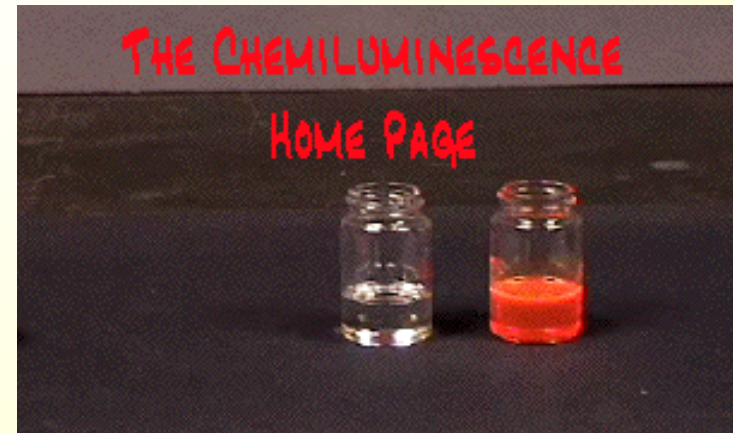


# **ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR**

# ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

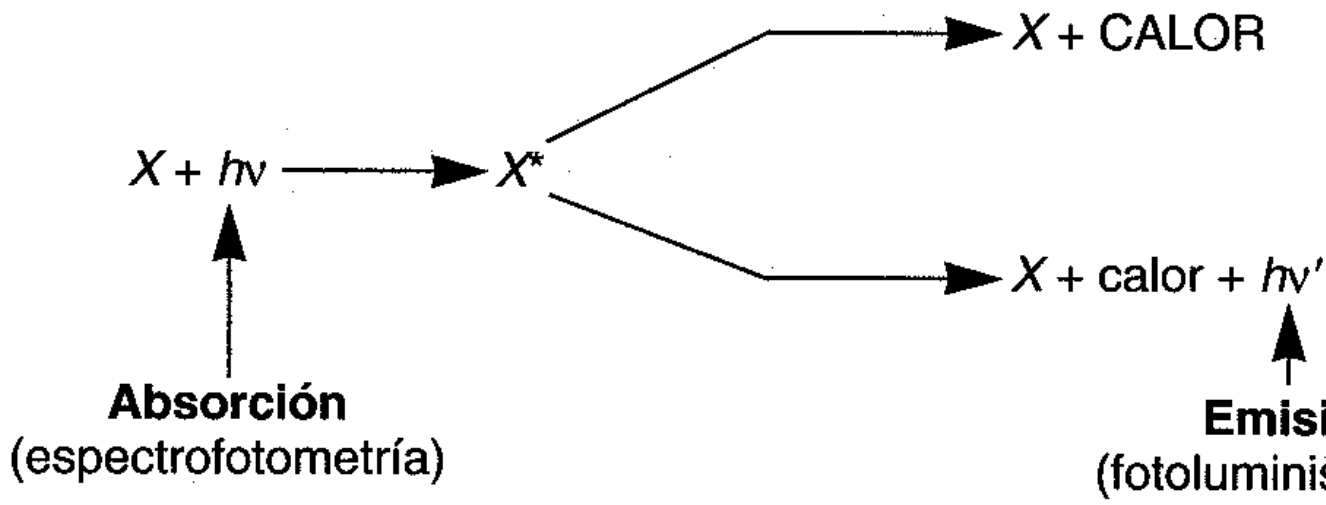
- ✿ Introducción
- ✿ Fundamentos de la Luminiscencia
- ✿ Factores que afectan a la fluorescencia
  - Estructura molecular
  - Factores medioambientales
    - Efecto del disolvente
    - Influencia del pH
    - Influencia del Oxígeno
    - Influencia de la temperatura
- ✿ Relación entre la intensidad y concentración
- ✿ Instrumentación
- ✿ Espectros de excitación y de emisión
- ✿ Aplicaciones



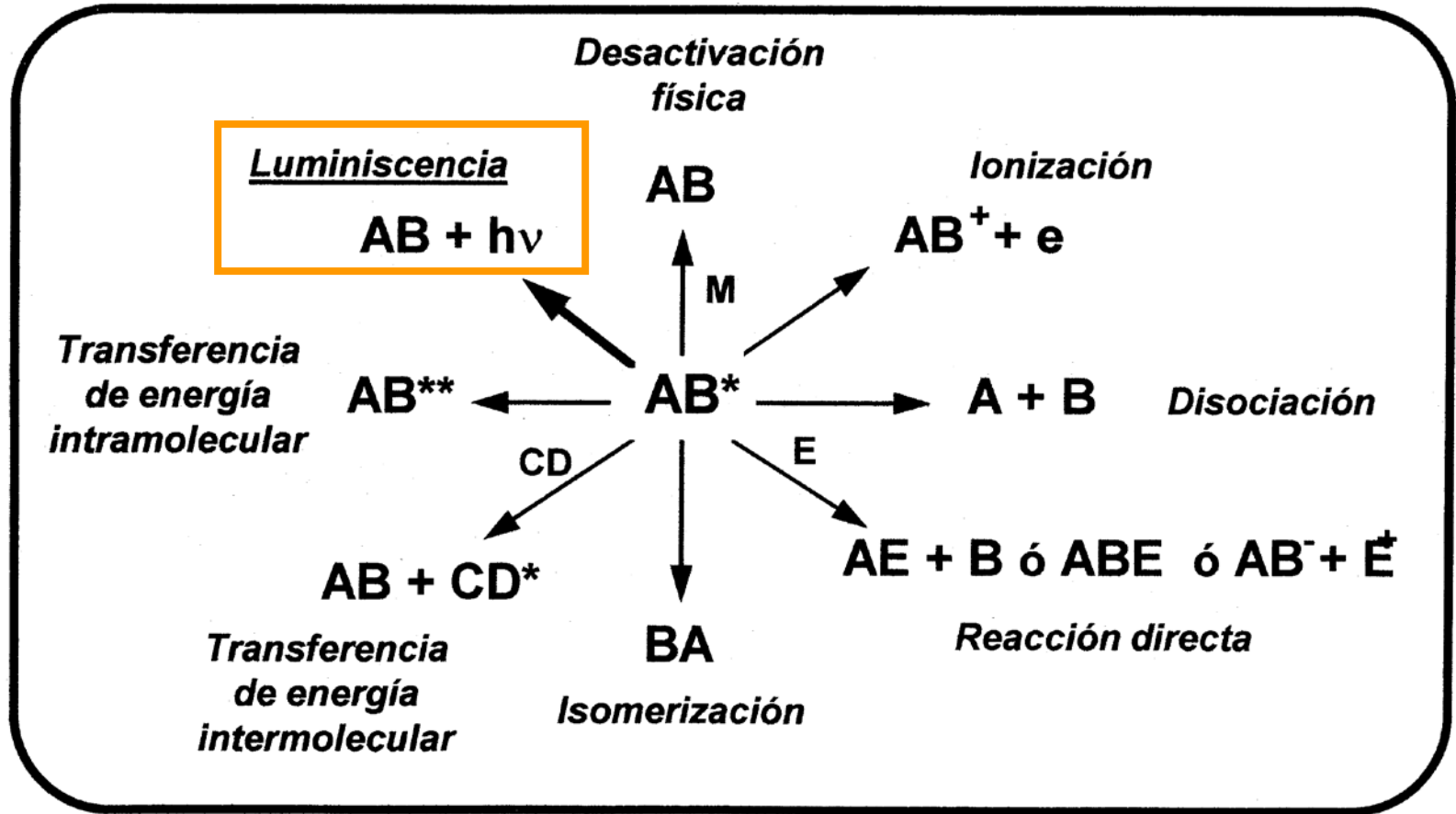


# BIBLIOGRAFÍA

1. SKOOG, HOLLER & NIEMAN, “Principios de Análisis Instrumental”, 5<sup>a</sup> Ed., Mc. Graw Hill, Madrid, 2003
2. SKOOG, WEST, HOLLER & CROUCH, “Fundamentos de Química Analítica”, Thomson & Paraninfo, Madrid, 2005
3. HARRIS, D. C., “Análisis Químico Cuantitativo”, Ed. Reverté, Barcelona, 2007
4. FRANCIS ROUESSAC Y ANNICK ROUESSAC “Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas”. Ed. McGraw-Hill, Madrid, 2003
5. LUCAS HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ y CLAUDIO GONZÁLEZ PÉREZ. “Introducción al análisis instrumental”. Ariel Ciencia, 2002
6. [http://www.shsu.edu/~chm\\_tgc/sounds/sound.html](http://www.shsu.edu/~chm_tgc/sounds/sound.html) (01-10-2017)

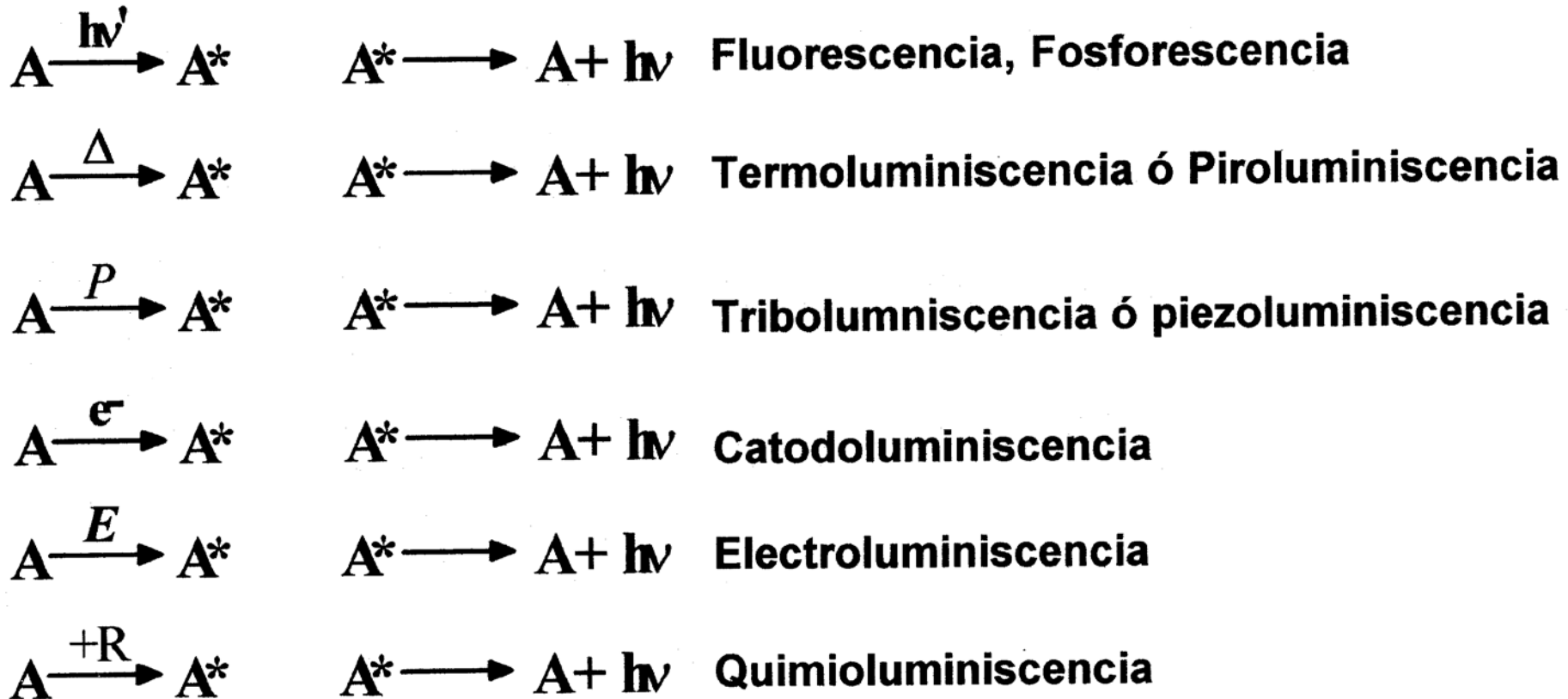


**Emisión  
de la  
adiación**



# Luminiscencia

Proceso de emisión de radiación como consecuencia de la desactivación de una molécula

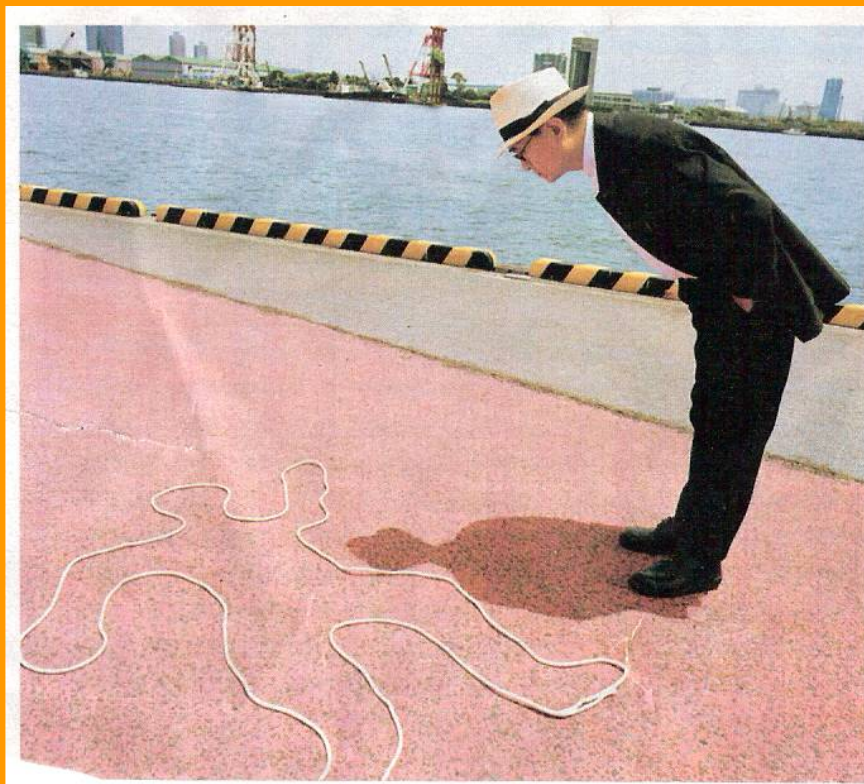


# Quimioluminiscencia

## ¿Qué es el luminol?

FERNANDO SUR K. CORREO ELECTRÓNICO

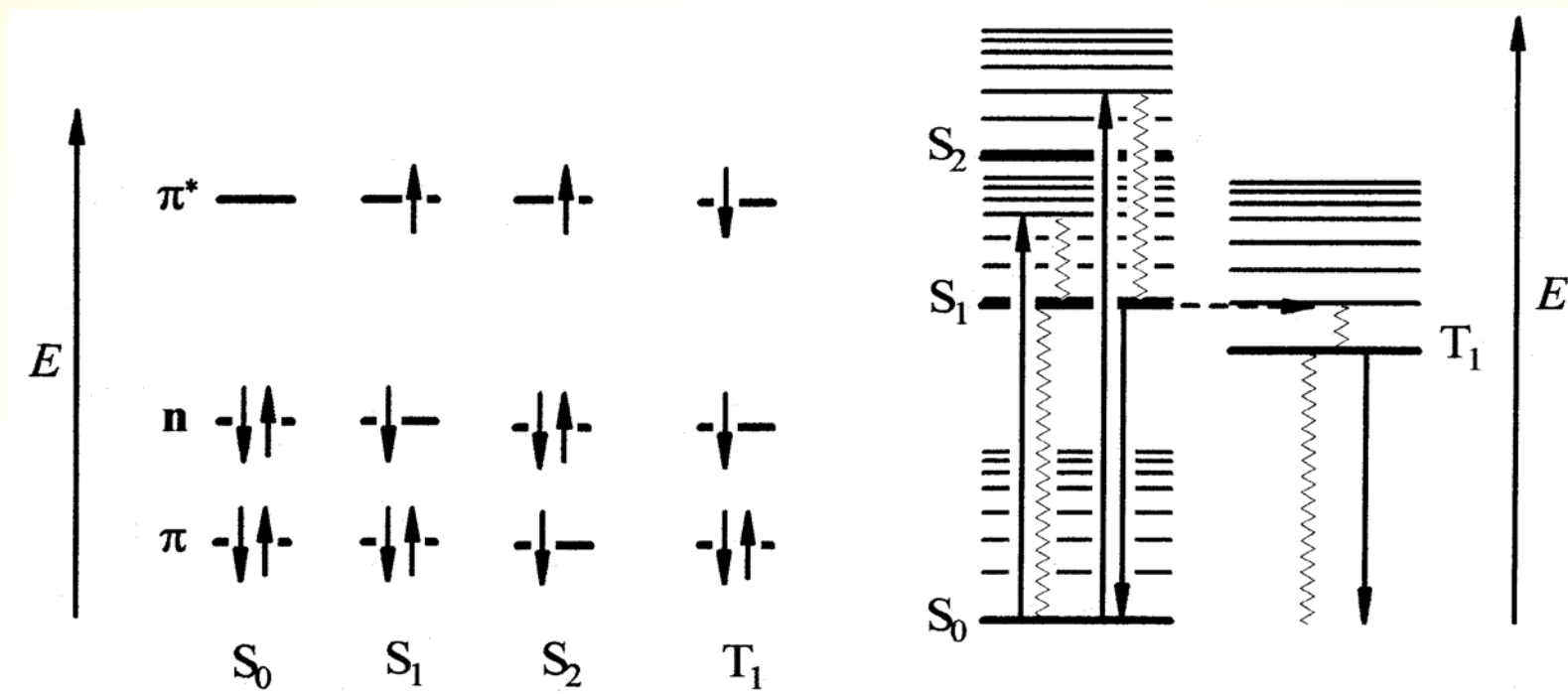
En las series policíacas, como *CSI*, los investigadores rocían con un *spray* el escenario del crimen para detectar manchas de sangre invisibles al ojo desnudo. Se trata del luminol, **un producto que contiene una molécula que, en determinadas condiciones químicas, emite una pequeña luz**. Si la molécula se halla en un medio alcalino y entra en contacto con hierro oxidado, un elemento de la sangre que se forma en presencia del oxígeno sanguíneo, da lugar a un fenómeno que se conoce como 'quimioluminiscencia' y que consiste en la emisión de una débil luz azul que resalta durante unos 20 segundos. El luminol, cuyas propiedades fueron descubiertas en los años 30 del siglo pasado, es capaz de detectar manchas de sangre que han sido lavadas, incluso en una concentración de una parte de sangre por cada 100.000 de agua. ■



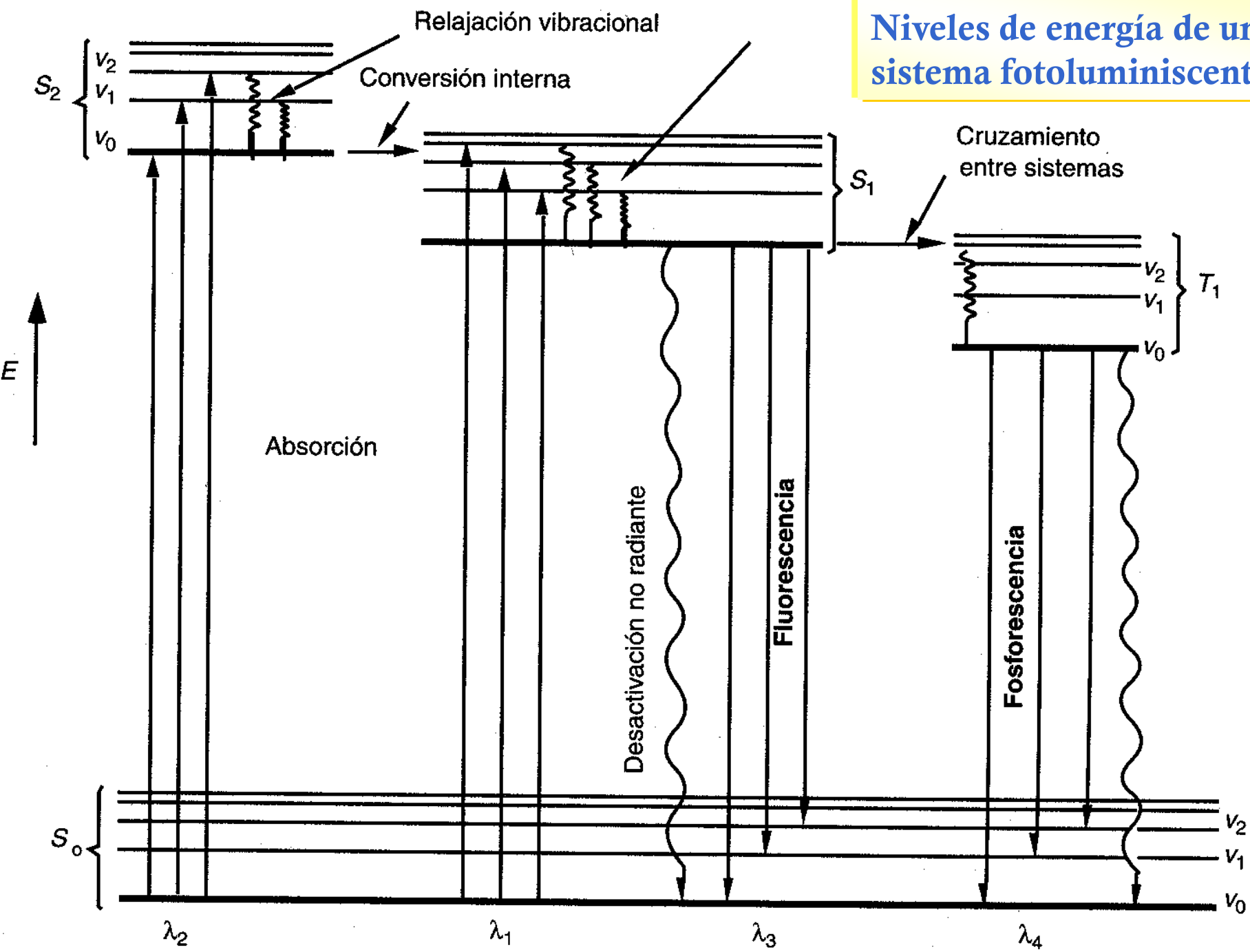
# Fundamento

## Procesos de absorción y emisión en tránsitos $\pi \rightarrow \pi^*$

- ✿ multiplicidad de la molécula  $M = 2S + 1$ 
  - **S**: número cuántico de espín = suma de espines de sus  $e^-$
- ✿ moléculas con un número par de  $e^-$   $S = 0$  y  $M = 1 \Rightarrow$  estado de energía **singlete**
- ✿ **estado singlete fundamental**: estado energético más bajo en el cual todos  $e^-$  están apareados
- ✿ **tránsito  $e^- \pi \rightarrow \pi^*$** 
  - estado **singlete** excitado : conserva su espín
  - estado **triplete** excitado: se produce un cambio de spin  $S = +\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1 \Rightarrow M = 3$
- ✿ **transiciones** desde el estado fundamental **singlete** al estado **triplete** excitado son **muy poco probables** y normalmente es necesario pasar por el estado singlete excitado

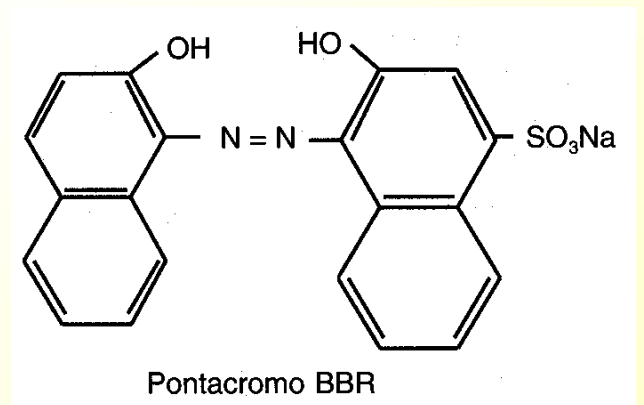
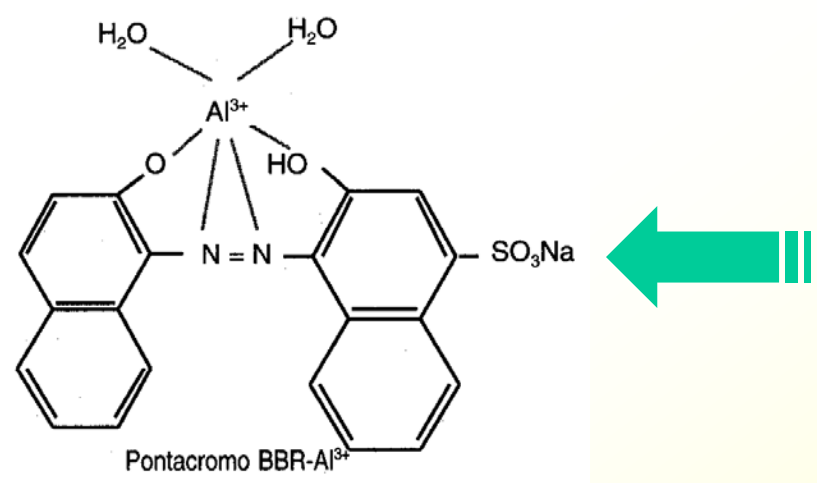
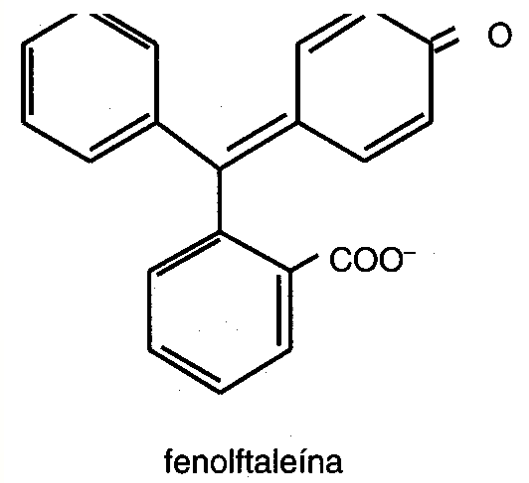
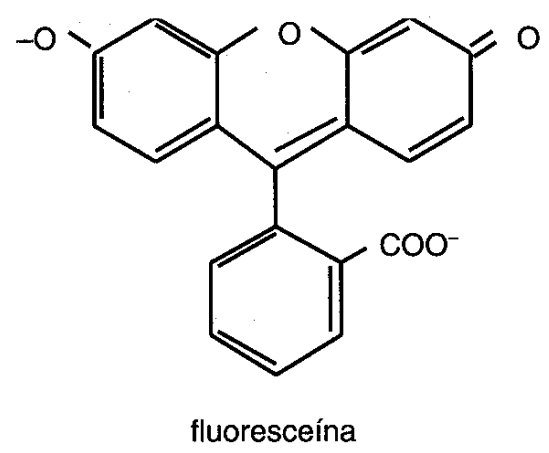
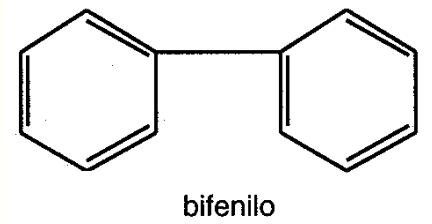
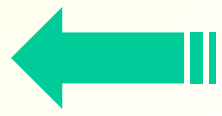
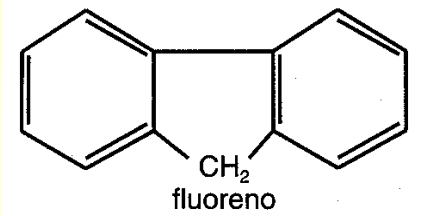


# Niveles de energía de un sistema fotoluminiscente





➡ Rigidez estructural ⇔ ↑ la fluorescencia

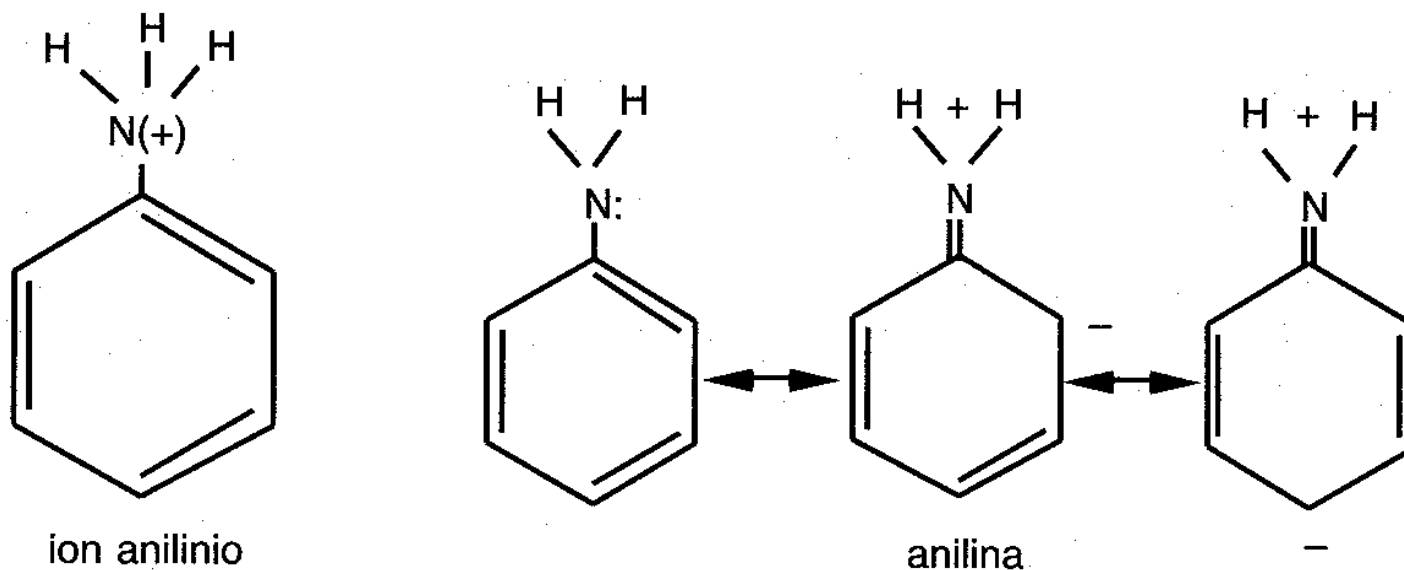


fluorescentes

no fluorescentes

# Influencia del pH

- El espectro de fluorescencia de compuestos aromáticos con grupos ácidos o básicos es sensible al pH
- Cambios en la emisión provienen del n° de **espectros resonantes**  $\neq$  que puede asociarse a la molécula en su forma ácida o básica
- La variación de la fluorescencia en función del pH puede emplearse para evaluar PF en volumetrías ácido-base
- Cambian los niveles electrónicos y cambia la probabilidad de la transición  $\pi^* \rightarrow \pi$



# Relación entre intensidad y concentración

$$I_F \propto \downarrow [ ]$$

fracción de radiación transmitida  $T = P / P_0 = 10^{-\varepsilon b c}$

fracción absorbida  $1 - (P / P_0) = 1 - 10^{-\varepsilon b c}$

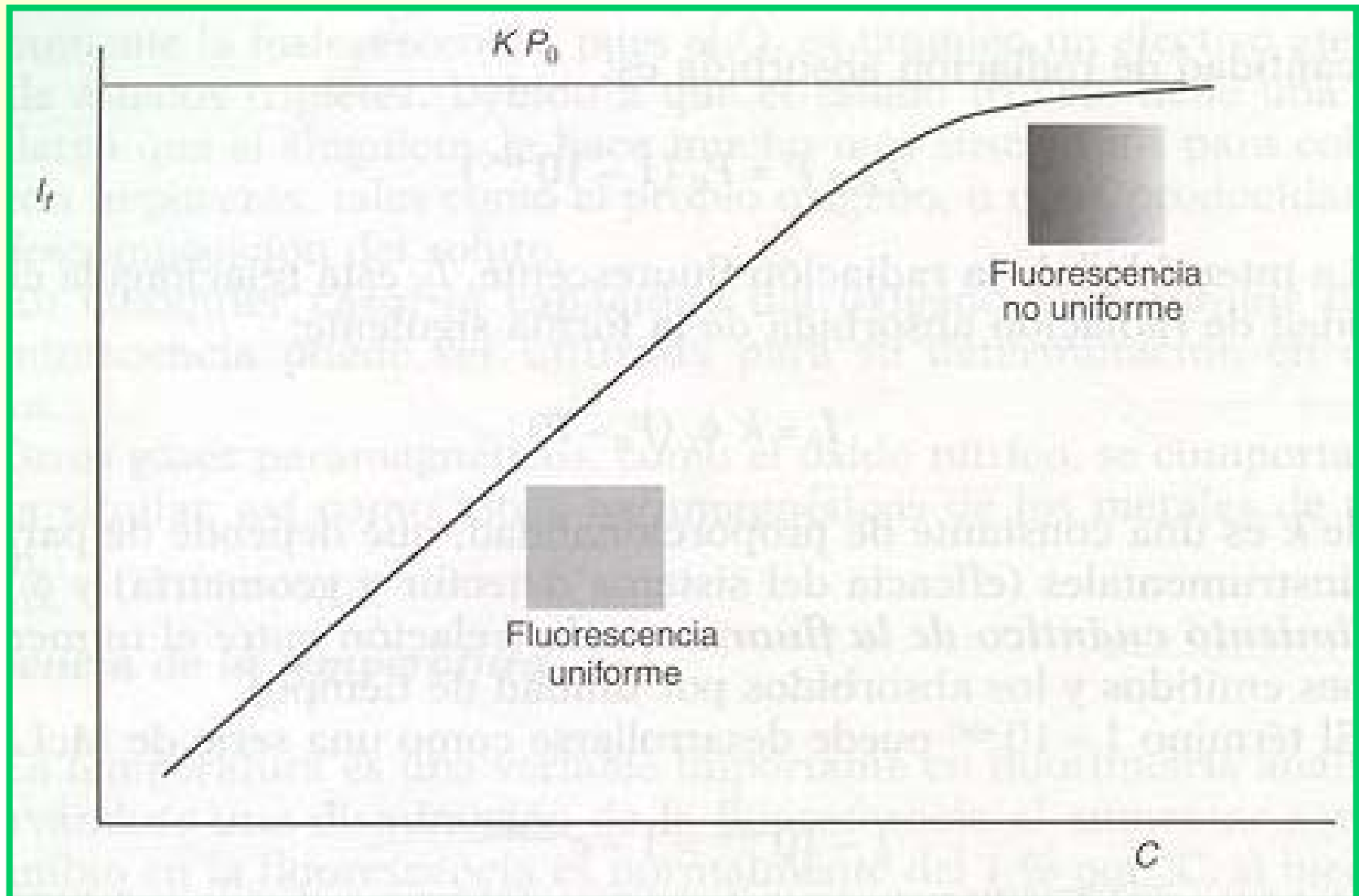
cantidad absorbida  $P_0 - P = P_0 (1 - 10^{-\varepsilon b c})$

$$I_f = k \Phi_f (P_0 - P)$$

- $\Phi_f$  = **rendimiento cuántico de la fluorescencia** = n° de fotones emitidos / n° de fotones absorbidos por unidad de tiempo
- **k** = Constante de proporcionalidad que depende de parámetros instrumentales como la eficacia del detector y geometría

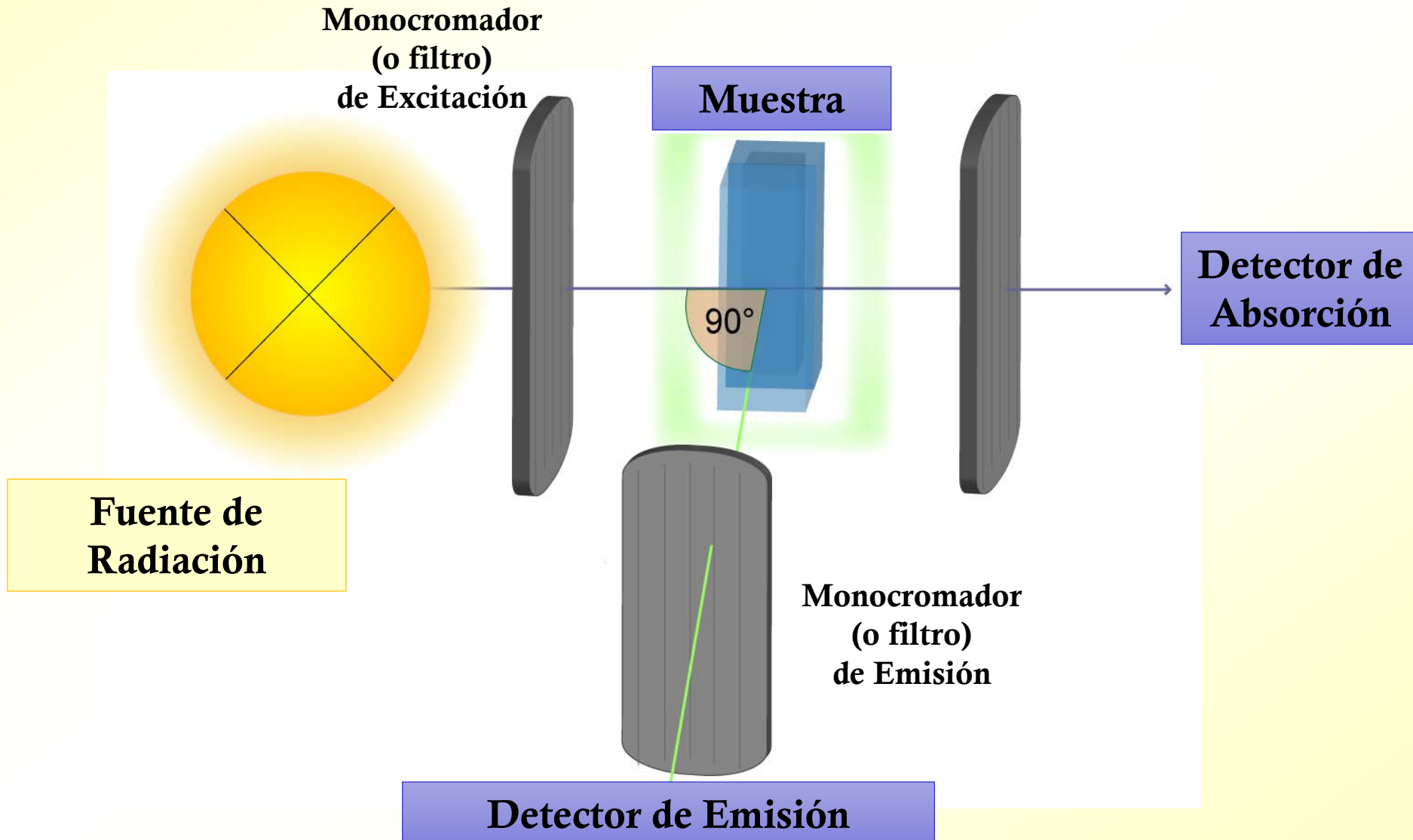
$$I_f \propto [ ]$$

## Relación entre intensidad y concentración



# INSTRUMENTACION

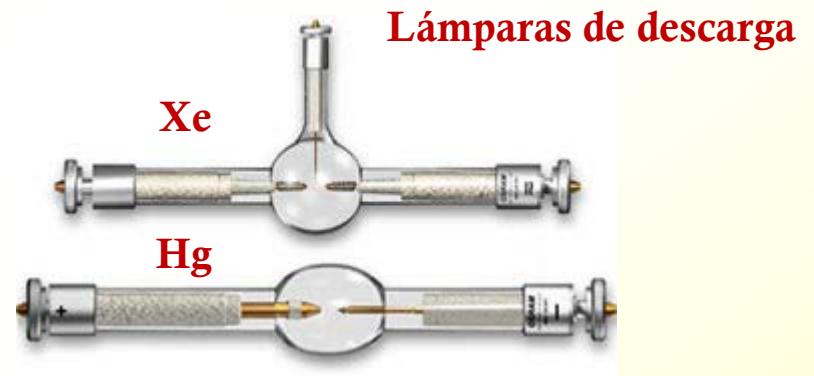
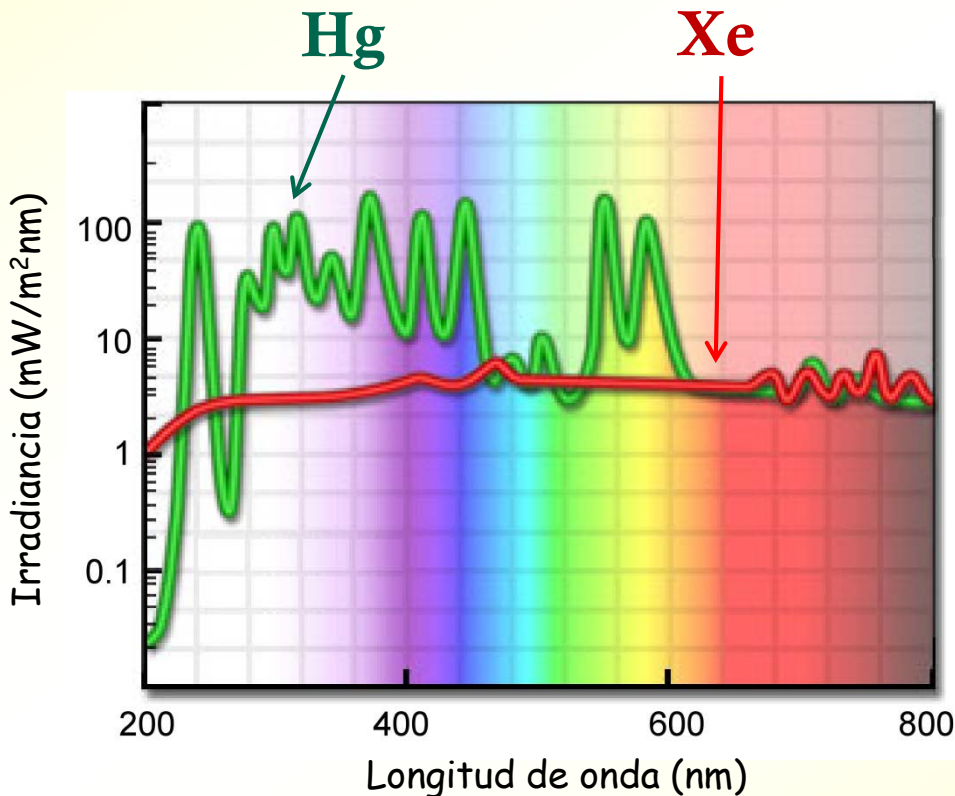
## Componentes básicos de un fluorímetro



# INSTRUMENTACION

## Fuente de Radiación

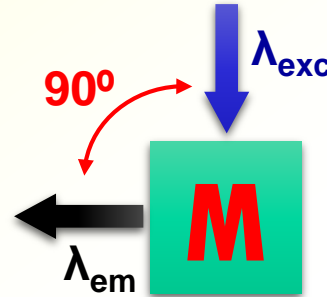
- Lámpara de arco de mercurio (Fluorímetros de filtro)
- Lámpara de descarga de xenón a alta presión (15 - 40 W)
- Lámpara pulsada de xenón (0,1 - 10 Hz)
- Láser



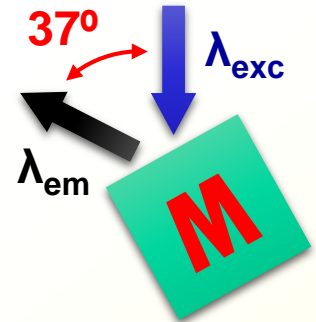
# INSTRUMENTACION

Portamuestras

Muestras con  
absorbancias  
pequeñas



Muestras con  
absorbancias  
elevadas



Cubetas de cuarzo con los  
cuatro lados transparentes

Detector

- Tubo Fotomultiplicador

# Espectros de excitación y de emisión

**Espectro de excitación** mide la intensidad de fluorescencia en función de  $\lambda_{ex}$  a una determinada  $\lambda_{em}$

- se fija  $\lambda_{em}$  y se varía  $\lambda_{ex}$
- espectro equivalente al de absorción, sino se producen reacciones fotoquímicas o procesos fotofísicos desde niveles excitados, y siempre que esté corregido

**Espectro de emisión**, mide la intensidad de emisión fluorescente en función de  $\lambda_{em}$  a una  $\lambda_{ex}$  fija

- se fija  $\lambda_{ex}$  y se mide la radiación emitida a  $\neq \lambda_{em}$

