TEMA 4. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA, FOSFORESCENCIA Y QUIMIOLUMINISCENCIA MOLECULAR

Universidad Europea

LAUREATE INTERNATIONAL UNIVERSITIES

1. MÉTODOS LUMINISCENTES

Las moléculas de analito son excitadas dando una especie cuyo **espectro de emisión** suministra información para el análisis cualitativo y cuantitativo

Métodos luminiscentes
- **Fotoluminiscencia: Fluorescencia y Fosforescencia**
- **Quimioluminiscencia**

Proteína Verde Fluorescente (GFP)

Martin Chelfie, Roger Tsien y Osamu Shimomura, Premio Nobel de Química 2008

Fotoluminiscencia

. En la fluorescencia y en la fosforescencia la excitación tiene lugar por absorción de fotones. La fluorescencia difiere de la fosforescencia en que las transiciones electrónicas responsables de la **fluorescencia no implican un cambio en el espín del electrón**. La fluorescencia tiene una vida más corta, cesando la luminiscencia casi de forma inmediata.

. Las emisiones de **fosforescencia implican un cambio en el espín del electrón**, lo cual hace que la luminiscencia sea detectable durante un intervalo de tiempo mayor.

. En la mayoría de los casos, la fotoluminiscencia (tanto para fluorescencia como para fosforescencia) tiene una longitud de onda más larga que la radiación empleada en la excitación.

Quimioluminiscencia

. Se basa en el espectro de emisión de una **especie excitada** que se ha formado en el curso de una **reacción química**. Las partículas excitadas pueden ser el producto de una reacción entre el analito y un reactivo adecuado. No obstante, el análisis puede también centrase en la inhibición del analito sobre una reacción de quimioluminiscencia.

Fluorescence is a phenomenon of light emission by a substance that has absorbed light. The emission stops immediately when the radiation ends, and, in most cases, emitted light has a longer wavelength than the absorbed radiation

Phosphorescence is a peculiar type of fluorescence. Phosphorescent materials do not immediately re-emit the radiation they absorb. After having been illuminated, phosphorescent substances can glow in the dark for some time (up to a few hours)

https://youtu.be/d5ugY9zZIIs

Ventajas de los métodos luminiscentes

- Elevada sensibilidad (límites de detección del orden de ppb)
- Gran intervalo lineal de concentraciones

Inconveniente

- Métodos menos aplicables que los de absorción, debido al limitado número de sistemas químicos que pueden producir luminiscencia

Aclaración:
ppb se refiere a una parte por billón, siendo éste el billón anglosajón (mil millones 10^9)

	ppm	ppb
Unidades	mg/L	μg/L

2. TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA Y DE LA FOSFORESCENCIA

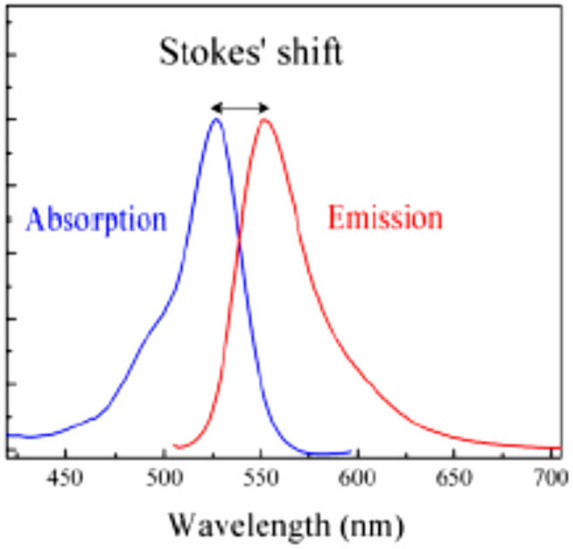
. FOTOLUMINISCENCIA (fluorescencia y fosforescencia). Dos etapas:

a) EXITACIÓN por ABSORCIÓN DE LUZ

b) DESACTIVACIÓN, incluyendo EMISIÓN DE LUZ

. Desplazamiento de Stokes

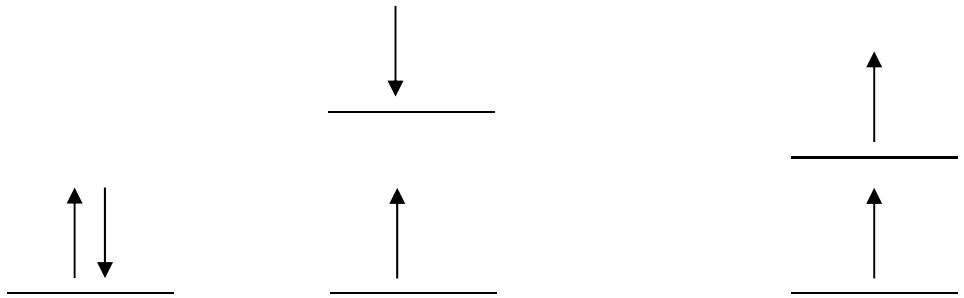
Generalmente la fotoluminiscencia presenta **longitudes de onda más largas** que la radiación absorbida. No obstante, si la radiación absorbida es emitida sin cambio en la longitud de onda o frecuencia, lo que se produce es un fenómeno de ***radiación de resonancia***



2. TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA Y DE LA FOSFORESCENCIA

. Espín del electrón. Estados singlete y triplete

Cuando uno de los electrones de una molécula es excitado a un nivel de energía superior, da lugar a un estado singlete o triplete.



Estado singlet fundamental | **Estado singlete excitado (espines apareados)** | **Estado triplete excitado (espines desapareados)**

Multiplicidad de espín:
$2s + 1$
S es el momento angular de spin total

- El estado triplete es menos energético que el correspondiente estado excitado singlete.
- Una transición singlete/triplete es menos probable que una singlete/singlete

- Las propiedades de una molécula en el estado excitado singlete difieren considerablemente de las de una molécula en el estado excitado triplete (s: diamagnética; t: paramagnética).

- La excitación inducida por radiación de una molécula en el estado fundamental al estado triplete es poco probable.
- No obstante, en ciertas moléculas un estado triplete puede ser ocupado desde un estado singlete (fosforescencia)

Tiempo de vida medio de un estado triplete: $> 10^{-4}$ s
Tiempo de vida medio de un estado singlete: 10^{-5} a 10^{-8} s

2. TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA Y DE LA FOSFORESCENCIA

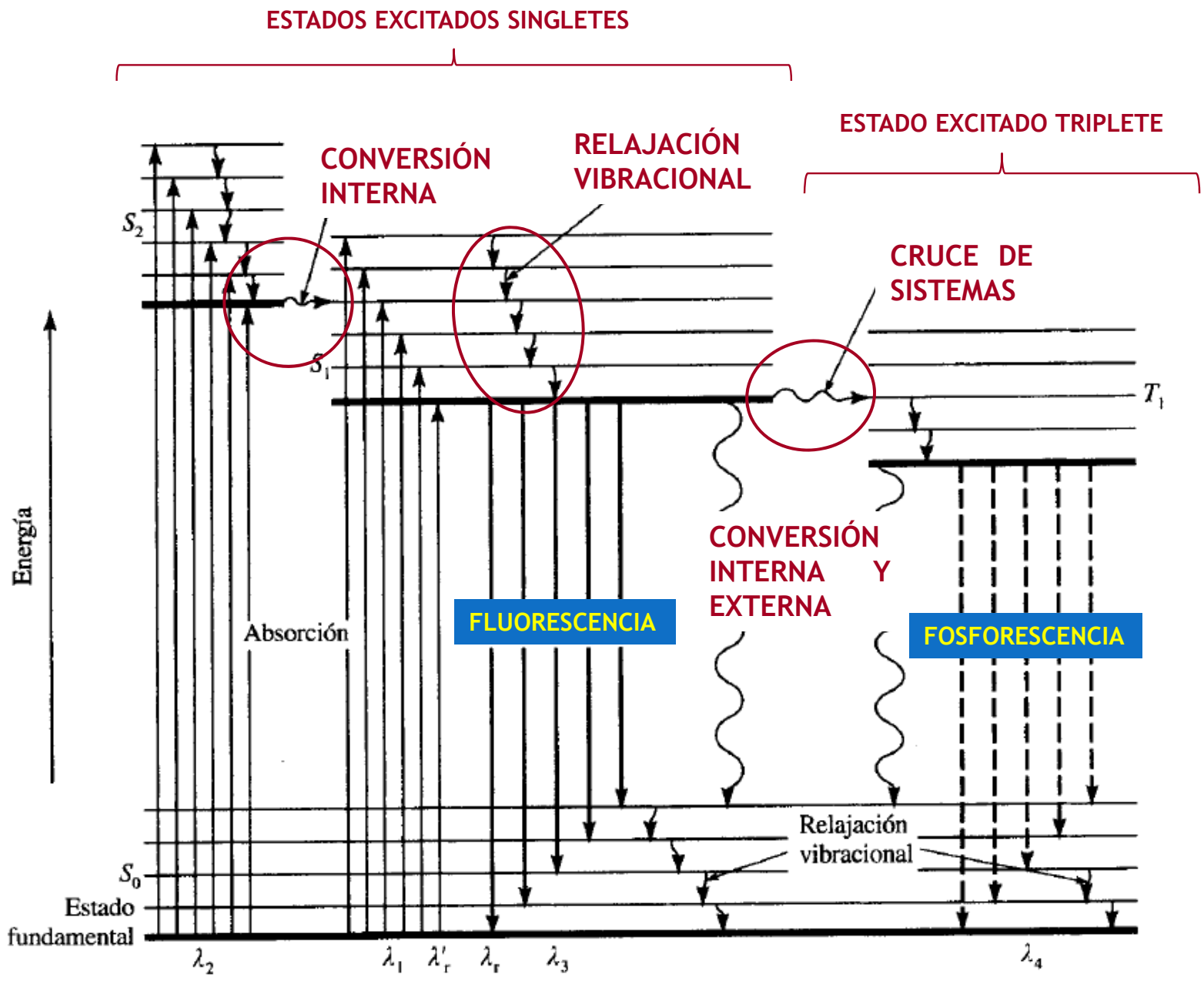
. Procesos de desactivación:

Una molécula excitada puede volver a su estado fundamental por una combinación de varias etapas mecanísticas

- Etapas que implican emisión de un fotón de radiación: fluorescencia y fosforescencia
- Etapas que implican procesos sin radiación: relajación vibracional, conversión interna, conversión externa y cruzamiento de sistemas

El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel en el que se minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Si un camino sin radiación tiene una constante de velocidad más favorable, la fluorescencia no se verá, o será menos intensa.

La fotoluminiscencia está limitada a sistemas en los que, por características estructurales y ambientales los procesos de emisión pueden competir cinéticamente con los procesos de relajación sin radiación.


ESTADOS EXCITADOS SINGLETES
ESTADO EXCITADO TRIPLETE
CONVERSIÓN INTERNA
RELAJACIÓN VIBRACIONAL
CRUCE DE SISTEMAS
CONVERSIÓN INTERNA Y EXTERNA
FLUORESCENCIA
FOSFORESCENCIA
Absorción
Relajación vibracional
Energía
S_2
S_1
T_1
S_0
Estado fundamental
λ_2
λ_1
λ'_r
λ_r
λ_3
λ_4

Procesos de desactivación SIN EMISIÓN DE LUZ

a) Relajación vibracional: proceso muy efectivo (tiempo de vida medio de una molécula excitada vibracionalmente es de 10^{-12} s). La fluorescencia, cuando tiene lugar, implica transiciones desde el nivel vibracional más bajo de un estado electrónico excitado. Una vez en el nivel fundamental, el electrón puede volver a cualquiera de los niveles vibracionales de dicho estado fundamental, cayendo al nivel más bajo por posteriores relajaciones vibracionales. Como consecuencia de la relajación vibracional, la fluorescencia se desplaza a longitudes de onda mayores respecto a la banda de absorción.

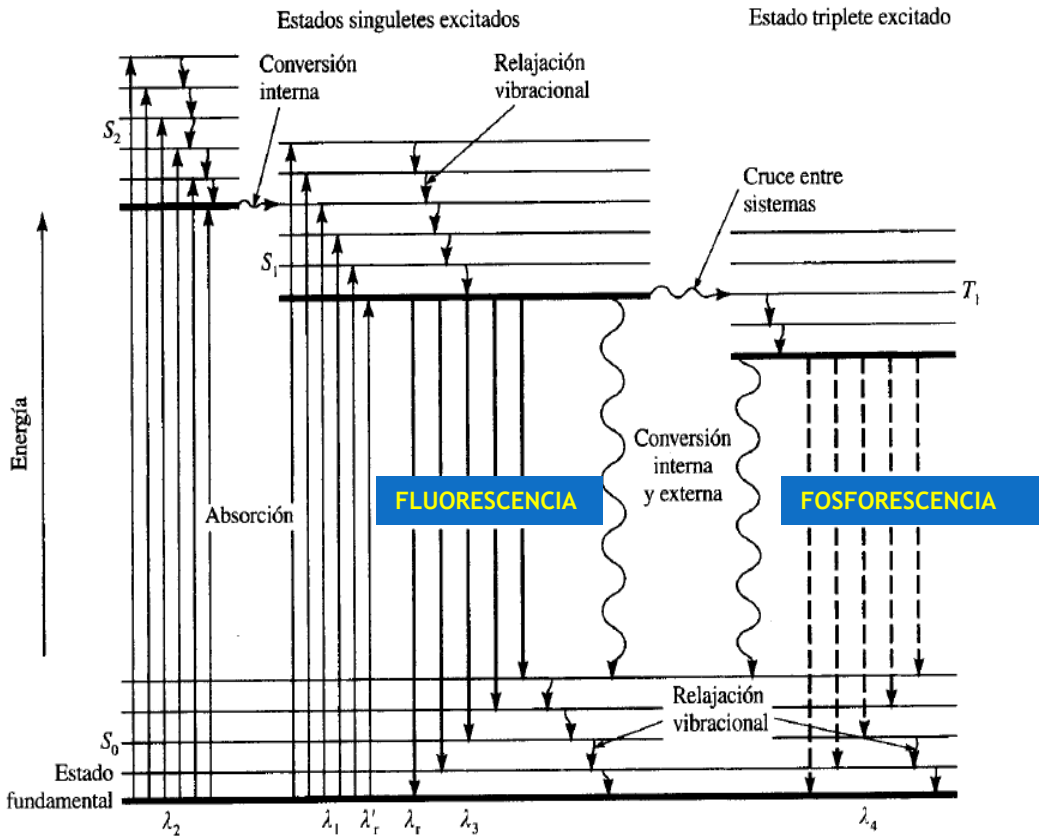
b) Conversión interna: procesos intermoleculares por los que la molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía sin emisión de radiación. Son procesos muy eficaces, pero que aún no están bien definidos. Parecen estar especialmente favorecidos cuando dos niveles de energía electrónicos están suficientemente próximos como para que haya solapamiento de los niveles de energía vibracional (transición entre niveles singletes excitados S2 y S1). La conversión interna a través de solapamiento de niveles vibracionales es más probable que la pérdida de energía por fluorescencia.

Procesos de desactivación SIN EMISIÓN DE LUZ

c) Conversión externa: proceso de desactivación por interacción y transferencia de energía entre la molécula excitada y el disolvente u otros solutos. De hecho, aquellas condiciones que reducen el número de colisiones entre partículas (baja T, elevada viscosidad) tienden a exaltar la fluorescencia.

d) Cruzamiento de sistemas: proceso en el que el espín de un electrón excitado se invierte dando lugar a un cambio en la multiplicidad de la molécula. El cruzamiento de sistemas es más usual en moléculas con átomo pesados, como el Br o I. La presencia de especies paramagnéticas (por ejemplo O_2) en disolución favorece este tipo de procesos y disminuye la fluorescencia.

Después de un cruzamiento de sistemas a un estado triplete excitado, la desactivación puede producirse por conversión interna, externa o por fosforescencia. Las dos primeras compiten con tanto éxito con la fosforescencia que éste tipo de emisión se observa normalmente solo a bajas temperaturas, en medios muy viscosos o con moléculas absorbidas sobre un soporte sólido.



FLUORESCENCE: A relaxation process involving light emission from the lowest vibrational energy level of a singlet excited electronic state to any vibrational energy level of the ground state.

PHOSPHORESCENCE: A relaxation process involving light emission from the lowest vibrational energy level of a triplet excited electronic state to any vibrational energy level of the ground state.

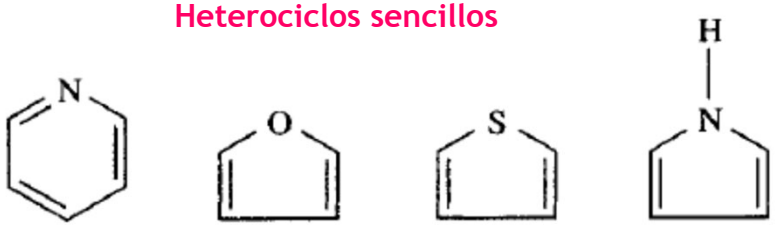
The average lifetime of the excited triplet state with respect to emission is large and ranges from 10^{-4} to 10 s or more. Emission from such a transition may persist for some time after irradiation has ceased.

3. VARIABLES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA

- **Transiciones:** La fluorescencia rara vez se observa como resultado de absorción de radiación UV de $\lambda < 250$ nm. En consecuencia, las transiciones $\sigma^* \rightarrow \sigma$ no suelen producir fluorescencia. Este tipo de misión se restringe a procesos menos energéticos como son las transiciones $\pi^* \rightarrow n$ y $\pi^* \rightarrow \pi$, siendo precisamente ésta última la más frecuentemente asociada a fenómenos de fluorescencia.

- **La rigidez estructural** favorece la fluorescencia: las moléculas fluorescentes son frecuentemente moléculas cíclicas, rígidas, que poseen doblen enlaces muy conjugados

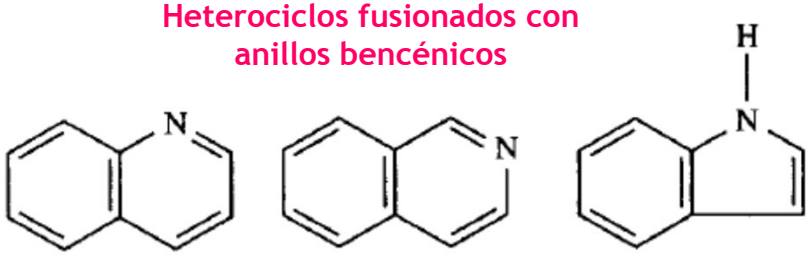
Heterociclos sencillos



Piridina Furano Tiofeno Pirrol

No presentan fluorescencia

Heterociclos fusionados con anillos bencénicos



Quinolina Isoquinolina Indol

Sí presentan fluorescencia

3. VARIABLES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA

ESTRUCTURA QUÍMICA

En los compuestos aromáticos la sustitución del anillo afecta a la fluorescencia:

- Desplazamientos de la λ de los máximos de excitación y emisión
- Aumento o disminución de la intensidad de fluorescencia según el sustituyente

Efecto de la sustitución en la fluorescencia del benceno

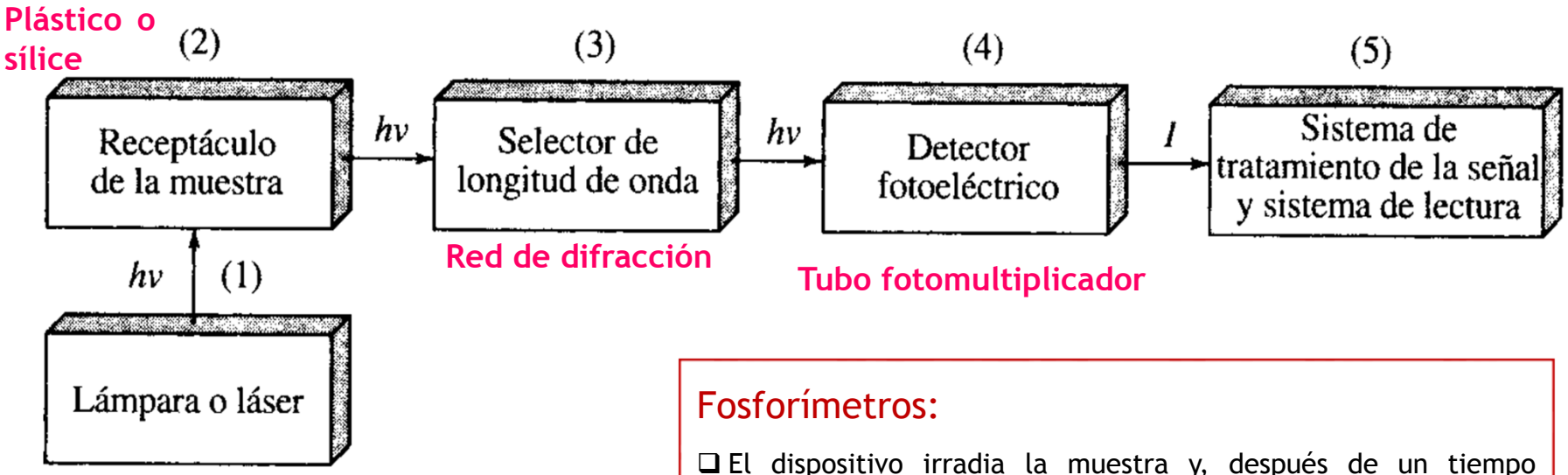
Compuesto	Fórmula	Longitud de onda de la fluorescencia, nm	Intensidad relativa de fluorescencia
Benceno	C_6H_6	270-310	10
Tolueno	$C_6H_5CH_3$	270-320	17
Propilbenceno	$C_6H_5C_3H_7$	270-320	17
Fluorobenceno	C_6H_5F	270-320	10
Clorobenceno	C_6H_5Cl	275-345	7
Bromobenceno	C_6H_5Br	290-380	5
Iodobenceno	C_6H_5I	-	0
Fenol	C_6H_5OH	285-365	18
Ión fenolato	$C_6H_5O^-$	310-400	10
Anisol	$C_6H_5OCH_3$	285-345	20
Anilina	$C_6H_5NH_2$	310-405	20
Ión anilinio	$C_6H_5NH_3^+$	-	0
Ácido benzóico	C_6H_5COOH	310-390	3
Benzonitrilo	C_6H_5CN	280-360	20
Nitrobenceno	$C_6H_5NO_2$	-	0

3. VARIABLES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA

ENTORNO QUÍMICO

- El **aumento de la temperatura y la disminución de la viscosidad del disolvente** favorecen la **desactivación por conversión externa** y disminuyen la fluorescencia.
- La **fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos depende** normalmente **del pH**, pudiendo ser diferente para las formas no ionizadas e ionizadas del compuesto.
- La presencia de **oxígeno disuelto** a menudo reduce la intensidad de la fluorescencia (quenching) debido a **sus propiedades paramagnéticas**, que favorecen el cruzamiento de sistemas con conversión de moléculas excitadas al estado triplete.

4. INSTRUMENTACIÓN PARA MEDIDAS DE FLUORESCENCIA Y FOSFORESCENCIA



Fosforímetros:

- El dispositivo irradia la muestra y, después de un tiempo adecuado, se mide la intensidad de la fosforescencia.
- La cubeta de la muestra suele colocarse en un recipiente Dewar que contenga nitrógeno líquido para realizar las medidas a baja temperatura y evitar así los procesos de desactivación por colisiones.

- Lámpara de arco de mercurio (fluorímetros)
Fuente de líneas. Produce líneas muy intensas a 254, 366, 405, 436, 546,577, 691 y 733 nm.

- Lámpara de arco de xenón (espectrofluorímetros)
Proporciona un espectro continuo

5. APLICACIONES DE LOS MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS Y FOSFORIMÉTRICOS

a) Métodos fluorimétricos

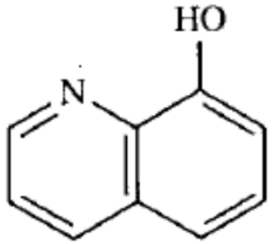
- Determinación de especies inorgánicas

Cationes que forman quelatos fluorescentes

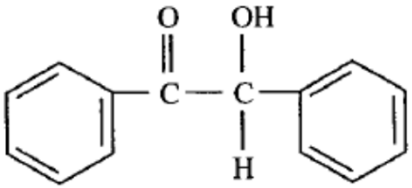
- Determinación de especies orgánicas:

Análisis de productos alimentarios, fármacos, muestras clínicas y productos naturales

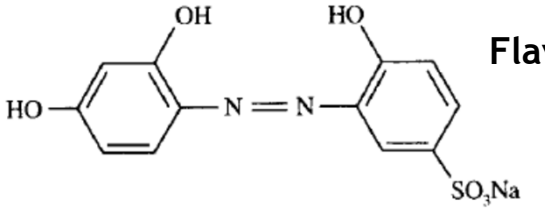
Reactivos Fluorimétricos



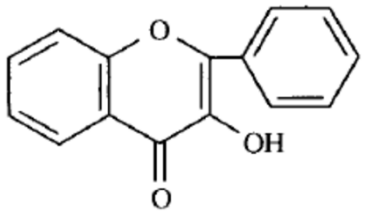
8-hidroxiquinoleína



Benzoína



Rojo de Alizarina R



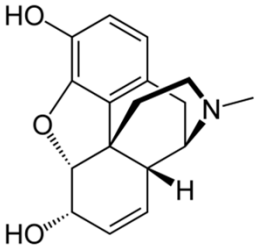
Flavanol

b) Métodos fosforimétricos:

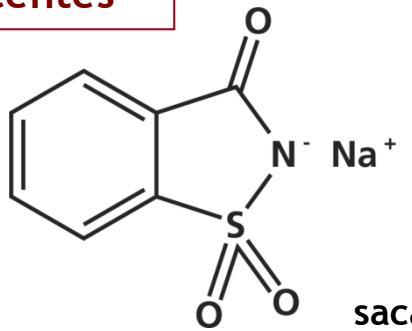
Aplicación menos extendida que métodos fluorimétricos debido a las condiciones del análisis y a la menor precisión que proporcionan. No obstante, la técnica se utiliza para la determinación cuantitativa de sustancias orgánicas y bioquímicas como ácidos nucléicos, aminoácidos, enzimas o pesticidas.

Fluorímetro de Placas

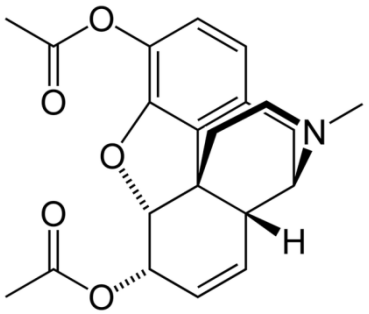
Algunas sustancias fluorescentes



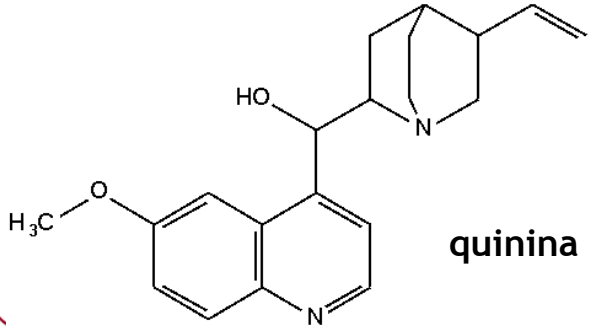
morfina



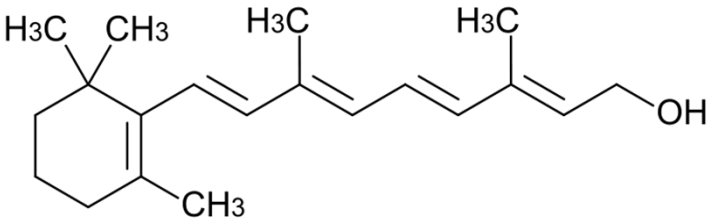
sacarina



heroína

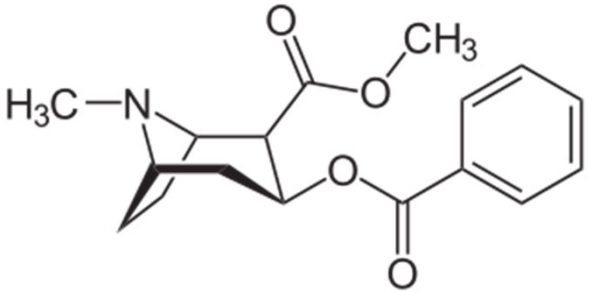


quinina

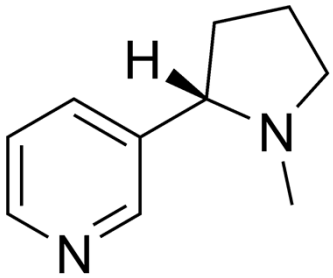


Vitamina A

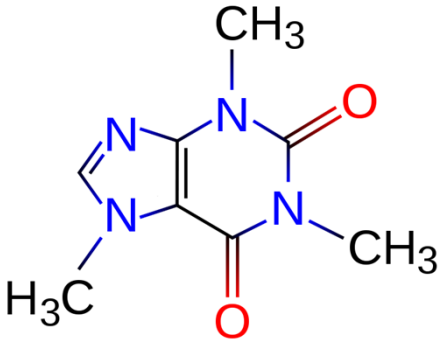
Algunas sustancias fosforescentes



cocaína



nicotina



cafeína

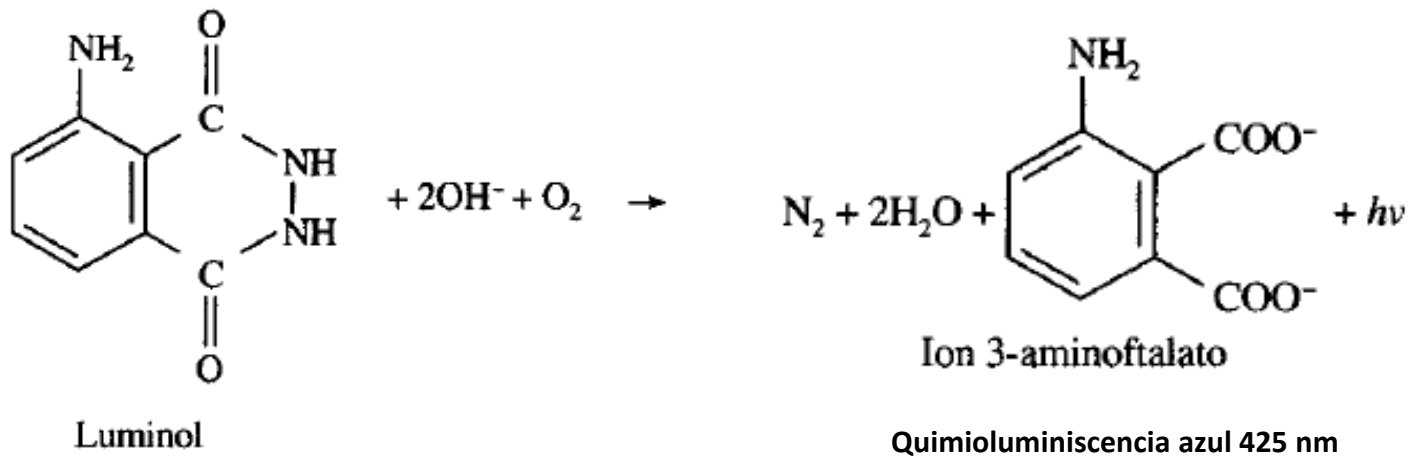
6. QUIMIOLUMINISCENCIA

Límites de detección del orden de ppm y ppb

Aplicaciones:

- Análisis de gases: determinación de contaminantes atmosféricos como ozono o monóxido de nitrógeno.
- Análisis de especies inorgánicas: determinación de iones metálicos por inhibición o exaltación de una reacción quimioluminiscente (**reacción del luminol** con oxígeno o peróxido de hidrógeno).
- Análisis de especies orgánicas: determinación de especies orgánicas por exaltación o inhibición de la reacción del luminol. Identificación de manchas de sangre por efecto catalítico de la hemoglobina (Fe) sobre la oxidación del luminol.

Reacción del luminol



Quimioluminiscencia azul 425 nm

Reactivos:

. Luminol

. Medio básico ($NaHCO_3$, Na_2CO_3, NH_3)

. Oxidante (H_2O_2)

. Catalizador: Fe-hemoglobina

Análisis Forense

Detección de restos de sangre