



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Espectrometría

Objeto de Estudio N° 6

LECTURA N° 8

ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

Bibliografía:

SKOOG, D.A.; Leary J.J.; ANÁLISIS INSTRUMENTAL, 4° ed.; Ed. McGraw-Hill (1994), págs. 201-219.

Facultad de Ciencias Químicas

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

El fenómeno de fotoluminiscencia ocurre cuando una especie química es excitada por medio de radiación electromagnética y como consecuencia la especie pierde la energía adquirida reemitiendo esta en forma parcial o total. Esto es, parte de la energía adquirida por la especie química se reemite en forma de choques moleculares y parte en forma de energía luminosa o el total de la energía adquirida se reemite en forma de radiación.

La fluorescencia y la fosforescencia son dos manifestaciones diferentes del fenómeno fotoluminiscente. Estos dos efectos difieren entre sí en el mecanismo a través del cual son producidos, además del tiempo de duración de la fotoluminiscencia una vez que ha cesado de excitarse la muestra con radiación electromagnética. La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de que a la muestra se le suspende la radiación ($<10^{-6}$ seg.), mientras que la fosforescencia puede durar varios segundos o minutos en iguales circunstancias. La fluorescencia no está restringida a un estado físico determinado de la materia, esta puede existir en: gases, sólidos o líquidos.

Uno de los aspectos más atractivos de la luminiscencia es su sensibilidad inherente, con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en espectroscopía de absorción. Los límites de detección típicos son el orden de **partes por billón**.

ESTADOS EXCITADOS.- Cuando se forma un enlace entre dos átomos en una molécula, los orbitales atómicos de cada uno de los átomos que forman el enlace generan dos orbitales: uno enlazante de baja energía y otro antienlazante de energía mucho mayor.

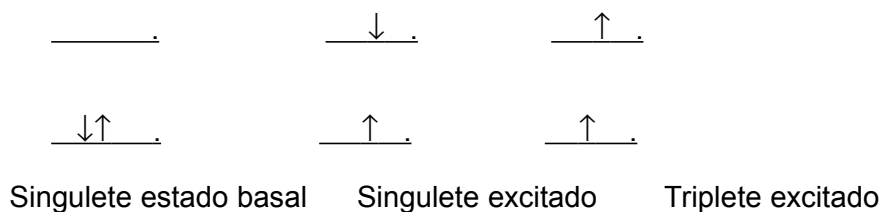
Cuando la molécula no está excitada, los electrones que forman un enlace específico se encuentran ocupando los orbitales enlazantes, debido a que estos son de energía menor y por lo tanto de esta manera la molécula es más estable.

Asociados a cada nivel electrónico se encuentran diferentes niveles vibracionales, por lo que cuando una molécula es irradiada con energía de cierta frecuencia o longitud de onda esta puede pasar a diferentes niveles vibracionales de alguno de los estados excitados S_0 y S_1 (Figura 1).

SPÍN DEL ELECTRON.- La mayoría de las moléculas poseen un número par de electrones. Estos dos electrones poseen diferente giro o diferente spin cuando están en el estado basal. En esta situación se dice que los electrones están apareados y el momento magnético producido por el spin es cancelado, siendo la molécula **diamagnética**. Cuando los pares electrónicos se encuentran apareados se le llama estado singulete. S_0 y S_1 son el primero y segundo estado excitado de un singulete. Otra posibilidad es que durante el proceso de transferencia del electrón del estado basal al estado excitado cambie su spin y en este caso los dos electrones tienen el mismo giro.

Tal estado en espectroscopia se conoce como triplete y en este caso la molécula es **paramagnética** ya que el vector magnético creado por el giro de los dos electrones no se

anula sino que se suma y da un valor neto de momento cuántico magnético de spin. Estos estados se pueden representar de la manera siguiente:



La Figura 1 es un diagrama parcial de niveles de energía para una hipotética molécula fotoluminiscente. La línea horizontal S_0 representa la energía del estado fundamental de la molécula, el cual normalmente es un estado singlete, en este nivel electrónico al igual que en los otros estados excitados se encuentran asociados varios niveles vibracionales de la molécula. A temperatura ambiente la energía electrónica de prácticamente todas las moléculas es S_0 . Las dos líneas de la izquierda representan S_1 y S_2 corresponden respectivamente primero y segundo estado singlete excitado. El de la derecha T_1 corresponde al primer estado triplete excitado. Hay que señalar que el estado triplete es menos energético que el correspondiente estado excitado singlete.

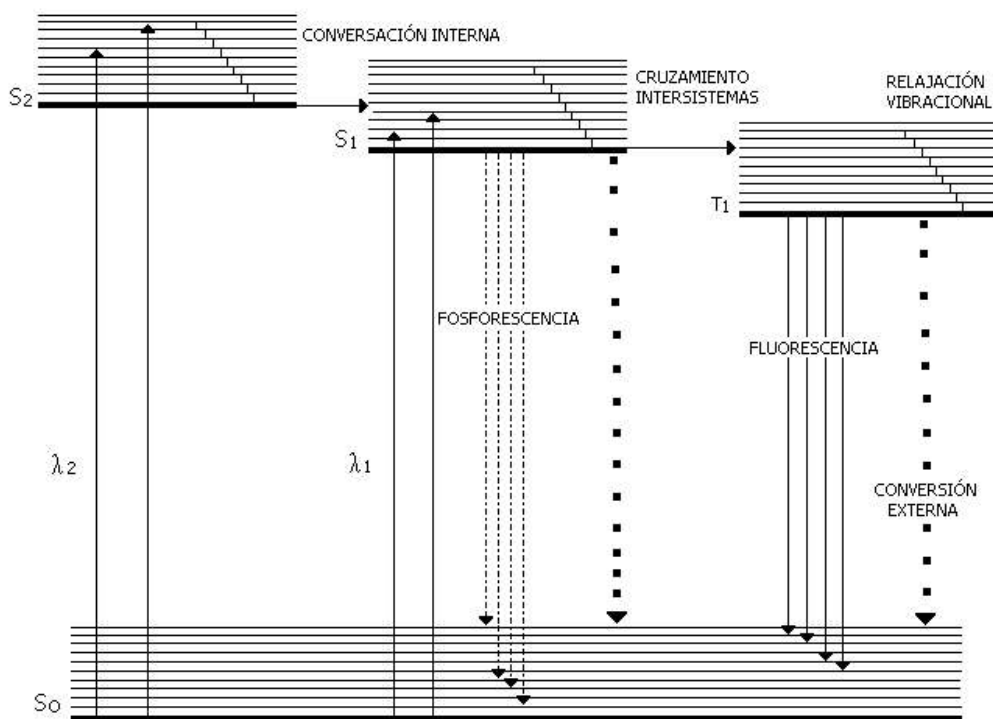


Figura 1: Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.

La excitación de esta molécula puede tener lugar por absorción de dos bandas de radiación, una centrada alrededor de la longitud de onda λ_1 ($S_0 \rightarrow S_1$) y la segunda alrededor de la longitud de onda más corta λ_2 ($S_0 \rightarrow S_2$). El paso directo de la molécula de un estado singulete basal S_0 a un triplete excitado T_1 no ocurre debido a que ciertas transiciones están prohibidas por las Leyes cuánticas, pero es posible tener la molécula en un triplete excitado a través de una transición indirecta como se explicará posteriormente.

PROCESOS DE DESACTIVACIÓN

Una vez que la especie ha sido excitada a niveles energéticos superiores, la desactivación o pérdida de la energía en exceso se puede efectuar a través de diferentes procesos. El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión.

En la mayor parte de las especies químicas, la desactivación por relajaciones no radiativas (choques moleculares de la especie excitada con el solvente) es la ruta cinéticamente favorecida, ya que el número de especies fluorescentes es muy pequeña en comparación con las especies no fluorescentes. El fenómeno de fluorescencia está restringida a un número relativamente pequeño de sistemas que poseen características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de relajación o desactivación sin radiación se reduzca hasta el punto que la reacción de emisión puede competir cinéticamente. Los procesos que son posibles de ocurrir en una molécula que tiene niveles de energía similares a los mostrados en la Figura 1 son los siguientes:

CONVERSIÓN EXTERNA.- Este es el proceso que ocurre más frecuentemente en las especies atómicas y moleculares. Durante este proceso y el exceso de energía que tiene la especie excitada se pierde por choques moleculares entre la especie excitada y el solvente, el resultado neto es una transferencia de energía de la especie excitada a las moléculas vecinas y un incremento mínimo en la temperatura del solvente.

CONVERSIÓN INTERNA.- En este proceso una molécula excitada pasa del estado electrónico más alto al estado electrónico más bajo ocasionando una serie de relajaciones vibracionales sin emisión de radiación, se favorece cuando dos niveles electrónicos son de energía similar y puede ocurrir un traslapamiento.

En estas circunstancias la fluorescencia tiene lugar *sólo* a λ_3 . A pesar de que la radiación de longitud de λ_1 o λ_2 fue la responsable de la excitación. La quinina es un ejemplo clásico de este comportamiento, esta sustancia presenta una banda de excitación a 340 nm y una banda de emisión a 450 nm.

Un espectro de fluorescencia siempre implica longitud de onda de mayor que la utilizada para la excitación de la especie, pues como se ve en el diagrama parte de la energía que recibe la molécula se disipa en forma de calor (procesos no radiativos) y solo parte de esta energía se reemite como radiación electromagnética (Fluorescencia).

CRUZAMIENTO INTERSISTEMAS.- Es un proceso en el que el espín de un electrón excitado se invierte y da lugar a un cambio en la multiplicidad de la molécula. Como se observa en la figura 1 La transición directa de un singulete a un triplete es altamente improbable debido a las restricciones cuánticas. La presencia de especies paramagnéticas como el oxígeno molecular en disolución también favorece el cruzamiento entre sistemas y consecuentemente disminuye la fluorescencia.

EFICACIA CUÁNTICA Y TIPO DE TRANSICIÓN.- Empíricamente se observa que el comportamiento fluorescente lo presentan con más frecuencia compuestos en los que la transición es el tipo π , π^* ya que tales transiciones presentan tiempos de vida promedio más cortos y no aquellos compuestos en los que la transición de menor energía es del tipo n , π^* ; esto es, la eficacia cuántica es mayor para transiciones π^* , π .

FLUORESCENCIA Y FOSFORESCENCIA

La fluorescencia es un fenómeno no muy común, pero la fosforescencia es aún menos frecuente de presentarse en sistemas químicos. Este último fenómeno está confinado a compuestos químicos muy específicos y bajo condiciones extraordinarias.

Para que los procesos de desactivación por fluorescencia puedan competir con los procesos de desactivación por fluorescencia y por relajaciones no radiativas, el medio debe ser altamente viscoso y la temperatura del sistema debe ser del orden de la temperatura del nitrógeno líquido aunque hay excepciones sobre todo en sólidos en las cuales la fosforescencia se presenta en condiciones normales, por ejemplo, el mineral **wilmenita** (ZnSiO_4) cuando es excitado con radiación Ultravioleta, fosforesce en condiciones ordinarias y el tiempo que dura la fosforescencia es alrededor de 340 horas después de que ha cesado la excitación.

Una diferencia específica con respecto a la fluorescencia y la fosforescencia es el tiempo de duración del fenómeno. La fluorescencia cesa de inmediato una vez que la fuente de excitación ha sido retirada de la sustancia ($<10^{-6}$ seg.) la fosforescencia dura al menor 10^{-4} seg. y en algunos casos hasta horas como en el caso de la wilmenita.

Ambas técnicas son muy útiles en el estudio teórico de estructura química, enlaces, configuración electrónica en moléculas, niveles de energía en teoría de orbitales moleculares, etc., sin embargo debido a las limitaciones físicas que impone la fosforescencia, en química analítica la aplicación de estos fenómenos está restringida a la fluorometría, que consiste en la cuantificación de la radiación emitida por fluorescencia de una especie química que posee estas características y que es directamente proporcional a su concentración.

RELACIÓN ENTRE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA Y CONCENTRACIÓN.- La relación que existe entre fluorescencia y concentración es directamente proporcional; a mayor concentración mayor fluorescencia y viceversa, por lo que una gráfica de intensidad de fluorescencia contra concentración es una línea recta (siempre y cuando $A < 0.05$).

FACTORES QUE AFECTAN LA FLUORESCENCIA.- La intensidad de fluorescencia es afectada por los siguientes factores:

1. Estructura: La fluorescencia se presenta más comúnmente y en forma más intensa con compuestos que tienen grupos funcionales aromáticos con bajas energías de transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Compuestos que tienen estructuras de carbonilos alifáticos y alicíclicos o de dobles enlaces conjugados con un alto grado de estabilidad de resonancia también pueden presentar fluorescencia, pero el número de estos es relativamente pequeño comparado con el número de sistemas aromáticos fluorescentes.

La sustitución de grupo funcional en el anillo de benceno cambia la longitud de onda de máxima absorción con un cambio correspondiente en la posición e intensidad de la línea de emisión de fluorescencia.

2. Temperatura y naturaleza del solvente: El efecto de un aumento en la temperatura incrementa el número de choques moleculares, por lo que la desactivación tiende a efectuarse a través de procesos no radiativos y por lo tanto se inhibe la fluorescencia. La viscosidad del solvente tiene efectos similares, a mayor viscosidad menor número de choques moleculares y mayor intensidad de fluorescencia.

La polaridad del solvente también tiene influencia en la fluorescencia, debido al efecto hipsocrómico y batocrómico que el solvente ejerce sobre el compuesto.

3. Efecto del pH: Debido a las diferentes formas químicas que son posibles de existir a diferentes condiciones de pH, la intensidad de fluorescencia también es afectado por este factor. Ejemplo: el fenol y el ión fenolato tienen diferentes propiedades fluorescentes, por lo que si las condiciones son de pH básico la especie estará en el equilibrio químico en la forma del fenol y/o ion fenolato, afectando así la intensidad de fluorescencia.

4. Efecto del oxígeno disuelto: Debido al paramagnetismo de la molécula de oxígeno, esta tiende a desactivar cualesquier estado activado por oxidación fotoquímica de la especie fotoluminiscente, provoca cruzamiento intersistemas y conversiones de las moléculas excitadas al estado triplete .por lo que es deseable que el oxígeno no se encuentra presente en solución o su concentración sea mínima

INSTRUMENTACIÓN PARA FLUORESCENCIA

Los componentes de un fluorómetro o espectrofluorómetro son muy similares a los de un espectrómetro Visible- UV. Un diagrama simplificado de los componentes de un fluorómetro son los que aparecen en la Figura 2.

El diagrama de doble haz es sumamente útil para compensar por las fluctuaciones en la intensidad de la fuente de excitación. El haz de referencia pasa a través de un atenuador de radiación y se ajusta éste hasta hacer que la intensidad de este haz sea igual a la intensidad del haz de fluorescencia que pasa por el recipiente de muestra cuando se encuentra en éste un blanco.

El haz de radiación dirigido al recipiente de muestra pasa por un filtro (fluorómetro) o por un monocromador (espectrofluorómetro), donde se selecciona la longitud de onda de la radiación que va a incidir en la muestra. La radiación fluorescente emitida por la muestra es en todas direcciones pero es más convenientemente medida a un ángulo de 90° con respecto al haz incidente ya que la radiación dispersada por la solución y por la celda misma puede interferir con la radiación emitida por la especie fluorescente.

Tanto el haz de referencia como el haz de muestra son dirigidos a un sistema de fototubos y posteriormente a un amplificador diferencial que se encuentra conectado a un sistema de lectura, tal como una escala digital o de aguja (Figura 2).

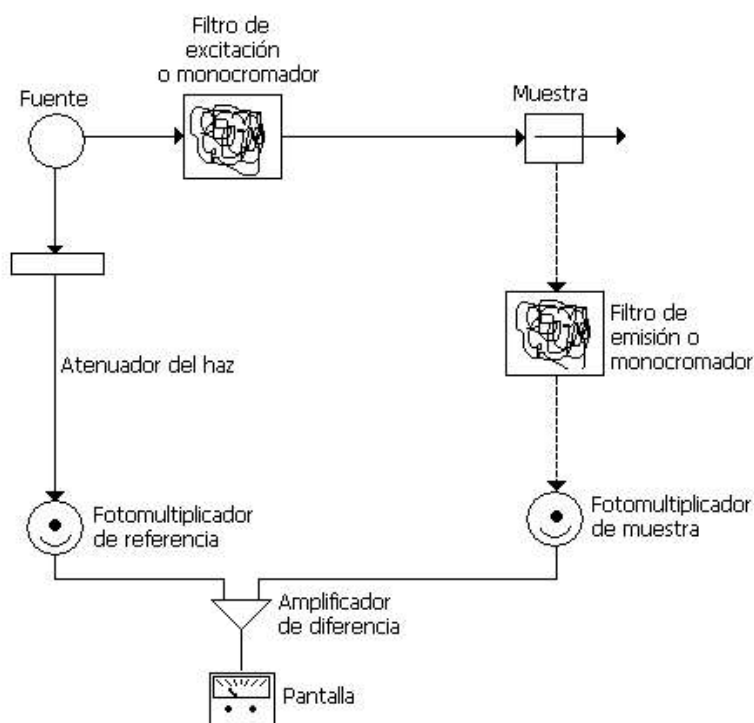


Figura 2 : Componentes de un fluorómetro o un espectrofluorómetro

La selección en la compra de un espectrofluorómetro o un fluorómetro radica esencialmente en el costo y en la finalidad del trabajo que se desea hacer con un instrumento de este tipo. Un espectrofluorómetro es mucho más costoso que un simple fluorómetro de filtros. Con el primero es posible hacer estudios sofisticados sobre una estructura electrónica y de niveles energéticos en moléculas o iones además de análisis cuantitativo.

Un fluorómetro de filtros es de mucho menos precio y funciona en forma completamente satisfactoria en aspectos de trabajo rutinario y con técnicas ya establecidas (Ejemplo:

laboratorios de análisis clínicos, laboratorios de control de calidad), por lo que en laboratorios de análisis, es mucho más frecuente encontrar fluorímetros simples que espectrofluorímetros.

COMPONENTES DE FLUORÍMETROS

FUENTES DE EXCITACIÓN.- La lámpara de tungsteno ordinaria no da suficiente intensidad para ser utilizada en fluorescencia. Son comunes las lámparas de Xenón y de Mercurio.

La lámpara de xenón es más versátil que la lámpara de mercurio. La lámpara de xenón produce una intensa radiación por el paso de corriente en una atmósfera de xenón; el espectro de este tipo de lámpara es continua de 250 a 600 nm. Con un pico de máxima intensidad a 470 nm.

FILTROS Y MONOCROMADORES.- Para fluorímetros de filtros se utilizan frecuentemente filtros de absorción y filtros de interferencia. Los espectrofluorímetros generalmente utilizan rejillas de difracción como monocromadores.

DETECTORES.- Debido a que la señal de fluorescencia es de baja intensidad se requiere de un potente sistema de amplificación. Por esto son preferidos los tubos fotomultiplicadores, aunque también se usan comúnmente los fototubos en aparatos de menor precio.

CELIDAS.- En fluorescencia se utilizan celdas de vidrio común cuando la radiación que se maneja es de rango visible. Para Ultravioleta es necesario utilizar sílice o cuarzo.

APLICACIONES DE LA FLUORESCENCIA

Durante un tiempo y no hace muchos años, la espectroscopia de fluorescencia molecular estuvo restringida en sus aplicaciones cuantitativas a unos cuantos químicos raros.

Hoy día la fluorescencia es de primordial importancia en la química analítica. Una de sus más espectaculares aplicaciones ha sido en la detección y cuantificación de sustancias que son separadas a través del uso de la cromatografía de líquidos.

Muchos sistemas bioquímicos son de estructura tal que frecuentemente presentan fluorescencia o pueden ser transformados a especies de este tipo si originalmente no lo son.

Por otra lado, especies inorgánicas que son difíciles de detectar y cuantificar por espectroscopia UV-Visible o por Absorción Atómica se utilizan por fluorescencia. Adicionalmente a esto los niveles de detección son del orden de **partes por billón**, cantidades que por otras técnicas son difíciles de detectar. Estas entre otras son las razones de la importancia creciente de la fluorescencia molecular.

Algunas de las especies que pueden ser analizadas por fluorescencia son las siguientes: _

Compuestos Orgánicos y Bioquímicos: adenina, ácido antranílico, cisteína, hidrocarburos aromáticos policíclicos, indol, naftol, proteínas, ácido salicílico, escatol, triptófano, ácido úrico, adrenalina, alquilmorfina, LSD, penicilina, fenobarbital, procaína, reserpina, clorofila, alcaloides, flavonoides, esteroides, ácido ascórbico, ácido fólico, nicotinamida, piridoxal, corticoesteroides, estrógenos, progesterona, andrógenos, ácidos biliares, colesterol, triglicéridos, creatinina, deshidrogenasas, transaminasas, fosfatasas, peroxidadas, **ATP**, luciferina, luciferasa, vitaminas: A, B₁, B₂, B₆, C y la E, etc.

Compuestos Inorgánicos: cianuro, fluoruro, sulfatos, fosfatos, aluminio, arsénico, berilio, boro, calcio, magnesio, tierras raras, selenio, uranio, etc.

Sin duda alguna las aplicaciones más importantes en la fluorometría son en análisis de alimentos, de productos farmacéuticos, de productos naturales y en análisis clínicos.