção ótico	

em 498 nm, a 5 Hz.	54
FIG-5.7 Espectro de absorção ótico da molécula de DDQ em clorofórmio.	55
FIG-5.8 Espectro de absorção ótico da molécula de DQ em clorofórmio	55
FIG-5.9 Comportamento da amplitude do sinal fotoacústico com a concentração de DDQ na região de 620 nm.	56
FIG-5.10 Comportamento da amplitude do sinal fotoacústico com a concentração de DQ na região de 620 nm.	56
FIG-5.11 Espectro fotoacústico do filme de porfirina.	57
FIG-5.12 Ajuste de três Gaussianas referente as bandas em 496, 529 e 566 nm.	57
FIG-5.13 Ajuste de uma curva Gaussiana na região de 620 nm.	58
FIG-5.14 Ajuste de uma curva Gaussiana no espectro subtraído.	58
FIG-5.15 Intensidade relativa em 619 nm, $\ln(I/I_0)$.	59
FIG-5.16 Gráfico de $\ln(I/I_0)$ em função de $[Q]_t$.	59
FIG-5.17 Espectro de fluorescência para a molécula de porfirina em clorofórmio.	60
FIG-5.18 Espectro de fluorescência para o filme de H ₂ OEP preparado em clorofórmio.	60
FIG-5.19 Espectros de filmes de H ₂ OEP com diferentes concentrações de duroquinona.	65
FIG-5.20 Ajuste de duas Gaussianas referente as bandas em 570 e 620 nm.	65
FIG-5.21 Intensidade relativa em 619 nm, $\ln(I/I_0)$.	66
FIG-5.22 Espectros de fluorescência para o filme de H ₂ OEP na região de 570 a 750 nm.	66
FIG-5.23 Espectros de fluorescência para o filme de H ₂ OEP ($1,4 \times 10^{-4}$ M) em varias concentrações de DQ	67
FIG-5.24 Espectros de fluorescência para filmes de H ₂ OEP.	67
FIG-5.25 Intensidade da fluorescência em 622 nm, $\ln(F_0/F)$, como função da concentração de aceitadores.	68

FIG-5.26 Dependência do ângulo de fase com a concentração de quinonas

69

Agradecimentos

Desejo agradecer a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço, especialmente:

à Profa. Dra. Rosemary Sanches pela orientação, pelo otimismo e amizade;

ao Prof. Otaciro R. Nascimento pela amizade e consideração;

à Profa. Leila Beltramini pela amizade e apoio;

aos colegas e amigos do Depto. de Física - UNESP São José do Rio Preto.

aos técnicos dos laboratórios de Biofísica (Isabel e Roberto) e Eletretos (Níbio e Zé Berto) pela amizade e assessoria;

ao Silvio Tonissi Jr. pelo seu apoio no interfaceamento e no programa de aquisição de dados;

ao Marcão, do Lab. de Luminescência, pelo apoio e consideração;

à secretária Suely (Biofísica) e Bené por sua amizade e dedicação;

a todos os colegas do Grupo de Biofísica pela amizade e incentivo. Agradeço, especialmente, a Washington Melo e a Cristina Lara;

a todos os técnicos da Oficina Mecânica, especialmente a Carlos, Manoel e Ferri, pela amizade e consideração;

aos técnicos da Oficina Eletrônica pelo seu apoio e consideração;

Agradeço muito aos meus pais, Manoel e Waldete por terem me dado os primeiros passos nessa vida. Também a minha família, Lírida minha esposa e aos pequeninos Lucas e Gabriel, por seu amor, alegria e compreensão.

Desejo agradecer ao CNPq pela ajuda financeira.

RESUMO

A espectroscopia fotoacústica e de fluorescência foram empregadas no estudo de reação da transferência de elétrons entre um doador (Octaetil-porfirina) e dois tipos de aceitadores [Diclorodiciano-benzoquinona (DDQ) e Duroquinona (DQ)] em um meio rígido [poli(metil-metacrilato)]. Foram preparados filmes nos quais a concentração de doador foi mantida constante e a de aceitador foi variada. Observou-se um aumento exponencial da amplitude do sinal fotoacústico do doador em 620 nm, com o aumento da concentração de aceitadores nos filmes. O modelo de Perrin para a supressão de fluorescência foi aplicado aos dados de fotoacústica e o raio da esfera de ação, que representa a distância crítica para a ocorrência da transferência de elétrons, foi determinado. Os resultados obtidos foram: para DDQ 37 Å e para a DQ 32 a 34 Å. Era esperado um raio maior para a DDQ devido a sua maior elétron afinidade.

Também foi aplicado a estes dados o modelo de Kaneko, desenvolvido para a supressão de fluorescência. Dele se obtem a distribuição de moléculas aceitadoras incorporadas na esfera de ação. Para uma mesma concentração de aceitadores ($2,8 \text{ mmol dm}^{-3}$), a probabilidade de encontrar uma molécula de DDQ na esfera de ação foi 27%, enquanto que a probabilidade de encontrar uma molécula de DQ na esfera de ação foi de 20%. Este resultado é, na verdade, equivalente ao encontrado no modelo de Perrin pois a probabilidade maior encontrada para a DDQ vem do fato do raio da sua esfera de ação ser maior.

O valor encontrado para o raio crítico com os dados de fluorescência foi de 34 Å para a DQ. Isto demonstra que as duas técnicas são complementares e que a espectroscopia fotoacústica pode ser usada para monitorar o processo de transferência de elétrons.

ABSTRACT

Steady-state photoacoustic and fluorescence spectroscopy were employed to study the electron-transfer reaction from donor molecules (Octaethyl-porphirin) to two types of acceptor molecules [Dichloro-dicyano-benzoquinone (DDQ) and Duroquinone (DQ)] in a rigid medium [poly(methyl-metacrylate)]. Films were prepared with a fixed donor concentration and several acceptor concentrations. It was observed an exponential growth in the donor photoacoustic signal amplitude at 620 nm, with the increase in the acceptor concentration. Perrin model, used in fluorescence quenching, was applied to the photoacoustic data and the radius of an action sphere, which represents a critical distance for the electron transfer process, was determined. The results obtained were: for DDQ 37 Å and for DQ from 32 to 34 Å. It was expected a larger radius for DDQ than for DQ due to its stronger electron affinity.

Kaneko's model, was also applied to these data. It provides the distribution of incorporated acceptor molecules in the action sphere. For the same acceptor concentration (2.8 mmol dm^{-3}), the probability of finding one DDQ molecule in the action sphere was 27%, while for the DQ molecule this value was 20%. Actually, this result is equivalent to that found using Perrin model, because the larger probability obtained for DDQ comes from the fact that its critical radius is bigger.

The value obtained for the critical radius from the fluorescence data was 34 Å for DQ. This shows that these two techniques are complementary and that photoacoustic spectroscopy can be used to monitor the electron transfer process.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A fotossíntese é um processo biológico pelo qual energia eletromagnética (luz) é convertida em energia química. A vida na terra é derivada deste processo de conversão de energia. O primeiro experimento desenvolvido para fotossíntese foi realizado aproximadamente 200 anos atrás, por Priestley, que fez o seguinte. Tomou duas campânulas de vidro e embaixo de cada uma delas colocou um rato e em apenas uma delas colocou uma planta. Na campânula onde estava o rato e a planta, o rato viveu mais tempo. Deste experimento Priestley concluiu corretamente que a planta, através da interação com a luz, modificou o ar produzindo alguma substância nova. Ele prosseguiu e descobriu que tal substância era o oxigênio. E com mais alguns anos, ele e outros pesquisadores trabalharam no equacionamento da fotossíntese.

Passado portanto este período de aproximadamente dois séculos, é que chegou-se a evidências experimentais a respeito do mecanismo da fotossíntese. Este importante mecanismo está baseado no processo de transferência de elétrons.

Este processo estende-se em áreas diversas como por exemplo em química e biologia. Até recentemente parecia ser bem evidente que reações químicas fossem possíveis para moléculas que estivessem diretamente em contato uma com a outra. Este ponto de vista foi considerado, devido a rápida diminuição da interação energética entre moléculas com o aumento da distância intermolecular, tal que distâncias que excedessem a soma do raio dos reagentes, a interação tornava-se pequena para reações químicas.

Nas últimas duas décadas, contudo, numerosas informações não concordaram com esta afirmação. Reações de redução em química e

bioquímica inter e intramoleculares feitas em muitos laboratórios foram observadas entre moléculas, cujas distâncias eram maiores do que o raio de van der Waals, chegando a algumas dezenas de angstroms. Todas estas reações ocorreram via o mecanismo de tunelamento de elétrons através da barreira de potencial do solvente que há entre os reagentes.

Trabalhos teóricos pioneiros relacionando o tunelamento de partículas através de uma barreira de potencial foram introduzidos logo em seguida a criação da mecânica quântica e utilizada para fenômenos de decaimento α de núcleos atômicos [1,2]. Mas, foi Marcus [3] quem primeiro utilizou o modelo de poços quânticos para reações químicas, denominando um poço para os reagentes e o outro para o produto, e a transferência de elétrons ocorrendo através do ponto de cruzamento entre estes dois poços.

Este problema também tem atraído experimentais que visualizaram um campo pouco explorado e com aplicações tecnológicas. Alguns trabalhos foram feitos utilizando estados excitados de moléculas não-biológicas [4-5]. Sabe-se que a excitação de moléculas para estados eletrônicos mais alto leva a uma diminuição do potencial de ionização [6]. É, então, esperado que a excitação de doadores aumente a probabilidade da transferência de elétrons destes para os aceitadores, considerando-se também a concentração de aceitadores que implica numa distância menor entre os sitios doador-aceitador.

No trabalho a ser apresentado investigamos este importante processo da natureza, a transferência de elétrons [7].

Na fotossíntese, a estrutura onde o processo de transferência de elétrons ocorre é chamado de centro de reação. O sistema que usualmente é utilizado nos laboratórios é conhecido como a bactéria fotossintética que é muito mais simples do que a fotossíntese de plantas verdes. Na bactéria fotossintética está o centro de reação. Esta unidade nada mais é do que uma proteína integral da membrana do

cloroplasto, i.é., ela está dentro da membrana plasmática da bactéria fotossintética. Duas destas bactérias foram investigadas a *Rps. viridis* e *Rb. sphaeroides*. A partir da determinação da sua estrutura tridimensional [8] foi possível conhecer em detalhes. Seu peso molecular é da ordem de 100 KDa e é composto de três subunidades protéicas L, M e H e possui os seguintes cofatores que estão envolvidos no processo de transferência de elétrons: quatro bacterioclorofilas, duas bacteriofiofitinas (doador), duas quinonas (aceitador) e um ferro Fe^{2+} .

No trabalho desenvolvido o centro de reação serviu-nos como modelo para o nosso experimento, pois nele está presente o doador, o aceitador e o meio pelo qual o elétron é transferido. Simulamos experimentalmente este centro utilizando como doador a octaetilporfirina [H_2OEP], como aceitador derivados da quinona e o poli-(metil-metacrilato) fez o papel do meio. No arranjo que adotamos os doadores e aceitadores foram dispostos aleatoriamente na matriz polimérica fazendo com que haja uma distância média fixa entre estas moléculas. Em muitos estudos [9] o doador e aceitador estão ligados covalentemente, mas isto na verdade não ocorre no centro de reação. Neste sentido, nosso modelo está mais próximo da natureza. As proteínas encontradas no centro de reação tem o papel estrutural para a disposição do doador e aceitador e o mais importante, serve como caminho [10] durante o processo de transferência de elétron. No nosso caso o polímero fez este papel.

Como nos processos de transferência de elétrons o processo reverso é, em geral, muito rápido as técnicas mais utilizadas para detectar o estado de cargas separadas são as resolvidas no tempo. Uma série de técnicas com resolução temporal foram empregadas na investigação deste processo: fluorescência [11], Raman [12], absorção [13] e ressonância paramagnética eletrônica [14,15]. Mais recentemente a

espectroscopia fotoacústica resolvida no tempo foi utilizada para estudar a transferência de elétrons [16].

No nosso trabalho nós utilizamos duas técnicas no modo convencional (fotoacústica e fluorescência) e modelos teóricos utilizados na análise de supressão de fluorescência.

Uma destas técnicas até o momento não havia sido aplicada a este tipo de sistema, a espectroscopia fotoacústica. Seu princípio básico consiste em detectar a conversão de energia luminosa, absorvida por uma amostra, em calor. Como a transferência de elétrons de um estado excitado de um doador para um aceitador é um processo que compete com a fluorescência e com o decaimento não-radiativo que gera o sinal fotoacústico, pensamos na possibilidade de monitorar transferência de elétrons utilizando a espectroscopia fotoacústica.

No capítulo I descrevemos o processo de transferência de elétrons, explicando principalmente os conceitos elementares que estão envolvidos neste mecanismo.

No capítulo II é apresentada uma breve teoria descrevendo os princípios da espectroscopia fotoacústica e no cap. III é discutida a espectroscopia de fluorescência e os modelos utilizados na interpretação do processo de transferência de elétrons em um meio rígido.

No capítulo IV descrevemos a preparação das amostras e a instrumentação utilizada, onde abordamos aspectos no desenvolvimento da câmara fotoacústica.

No capítulo V, apresentamos os resultados obtidos e discutimos os parâmetros calculados com a utilização de modelos de transferência de elétrons. Comparamos ainda estes dados com os que encontramos na literatura corrente.

No capítulo VI, apresentamos as conclusões deste trabalho e sugestões para prosseguimento de trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

1. Gamow, G., (1928) Z. Phys. **51**, 204.
2. Gurney, R. W. e Condon, E. V., (1928) Nature (london) **122**, 439.
3. Marcus, R. A., (1964) Ann. Rev. Phys. Chem. **15**, 155.
4. Leiman, V. I., (1972) Fiz. Tverd. Tela. **14**, 3650.
5. Zhutkovskii, R. B., Khairutdinov, R. F. e Zamaraev, K. I., (1973) Khim. Vys. Energ., **7**, 558.
6. Leonhardt, H. e Weller, A., (1963) Ber. Bunsenges Phys. Chem. **67**, 791.
7. Feher, G., (1992) J. Chem. Soc. Perkin Trans. **2**, 157.
8. Deinsenhofer, J., Epp, O., Miki, R., Huber, R. e Michel, H. (1984) J. Mol. Biol., **180**, 385.
9. Mauzerall, D. C. (1992) Photoinduced Electron Transfer, Part B (Fox, M. A. e Chanon. M eds.) 191.
10. Onuchic, J. N., Beratan, D. N., Winkler, J. R. e Gray, H. B., (1992) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **21**, 349.
11. Leland, B. A., Joran, A. D., Felker, P. M., Hopfield, J. J., Zewail, A. D. e Dervan, P. B., (1985) J. Phys. Chem. **89**, 5571.
12. Brus, L. (1992) Photoinduced Electron Transfer, Part B (Fox, M. A. e Chanon, M eds.) 314.
13. Rodriguez, J., Kirmier, C, Johnson, M. R., Friesner, R. A., Holten, D. e Sessier, J. L. (1991) J. Am. Chem. Soc. **113**, 1652.
14. Ho, T. F., McIntosh, A. R. e Bolton, J. R. (1980) Nature **286**, 254.
15. Ebersole, M., Levstein, P. R., Willigen, H. (1992) J. Phys. Chem. **96**, 9310.
16. Feitelson, J. e Mauzerall, D. C. (1993) J. Phys. Chem. **97**, 8410.

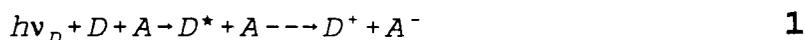
CAPÍTULO I

TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS

CAPÍTULO I

TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS FOTOINDUZIDA

A transferência de elétrons fotoinduzida pode ser descrita como o movimento de um elétron, provocado pela absorção de luz, de uma molécula rica em elétrons (doador D) para uma molécula deficiente em elétrons (aceitador A). A transferência de elétrons fotoinduzida processa-se do doador para o aceitador de acordo com a equação abaixo (consideraremos sempre a transferência ocorrendo com a excitação do doador)



onde $h\nu_D$ indica a energia absorvida pelo doador e o asterisco indica o estado excitado.

A fotoexcitação induz a transferência de elétrons do doador para o aceitador devido o aumento na redução. A promoção de um elétron do mais alto orbital molecular ocupado (HOMO) para o mais baixo orbital molecular desocupado (LUMO) do estado fundamental gera um estado excitado. Desde que o potencial de ionização (IP) é uma medida da energia necessária para remover um elétron do orbital molecular mais alto para o vácuo, o estado excitado possuirá um potencial de ionização menor que o estado fundamental (fig.1.1) [1].

Os conceitos mais importantes do processo de transferência de elétrons fotoinduzida são mais facilmente visualizados examinando-se as superfícies da energia potencial nas figuras 1.2 e 1.3. Na figura

1.2, os reagentes (complexo precursor) são definidos pela curva R e o produto (complexo sucessor) pela curva P.

Estas curvas representam a energia potencial do sistema como uma função de alguma coordenada nuclear. Em geral a posição nuclear de equilíbrio (R_R) mudará com a transferência de elétrons para outra posição (R). A coordenada nuclear usada nas figuras 1.2 e 1.3 representa algum parâmetro estrutural que é alterado quando a transferência ocorre indo dos reagentes em equilíbrio para os produtos em equilíbrio.

Se A e D estão separados por uma distância infinita, a transferência de elétrons não ocorre. O sistema permaneceria na curva R e nunca mudaria para P.

No entanto, quando o complexo precursor R é tal que a distância entre os sitios A e D podem se comunicar eletronicamente, há uma mistura dos níveis eletrônicos de D e A e uma abertura das superfícies de energia, na região do ponto de cruzamento (R_{cp}). Quanto mais forte for a interação eletrônica, maior a abertura (ΔE) e maior a probabilidade para conversão de R - P, desde que o sistema chegue à coordenada nuclear do ponto de cruzamento (R_{cp}). No limite de interação eletrônica forte, ΔE torna-se largo e a superfície energética superior pode ser ignorada e o sistema terá uma probabilidade unitária de passar da curva R para a curva P em R_{cp} . Esta situação é referida como transferência de elétrons adiabática [2].

No sistema cuja interação eletrônica entre A e D for fraca, ΔE (fig.1.2) é pequeno e existe alguma probabilidade do sistema permanecer na curva R quando passar pelo ponto de cruzamento (i.é., seguirá a linha pontilhada na fig.1.2). Quando a probabilidade de reação é menor que a unidade para sistemas que chegam ao ponto de cruzamento, a transferência de elétron é chamada não adiabática [2].

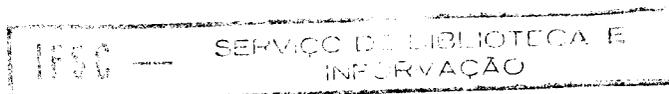
A figura 1.2 mostra que a coordenada nuclear deve distorcer para uma configuração comum para as superfícies potenciais dos reagentes e

dos produtos (i.é., ao chegar no ponto de cruzamento) antes que a transferência de elétrons ocorra. O movimento vibracional é responsável por esta distorção e se o sistema possuí bastante energia vibracional (térmica) para superar a barreira (ΔE^*), então a transferência de elétrons ocorre por um processo ativado. A baixas temperaturas, onde o sistema não possuí energia térmica suficiente para superar a barreira, a transferência pode ainda ocorrer por tunelamento (nuclear) através da barreira. Isto é devido a superposição da cauda das funções de onda vibracionais para todas as configurações R e P na região de cruzamento abaixo da barreira. À baixíssima temperatura apenas o nível vibracional mais baixo da superfície potencial R estará populado e as taxas de transferência de elétron (tunelamento) tornam-se independente da temperatura.

Desta discussão, fica claro que as propriedades do sistema que afetam o valor do ΔE afetarão também a taxa de transferência de elétron. Uma outra propriedade do sistema que afeta a taxa de transferência de elétrons é o *Driving Force* para a reação. A figura 1.3 ilustra isto em termos das curvas de energia potencial.

Como foi primeiro citado por Marcus [3], a energia de ativação (ΔE^*), exigida para transferência de elétrons inicialmente diminui com o aumento do *driving force* (ΔE^0) (fig.3b), mas depois ΔE^* aumenta com o aumento do *driving force* (fig.3c). Esta região final é conhecida como a "região invertida" de Marcus [4].

Estes são os princípios que governam a transferência de elétrons em meios biológicos e não biológicos. Resultados teóricos e experimentais com modelos efetivos têm demonstrado claramente que a transferência pode ser controlada variando-se a distância, orientação, solventes, *driving force* e o ambiente no qual o requisito seja transferência. No nosso caso a variação da distância foi feita variando-se a concentração dos aceitadores e o *driving force* dos dois aceitadores utilizados



determinou a diferença nos resultados obtidos. Todos estes estudos trouxeram uma compreensão razoável com respeito a este importante processo presente na natureza.

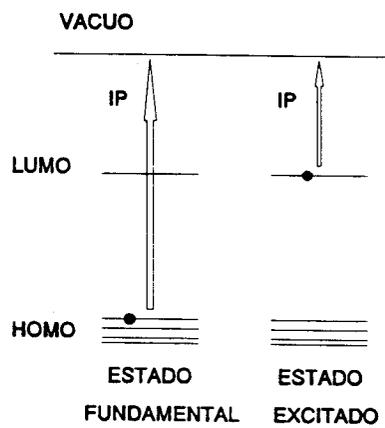


Figura 1.1 Ilustração do aumento da atividade de redução por fotoexcitação, o ponto escuro representa o elétron.

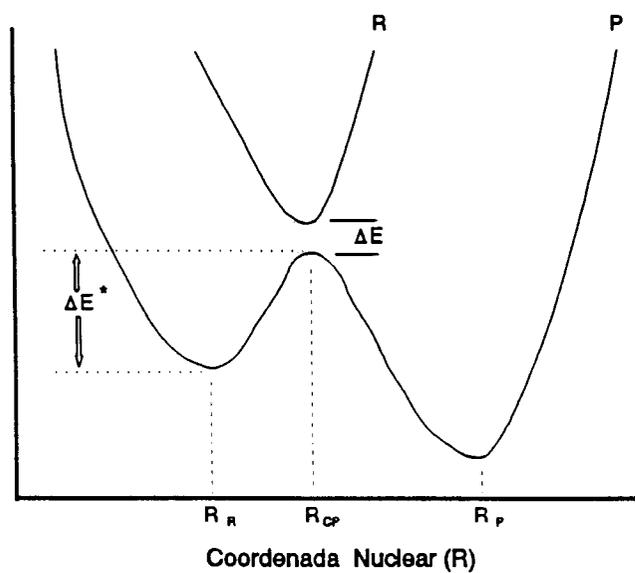


Figura 1.2 Curvas de energia potencial que representa a transferência de elétrons. O eixo da abscissa representa a coordenada nuclear, o eixo da coordenada representa a energia.

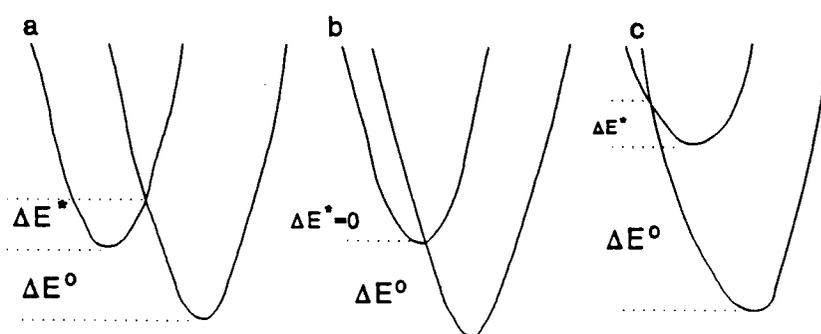


Figura 1.3 Curvas de energia potencial mostrando o efeito do *driving force* (DV) na ativação da barreira de transferência de elétrons. (a) DV pequeno, (b) ponto de transição e (c) região invertida.

CAPÍTULO II

ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

**IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E
INFORMAÇÃO**

CAPÍTULO II

ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

1. O Efeito Fotoacústico

A Espectroscopia Fotoacústica é uma técnica baseada no efeito fotoacústico, descoberto por Alexander Graham Bell em 1880 [1]. Ele observou que um sólido, quando iluminado pela luz do sol modulada, produzia efeitos sonoros dentro de uma câmara fechada onde se localizava a amostra. Estes efeitos dependiam da intensidade da luz do sol e da natureza da amostra. Apesar de ter sido também observado em líquidos e gases [2], este efeito foi deixado de lado por quase um século, tendo uma pequena utilização, a partir da década de 1930, na detecção de poluentes em gases [3]. Já na década de 1970, a utilização do efeito fotoacústico ganhou um grande impulso tanto para gases, onde o uso de laser como fonte de luz foi empregado [4], quanto para sólidos, onde o desenvolvimento de um modelo teórico explicava a maioria dos resultados experimentais [5]. Desde então, o grande número de trabalhos nas diferentes áreas de aplicações pode ser visto nos livros publicados [6-7] e nos trabalhos de revisão [8-9].

2. Geração do Sinal Fotoacústico em Sólidos

Muitas foram as interpretações para o efeito fotoacústico em sólidos [6], mas só em 1973 Parker [10] considerou que o sinal fotoacústico é produzido, principalmente, pela condução do calor do

sólido para o gás em contato com este. Rosencwaig e Gersho [5], em 1976, reafirmaram este mecanismo de difusão térmica (fig 2.1.a) e desenvolveram uma teoria para explicar quantitativamente o sinal fotoacústico (teoria Rosencwaig-Gersho). Segundo essa teoria, o sinal fotoacústico é gerado a partir da absorção de uma radiação eletromagnética modulada, por uma amostra (sólida) dentro de uma célula fechada como mostra a figura 2.2. Na amostra a energia absorvida é convertida, parcial ou totalmente, em calor por processo de decaimento não radiativo. Esse calor é transferido para uma camada do gás que está em contato com a amostra, e devido à modulação esta camada de gás irá se expandir e contrair funcionando como um pistão vibratório no resto do gás, produzindo, assim, o sinal acústico detectado por um microfone acoplado ao gás. Este mecanismo é conhecido como **difusão térmica**.

Um segundo mecanismo de geração do sinal é a **expansão térmica** da amostra (figura 2.1.b). Este, desprezado na teoria de Rosencwaig-Gersho, foi considerado por McDonald e Wetsel [11]. Eles propuseram um modelo de pistão composto, ou seja, a vibração mecânica da superfície da amostra, devido à expansão térmica, funcionaria como um segundo pistão vibratório para o resto do gás. Esse mecanismo pode ser dominante, principalmente para amostras de baixo coeficiente de absorção ótica, para altas frequências de modulação e materiais porosos [12], e depende da temperatura média da amostra.

Quando se tem um gradiente de temperatura dentro da amostra, devido à absorção da luz incidente modulada, pode ocorrer a **flexão termoelástica** da amostra. Este efeito foi originalmente estudado por Rousset et al [13]. Esse mecanismo é dependente do gradiente de temperatura na amostra, este gradiente será diferente a cada ponto da amostra e em consequência haverá também uma expansão diferente ponto a ponto. Como a expansão ocorre paralelamente à face maior da amostra ela produz a flexão da mesma (figura 2.1.c).

Um último mecanismo de geração do sinal a ser considerado é o **efeito fotobárico**, que pode ocorrer em amostras fotoquimicamente ativas, com troca gasosa entre a amostra e o gás da célula fotoacústica (figura 2.1.d). Bults et al [14] constataram esse mecanismo em folhas vegetais, onde a evolução do oxigênio, devido à atividade fotossintética modulada (que é devida a absorção da luz modulada), contribui para o sinal fotoacústico detectado pelo microfone.

3. Modelo Rosencwaig Gersho

Quando estamos estudando uma dada amostra por espectroscopia fototérmica a geração do sinal fotoacústico é proveniente de um ou mais de um dos mecanismos citados acima. Na realidade os efeitos de difusão térmica, expansão térmica e flexão termoelástica estão sempre presentes quando iluminamos moduladamente uma amostra sólida. Dependendo das propriedades ópticas e térmicas da amostra, bem como de seus parâmetros geométricos, um dos mecanismos pode predominar sobre os outros, e o comportamento do sinal fotoacústico é "comandado" por tal mecanismo predominante. Isto colabora para a análise do sinal fotoacústico, uma vez que pode-se ajustar os dados experimentais com o modelo teórico do mecanismo predominante.

Para amostras sólidas o modelo escolhido para o tratamento dos dados é o Rosencwaig-Gersho pois seu desenvolvimento inclui a **difusão térmica**.

Rosencwaig e Gersho [5] desenvolveram um modelo, unidimensional para explicar o efeito fotoacústico. Como comentamos acima, este baseia-se na difusão do calor gerado, da amostra para o gás.

Define-se, usando os símbolos do modelo Rosencwaig-Gersho, para o material "i" ("g" - gás, "s" - amostra, "b" - suporte):

k_i - condutividade térmica do material i (cal/cm.seg. $^{\circ}$ C)

ρ_i - densidade do material i (g/cm 3)

c_i - calor específico do material i (cal/g $^{\circ}$ C)

$\alpha_i = k_i/\rho_i c_i$ - difusividade térmica do material i (cm 2 /seg)

$a_i = (\omega/2\alpha_i)^{1/2}$ - coeficiente de difusão térmica do material i (cm $^{-1}$)

$\sigma_i = (1 + j)a_i$ - coeficiente complexo de difusão térmica do material i

$\mu_i = 1/a_i$ - comprimento de difusão térmica do material i (cm)

β_i - coeficiente de absorção ótica (cm $^{-1}$)

$l_{\beta i} = 1/\beta_i$ - comprimento de absorção ótico (cm)

onde $\omega=2\pi f$, e f é a frequência de modulação da radiação incidente na amostra.

Supondo que a luz monocromática seja sinusoidal

$$I = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos \omega t) \quad 2.3.1$$

onde I é a intensidade da luz incidente. Então, a densidade de calor produzido devido à absorção da luz em algum ponto x no interior da amostra é dada pela eq.2.3.2. β_s coeficiente de absorção óptica da amostra (cm $^{-1}$) e η_s eficiência de conversão da luz absorvida em calor pela amostra.

$$\frac{1}{2} \beta_s \eta_s I_0 \exp(\beta_s x) (1 + \cos \omega t) \quad 2.3.2$$

A Figura 2.2 mostra um esquema de uma câmara fotoacústica. A amostra está na forma de disco com diâmetro D e espessura L_s montada de maneira que sua superfície frontal esteja exposta ao gás dentro da câmara e sua superfície traseira esteja sobre um suporte mau condutor térmico. Supondo que o gás e o suporte não absorvem luz, então temos

três regiões de distribuição de calor através da câmara.

Portanto, as equações de difusão de calor no interior da câmara são:

1 - para $0 \leq x \leq L_g$

$$\frac{\partial^2 T_g}{\partial x^2} - \sigma_g^2 T_g = 0 \quad 2.3.3$$

2 - para $-L_s \leq x \leq 0$

$$\frac{\partial^2 T_s}{\partial x^2} - \sigma_s^2 T_s = - \left[\frac{\beta_s I_0 \eta_s}{2K_s} \right] e^{\beta_s x} [1 + e^{j\omega t}] \quad 2.3.4$$

3 - para $-(L_s + L_b) \leq x \leq -L_b$

$$\frac{\partial^2 T_b}{\partial x^2} - \sigma_b^2 T_b = 0 \quad 2.3.5$$

Aplicando-se as condições de contorno de temperatura e continuidade do fluxo de calor e supondo que o gás se comporta como um gás ideal numa fina camada próxima à superfície da amostra e no restante adiabaticamente, obtém-se que a variação de pressão é dada por [6,15]

$$\Delta P = \frac{\beta_s I_0 \gamma P_0}{2\sqrt{2} K_s L_g a_g T_0 (\beta_s^2 - \sigma_s^2)} x \frac{[(r_s - 1)(b_{bs} + 1)e^{\sigma_s L_s} - (r_s + 1)(b_{bs} - 1)e^{-\sigma_s L_s} + 2(b_{bs} - r_s)e^{-\beta_s L_s}]}{[(b_{gs} + 1)(b_{bs} + 1)e^{\sigma_s L_s} - (b_{gs} - 1)(b_{bs} - 1)e^{-\sigma_s L_s}]}$$

sendo γ a razão dos calores específicos, P_0 e T_0 a pressão e temperatura ambientes.

Nota-se na equação 2.3.6 que a amplitude do sinal fotoacústico depende das grandezas óticas e térmicas da amostra. Assim, além de possibilitar estudos espectroscópicos, também podemos obter

propriedades térmicas da amostra, como por exemplo: difusividade térmica, condutividade térmica e calor específico [16-21]. A amplitude do sinal depende da frequência (presente no parâmetro a_1 da eq.2.3.6) e esta dependência com a frequência possibilita fazer estudos de profundidade na amostra [6,22-25].

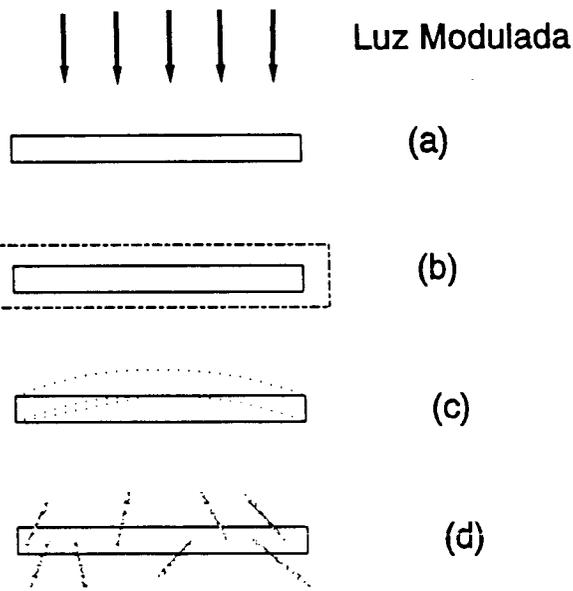


Figura 2.1 Ilustração dos mecanismos de geração do sinal fotoacústico. (a) difusão térmica; (b) expansão térmica; (c) flexão termoelástica e (d) evolução dos gases.

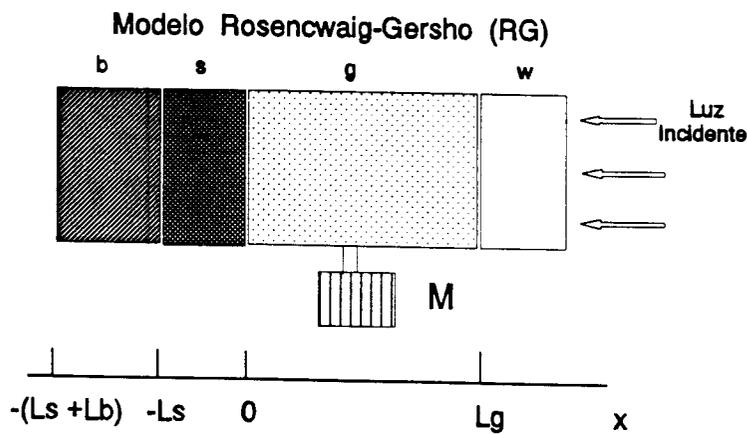


Figura 2.2 Geometria de uma célula fotoacústica convencional. É mostrada a posição da amostra(s), suporte(b), coluna de gás(g), janela(W) e do microfone(M).

REFERÊNCIAS

1. Bell, A. G. (1880) On the Production and Reproduction of Sound by light : Am. J. Sci. **20**, 305.
2. Bell, A. G., (1881) Philos. Mag., **11**, 510.
3. Pfund, A. H., (1939) Science, **90**, 326.
4. Pao, Y. H. (1977) Optoacoustic Spectroscopy and Detection, Academic Press, New York.
5. Rosencwaig, A. e Gersho, A. (1976) J. Appl. Phys., **47**, 64.
6. Rosencwaig, A. (1980) Photoacoustic and Photoacoustic Spectroscopy, John Wiley & Sons, New York .
7. Mandelis, A. (1987) Photoacoustic and Photothermal Waves Phenomena in Semiconductors, North-Holland, Amsterdam .
8. Tam, A. C. (1986) Rev. Mod. Phys. **58**, 381.
9. Vargas, H. e Miranda, L. C. M. (1988) Phys. Rept., **161**, 43.
10. Parker, J. G. (1973) Appl. Opt., **12**, 2974.
11. McDonald, F. A. e Wetsel, G. C. Jr. (1978) J. Appl. Phys., **49**, 2313.
12. Bertrand, L.; Monchalín, J. P.; Lepontre, F. (1982) Appl. Opt., **21**, 248.
13. Rousset, G.; Lepontre, F.; Bertrand, L. (1983) J. Appl. Phys., **54**, 2383.
14. Bults, G.; Horwitz, B.A.; Malkin, S.; Cahen, D. (1982) Biochim. Biophys. Acta, **679**, 452.
15. Rosencwaig, A., (1975) J. Appl. Phys., **47**, 64.
16. Pessoa, Jr., O.; Cesar, C. L.; Patel, N. A.; Vargas, H.; Ghizoni, C. C.; Miranda, L. C. M. (1986) J. Appl. Phys., **59**, 1316.
17. Mansanares, A. M.; Baesso, M. L.; da Silda, F. C.; Gandra, F. C. G.; Vargas, H. (1989) Phys. Rev. B, **40**, 7912.
18. Perondi, L. F.; Miranda, L. C. M. (1987) J. Appl. Phys., **62**,

2955.

19. Bento A. C.; Vargas, H.; Aguiar, M. M. F.; Miranda, L. C. M. (1987) *Phys. Chem. of Glasses*, **28**, 127.

20. Madusoodanan, K. N.; Thomas, M. R.; Philip, J. (1987) *J. Appl. Phys.*, **62**, 1162.

21. Lachaine, A. e Poulet, P. (1984) *Appl. Phys. Lett.* **45**, 953.

22. Michaelin, K. H. (1989) *Appl. Spectroscopy*, **43**, 185.

23. Marek, W. U. e Koenig, J. L. (1986) *Appl. Spectroscopy*, **40**, 994.

24. Nery, J. W.; Pessoa Jr., O.; Vargas, H.; Reis, F. A. M.; Gabrielli, A. C.; Miranda, L. C. M.; Vinha, C. A. (1987) *Analyst.*, **112**, 1487.

25. Cesar, C. L.; Vargas, H.; Pelzel, J.; Miranda, L. C. M. (1984) *J. Appl. Phys.* **55**, 3460.

CAPÍTULO III

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E
INFORMAÇÃO

CAPÍTULO III

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

1. Princípios Básicos de Fluorescência

A fluorescência é um fenômeno que envolve a absorção de energia por uma molécula, promovendo uma transição do estado fundamental para um dos estados excitados. Isto é seguido por uma desexcitação para o nível vibracional fundamental do primeiro estado excitado através da conversão interna (processo não-radiativo), decaindo daí para o estado eletrônico fundamental com emissão de luz.

Este não é o único processo pelo qual o estado excitado pode perder energia, a fig 3.1 mostra outros processos possíveis.

Os processos não radiativos de desexcitação que competem com a fluorescência (e as taxas que os caracterizam) (K_f) são: conversão interna (K_{ic}); cruzamento intersistema (K_{isc}) e supressão estática [$K_s(Q)$]. Portanto a fração que representa a desexcitação através da fluorescência é dada por:

$$\phi_F = \frac{K_F}{K_F + K_{ic} + K_{isc} + K_s(Q)} \quad 3.1.1$$

Esta fração ϕ_F é conhecida como rendimento quântico de fluorescência. Podemos ver através desta equação que, se todos os processos não radiativos fossem desprezíveis então $\phi_F=1$, ou seja o rendimento quântico de fluorescência seria 100%, isto é, o único mecanismo de relaxação seria a fluorescência.

Alguns detalhes dos processos que competem no decaimento

do estado excitado são descritos a seguir [1]:

1) Conversão Interna (K_{ic}): Neste processo a energia de excitação é perdida por colisão com o solvente ou por dissipação através dos modos vibracionais internos. Geralmente K_{ic} e a temperatura são diretamente proporcionais, conseqüentemente a fluorescência decresce com o aumento da temperatura.

2) Cruzamento Intersistema (K_{is}): Neste processo isoenergético a troca de spin (nominalmente proibida) converte um singlete excitado S_1 em um estado tripleto excitado T_1 que decai para o nível vibracional fundamental T_1 , e daí para o estado singlete fundamental S_0 , tanto por fosforescência (emissão de um fóton) ou por conversão interna. Geralmente o estado tripleto T_1 , tem energia mais baixa que o singlete excitado S_1 , portanto, a fosforescência ocorre em comprimentos de ondas maiores que a fluorescência. Como a transição envolvida na fosforescência promove mudança de multiplicidade S_1-T_1 e T_1-S_0 o tempo de vida é muito mais longo que o tempo de vida de fluorescência.

3) Supressão de fluorescência [$K_q(Q)$]. Quando trabalha-se com soluções, a supressão de fluorescência geralmente ocorre devido a colisões entre o aceitador e o doador. No nosso caso como o doador e o aceitador estão a uma distância fixa numa matriz rígida, a supressão é conhecida como estática. Ela ocorre devido a transferência do elétron do primeiro estado excitado do doador para o aceitador reduzindo a população do estado excitado do doador, provocando uma diminuição na intensidade do sinal de fluorescência.

Consideramos também o efeito de outros níveis eletrônicos. A fig.3.2 mostra esquematicamente a excitação e emissão de fluorescência.

A conversão interna entre os singletos de energia mais alta, tal como S_3-S_2 é muito mais rápida que as taxas que consideramos até aqui (S_1-S_0). A relaxação vibracional dos níveis vibracionais

excitado de cada estado eletrônico é mais rápido que a emissão de fóton. O resultado prático é que toda fluorescência que observamos é normalmente originária do nível vibracional fundamental do singlete excitado [2]. Isto implica o seguinte:

- O espectro de luz emitida deve ser independente do comprimento de onda de excitação, λ_{exc} .

- Todos os espectros de fluorescência estarão deslocados para comprimentos de onda maiores (menor energia) que a banda de absorção.

- A forma da banda de emissão será aproximadamente uma imagem especular da banda de absorção cujo máximo está centrado em comprimento de ondas maiores que o da banda de absorção. Este deslocamento é conhecido como deslocamento de Stoke.

2. Supressão de Fluorescência

A supressão de fluorescência refere-se ao processo que diminui a intensidade de fluorescência de uma dada substância. Uma variedade de processos podem promover a supressão. Entre eles estão: transferência de energia, transferência de elétrons e supressão por colisão.

Dentre estes processos podemos desconsiderar os seguintes: a transferência de energia, porque esta requer uma superposição entre a energia de emissão do doador e a energia de absorção do aceitador (no nosso caso a emissão do doador ocorre em torno de 625 nm enquanto o aceitador absorve na região de Soret); a supressão por colisão porque na nossa amostra as moléculas doadoras e aceitadoras tiveram suas distâncias fixadas por meio de uma matriz polimérica. Resta, portanto, a supressão via transferência de elétrons .

2.1 Modelo do Kaneko

Nosso interesse é um modelo simples que explique a transferência de elétron intermolecular, utilizando a supressão de fluorescência. Na supressão dinâmica o aceitador no estado excitado, F^* , e o aceitador, Q , difundem em uma solução e a reação ocorre quando eles colidem. Quando F^* e i moléculas de Q estão presentes em uma esfera supressora ao redor de F , a supressão pode ocorrer imediatamente após a excitação (sem difusão) e o processo é chamado supressão estática.

No caso da supressão estática, vamos introduzir um modelo para a interação de F com Q , ou para a incorporação de Q na esfera de supressora de F . Este modelo, proposto por Kaneko [4], supõe que os aceitadores são adicionados um a um na esfera supressora, sendo a constante de equilíbrio do i-ésimo passo, K_i , dado por K_i/i . Sob esta condição a distribuição de supressores incorporados obedece a probabilidade de Poisson [5]. A distribuição de probabilidade (P_i) que o doador incorpore i moléculas Q é dado por

$$P_i = \frac{m^i}{i!} \exp(-m) \quad 3.2.1.1$$

onde

$$m = \frac{[Q]_{es}}{[H_2OEP]_t} \quad 3.2.1.2$$

onde $[H_2OEP]_t$ é a concentração total de doadores, e $[Q]_{es}$ a concentração de aceitadores na esfera supressora.

Sendo $[H_2OEP]$ e $[Q]$ as concentrações de espécies livres, obtemos para $[H_2OEP]_t$ e $[Q]_{es}$:

$$[H_2OEP]_t = [H_2OEP] \exp(k_1 [Q])$$

e

$$[Q]_{es} = k_1 [Q] [H_2OEP]_t$$

De modo que podemos reescrever

$$m = k_1 [Q]$$

e

$$[Q] = [Q]_t - k_1 [Q] [H_2OEP]_t$$

assim

$$[Q] = \frac{[Q]_t}{1 + k_1 [H_2OEP]_t} \quad 3.2.1.3$$

Pela eq. 3.2.1.1, a distribuição de probabilidade de H_2OEP livres, que não incorporam moléculas Q , P_0 , é escrita como:

$$P_0 = \exp(-m) = \exp(-k_1 [Q]) \quad 3.2.1.4$$

Desde que o processo de supressão é estático, a taxa de emissão relativa (I/I_0) na ausência (I_0) e presença (I) do supressor é dada por:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{1}{P_0} = \exp(k_1 [Q])$$

com isso

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = k_1 [Q] = \frac{k_1}{1 + k_1 [H_2OEP]_t} [Q]_t \quad 3.2.1.5$$

A partir desta expressão podemos obter o valor da constante de equilíbrio K_1 , referente à incorporação do primeiro supressor. Além disso, conhecido $K_1 [Q]$ e portanto m , pode-se obter todas as distribuições de probabilidade de Poisson.

2.2 Modelo de Perrin

Para a aplicação do modelo de Perrin algumas considerações

experimentais são levadas em conta:

i. A concentração de doadores deve ser pequena evitando interação entre eles e a concentração de aceitadores deve ser dezenas de vezes maior que a concentração do doador.

ii. A distância entre doador e aceitador deve ser fixa, obtida através de baixa temperatura, no caso de solução, ou dispondo as moléculas em uma matriz rígida de polímero, sendo a sua distribuição aleatória e uniforme.

Neste modelo a supressão estática do estado excitado do doador é realizada por meio de uma distribuição aleatória de aceitadores que estão ao redor do doador. Considera-se uma esfera de raio r_0 , que se a distância do aceitador ao doador, for menor do que r_0 a supressão ocorrerá, e se for maior ela não ocorrerá. No nosso caso, onde a supressão ocorre devido à transferência de elétrons, r_0 é chamado de distância crítica para a ocorrência da transferência. Este é o parâmetro que é determinado com o modelo de Perrin.

O processo de supressão da fluorescência envolve os seguintes passos.

- 1) $h\nu + D \rightarrow D^*$ (excitação)
- 2) $D^* \rightarrow D$ (decaimento sem supressão com taxa w_0)
- 3) $D^* \rightarrow D$ (decaimento com supressão com taxa w)

A eficiência de fluorescência é dada por

$$\frac{F}{F_0} = \frac{[D^*]}{[D^*]_0} = \frac{w_0}{w_0 + w} \quad 3.2.2.1$$

onde F e F_0 são as intensidades de fluorescência na presença e ausência de supressor.

Supondo que haja uma distribuição $P(w)$ de taxas de decaimento w , com

$$\int_0^{\infty} P(w) dw = 1 \quad 3.2.2.2$$

é necessário realizarmos a média com relação a w e tem-se

$$\frac{F}{F_0} = \int_0^{\infty} \frac{w_0}{w_0 + w} p(w) dw \quad 3.2.2.3$$

Para pequenas concentrações de supressores, pode-se considerar que a supressão da fluorescência do fluoróforo ocorre só com o seu vizinho mais próximo.

Chamamos de $p_1(r)$ a probabilidade do doador ter o aceitador mais próximo à uma distância r , e considerando a probabilidade normalizada:

$$\int_0^{\infty} p_1(r) 4\pi r^2 dr = 1$$

Temos ainda que a taxa de decaimento w é única e em função da distância r , ou seja, $w=K(r)$. Então, a distribuição $p(w)dw$ se torna $p_1(r)4\pi r^2 dr$. A equação 3.2.2.3 pode ser escrita como:

$$\frac{F}{F_0} = \int_0^{\infty} \frac{w_0}{w + K(r)} p_1(r) 4\pi r^2 dr$$

Para encontrar $p_1(r)$, notemos que, dizer que o primeiro vizinho está à uma distância r , quer dizer que não há vizinhos para distâncias $\rho < r$. Precisamos encontrar uma expressão para $p(w)$ considerando uma distribuição uniforme de supressores.

A probabilidade de encontrar um supressor no elemento de volume $dV=4\pi\rho^2 d\rho$ é $4\pi C\rho^2 d\rho$; onde C é o número de moléculas aceitadoras por unidade de volume. A probabilidade que não haja uma molécula supressora em dV é portanto $1-4\pi C\rho^2 d\rho$.

Supondo que os diferentes elementos de volume não estejam correlacionados, o evento de não encontrar um supressor em $4\pi C\rho_i^2 d\rho_i$

é independente do evento de não encontrar um supressor em $4\pi C_i \rho_j^2 d\rho_j$, $\rho_i \neq \rho_j$. Então para obtermos a probabilidade de não haver uma molécula supressora em $\rho < r$, multiplicamos as probabilidades individuais.

$$p(\text{sem } A \text{ em } \rho < r) = \prod_i^N (1 - 4\pi C \rho_i^2 d\rho_i) \quad 3.2.2.4$$

onde $\rho_1 = 0, \dots, \rho_N = r$.

Tomando o logaritmo e usando a aproximação $\ln(1-x) \approx -x$ para pequenos valores de x , obtemos

$$\ln p \approx -4\pi C \sum_i \rho_i^2 d\rho_i$$

como ρ é, na verdade, um parâmetro contínuo, escrevemos

$$\begin{aligned} \ln p &= -4\pi C \int_0^r \rho^2 d\rho \\ &= -\frac{4}{3}\pi C r^3 \end{aligned}$$

e, portanto,

$$p = \exp^{-\frac{4}{3}\pi C r^3} \quad 3.2.2.5$$

Então, a probabilidade de não haver um aceitador para $\rho < r$ e haver um no elemento de volume $dV = 4\pi r^2 dr$ é:

$$p_1(r) dV = C 4\pi r^2 dr e^{-\left(\frac{4}{3}\pi C r^3\right)}$$

A eq. 3.2.2.3 fica escrita como eq. 3.2.2.6;

$$\frac{F}{F_0} = \int_0^{\infty} \frac{w_0}{w_0 + K(r)} C e^{-\left(\frac{4}{3}\pi C r^3\right)} 4\pi r^2 dr \quad 3.2.2.6$$

Para chegar ao modelo de Perrin, consideramos uma esfera

de raio r_0 tal que ou seja, haverá transferência de elétron se $r < r_0$ e não ocorrerá se $r > r_0$.

$$K(r) = \begin{cases} \infty & r < r_0 \\ 0 & r > r_0 \end{cases}$$

A equação 3.2.2.6 fica, então,

$$\frac{F}{F_0} = \int_{r_0}^{\infty} 4\pi C e^{-\frac{4\pi C}{3} r^3} r^2 dr = e^{-\frac{4}{3}\pi C r_0^3} \quad \mathbf{3.2.2.7}$$

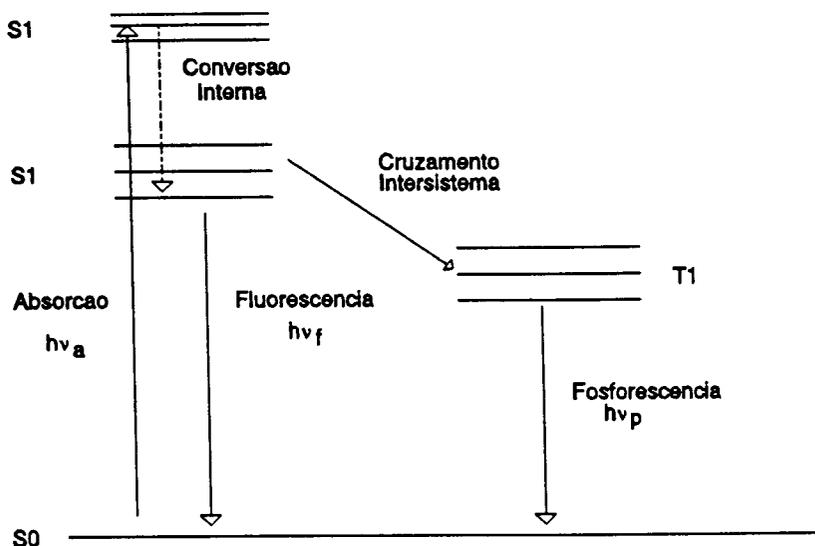


Figura 3.1 Diagrama de Jablonski

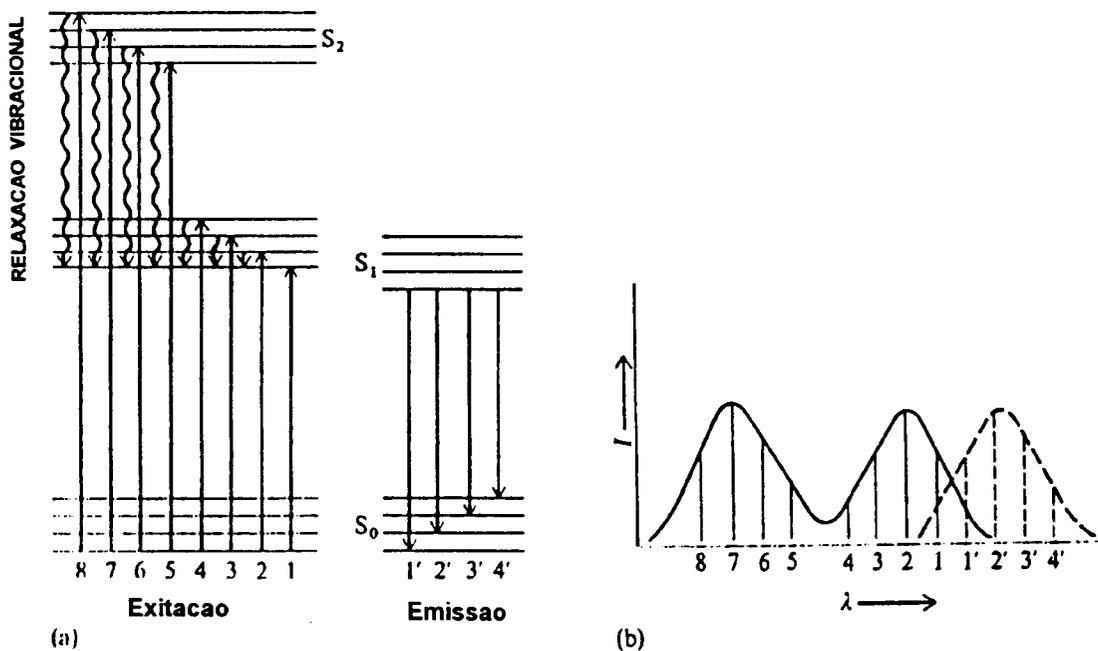


Figura 3.2 Excitação e emissão de fluorescência [1].

REFERÊNCIAS

1. Cantor, C. R. e Schimel, P. R. (1980): "Biophysical chemistry

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

part II: Techniques for the study of Biological Structure and Function." Freeman and Company, .

2. Kasha, M. (1950) Discuss. Faraday Soc. 9, 14 .

3. Lakowicz, J. R. (1983) " Principles of Fluorescence Spectroscopy" Plenum Press, NY.

4. Kaneko, M.; Tsuchido, E.; Imai, Y. (1991) J. Chem. Soc. Faraday Trans. 87(1) 83.

5. Boas, M. L. (1983) "Mathematical Methods in Physical Sciences" John Wiley & Sons .

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação das Amostras

Como a idéia do trabalho era estudar o processo de transferência de elétrons em um meio rígido, usamos uma substância rica em elétrons (um doador) e outra deficiente em elétrons (um aceitador) dispersas em um meio polimérico. Este sistema é interessante também por simular o centro de reação fotossintético.

Para prepararmos as amostras foi necessário que o solvente utilizado dissolvesse tanto o polímero como o doador e o aceitador envolvidos. Vários solventes foram empregados no preparo dos filmes. O dicloro-metano foi um dos utilizados, sua ação sobre o polímero foi excelente, no entanto, seu inconveniente estava na rápida evaporação alterando a viscosidade da solução e em consequência a espessura do filme durante sua deposição. Passamos a utilizar o clorofórmio que não apresentou o problema do anterior, embora a dissolução do solvente tenha se tornado mais lenta, mas surgiu um problema pois nele havia a presença de cloro-livre e este reagia com a molécula doadora. Finalmente decidimos utilizar o tolueno que dentre estes não foi o melhor para dissolver o polímero mas não apresentou nenhum outro inconveniente. Para cada solução preparada foram feitas medidas de absorção ótica utilizando para isto o espectrofotometro Cary-Varian 2315. Este controle seria para a obtenção da concentração da solução com doador e também para verificar possíveis alterações nas soluções estocadas. A concentração da solução com doador foi determinada utilizando o

coeficiente de extinção para a porfina, em 498 nm, $1,38 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1]. A concentração da solução com as quinonas foi obtida por gravimetria.

As moléculas utilizadas foram as seguintes, para doador foi usada a 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaetil-21H,23H-Porfirina (H_2OEP) figura 4.1. Para aceitadoras foram a 2,3-Dicloro 5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) figura 4.2 e a Tetrametil-1,4-benzoquinona (DQ) figura 4.3.

Para a preparação dos filmes foi utilizado cerca de 300 mg do poli(metil-metacrilato) PMMA dissolvidos em um volume de 1 ml do solvente que já continha as moléculas doadoras e aceitadoras em uma concentração conhecida. Inicialmente tentamos utilizar o policarbonato (PC), mas devido à dificuldade de dissolvê-lo, exigindo que fosse feito um aquecimento para sua total dissolução, resolvemos utilizar o PMMA com isto evitamos o aquecimento que poderia provocar algum dano nas moléculas em estudo.

Para fazer os filmes a solução composta do polímero e das moléculas doadoras e/ou aceitadoras foi derramada sobre uma placa de vidro e estirado com um extensor, formando um filme uniforme e de espessura de 100 μm . A espessura era função da viscosidade da solução e do micrômetro do extensor [2]. Estes dois parâmetros foram mantidos constantes para que os filmes tivessem aproximadamente a mesma espessura.

Em geral, estes filmes eram feitos e secados em um ambiente de N_2 para evitar oxidação das moléculas ou a supressão do estado tripleto.

Eram necessárias 12 horas para a evaporação completa do solvente. Foram feitos teste para a secagem à vácuo para diminuir o tempo de evaporação mas ocorreu o inconveniente da formação de bolhas. Depois de se obter os filmes secos, eram cortados quatro pedaços com

um fura-rolhas, com os quais eram obtidos os espectros. O valor médio deles foi utilizado nas análises. Dessa maneira obtivemos amostras de mesmo tamanho e espessura para todos os filmes conseguidos. A utilização de quatro pedaços de cada filme melhorou a relação sinal/ruído e testou a homogeneidade do filme.

2. Instrumentação

2.1 Espectrômetro Fotoacústico

A figura 4.4 mostra o diagrama esquemático do espectrômetro fotoacústico, que basicamente é composto por:

- 1 - fonte de luz;
- 2 - modulador mecânico ou chopper;
- 3 - monocromador;
- 4 - detetor(câmara fotoacústica);
- 5 - sistema de aquisição

A fonte de luz branca de alta potência (ORIEL 450W) produz uma forte radiação nas regiões espectrais: ultravioleta próximo, visível e infravermelho próximo.

A luz modulada incidiu sobre a fenda de entrada do monocromador (Jarrel - Ash mod.82 - 497) equipado com uma rede de difração, no visível. Esta rede foi controlada por um motor de passo (Astrosyn - Minebea Co. Ltda. tipo 23PM - C406) conectado ao microcomputador.

A luz monocromática foi então colimada por uma lente e passou, em seguida, através das fendas de um modulador mecânico de velocidade variável (chopper PAR 194A).

A luz agora modulada foi focada em uma fibra ótica (ORIEL) e foi conduzida através da fibra até a câmara fotoacústica. A utilização da fibra facilitou o alinhamento ótico do sistema. A descrição

detalhada da câmara está dada abaixo.

O sinal elétrico gerado na câmara fotoacústica foi enviado para a entrada do amplificador Lock-in (SR530 - Stanford) funcionando na frequência do chopper. O sinal do lock-in foi enviado através da interface RS-232 ao mesmo microcomputador que controlou o driver do motor de passo.

Um programa de aquisição de dados desenvolvido pelo grupo de ótica fez o microcomputador controlar todas as operações do espectrômetro: ler os sinais, realizar os cálculos, controlar o movimento do motor de passo, e mostrar na tela, em tempo real, o sinal da amostra que estivesse sendo estudada. O espectro de referência, ou seja, de emissão da lâmpada foi obtido por meio de uma papel enegrecido (papel carbono) sendo este utilizado para normalizar os espectros obtidos.

2.1.1 Câmara Fotoacústica

As câmaras fotoacústicas desenvolvidas observaram critérios já conhecidos na literatura [3-5]. As características da câmara se baseiam principalmente em sua geometria.

No projeto de uma câmara fotoacústica devemos ter os seguintes cuidados:

1 - o volume interno da câmara deve ser o menor possível. Para a câmara onde o comprimento do gás (L_g) é maior que a difusão térmica do gás (μ_g), o sinal fotoacústico aumenta com a diminuição de L_g . Para a Câmara com $L_g < \mu_g$, o sinal fotoacústico decresce com o decréscimo de L_g . McDonald [4] sugere que na otimização de uma câmara fotoacústica com geometria cilíndrica, as dimensões sejam as seguintes: o raio (r) e o comprimento (L_g) seja o menor possível, mas com $L_g > 2\mu_g$ e $r > 2L_g$ (na frequência de modulação mais baixa);

2 - o microfone deve ser posicionado o mais próximo possível da amostra;

3 - a massa da câmara deve ser grande para difundir o calor por ela absorvido e não gerar sinal fotoacústico;

4 - a superfície interna deve ser metálica, bem limpa e polida;

5 - o suporte da amostra não deve ser um bom condutor de calor;

6 - o interior da câmara deve ser isolado acusticamente de fontes de ruídos externos. O sinal fotoacústico é várias ordens de grandezas menor do que o ruído ambiente.

Com base nestes itens, desenvolvemos algumas câmaras e aqui apresentamos a melhor configuração. Com essas câmaras temos conseguido obter sinais fotoacústicos de amostras com coeficiente de absorção muito pequeno.

Projetamos uma câmara de único corpo dividida em dois ambientes: da amostra e do microfone, como mostra a figura 4.2.

Essa câmara tem mostrado ter alto sinal com corpo negro, aproximadamente 2mV com microfone de eletretos comercial sem pré-amplificador e na frequência de modulação de 3 Hz em 470 nm. Apresenta baixo ruído ($\ll 1\mu V$), além de ser mecanicamente resistente. A amostra é colocada pela abertura inferior do "compartimento da amostra" e a entrada de luz é feita pela janela superior. O suporte da amostra é feito de lucite ou acrílico, de modo que a transmissão de calor que pode ocorrer da amostra não produza sinal fotoacústico.

2.2 Espectrofluorímetro

A montagem do espectrofluorímetro utilizado em nosso

laboratório está esquematizado na figura 4.6.

A configuração básica do nosso espectrofluorímetro possui os seguintes componentes.

1. Fonte de Luz
2. Monocromadores
3. Filtros e Fibras Óticas
4. Fotomultiplicadora
5. Modulador Mecânico (chopper)
6. Sistema de Aquisição

A fonte de luz branca é de Xenônio de alta potência (Oriental 450W). A luz por ela emitida foi focada diretamente em um monocromador (Jarrel-Ash mod. 82-497) que foi mantido em 500 nm. As fendas foram dispostas com aberturas de 3 mm o que resultou em uma resolução de 9 nm. Logo na saída do monocromador o feixe foi colimado e passou através de um modulador mecânico da Stanford (SR 541). Um segundo monocromador (Oriental mod. 77250) foi utilizado para a obtenção do espectro de emissão. A resolução deste foi fixada em 4 nm. Os dois monocromadores foram calibrados utilizando-se para isso uma lâmpada de mercúrio que possui linhas espectrais características [6].

A luz emergente do primeiro monocromador passa por um filtro OG420 que corta os possíveis harmônicos. Um segundo filtro passa alto GG550 foi colocado antes da fotomultiplicadora evitando que o feixe de excitação contribuísse no sinal de intensidade de fluorescência.

Uma fibra ótica bifurcada da Oriental 77522 foi utilizada da seguinte maneira. A luz monocromática de excitação foi focada em um dos ramos da fibra, esta luz então incidiu sobre a amostra, e a luz emitida foi coletada pelo outro ramo da fibra guiando a luz de emissão para o segundo monocromador. A luz após ser filtrada era detectada pela fotomultiplicadora.

A fotomultiplicadora (Oriel mod. 7066) possui sensibilidade de 400 a 1100 nm. O sinal elétrico da fotomultiplicadora era então detectado por um amplificador lock-in (SR530 - Stanford Research) que estava conectado ao "chopper".

O sistema de aquisição composto por um microcomputador compatível com IBM PC-xt executava os comandos de acionamento do motor de passo e lia os sinais, posteriormente podendo tratar os dados obtidos.

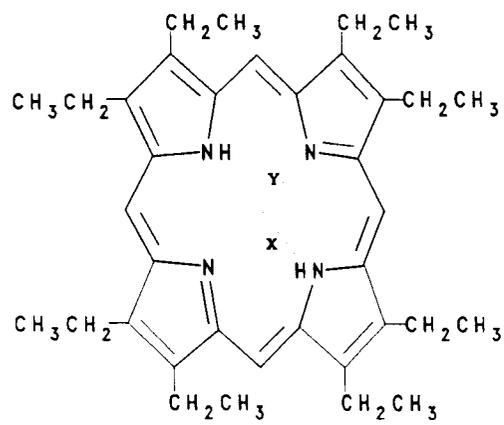


Figura 4.1 Molécula de H₂OEP.

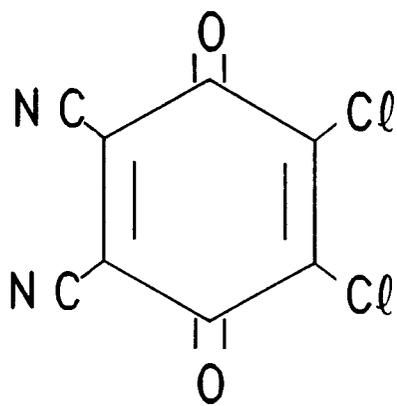


Figura 4.2 Molécula de DDQ.

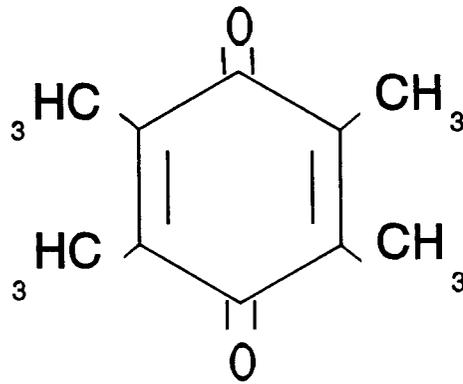


Figura 4.3 Molécula de DQ.

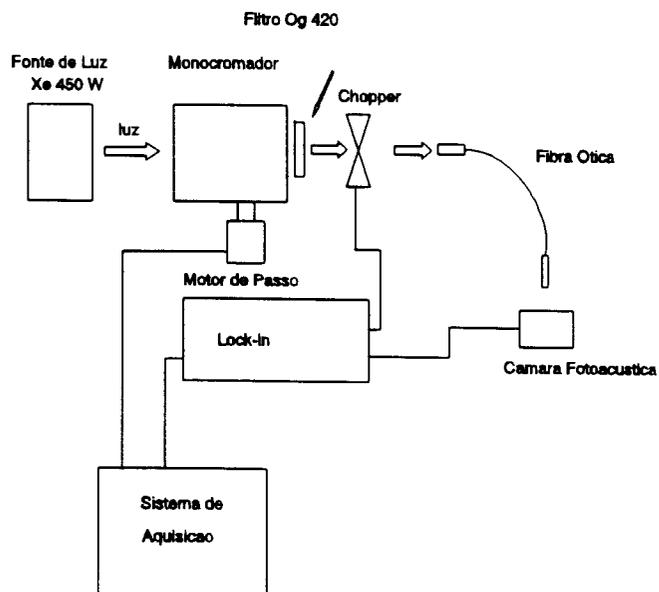


Figura 4.4 Esquema do espectrômetro fotoacústico.

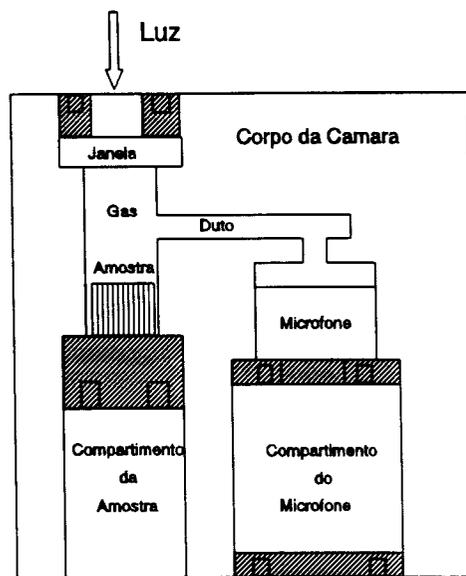


Figura 4.5 Esquema da câmara fotoacústica.

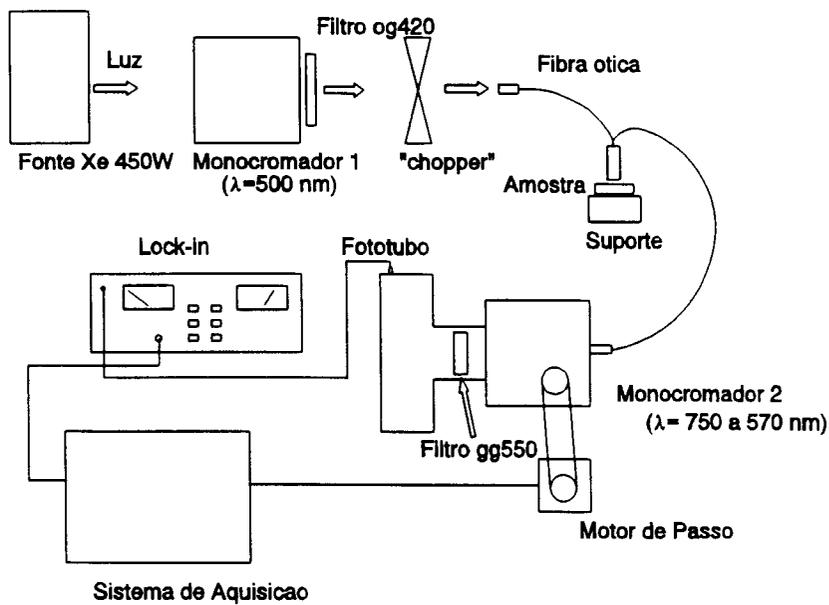


Figura 4.6 Esquema do espectrofluorimetro.

REFERÊNCIAS

1. Gong, L. C. e Dolphin, D. (1985) Can. J. Chem. **63**, 401.
2. Albuquerque, E. J. (1992) Dissertação de Mestrado IFQSC-DFCM-USP.
3. Aamodt, L. C.; Murphy, J. C.; Parker, J. G. (1977) J. Appl. Phys., **48**, 927.
4. McDonald, F. A. (1986) Can. J. Phys. **64**, 1023.
5. Tam, A. C. e Wong, Y. H. (1980) Appl. Phys. Lett. **36**(6), 471.
6. Moore, J. H., Davis, C. C. e Caplan, M. A. (1983) "Building Scientific Apparatus" Addison-Wesley Publishing Company .
7. Lakowicz, J. R. (1983) " Principles of Fluorescence Spectroscopy" Plenum Press, NY .

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos nos espectrômetros fotoacústico e de fluorescência ambos montados no grupo de biofísica, e as medidas de absorção foram feitas no Cary-Varian 2315.

Como no presente trabalho foram utilizadas duas técnicas, e amostras feitas com dois solventes diferentes, apresentaremos os dados da seguinte maneira. Na seção 5.1 estão os dados para amostras feitas com clorofórmio e na seção 5.2 os dados para amostras feitas com tolueno. Cada uma destas seções está dividida nas técnicas fotoacústica e fluorescência.

Alguns cuidados descritos abaixo, foram tomados durante os experimentos para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

1. Geometria da Câmara Fotoacústica

A câmara utilizada para as medidas de fotoacústica foi sempre a mesma garantindo que as diferenças observadas nas medidas não fossem devido a diferença de geometria da câmara, mas fossem exclusivas das amostras. A sua construção seguiu os parâmetros técnicos definidos na literatura, e já descritos no capítulo referente a materiais e métodos.

2. Alinhamento Ótico

O alinhamento ótico foi sempre verificado antes de um conjunto de medidas. Isto foi feito utilizando um detetor piroelétrico, mantendo-se o comprimento de onda de excitação em 470 nm e a frequência

do modulador mecânico (chopper) a 10 Hz. Assim a quantidade de luz incidente foi mantida constante.

3. Sistema de Detecção

Na montagem para fotoacústica um único microfone de eletretos foi utilizado como o dispositivo de detecção. Na montagem para a fluorescência foi utilizada uma única fotomultiplicadora.

4. Saturação do Espectro

Devido a dependência da espectroscopia fotoacústica com os parâmetros óticos e térmicos da amostra, existia a possibilidade de estarmos trabalhando em uma concentração que estivesse saturando o espectro. Isto é facilmente verificado pelo achatamento das bandas, o que não ocorreu nos espectros obtidos, como mostrado abaixo.

5. Fotodegradação

Outro fator importante verificado experimentalmente, foi a ausência de produtos resultantes da ação da luz ou de agentes químicos. A constância da forma de linha dos espectros foi utilizada como indício de que não havia a geração de produtos, como mostrado abaixo.

5.1 Resultados de Amostras Preparadas com Clorofórmio

O sinal fotoacústico é composto da amplitude e fase. A amplitude em um determinado comprimento de onda representa a quantidade de energia luminosa que é convertida em calor logo após a absorção de luz, neste comprimento de onda, pela amostra. A fase representa o intervalo de tempo que há entre a excitação da amostra e a detecção da variação de pressão pelo microfone, estando incluído o tempo de propagação do calor do seu ponto de geração até a superfície da amostra

(pensando em termos do modelo de difusão térmica).

Assim sendo, primeiro abordaremos o comportamento da amplitude e depois da fase.

5.1.1 Resultados da Amplitude do Sinal Fotoacústico

Dando início, portanto, à apresentação e discussão dos dados obtidos, começamos mostrando que os espectros obtidos por fotoacústica mantêm a mesma forma de linha do que o obtido por absorção convencional, como mostram as figuras 5.1 e 5.2, respectivamente. Verificamos também o problema relativo a ação da luz ou de algum agente químico sobre a amostra. Como é comum o uso de lâmpadas com potência relativamente alta na espectroscopia fotoacústica, havia a possibilidade da degradação da porfirina pela luz. Neste sentido nos preocupamos em iniciar as medidas sempre de comprimento de onda maiores (660 nm) para menores (450 nm), desta maneira a mostra foi exposta primeira a feixes de menor energia. A figura 5.3 mostra uma sequência de medidas feitas com um único filme de porfirina, obtidas a 5 Hz. Percebemos que não há uma grande variação na forma de linha dos espectros, garantindo que não há formação de nenhum fotoproduto opticamente ativo. Estes dados mostram também a reprodutibilidade deste equipamento.

Na espectroscopia fotoacústica, parâmetros óticos e térmicos são determinantes na composição do sinal obtido. A olho nú percebemos que a amostra era opticamente transparente mas quanto ao aspecto térmico não pudemos dizer nada apenas por este tipo de observação. O aspecto térmico diz respeito a geração de calor na amostra e sua propagação. Caso a propagação estenda-se além da espessura da amostra, ela é classificada como termicamente fina, do contrário ela é termicamente espessa. O resultado prático é que se a

amostra for termicamente fina, a onda de calor gerada nela alcançará o material de suporte da amostra, podendo gerar um sinal adicional e mascarar a análise do resultado. Se for termicamente espessa a onda de calor decairá dentro da espessura da amostra e a geração de calor na câmara será devido unicamente a amostra.

A classificação térmica da amostra foi obtida através das medidas da amplitude para diferentes frequências de modulação ω . As figuras 5.4 e 5.5 mostram, em escala logarítmica, a dependência com ω da amplitude do sinal observado para filmes de H₂OEP e H₂OEP+DDQ, respectivamente. As inclinações obtidas através de ajuste linear para as figuras 5.4 e 5.5 foram -1,49 e -1,53, respectivamente. De acordo com o modelo Rosencwaig-Gersho [1], para amostras opticamente transparente e termicamente espessas o valor desta inclinação é de -1,5. Os nossos valores, portanto, estão bem próximos, podendo ser incluídos neste caso limite. Garante-se deste modo que o material sobre o qual a amostra é colocada não tem influência alguma na amplitude ou fase do sinal fotoacústico.

O espectro fotoacústico, assim como o espectro de absorção, pode sofrer saturação. No caso do fotoacústico, parâmetros óticos e térmicos podem produzir tal efeito. Investigamos então, que concentração poderia ser utilizada para conseguir um bom sinal, mas evitar a saturação do espectro. O coeficiente de absorção ótico β , foi obtido a partir da concentração da solução de porfirina utilizada, do coeficiente de extinção em 498 nm $1,38 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [2], e da espessura média do filme, 100 μm . Graficamos na figura 5.6 a amplitude em 498 nm em função do coeficiente de absorção ótico. Percebe-se que o comportamento é linear, indicando que a faixa de concentração que utilizamos para os filmes não produziu saturação. Se não houve saturação da banda mais intensa na região entre 450 e 660 nm, também não ocorreu saturação no restante dos espectros. Optamos por utilizar

nos experimentos seguintes uma concentração de porfirina de $1,4 \times 10^{-4} \text{M}$, que corresponde a $\beta = 2,67 \text{ cm}^{-1}$, e a concentração de aceitadores foi de 10 a 50 vezes maior que a do doador. Essas duas condições satisfazem os critérios exigidos pelo modelo de Perrin (seção 2.2).

Os efeitos devido ao aumento da concentração de aceitadores, sobre o sinal gerado pelo doador, foram investigados na região de 620 nm. Isto porque nesta região apenas a molécula doadora absorve. As figuras 5.7 e 5.8 mostram os espectros de absorção ótica para as moléculas aceitadoras DDQ e DQ, respectivamente. Vê-se que na região de 620 nm não há absorção por parte destas espécies.

Os espectros fotoacústicos foram obtidos na região de 450 a 660 nm para filmes onde a quantidade de doador foi mantida constante e a do aceitador foi variada. Para cada filme preparado foram retirados pequenos pedaços na forma de discos com os quais as medidas foram feitas. Este procedimento confirmou que a distribuição de doadores e aceitadores no filme é uniforme e que durante o processo de evaporação do solvente não ocorreu difusão das moléculas para o centro ou para as bordas.

Observou-se, como mostra as figuras 5.9 e 5.10, que a presença dos aceitadores não altera a posição da banda em 620 nm. Há, no entanto, um aumento da intensidade desta banda com o aumento da concentração de aceitadores.

Este comportamento é explicado considerando que quando o doador está só no filme, tão logo ele seja excitado, existem dois processos que competem no decaimento desta molécula para o estado fundamental: luminescência e decaimento não-radiativo. Quando o aceitador está presente no filme, um terceiro processo é possível: o elétron ser transferido do doador para o aceitador. Neste tipo de transferência, as vezes, ocorre simultaneamente com a transferência de energia, neste caso é necessário que haja superposição entre a banda

de emissão do doador e a banda de absorção do aceitador, no nosso caso esta contribuição não está presente. E se o elétron no aceitador decai por processo não-radiativo, há um aumento no calor produzido e em consequência uma amplitude maior do sinal fotoacústico. Isto é o que deve estar ocorrendo em nossas amostras.

Para determinarmos o valor da intensidade da banda em 620 nm, foram feitos ajustes de 5 Gaussianas na região espectral compreendida entre 450 e 660 nm. A escolha do provável número de Gaussianas a serem utilizadas teve o seguinte critério. Como pode-se observar no espectro obtido para a amostra de porfirina com a concentração de aceitadores 30 vezes maior que a do doador, figura 5.11, existem quatro bandas bem distintas em torno de 500, 530, 570 e 620 nm, e uma banda não bem definida, próxima a 600 nm. Como nosso objetivo era trabalhar com a região de 620 nm era importante determinar a posição desta pequena banda para termos certeza da sua influência nos ajustes. O que fizemos primeiro foi ajustar três Gaussianas às bandas em menor comprimento de onda. Suas posições resultaram em 496, 529 e 566 nm, como mostra a figura 5.12. O mesmo procedimento foi feito em relação a banda em 620 nm, como mostra a figura 5.13. O centro desta Gaussiana ficou em torno de 619 nm. Tendo definido as quatro bandas que são facilmente percebidas, subtraímos dos dados experimentais cada uma das bandas. Verificamos que o dado resultante pode ser ajustado a uma Gaussiana, como pode ser visto na figura 5.14. A posição desta banda é 598 nm.

Para todos os espectros foram, então, ajustadas 5 Gaussianas posicionadas em 496, 529, 565, 598 e 619 nm com larguras 31, 22, 27, 27 e 18 nm, respectivamente. Para a posição das bandas foi permitida uma variação de 1 nm, e para a largura foi permitida uma variação de 2 nm.

5.1.1.a Análise dos dados segundo o Modelo de Perrin

O modelo de Perrin, para medidas estáticas de supressão de fluorescência de moléculas doadoras e aceitadoras distribuídas aleatoriamente, foi utilizado para interpretar os dados de fotoacústica. Neste modelo a intensidade do sinal fotoacústico, I , está relacionado a concentração de aceitadores na amostra, C , pela expressão (3.2.2.7) onde I_0 é a intensidade do sinal fotoacústico para uma amostra sem aceitadores e r_0 é o raio crítico para a transferência de elétrons. Esta é uma distância crítica doador-aceitador tal que para $r < r_0$ a transferência ocorre, enquanto para $r > r_0$ não ocorre transferência. Utilizando a expressão 3.2.2.7 nos dados obtidos verificamos que o crescimento da intensidade do sinal mostrou-se exponencial, como é mostrado no gráfico semi-log da figura 5.15. A partir das inclinações do ajuste linear aos dados experimentais foram encontrados os valores para r_0 . Quando DDQ foi o aceitador obtivemos 38 Å quando DQ foi aceitador obtivemos 32 Å [3,4]. O valor de r_0 maior para DDQ é explicado por sua maior afinidade eletrônica [5]. Distâncias críticas da mesma ordem foram obtidas para outros sistemas em matriz rígida [5-7].

5.1.1.b Análise dos dados segundo o Modelo do Kaneko

Como visto no cap.3, o modelo do Kaneko [8] obedece a expressão (3.2.1.5). Os valores de $\ln (F/F_0)$ foram graficados em função de $[Q]_t$ como mostra a figura 5.16. Dos ajustes mostrados na fig.5.16 as constantes de equilíbrio (K_1) foram determinadas. Quando DDQ foi o aceitador obtivemos $14,3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, e quando o aceitador foi DQ obtivemos $9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ [9]. Deste valor a distribuição de aceitadores

incorporados na esfera de ação pode ser determinada. Para uma concentração típica de aceitadores de $2,8 \text{ mmol dm}^{-3}$, 70% dos doadores não incorporaram DDQ na esfera de ação, enquanto a proporção de doadores que incorporaram uma molécula de DDQ é de 27%. Quando utilizamos a DQ estes valores passaram a ser de 80% e 20%, respectivamente. Portanto, para uma mesma concentração de aceitador, a porcentagem de esferas de ação que incorporam uma DDQ é maior do que as que incorporam uma DQ, o que é esperado devido a maior afinidade eletrônica da DDQ.

5.1.2 Resultados de Fluorescência

Para verificar se a fotoacústica e a fluorescência são mesmo técnicas complementares, foram feitas medidas de fluorescência com os mesmos filmes que anteriormente foram utilizados na fotoacústica. O espectro de fluorescência para H_2OEP em clorofórmio está mostrado na figura 5.17, observa-se duas bandas distintas em torno de 622 e 680 nm. Ao realizarmos as medidas de fluorescência nos filmes, percebemos que surgiram mais bandas do que obtidas em solução, como pode ser visto na figura 5.18. Percebemos que algum agente estava degradando a amostra. Como tivemos cuidado no preparo da amostra em relação ao oxigênio e à luz ambiente, resolvemos investigar o solvente. Então descobrimos que este tipo de porfirina reage ao cloro e que o clorofórmio contém cloro-livre. Passamos a usar, então, o tolueno como solvente.

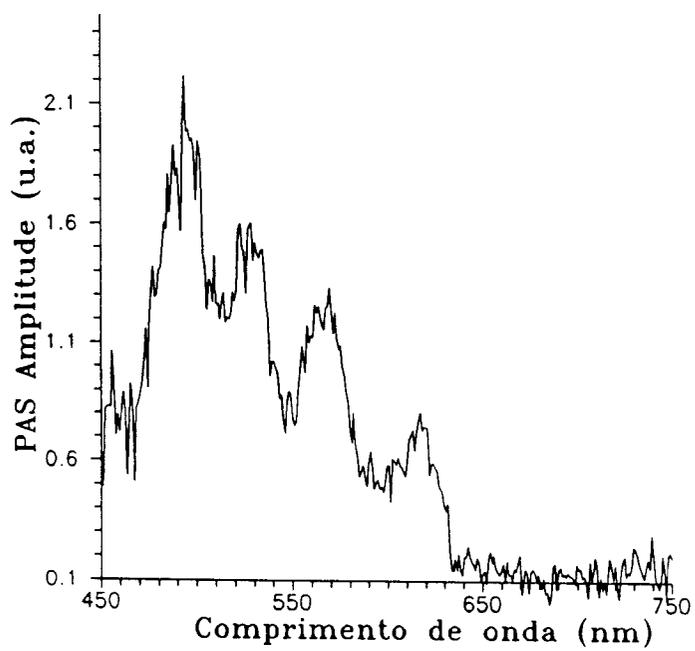


Figura 5.1 Espectro fotoacústico de um filme de porfirina.

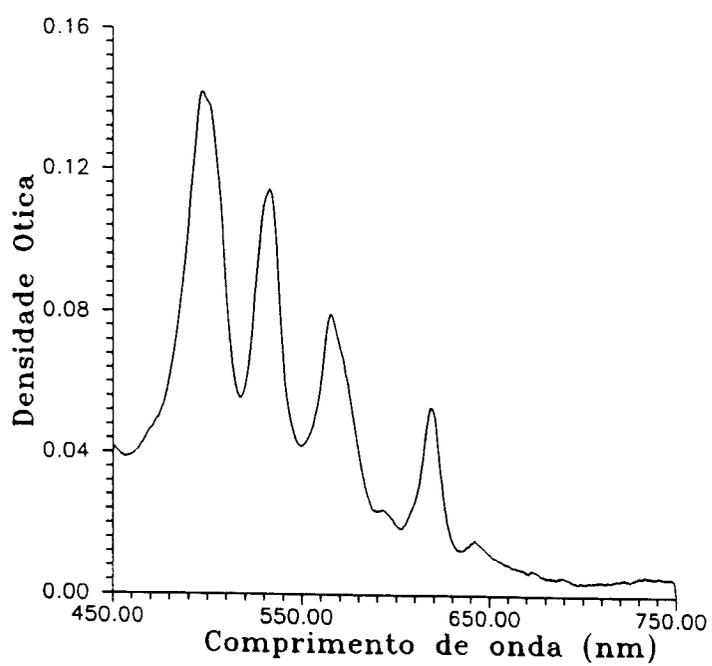


Figura 5.2 Espectro de absorção convencional da porfirina em clorofórmio.

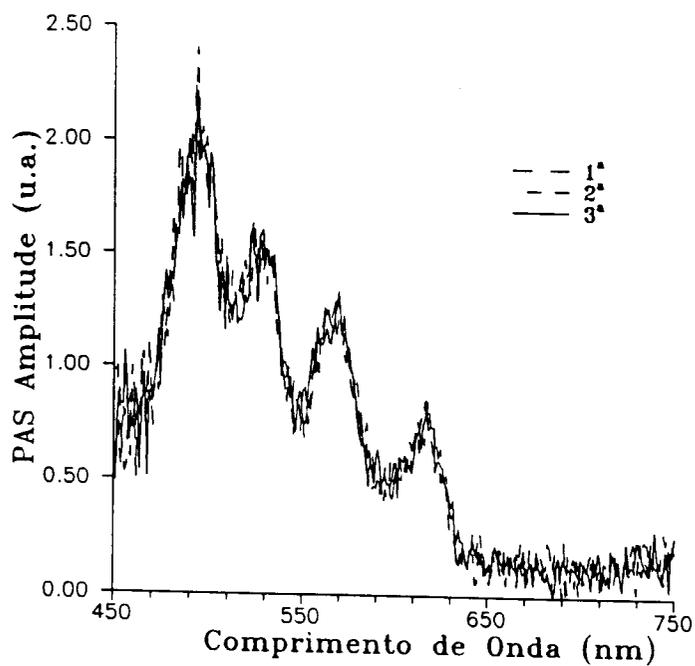


Figura 5.3 Sequência de medidas de fotoacústica de um filme de porfirina, obtidas a 5 Hz. $[P] = 1,4 \times 10^{-4} M$.

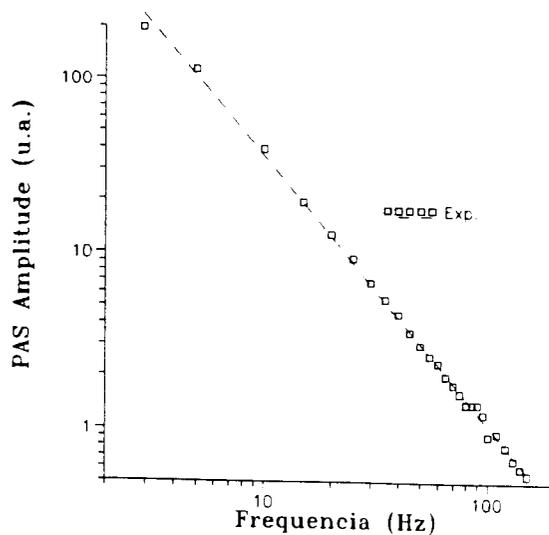


Figura 5.4 Amplitude em 400 nm em função da frequência de modulação, para um filme de H₂OEP.

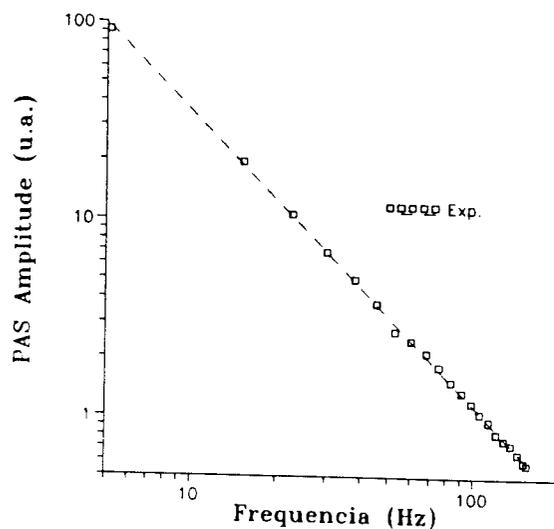


Figura 5.5 Amplitude em 400 nm em função da frequência de modulação para um filme de H₂OEP+DDQ.

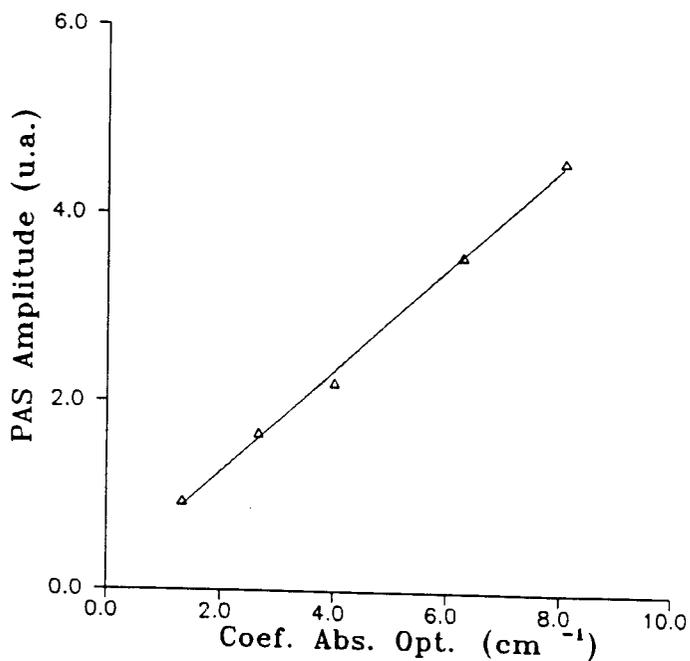


Figura 5.6 Dependência da amplitude com o coeficiente de absorção ótico em 498 nm, a 5 Hz.

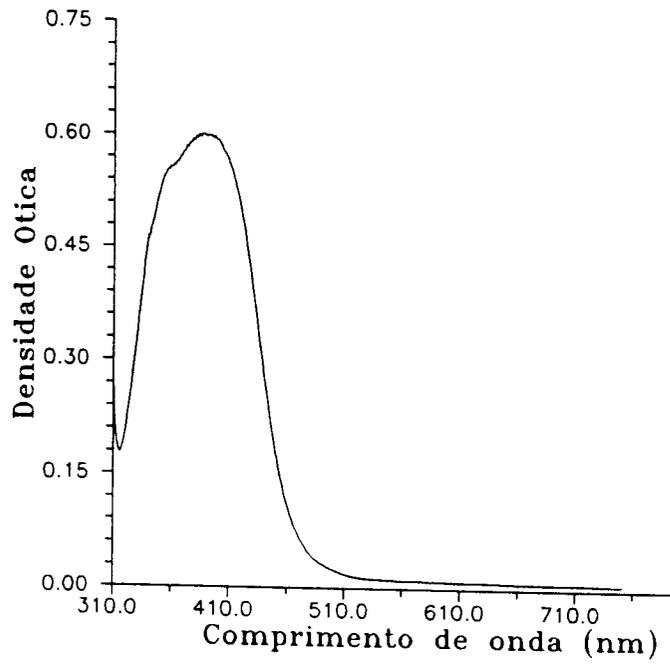


Figura 5.7 Espectro de absorção ótica da molécula de DDQ em clorofórmio.

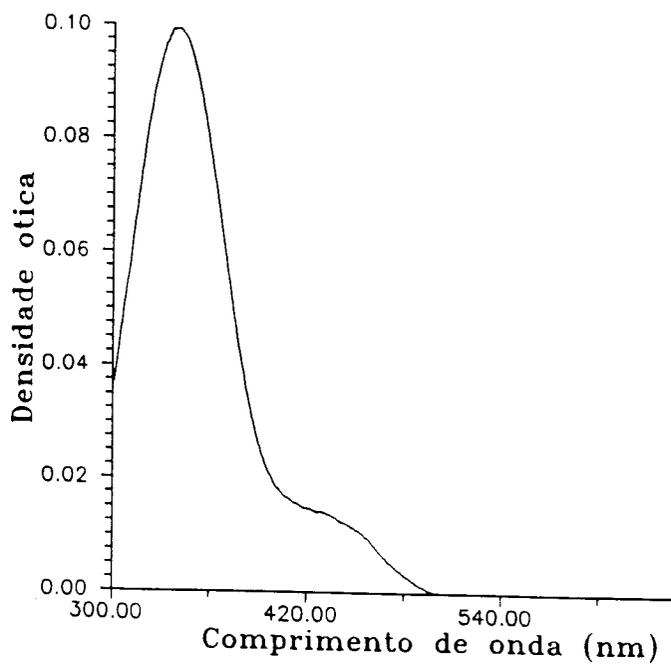


Figura 5.8 Espectro de absorção ótica da molécula DQ em clorofórmio.

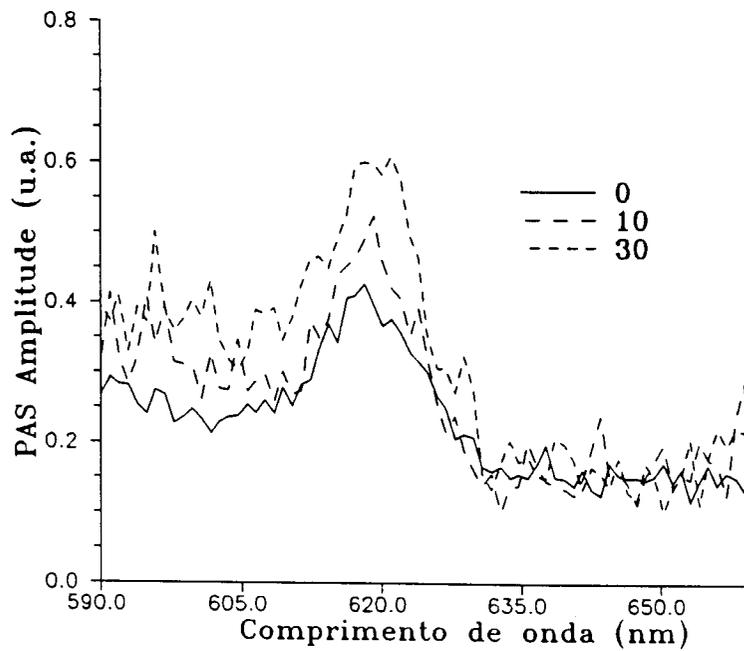


Figura 5.9 Comportamento da amplitude do sinal fotoacústico com a concentração de DDQ na região de 620 nm (freq. de mod. 5 Hz). As concentrações de DDQ foram 0, 10 e 30 vezes maior que a do doador.

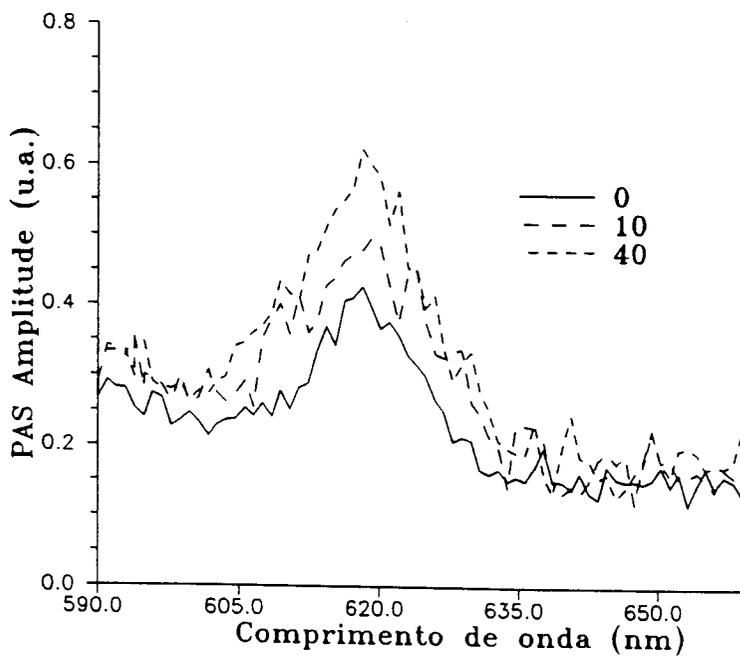


Figura 5.10 Comportamento da amplitude do sinal fotoacústico com a concentração de DQ na região de 620 nm (freq. mod. 5 Hz). As concentrações de DQ nos filmes foram 0, 10 e 40 vezes maior que do doador.

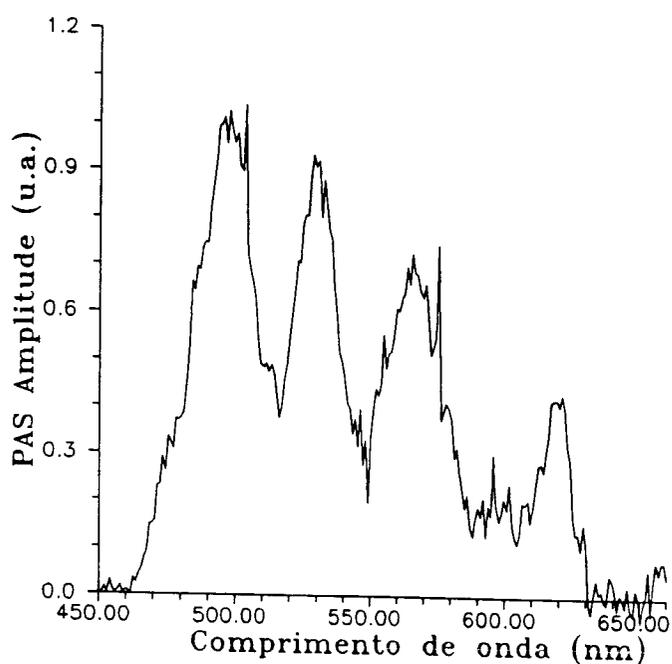


Figura 5.11 Espectro fotoacústico do filme de porfirina $[P]=1,4 \times 10^{-4} M$ e DDQ 30 vezes mais concentrada (freq. mod. 5 Hz).

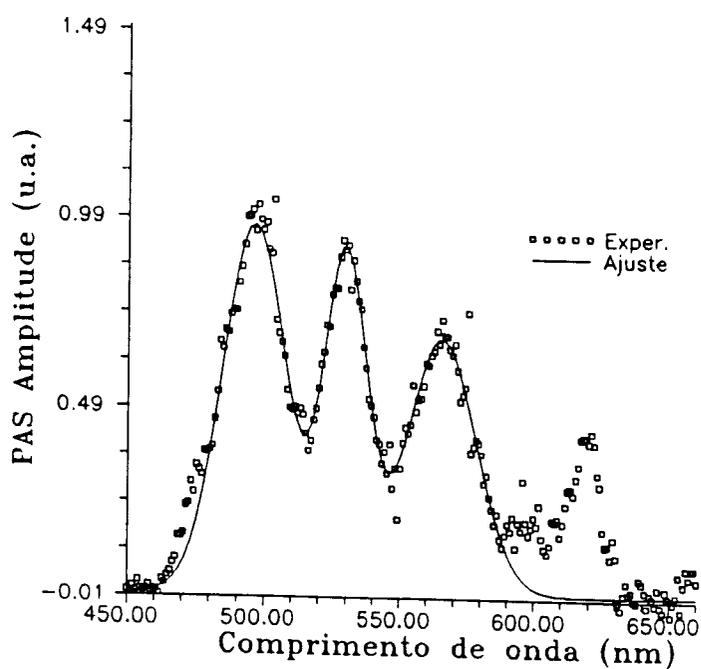


Figura 5.12 Ajuste de três Gaussianas referente as bandas em 496, 529 e 566 nm. Espectro obtido para o filme com uma concentração de DDQ 30 vezes maior que a de porfirina.

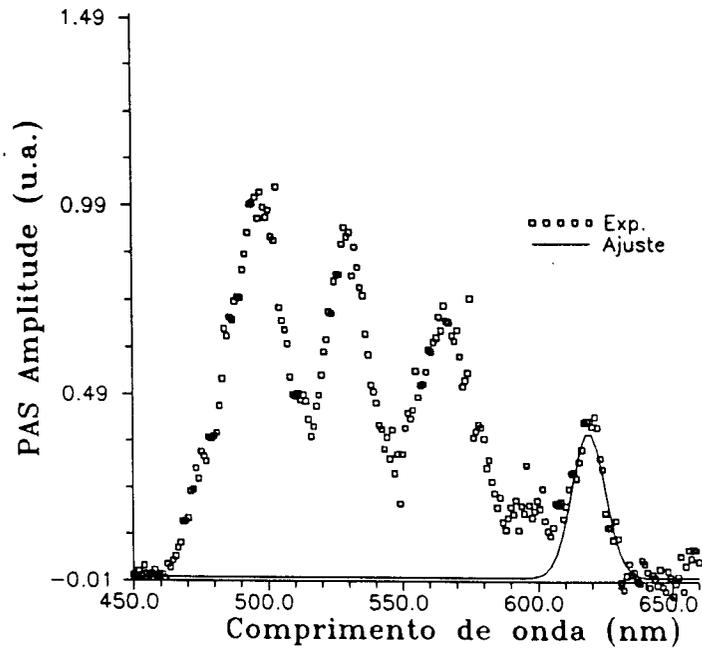


Figura 5.13 Ajuste de uma curva Gaussiana na região de 620 nm, da mesma amostra anterior.

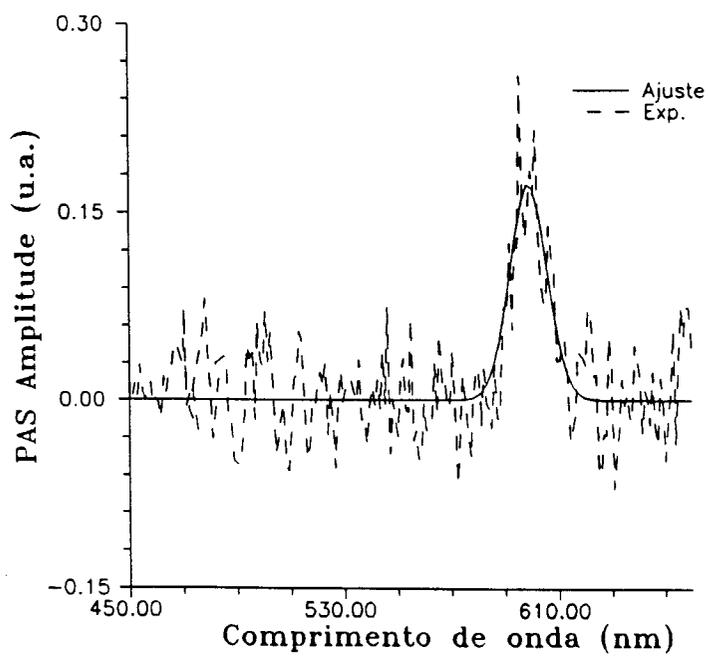


Figura 5.14 Ajuste de uma curva Gaussiana no espectro subtraído, determinando a existência da banda em 598 nm.

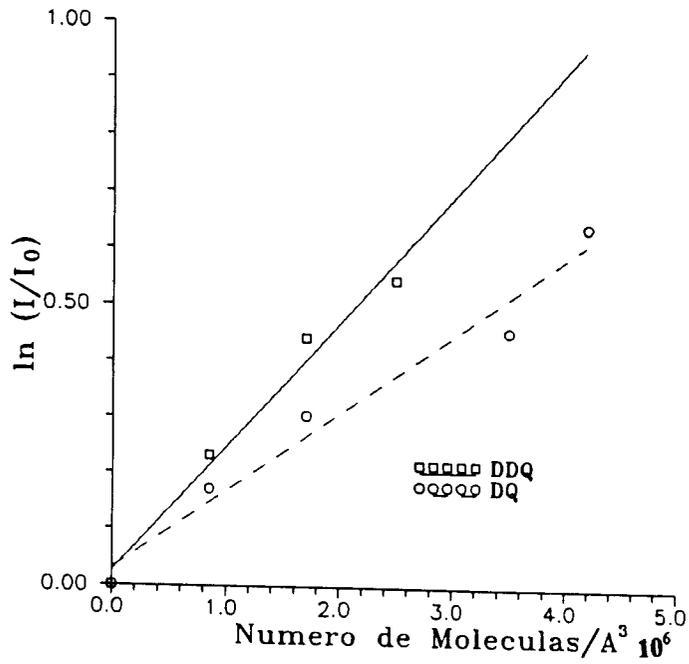


Figura 5.15 Intensidade relativa em 619 nm, $\ln(I/I_0)$, como função da concentração de aceitadores. As linhas são ajustes de mínimos quadrados aos dados experimentais.

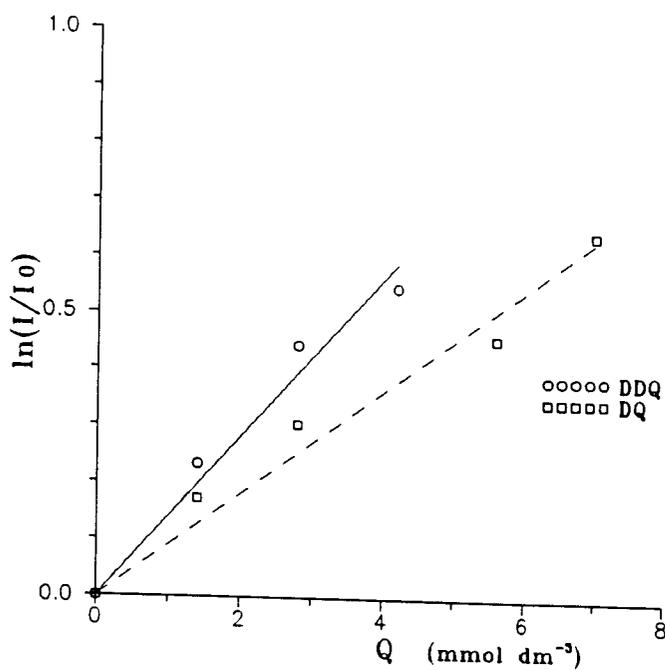


Figura 5.16 Gráfico de $\ln(I/I_0)$ em função de $[Q]_t$ para as medidas de fotoacústica obtidas em 620 nm.

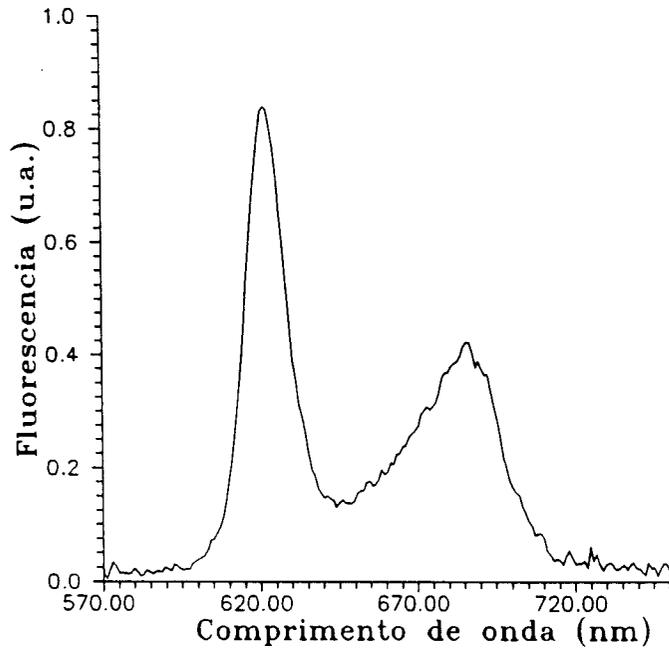


Figura 5.17 Espectro de fluorescência para a molécula de porfirina em clorofórmio.

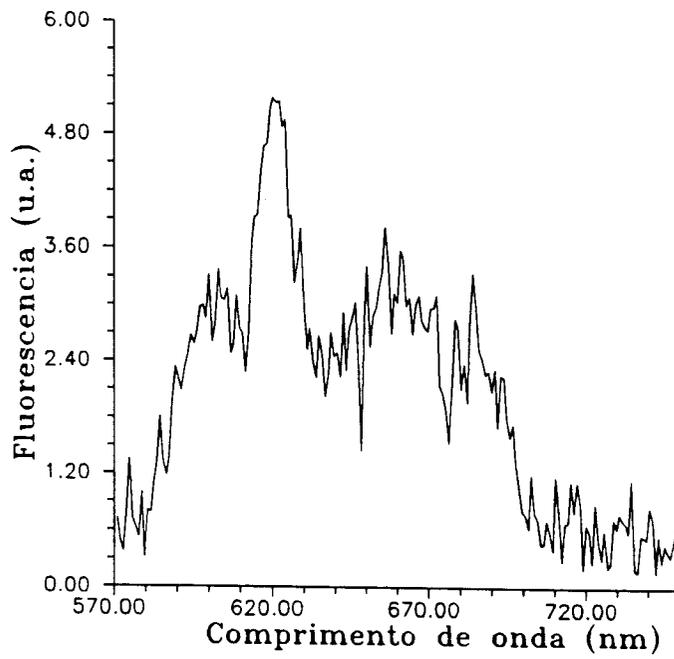


Figura 5.18 Espectros de fluorescência para o filme de H₂OEP preparado com clorofórmio.

5.2 Resultados de Amostras Preparadas com Tolueno

Foi feito um novo conjunto de filmes usando o tolueno como solvente, para os quais foram feitas medidas de fotoacústica e fluorescência.

Utilizamos novamente o modelo de Perrin para estes dados. A idéia era confirmar a validade deste procedimento, comparando o valor do raio crítico para a transferência de elétrons, obtido pelas duas técnicas.

5.2.1 Resultados da Amplitude do Sinal Fotoacústico

Os novos resultados obtidos para fotoacústica ainda mostraram o aumento da intensidade da banda em torno de 620 nm com o aumento da concentração de duroquinona, como mostra a figura 5.19. O ajuste de Gaussianas para os novos dados foram feitos de maneira diferente. Consideramos melhor ajustar apenas as duas bandas de menor energia, pois as duas de maior energia são bandas bem definidas e não influenciavam a banda na região de 620 nm. A figura 5.20 mostra os dados experimentais para o filme de H₂OEP com a concentração de DQ 45 vezes maior que a de porfirina, e o ajuste de duas Gaussianas para as bandas em torno de 570 e 620 nm. Não foi necessário colocar uma Gaussiana em torno de 600 nm, como nas amostras em clorofórmio. Os resultados obtidos foram em 568 e 619 nm com larguras 32 e 24 nm, respectivamente. Para os dados obtidos com os outros filmes a posição e a largura dessas bandas foram mantidas fixas. Permitindo-se uma variação de 1 nm para a posição e de 2 nm para a largura. A intensidade da banda em 619 nm foi então analisada usando o modelo de Perrin. A figura 5.21 mostra o gráfico em escala logaritmica da intensidade

relativa em função da concentração de duroquinona. A partir da inclinação da reta ajustada aos dados foi encontrado o valor para r_0 , sendo este 34 Å [10]. O erro estimado para este valor é de 1 Å. Isto indicou que, apesar do espectro de fluorescência da H₂OEP em clorofórmio ter mostrado bandas a mais que o normal, esta mudança não afetou os resultados sendo, portanto, similares.

5.2.2 Resultados de fluorescência

A figura 5.22 mostra o espectro de fluorescência de um filme de H₂OEP na região de 570 a 750 nm. Observa-se que as bandas extras que aparecem no filme feito com clorofórmio desaparecem e o espectro é bem parecido com o da porfirina em solução.

Tendo confirmado a boa condição do filme passamos a preparar outros com a presença da duroquinona. A figura 5.23 mostra os espectros de fluorescência para amostras com diferentes concentrações de duroquinona. Observa-se que com o aumento da concentração de duroquinona há uma diminuição da intensidade das bandas. Isto é esperado pois ocorre a transferência de elétrons da porfirina para a quinona, havendo com isto a supressão da fluorescência. A figura 5.24 mostra as Gaussianas que foram ajustadas aos espectros de fluorescência na região de 620 nm. A posição da banda ficou em 622 nm, com uma variação de 0,1 nm, para todos os espectros e a largura ficou em $20,8 \pm 0,2$ nm.

Os dados foram analisados segundo o modelo de Perrin, dado pela expressão:

$$\ln\left(\frac{F_0}{F}\right) = \frac{4}{3} \pi C I_0^3$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência de filmes sem e com

aceitadores, respectivamente, C a concentração de aceitadores em número de moléculas por angstrom cúbico e r_0 o raio crítico para a transferência de elétrons. Na figura 5.25 a intensidade relativa de fluorescência F_0/F , está graficada em função da concentração de duroquinona. A partir da inclinação da reta ajustada aos dados experimentais determinamos o valor do r_0 . Na obtenção deste valor o filme cuja concentração de aceitadores era 100 vezes a do doador não foi utilizado, a intensidade obtida estava fora do ajuste de uma reta, isto provavelmente por causa da concentração elevada que produz interação entre aceitadores. O valor obtido foi 34 Å. Este valor é o mesmo que foi determinado por meio dos dados de fotoacústica fazendo-se uso do mesmo modelo. Tal resultado mostra que como prevíamos, há uma equivalência entre as técnicas.

Os dados obtidos, juntamente com os modelos aplicados a estes confirmaram a ocorrência do processo de transferência de elétrons fotoinduzido, e a possibilidade da utilização da espectroscopia fotoacústica monitorar este processo.

5.2.3 Resultados da Fase do Sinal Fotoacústico

Os dados apresentados até o momento foram relacionados a amplitude do sinal fotoacústico e a intensidade de fluorescência. Vejamos agora como a fase do sinal varia com a concentração de quinona nos filmes. A fase pode ser entendida como a diferença que há entre o instante em que um trem de onda ótico incide sobre a amostra e quando um trem de onda acústico é detectado pelo microfone [11].

Foram utilizados os filmes obtidos usando clorofórmio como solvente, pois para estes tínhamos dados para DQ e DDQ.

A figura 5.26 mostra o comportamento da fase medida em 620 nm em função da concentração de aceitadores. Vê-se que a presença dos aceitadores induziu um deslocamento na fase para valores negativos

menores. Isto implica que o sinal detetado pelo microfone estava menos atrasado em relação ao sinal de excitação (a fase de referência do lock-in foi mantida a zero grau). Ou seja, a presença dos aceitadores fez com que a geração do calor fosse mais rápida. A presença de aceitadores possibilitou a transferência de elétrons e este é um caminho para o decaimento não-radiativo que compete com a fluorescência. Mas como o aumento da concentração de aceitadores indica que menos tempo de vida tem o estado excitado do doador isto implica também que menos tempo foi necessário para produzir o calor, refletindo portanto na diminuição do valor do ângulo de fase. Observa-se que não ocorreu apenas o deslocamento na fase, mas que estes deslocamentos foram diferentes dependendo da quinona utilizada. Tomemos como exemplo o valor da fase na concentração $2,8 \times 10^{-3}$ M, os ângulos obtidos foram -137° e -166° para DDQ e DQ, respectivamente [12]. Deduzimos que DDQ tem uma maior facilidade em capturar elétrons do que a DQ, como já havia sido verificado com o cálculo do raio crítico.

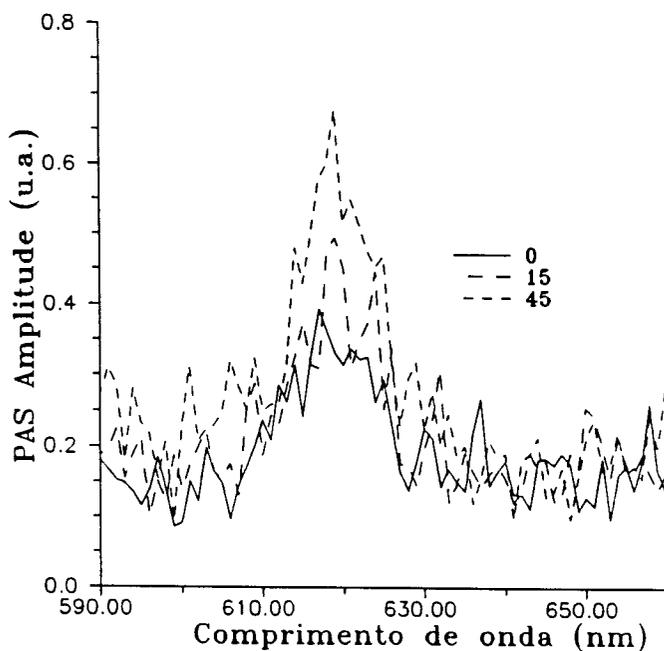


Figura 5.19 Espectros de filmes de H₂OEP com diferentes concentrações de duroquinona.

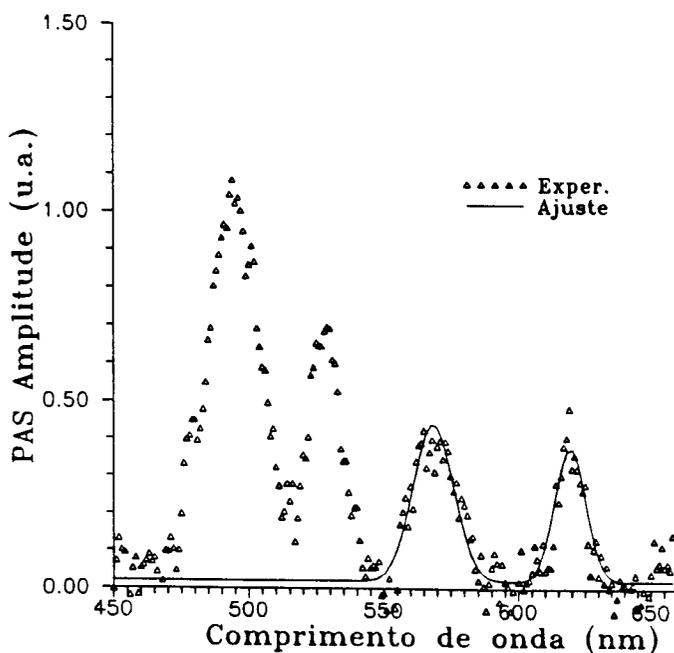


Figura 5.20 Ajuste de duas Gaussianas referente as bandas em 570 e 620 nm. Espectro obtido para o filme com uma concentração de DQ 45 vezes maior do que a de porfirina.

UFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

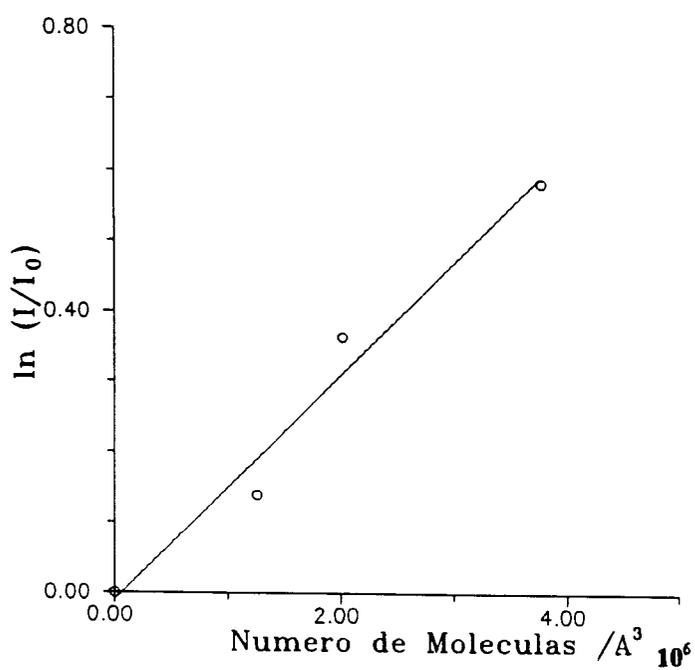


Figura 5.21 Intensidade relativa em 619 nm, $\ln(I/I_0)$, como função da concentração de aceitadores. A linha representa o ajuste por mínimos quadrados aos dados experimentais.

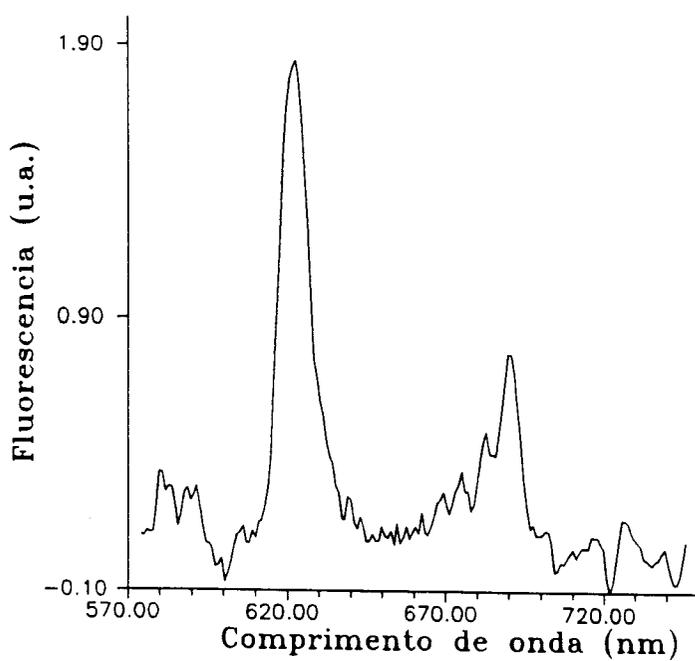


Figura 5.22 Espectros de fluorescência para o filme de H₂OEP na região de 570 a 750 nm.

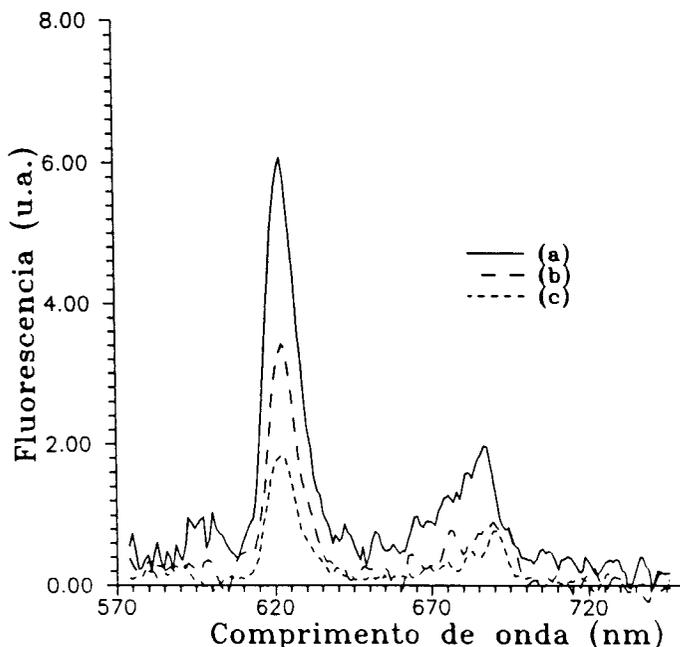


Figura 5.23 Espectros de fluorescência para filmes de H₂OEP em varias concentrações de DQ (a) zero; (b) 30 e (c) 100 vezes maior que a concentração de porfirina.

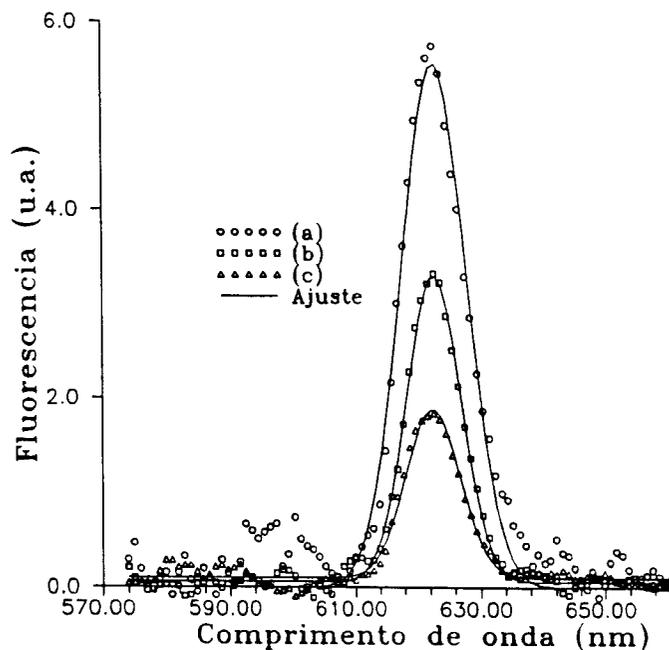


Figura 5.24 Espectros de fluorescência para filmes de H₂OEP(1,4x10⁻⁴M) na presença de aceitadores nas concentrações (a) zero; (b) 30 e (c) 100 vezes a concentração do doador.

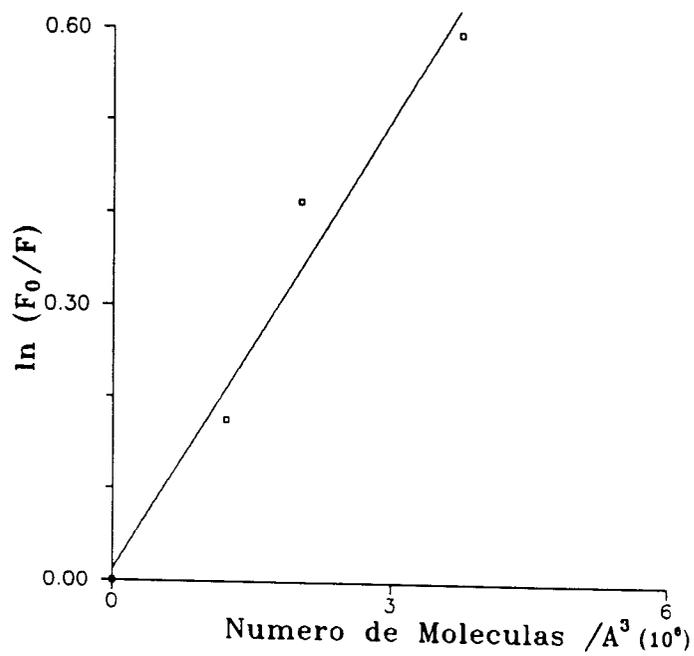


Figura 5.25 Intensidade da fluorescência em 622 nm, $\ln(F_0/F)$, como função da concentração de aceitadores.

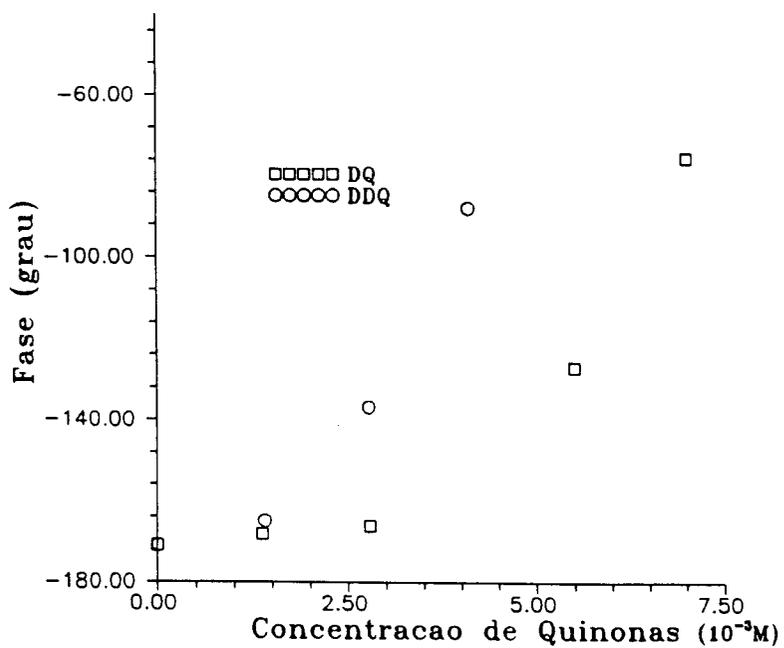


Figura 5.26 Dependência do ângulo de fase com a concentração de quinonas em 620 nm a 5 Hz.

REFERÊNCIAS

1. Rosencwaig, A., (1975) *J. Appl. Phys.*, **74**, 64.
2. Gong, L. C.; Dolphin, D. (1985) *Can. J. Chem.* **63**, 410.
3. Cornélio M. L. e Sanches, R. (1993) "Photoinduced Charge Transfer Process by Photoacoustic Technique" 11th International Biophysics Congress, July 25-30, 1993 Budapest, Hungary.
4. M. L. Cornélio e Sanches, R. (1994) "The use of photoacoustic spectroscopy to determine the critical distance for electron transfer" submetido: *J. Biochem. Biophys. Methods*.
5. Beitz, J. V.; Miller, J. R. (1979) *J. Chem. Phys.* **71**, 4579.
6. Miller, J. R.; Beitz, J. V. (1981) *J. Chem. Phys.* **74**, 6746.
7. Miller, J. R., Hartman, K. W. e Abrash, S. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4296.
8. Kaneko, M; Tsuchido, E.; Imai, Y. (1991) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **87** (1), 83.
9. Sanches, R. e Cornélio, M. L. (1993) "Photoinduced Electron Transfer in Porphyrin-Quinone Systems" II Congresso Iberoamericano de Biofísica 3-7 de Outubro, 1993 Puebla, México.
10. Cornélio, M. L. e Sanches, R. "Monitoring Electron Transfer process by Photoacoustic Spectroscopy" 8th International Topical Meeting in Photothermal Technique" Jan 23-25, 1994, Guadalupe, France.
11. Mandelis, A., Teng, Y. C. e Royce, B. C. H. (1979) *J. Appl. Phys.* **50**, 7138.
12. Cornélio, M. L. "Investigation of Non-radiative Decay of Donor-Acceptor Molecules in a rigid medium by Photoacoustic Spectroscopy" IV Encuentro Latinoamericano /I Iberoamericano de Fotoquímica y Fotobiología. 12-15 Abril 1994, Valparaíso, Chile.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

Nesta tese foram estudados os efeitos provocados pela presença de moléculas aceitadoras junto a moléculas doadoras de elétrons, utilizando para isso a espectroscopia fotoacústica e de fluorescência.

O equipamento montado para as duas técnicas mostrou ter uma boa reprodutibilidade.

De acordo com o modelo teórico desenvolvido para o efeito fotoacústico por Rosencwaig-Gersho, a amostra utilizada foi classificada como sendo ópticamente transparente e termicamente espessa. Isto implica que dentro da câmara fotoacústica apenas a amostra foi responsável pelo sinal fotoacústico.

Na preparação dos filmes a concentração de moléculas doadoras foi mantida constante e a de moléculas aceitadoras foi variada. O sistema em estudo possuía uma baixa concentração de doadores ($10^{-4}M$), a concentração de aceitadores foi de 10 a 50 vezes maior que a de doadores e a distância entre doador-aceitador foi mantida fixa por meio da matriz de polímero. Tais condições satisfazem as exigências para a aplicação do modelo de Perrin. Numa análise cuidadosa, observou-se que o sinal devido ao doador o sinal aumentava exponencialmente com a concentração de aceitadores, portanto, como previa o modelo de Perrin. Os resultados obtidos para o raio crítico para a ocorrência de transferência de elétrons, foi de 38 Å quando DDQ foi o aceitador e 32 Å quando DQ foi utilizada, com um erro estimado de 1 Å. Estes dados podem ser explicados considerando que o *driving force* da DDQ é maior que o da DQ facilitando a transferência, e isto era esperado pois

a DDQ possui afinidade eletrônica maior que a DQ.

Os dados de fluorescência foram obtidos com o intuito de demonstrar que os modelos utilizados na análise da supressão da fluorescência, também podiam ser utilizados para os dados de fotoacústica. Utilizando o modelo de Perrin e tratando os dados obtidos para a DQ, chegamos aos seguintes valores para o raio crítico. Para os dados de fotoacústica foi 34 Å e para fluorescência 34 Å, com um erro estimado de 1 Å.

Estes valores demonstram que os dados obtidos em fotoacústica e fluorescência são iguais e concluimos que estas técnicas são complementares e que a espectroscopia fotoacústica desta forma torna-se uma ferramenta confiável neste tipo de estudo. Comparando estes resultados com os obtidos nas amostras preparadas com clorofórmio vemos que os valores estão dentro do erro estimado. Isto nos diz que apesar dos resultados de fluorescência para amostras preparadas em clorofórmio terem apresentado um espectro alterado, os resultados de fotoacústica ainda são confiáveis. Um outro modelo utilizado na supressão estática de fluorescência (modelo do Kaneko) foi aplicado aos dados de fotoacústica. Deste modelo obtivemos a distribuição de moléculas aceitadoras incorporadas pela molécula de doador. Numa concentração típica de aceitadores de $2,8 \text{ mmol dm}^{-3}$, quando DDQ foi utilizado 27% das moléculas aceitadoras foram incorporadas contra 20% quando a DQ foi utilizada. Este resultado é esperado tendo em vista que a DDQ possui maior afinidade eletrônica do que a DQ. A técnica de fluorescência tem sido bastante aplicada nestes sistemas, verifica-se, no entanto, que a espectroscopia fotoacústica não tem sido pouco explorada, demonstrado por nenhuma publicação nesta linha de pesquisa nos anos recentes. Este trabalho torna-se portanto pioneiro no monitoramento da transferência de elétrons por espectroscopia fotoacústica.

PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

Por meio do trabalho desenvolvido sentimos que a espectroscopia fotoacústica ainda reserva muito a ser explorado, seja na configuração de novas câmaras para estudos de calorimetria, como na sua utilização no estudo de outros processos fotofísicos.

Dando continuidade nesta área sugerimos a seguir alguns trabalhos a serem desenvolvidos.

● Podemos iniciar sugerindo mudanças nos tipos de moléculas empregadas. Outros doadores podem ser investigados como também aceitadores, tomando o devido cuidado na sua escolha pois além do processo de transferência de elétrons há a possibilidade de ocorrer transferência de energia. Neste caso deve-se observar se a banda de emissão do doador superponhe a banda de absorção do aceitador, o que caracteriza uma transferência de energia. O meio, no caso o polímero, também pode ser investigado. Considerando que no centro de reação a proteína tem um papel importante na transferência de elétrons, a troca do polímero pode trazer resultados interessantes sobre este papel.

● A disposição das moléculas pode ser modificada preparando-se filmes ordenados. Como uma delas tem a propriedade de doar e a outra de aceitar elétrons obtém-se uma transferência direcionada. Este tipo de amostra poderia operar, então, como um fotodíodo. A área de montagem deste tipo de dispositivo conhecida como eletrônica molecular, tem tido um desenvolvimento fantástico e aí, o processo de transferência de elétrons parece ser bastante interessante.

● Filmes ordenados podem ser preparados de várias maneiras, seja por deposição, superposição ou usando a técnica de Langmuir-Blodgett. Já se encontra na literatura [1-2] trabalhos que investigaram a transferência de elétrons, utilizando a espectroscopia de fluorescência em filmes de Langmuir-Blodgett.

● Filmes finos, em geral, produzem franjas de interferência o que impossibilita o uso da espectroscopia de absorção. Podemos muito bem utilizar a espectroscopia fotoacústica [3] para caracterizá-los ótica e térmicamente.

● O estudo da fase do sinal fotoacústico pode revelar dados interessantes que de algum modo estão relacionados a taxa de transferência de elétrons. É do nosso interesse buscar uma relação que demonstre como a fase inclui a taxa de transferência de elétrons. Se isto for possível, teremos em mãos um técnica menos dispendiosa e que produz resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS

1. Ahuja, R. C. e Möbius, D. (1989) Thin Solid Films, **179**, 457.
2. Kondo, T., Yamada, H., Nishiyama, K., Suga, K. e Fujihira, M., (1989) Thin Solid Films, **179**, 463.
3. Amato, G., Benedetto, G. e Spagnolo, R., (1990) Materials Letters, **9(4)**, 173.

