

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

INTRODUCCIÓN

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres órdenes de magnitud mejor que las de la Espectroscopía de absorción. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que se pueden hacer fluorescer.

TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA MOLECULAR

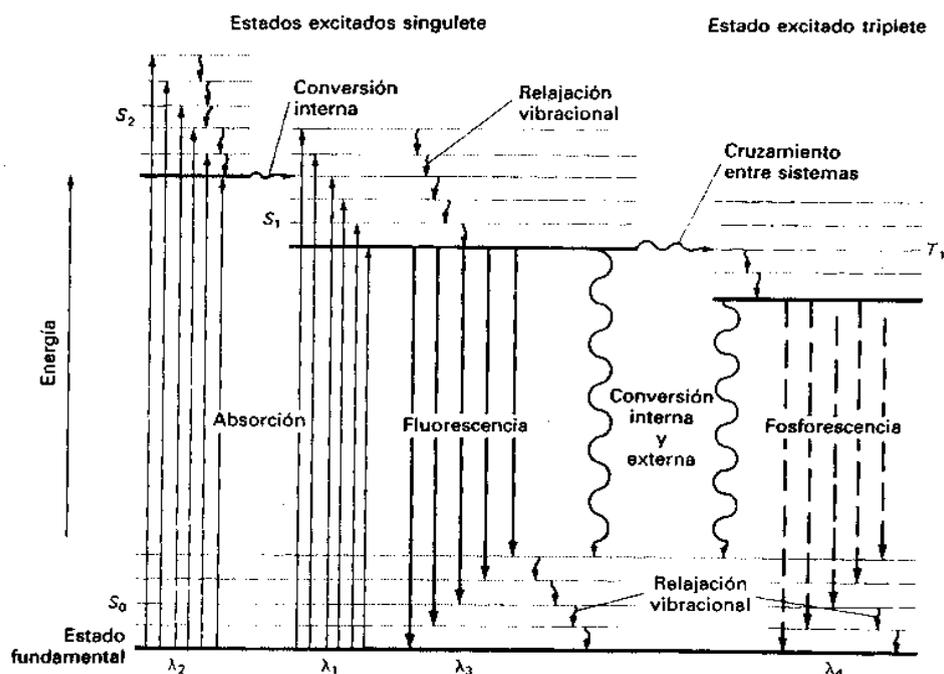
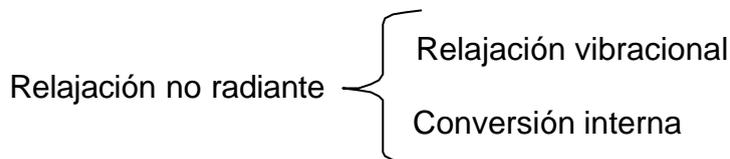


Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente

Normalmente, el tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. Dos de las

más importantes de estos mecanismos son la relajación (desactivación) no radiante y la relajación fluorescente.



La **relajación vibracional**, señalada por las flechas onduladas cortas entre los niveles de energía vibracionales, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas del disolvente en una serie de etapas como se indica en la figura. La ganancia de energía vibracional del disolvente se refleja en un ligero incremento de la temperatura del medio. La relajación vibracional es un proceso tan eficiente que el tiempo de vida promedio de un estado vibracional excitado es de 10^{-15} s aproximadamente.

También puede ocurrir el relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Este tipo de relajación llamado algunas veces **conversión interna**, se ilustra por las flechas onduladas largas.

En la figura se ilustra el otro proceso de relajación: la **fluorescencia**. Se puede observar que las bandas de radiación son producidas cuando las moléculas fluorescen debido a que las moléculas electrónicamente excitadas se pueden relajar a cualquiera estados vibracionales del estado electrónico fundamental. De igual forma que las bandas de absorción molecular, las bandas de fluorescencia molecular están formadas por una multitud de líneas espaciadas tan estrechamente que son muy difíciles de resolver.

El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión. Por otro lado, si un camino sin radiación tiene una constante de velocidad favorable, la fluorescencia no tiene lugar o es menos intensa.

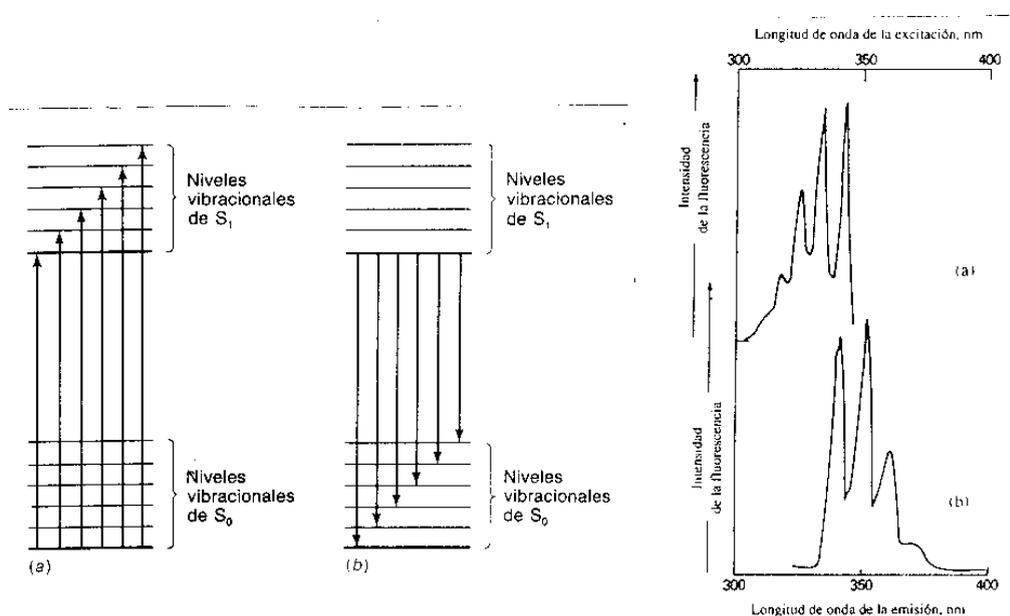
La fotoluminiscencia está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de desactivación sin radiación se reduzcan hasta el punto que la reacción de emisión puede competir cinéticamente.

Se observa que las bandas de fluorescencia molecular están formadas principalmente por bandas que tienen longitudes de onda más largas y , por

tanto, energías menores que la banda de radiación responsable de su excitación. Este desplazamiento hacia longitudes de onda mayores se llama **desplazamiento de Stokes**.

En aquellos casos en los que la radiación absorbida sea emitida sin cambio en la longitud de onda (misma energía) se conoce como **radiación de resonancia o resonancia fluorescente**.

Debido a que las diferencias de energía entre los estados vibracionales es aproximadamente el mismo, tanto para el estado fundamental como para el excitado, la absorción, o espectro de excitación, y el espectro de emisión o fluorescencia de un compuesto frecuentemente aparece como una imagen especular de uno a otro con una sobreposición que ocurre en la línea de resonancia.



Espectro de fluorescencia para 1 ppm de antraceno en alcohol: (a) espectro de excitación; (b) espectro de emisión.

VARIABLES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA

1.- Rendimiento cuántico: El rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Las moléculas altamente fluorescentes, por ejemplo, la fluoresceína, tienen eficiencias cuánticas que, en ciertas condiciones, se aproximan a la unidad. Las especies no fluorescentes tienen eficiencias que son prácticamente cero.

2.- Estructura: La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación.

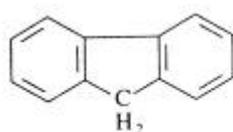
La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia. Además, la sustitución afecta frecuentemente la eficiencia de la fluorescencia como se demuestra en la siguiente TABLA

Efecto de la sustitución en la fluorescencia del benceno^a

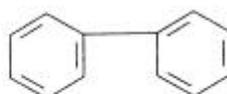
| Compuesto | Fórmula | Longitud de onda de la fluorescencia, nm | Intensidad relativa de la fluorescencia |
|----------------|---|--|---|
| Benceno | C ₆ H ₆ | 270-310 | 10 |
| Tolueno | C ₆ H ₅ CH ₃ | 270-320 | 17 |
| Propilbenceno | C ₆ H ₅ C ₃ H ₇ | 270-320 | 17 |
| Fluorobenceno | C ₆ H ₅ F | 270-320 | 10 |
| Clorobenceno | C ₆ H ₅ Cl | 275-345 | 7 |
| Bromobenceno | C ₆ H ₅ Br | 290-380 | 5 |
| Iodobenceno | C ₆ H ₅ I | — | 0 |
| Fenol | C ₆ H ₅ OH | 285-365 | 18 |
| Ion fenolato | C ₆ H ₅ O ⁻ | 310-400 | 10 |
| Anisol | C ₆ H ₅ OCH ₃ | 285-345 | 20 |
| Anilina | C ₆ H ₅ NH ₂ | 310-405 | 20 |
| Ion anilinio | C ₆ H ₅ NH ₃ ⁺ | — | 0 |
| Acido benzoico | C ₆ H ₅ COOH | 310-390 | 3 |
| Benzonitrilo | C ₆ H ₅ CN | 280-360 | 20 |
| Nitrobenceno | C ₆ H ₅ NO ₂ | — | 0 |

^a En disolución de etanol.

3.- Rigidez estructural: Empíricamente se encuentra que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. Por ejemplo, las eficacias cuánticas para el fluoreno y el bifenilo están próximas a 1'0 y 0'2, respectivamente, bajo condiciones similares de medida.



fluoreno



bifenilo

La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelatantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico. Por ejemplo, la fluorescencia de la 8-hidroxiquinoleína es mucho menor que la de su complejo con zinc:

Leary 210

4.- Temperatura y disolvente: La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante (conversión externa). Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado.

5.- Efecto del pH: La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Por lo tanto será muy frecuente en los métodos fluorimétricos el control estricto del pH.

6.- Efecto de la concentración: La potencia de la radiación fluorescente F es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema.

$$F = K' (P_0 - P)$$

donde P_0 es la potencia del haz incidente sobre la disolución y P es su potencia después de atravesar la longitud b del medio. La constante K' depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia. Con objeto de relacionar F con la concentración c escribimos la ley de Beer así:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc}$$

sustituyendo nos queda: $F = K' P_0 (1 - 10^{-\epsilon bc})$

Si desarrollamos el término exponencial como una serie de Maclaurin será;

$$F = K' P_0 \left[2.303 \epsilon bc - \frac{(2.303 \epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2.303 \epsilon bc)^3}{3!} \right]$$

Siempre que $2.303 \epsilon bc < 0.05$ podemos escribir que,

$$F = K' P_0 2.303 \epsilon bc$$

y si P_0 se mantiene constante,

$$F = Kc$$

Cuando c es suficientemente elevada como para que la absorbancia multiplicada por 2.303 sea mayor que 0.05, los términos de mayor orden de la expresión anterior no son despreciables y la linealidad se pierde. Este efecto es un resultado de autoapagamiento, en el cual las moléculas del analito absorben la fluorescencia producida por otras moléculas de analito.

fig.23.7Skoog448

INSTRUMENTACIÓN

En la siguiente figura se muestra un esquema general de un espectrofluorímetro.

Fig. Scimedia

Un monocromador selecciona una longitud de onda de excitación, y la fluorescencia se examina con un segundo monocromador el cual se coloca de manera que forme un ángulo de 90° con la luz incidente. Manteniendo fija la λ_{ex} y haciendo un barrido de la radiación emitida, se obtiene un espectro de emisión. Si la λ_{em} se mantiene constante y se hace variar la λ_{ex} , se obtiene el espectro de excitación.

Fuentes: En la mayoría de las aplicaciones se necesita una fuente más intensa que las lámparas de wolframio o de deuterio utilizadas para la medida de absorción. Esto se debe, como quedó demostrado anteriormente a que la magnitud de la señal de salida, y por tanto la sensibilidad, es directamente proporcional a la potencia de la fuente P_0 . Normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón o de mercurio.

Filtros y monocromadores: En los fluorímetros se utilizan tanto los filtros de interferencia como los de absorción, mientras que los espectrofluorímetros están equipados con monocromadores de red.

Detectores: La señal de fluorescencia típica es de baja intensidad, por tanto, se necesitan factores de amplificación altos para estas medidas. Los tubos fotomultiplicadores son los más utilizados como detectores en instrumentos de fluorescencia sensibles.

Cubetas: Para medidas de fluorescencia se utilizan tanto cubetas cilíndricas como rectangulares fabricadas con vidrio o más normalmente con sílice.

APLICACIONES DE LOS MÉTODOS DE FLUORESCENCIA

En general, los métodos de fluorescencia son de uno a tres ordenes de magnitud más sensibles que los métodos basados en la absorción porque la sensibilidad de los primeros se puede reforzar, sea aumentando la energía del haz de excitación o por amplificación de la señal del detector. Es de destacar que ninguna de estas opciones mejora la sensibilidad de los métodos basados en los procesos de absorción porque el parámetro en la ley de Beer basado en la concentración es el logaritmo de una proporción

$$-\log P_0/P = abc$$

Al aumentar la energía P_0 se incrementa proporcionalmente P y no tiene efecto sobre la sensibilidad. De manera parecida, incrementando la amplificación de la señal del detector se influye en las dos magnitudes medidas de forma idéntica, lo que evita cualquier mejoría.

Determinación fluorimétrica de especies inorgánicas: Los métodos fluorimétricos de determinación de especies inorgánicas pueden ser de dos tipos. Los métodos directos que implican la formación de un quelato fluorescente y la medida de su emisión y un segundo grupo que se basa en la disminución de la fluorescencia que resulta de la acción atenuadora de la sustancia que va a ser determinada. Esta última técnica ha sido más ampliamente utilizada en la determinación de aniones.

Los reactivos fluorimétricos que más éxito tienen para el análisis de cationes son los que presentan estructuras aromáticas con dos o más grupos funcionales dadores que permitan la formación de quelatos con el ion metálico. A continuación se muestran las estructuras de los cuatro reactivos más corrientes.

En la siguiente Tabla se muestra una selección de algunos reactivos fluorimétricos y sus aplicaciones.

Leary 219

Determinación fluorimétrica de especies orgánicas y bioquímicas:

El número de aplicaciones del análisis fluorimétrico a especies orgánicas es muy elevado. Por ejemplo existen métodos para la determinación de sustancias tales como enzimas, agentes medicinales, productos naturales, esteroides, vitaminas, etc. Sin lugar a dudas, las aplicaciones más importantes de la fluorimetría están en el campo del análisis de productos alimentarios, farmacéuticos, muestras clínicas y productos naturales. La sensibilidad y selectividad del método lo hace una herramienta particularmente valiosa en estos campos.