

História da luminescência

Benito del Castillo García*

Resumo

O presente artigo discorre sobre os processos de fotoluminescência molecular (fluorescência e fosforescência) na análise farmacêutica, no contexto da evolução da química e da análise instrumental, de forma que possamos ver a trajetória seguida por esse conjunto de técnicas espectroscópicas.

Palavras-chave

Fotoluminescência molecular; Fluorescência; Fosforescência; Espectroscopia

History of luminescence

The present article discusses the processes of molecular photoluminescence (fluorescence and phosphorescence) in pharmaceutical analysis within the context of the advancement of chemistry and instrumental analysis to illustrate the trajectory of that set of spectroscopic techniques.

Keywords

Molecular photoluminescence; Fluorescence; Phosphorescence; Spectroscopy

* Decano e catedrático de Técnicas Instrumentais, Faculdade de Farmácia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madri (Espanha), bdc@farm.ucm.es

Os processos de fotoluminescência molecular consistem, fundamentalmente, da emissão de radiações eletromagnéticas por moléculas eletronicamente excitadas. A existência de moléculas em estado excitado implica na absorção prévia de energia ou na geração dessas moléculas durante uma reação química; nesse caso, o processo é denominado “quimioluminescência”. Quando as reações quimioluminescentes acontecem nos seres vivos, adota-se o termo “bioluminescência”. No restante dos processos luminescentes, é óbvio que também é requerida uma absorção de energia antes da emissão. Sua classificação e denominação dependem da natureza da fonte de energia excitadora: “fotoluminescência” refere-se às radiações eletromagnéticas, geralmente ultravioletas ou visíveis; “radioluminescência”, às radiações mais energéticas e, portanto, de longitude de onda muito curta, por exemplo, os raios X; “triboluminescência”, às radiações que acontecem depois da aplicação de energia mecânica, fricção ou pulverização; “eletroluminescência”, no caso de energia associada a campos elétricos ou magnéticos; “sonoluminescência”, quando a excitação deve-se a ondas sonoras; “catodoluminescência”, à emissão depois do bombardeio com elétrons acelerados; “termoluminescência”, por ação da energia calorífica, etc.

Tentarei concentrar a atenção sobre os processos de fotoluminescência molecular (fluorescência e fosforescência) na análise farmacêutica, no contexto da evolução da *Química* e da *Análise Instrumental*, de forma que possamos ver a trajetória seguida por esse conjunto de técnicas espectroscópicas.

Não posso imaginar qual o tipo de energia excitadora utilizado para explicar as poéticas palavras iniciais do Gênesis: “Então, disse Deus, ‘Haja luz’, e houve luz”.

Gostaria de começar por algumas reflexões, de uma perspectiva histórica, acerca dos fenômenos luminescentes que deram origem a um conjunto poderoso e elegante de técnicas instrumentais, como as espectrofotometrias de fluorescência molecular e de fosforescência.

Sem dúvida, na mais remota antiguidade, devem ter chamado a atenção do homem a luz dos relâmpagos, as auroras boreais e a existência de seres vivos que, sob determinadas circunstâncias, emitiam luz, como os vaga-lumes ou os infusórios de algumas regiões marinhas, sem esquecer certas algas e fungos que hoje sabemos que produzem luminescência. Certamente, foram observados alguns fenômenos atualmente interpretados como bioluminescentes.

Quando Aristóteles, em sua *História dos Animais*, fala de “lampiridas”, provavelmente referia-se aos coleópteros cantaroideos. Seu discípulo Teofrasto, no *Tratado das Pedras*, menciona um carbúnculo luminoso que, exposto à luz solar, brilha profusamente.

Após alguns séculos, Plínio, “o Velho”, escrevia – mais poética do que cientificamente – que as pedras preciosas tinham roubado aos astros sua luz e que certos minerais tinham em seu interior uma chama “visível” na escuridão da noite. Esse autor também descreve insetos capazes de emitirem luz e que possuem um líquido que conserva essa característica mesmo depois de extraído do animal. O poeta

Aeliano, ao descrever as joias das mulheres de Tarento, também oferece sua “brilhante” opinião acerca desse tipo de fenômenos.

Houve muitas lendas e fábulas acerca de joias maravilhosas no Oriente Médio e Extremo, que chegaram até a Europa medieval. Os fenômenos fosforescentes nas pedras preciosas foram, nesse momento, talvez melhor interpretados, porém sempre com uma visão muito literária. Provavelmente, foi Cellini o observador mais agudo e surpreso da fosforescência de certas gemas de uma joalheria de Ragusa. Certamente, deve sempre ser colocada a questão de se esses observadores “pré-científicos” interpretavam de alguma maneira os fenômenos luminescentes ou se só deixavam-se levar por sua imaginação. O que está claro é que, mesmo antes da Idade Média, tinham sido descritas algumas propriedades fotoluminescentes de diversos minerais. Contudo, a observação desses fenômenos exigia certos artefatos: a fluorescência, no sentido científico atual, não pode ser conhecida enquanto tal.

Atualmente, é fácil afirmar que alguns tipos de diamantes e a fluorita são luminescentes, especialmente a variedade denominada clorofana, que mostra uma emissão verde depois de ser exposta à luz ultravioleta. Deve-se lembrar **de que**, até relativamente poucos anos atrás, não se dispunha de fontes artificiais adequadas de luz capazes de excitarem as amostras que, após, emitirão fosforescência. Na antiguidade, para se observar esses fenômenos, os cristais deviam ser imediatamente introduzidos na escuridão depois de terem sido expostos à luz solar.

Provavelmente, os fenômenos luminescentes mais fáceis de observar nos minerais, antigamente, foram os de triboluminescência de alguns tipos de diamante, calcita e fluorita. Para isso, tinham de ser esmagados ou comprimidos ou, no mínimo, sua superfície devia ser drasticamente friccionada. A observação da termoluminescência do diamante e da fluorita era mais difícil séculos atrás.

Na atualidade, está perfeitamente estudada a emissão luminescente de mais de 500 minerais. Não só devemos prestar atenção às pedras preciosas, como diamantes, rubis, safiras ou granates (tão imersos na matéria farmacêutica mineral de poucos séculos atrás), mas também aos minerais mais vulgares, como a pesada baritina ou nossa ímpar aragonita.

A história da descoberta da fosforescência deve ser procurada em 1603, com Vincenzo Casciarola, sapateiro de Bolonha e alquimista aficionado. Em seu tempo livre, coletava algumas “pedras pesadas” – baratina, sem dúvida – nos arredores de sua cidade. Em casa, esquentava-as no fogão, procurando obter ouro ou prata, no mínimo. Grande foi sua desilusão, mas pôde perceber a capacidade da “petra luminífera” ou “petra de Bolonha” (provavelmente, sulfato bórico, com traços de bismuto ou manganês, o qual, calcinado na presença de carvão como redutor, produz monossulfeto de bário) para emitir uma luz avermelhada durante um tempo considerável. Foi também chamada de “lúcifer”, “esponja luminosa”, etc. Todos esses nomes são muito pitorescos e próprios da alquimia.

Essa emissão de luz chamou a atenção dos cientistas. Galileu ficou tão fascinado por esses fatos, que fez uma demonstração na Academia dei Lincei e enviou amostras desses minerais para vários centros europeus prestigiosos. Lagalla, em 1612, descreve em seu livro de filosofia, *De phenomenis in orbe lunae*, as emissões luminosas do “lapis solares”. Anos mais tarde, em 1640, Liceti publica uma monografia completa acerca dos fenômenos observados em minerais – “lithephosphorus” – capazes de emitirem luz. O duque Leopoldo de Toscana também fornece uma bela descrição do fenômeno, indicando que a luz é concebida no mineral e devolve-a, depois de certo tempo, como se fosse um parto.

Na metade do século XVII, foi chamado de “phosphor” (no grego, portador de luz). Peter Poterius, em 1625, construiu figuras de animais com materiais fosforescentes só porque era agradável olhar para eles à noite. Não devemos rir dessas pessoas, pois estavam observando pela primeira vez um fenômeno tão curioso quanto esse ou, com mentalidade romântica, supunham que a lua devolvia à noite, a luz emprestada a ela pelo sol durante o dia. Tiveram que passar dois séculos e meio para que se explicasse cientificamente o fenômeno da fosforescência.

Um fenômeno tão belo quanto inusual não podia deixar de despertar a atenção tanto dos leigos quanto dos cientistas da época, muitos deles de grande prestígio. Por isso não é estranho que alguns físicos, como Grimaldi, Boyle e Newton, dedicassem algum tempo ao estudo da luminescência de soluções e meios fluídos em geral, no intuito de compreenderem esses fenômenos, embora nem sempre interpretassem o processo como reflexão ou transmissão da luz. Ainda não estavam cientes da absorção e posterior emissão.

Em 1663, Robert Boyle descreveu “de adamantis tenebris lucente”, o diamante, que depois de ser friccionado e esquentado, emite luz na escuridão. A descoberta do elemento fósforo (P) parece também ter certo ar alquímico. Brandt, procurando pela “pedra filosofal”, obteve-o a partir da urina. Em 1769, Scheele e Gahn puderam obtê-lo em maiores quantidades. Contudo, esse fósforo é bioluminescente porque emite luz ao ser oxidado ao ar (lembramos os fogos fátuos). Uns anos depois, em 1793, Homberg descreve pela primeira vez como o cloreto cálcico é capaz de emitir luz ao receber energia mecânica (triboluminescência).

Os estudos luminescentes de Biot e Becquerel, em 1839, permitiram completar os de Canton no século anterior. Edward Becquerel foi, sem dúvida, quem realmente fez o primeiro estudo científico da fosforescência, determinando a longitude de onda das radiações excitadora e emitida, o tempo de duração da emissão e a influência da temperatura. Estudou a luminescência de sais de urânio, fluorita, calcita, rubi, diamante, etc. O primeiro equipamento instrumental para determinar a duração da emissão fosforescente, depois de se suprimir a excitação, foi o fosforoscópio, desenhado em 1859 por Becquerel, ao estudar a fosforescência de compostos de urânio. Em 1861, estabeleceu a lei exponencial que rege a queda da intensidade da emissão fosforescente. Esses estudos permitiram a Verneuil e Lenard, no final do século XIX, estabelecer os “minerais

fósforo”, entre eles, certos óxidos, carbonatos, sulfetos e selenietos, que devem sua luminescência à presença de traços de manganês, cobre ou prata. Seus contemporâneos, Crooks e Goldstein, foram os pioneiros nos estudos acerca da luminescência produzida pelos raios catódicos.

A interpretação, mais ou menos científica, dos fenômenos luminescentes mencionados foi relativamente fácil, quando comparada com a da fluorescência, pois essa emissão é quase instantânea (10^{-7} - 10^{-9} s), praticamente cessando ao se suprimir a radiação excitadora. É fácil compreender as dificuldades instrumentais para se dispor de meios capazes de distinguir, independentemente, a longitude de onda da radiação excitadora da emitida pela fluorescência e, também, o tempo de vida da fluorescência.

Segundo nosso contemporâneo, o professor George G. Guibault, da Universidade de Louisiana, um dos grandes peritos nas técnicas de luminescência, pode-se afirmar que isso não foi um obstáculo para que a fluorescência fosse observada antes que a fosforescência, pelo botânico sevilhano Nicolás Monardes em 1574, ao descrever o “lignum nephriticum” em sua *Primera y Segunda y Tercera partes de la historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirvoen en Medicina*. Tinha percebido a luz que era emitida quando era interposto em água.

O lenho nefrítico procede da leguminosa *Pithecolobium unguis-cati*, ou *Guindalina moringa*. O qualificativo “nefrítico” refere-se a seu uso, no México, para dissolver cálculos renais. A nobreza europeia mandou fabricar cálices de madeira de lenho nefrítico, nos quais bebiam uma água azulada, supostamente para evitar a litíase. Muitas célebres pinacotecas da Europa Central mostram aristocratas belamente representados, com essa taça de madeira plebeia na mão. Hoje, essa atividade terapêutica foi descartada, mas parece possuir ação diurética e sudorífica. Nas mais distintas boticas do Velho Mundo, esse lenho era apresentado em pedaços sem o córtex, de cor avermelhada, com pacotes de fibras intercalados com outros de cor mais clara, odor ligeiro, mas aromático pelo aquecimento e sabor muito levemente acre. Sua infusão, de cor amarela dourada, com o tempo torna-se escura, enquanto que é azul-esverdeada quando olhada lateralmente. O acréscimo de ácidos faz desaparecer esse fenômeno, mas os álcalis parecem reforçar esse efeito.

Outros cientistas também perceberam a emissão fluorescente. Não só Boyle e Newton, mas também Hook, Herschel e, inclusive, Brewster, já no século XIX, opinavam que o fenômeno que tinham observado consistia numa dispersão da radiação inicial, dando-lhe nomes tão curiosos quanto “dispersão interna” ou “dispersão epipólica”. A principal dificuldade para analisar e compreender o processo fluorescente assentava-se na observação da radiação secundária emitida e diferenciá-la da excitadora primária, enquanto era atravessada a amostra problema.

Brewster comunicou à Royal Society de Edimburgo em 1833, o novo fenômeno que tinha descoberto e denominado “dispersão interna”, que se produzia numa solução verde de clorofila, obtida a partir de folhas frescas, depois da irradiação e focalização da luz solar através de um sistema de lentes. Aparecia um cone vermelho de luz, emitida

dentro da solução esverdeada, como consequência da passagem da luz incidente. Pensou que a cor vermelha observada devia-se às partículas em suspensão.

Na Inglaterra, o físico e matemático George G. Stokes (1819-1903), destacado professor de Cambridge, no Pembroke College durante mais de meio século, observando em seu laboratório a diferença de cor e intensidade da luz incidente e “reflexa”, quando uma variedade de fluorita verde era atravessada, convenceu-se de que a absorção e a reflexão “seletivas” não justificavam as mudanças experimentadas pela radiação emergente. Stokes tinha presentes os trabalhos de Haiüy e Brewster.

Em sua obra, *On the Change of Refrangibility of Light*, publicada em Cambridge em 1852, diz estar decidido a cunhar uma nova palavra, *fluorescência*, etimologicamente procedente da fluorita ou espato flúor, análoga à já existente “opalescência”, que descrevia os fenômenos ópticos que se produzem na opala. Hoje se considera que Stokes foi o primeiro a propor a utilização da fluorescência com fins analíticos, em 1854, quando estabeleceu a relação existente entre a intensidade da fluorescência e a concentração do soluto em soluções de sulfato de quinina. Foi assim que surgiu a *lei de Stokes*, segundo a qual, a luz absorvida na região ultravioleta ou violeta do espectro eletromagnético é emitida no azul ou no vermelho, vale dizer, numa longitude de onda mais longa; a diferença constitui o que se chama de *deslocamento de Stokes*. Essa lei foi discutida durante várias décadas e teve que aguardar até que Einstein, em 1917, diferenciasse a emissão espontânea e a emissão estimulada, para ratificá-la.

A glória da interpretação física ficou com Stokes, mas não se deve negar o mérito de Brewster (1833) e Herschel (1845), que ao observarem o fenômeno, consideraram-no uma dispersão interna, nem o de Monardes, que o descreveu pela primeira vez.

Nas últimas décadas do século XIX, foi ficando cada vez mais evidente sua utilidade como técnica analítica. Em 1867, Goppelsröder propôs o termo “*fluoreszenzanalyse*” para a fluorimetria (espectroscopia de fluorescência molecular).

Nesse ano, Berthelot sintetiza o fluoreno. Intimamente ligado a esses avanços, é a síntese realizada por Baeyer em 1871, de um composto orgânico tão fluorescente que foi chamado de fluoresceína. Em 1877, foi realizada uma curiosa experiência para demonstrar a conexão subterrânea entre o Danúbio e o Reno. Foram jogados na cabeceira do Danúbio, 10 kg de fluoresceína; 70 horas após pôde-se observar a fluorescência característica desse composto, num riacho que, aparentemente, não tinha conexão com o Danúbio, mas que verte suas águas no lago Constanza e, portanto, no Reno. Dessa forma, demonstrou-se, inequivocamente, que dois dos rios mais importantes da Europa estavam unidos. Walter, em 1888, estudou o amortecimento da fluorescência. Nicols e Merrit observaram, em 1907, em soluções de eosina, a simetria existente entre o espectro de absorção e o de fluorescência de diversos derivados do benzeno, valores que eram mencionados até poucos anos atrás. A fluorimetria também contribuiu indiretamente para a descoberta dos raios X e da radioatividade.

A catodoluminescência permitiu a Crooks (1883) e Boisbaudran (1885) descobrir e separar as terras raras.

Wiedemann, em 1887, detalhou a emissão fosforescente de diversos corantes, anilinas, interpostos em gelatina; James Dejar, em 1894, descreve a fosforescência de soluções sobre-esfriadas de compostos orgânicos.

Ao longo do século XX, foram sucedendo-se “brilhantes” descobertas devidas a outros cientistas. Contudo, teve que se aguardar até 1935, quando o polonês Jablonski propôs seu famoso diagrama, que trazia uma interpretação física mais adequada dos fenômenos luminescentes de fluorescência e fosforescência. O diagrama eletrônico proposto por ele é, atualmente, a base para a interpretação desses fenômenos e leva, como homenagem, seu nome. Durante séculos, os fenômenos luminescentes estavam mesclados e confundidos; só a partir do século XIX que foram considerados independentes e, obviamente, suas aplicações analíticas, embora não excludentes em muitas ocasiões, apresentam-se, geralmente, em capítulos diferentes.

Também devem ser mencionadas as importantes contribuições científicas realizadas nestes campos por Kautsky, Tiede, Lewis y Kasha, sem esquecer-se de Stern, Volmer, Vavilov, Kavahaghm Levshin, Gaviola e Perrin.

Desde as últimas décadas do século XIX, todas as técnicas luminescentes começam a ter um papel cada vez mais importante na análise química e, obviamente, na farmacêutica. Pode-se afirmar que, desde o final do século XIX até os anos 80 do XX, o devir das técnicas analíticas baseadas nos fenômenos de luminescência levou para caminhos muito díspares, pois, enquanto a fluorimetria experimenta um desenvolvimento espetacular, por causa de suas interessantes aplicações, a fosforimetria, que requer condições especiais (normalmente, meios rígidos ou soluções vitrificadas a 77 k), ficou relegada, até sua posterior expansão faz 15 anos. Atualmente, está surgindo uma nova era para as espectrometrias de luminescência, estando assentadas as bases que explicam os fenômenos implicados, estabelecida uma terminologia científica clara e aceita, com algumas modificações complementares, o diagrama de Jablonski, com o apoio das teorias mecânico-quânticas. Dispõe-se de ferramentas de trabalho muito úteis para diversos campos científicos, que permitiram o desenvolvimento vertiginoso dessas técnicas analíticas.

Nas últimas três décadas, a espectroscopia de luminescência molecular, em duas de suas vertentes, tanto fluorimetria quanto fosforimetria, têm passado de métodos rudimentares de trabalho a importantes técnicas instrumentais, utilizadas na análise e quantificação, tanto de compostos orgânicos quanto inorgânicos. Aos poucos, foi-se ganhando terreno às técnicas de absorção UV-VIS, utilizadas anteriormente e nos últimos anos, têm alcançado grande notoriedade analítica. Isso foi possível graças às singulares características de sensibilidade e seletividade dessas técnicas, bem como ao elevado desenvolvimento integral alcançado, que permitiu sua automatização. Com a recente associação dos modernos espectrofotômetros de luminescência, como detectores em cromatografia líquida de alta eficácia, seu interesse analítico tem-se intensificado.

Finalmente, deve-se destacar que, na atualidade, os métodos fluoroimunoanalíticos (FIA) fornecem maior sensibilidade que os radioimunoanalíticos

(RIA), com maior vantagem por não precisarem operar com isótopos radiativos, portanto, sem o problema adicional que, às vezes, representa seu uso, tanto do ponto de vista ambiental quanto da segurança no laboratório.

Um último aspecto de grande importância nas técnicas fluorimétricas é constituído pela possibilidade de se cinematografar *in vivo* células marcadas e assim captar, em escala de tempo real, as modificações que se produzem.

Referências

- Berlman, Isadore B. *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*. 2ª ed. New York: Academic Press, 1971.
- Colmeiro, Miguel. *Diccionario de los diversos nombres vulgares de muchas plantas usuales o notables del Antiguo y Nuevo Mundo*. Madrid: Imprenta Gabriel Alhambra, 1871.
- _____. *Diccionario de Farmacia del Colegio de Farmacêuticos de Madrid*. Madrid: Imprenta Martínez y Bogo, Madri, 1865.
- Del Castillo, Benito. *El Largo Camino de los Métodos Luminescentes en Análisis Farmacêutico*. Madrid: Real Academia de Farmacia, 1996.
- Harvey, Edmund N. *Bioluminescence*. New York; Academic Press, 1952.
- Levialdi, Andrea. *Luminiscencia*. Madrid: Espasa Calpe, 1946.
- Pringsheim, Peter, & Vogel, Marcel. *Luminiscence of Liquids and Solids and its Practical Applications*. New York: Interscience, 1946.
- Schulman, Stephen G. *Molecular Luminiscence Spectroscopy: Methods and Applications: Part I*. New York: Wiley-Interscience, 1985.
- Valls, Oriol, & Del Castillo, Benito. *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*. 4ª ed. México: Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, 2002.