

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

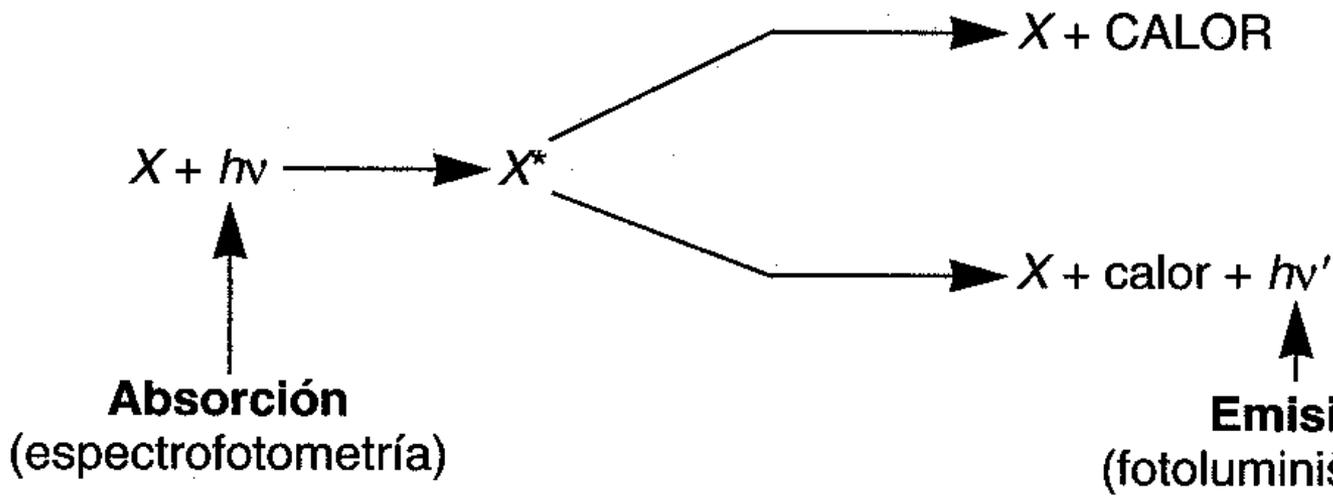
- ✿ Introducción
- ✿ Fundamentos de la Luminiscencia
- ✿ Factores que afectan a la fluorescencia
 - Estructura molecular
 - Factores medioambientales
 - Efecto del disolvente
 - Influencia del pH
 - Influencia del Oxígeno
 - Influencia de la temperatura
- ✿ Relación entre la intensidad y concentración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



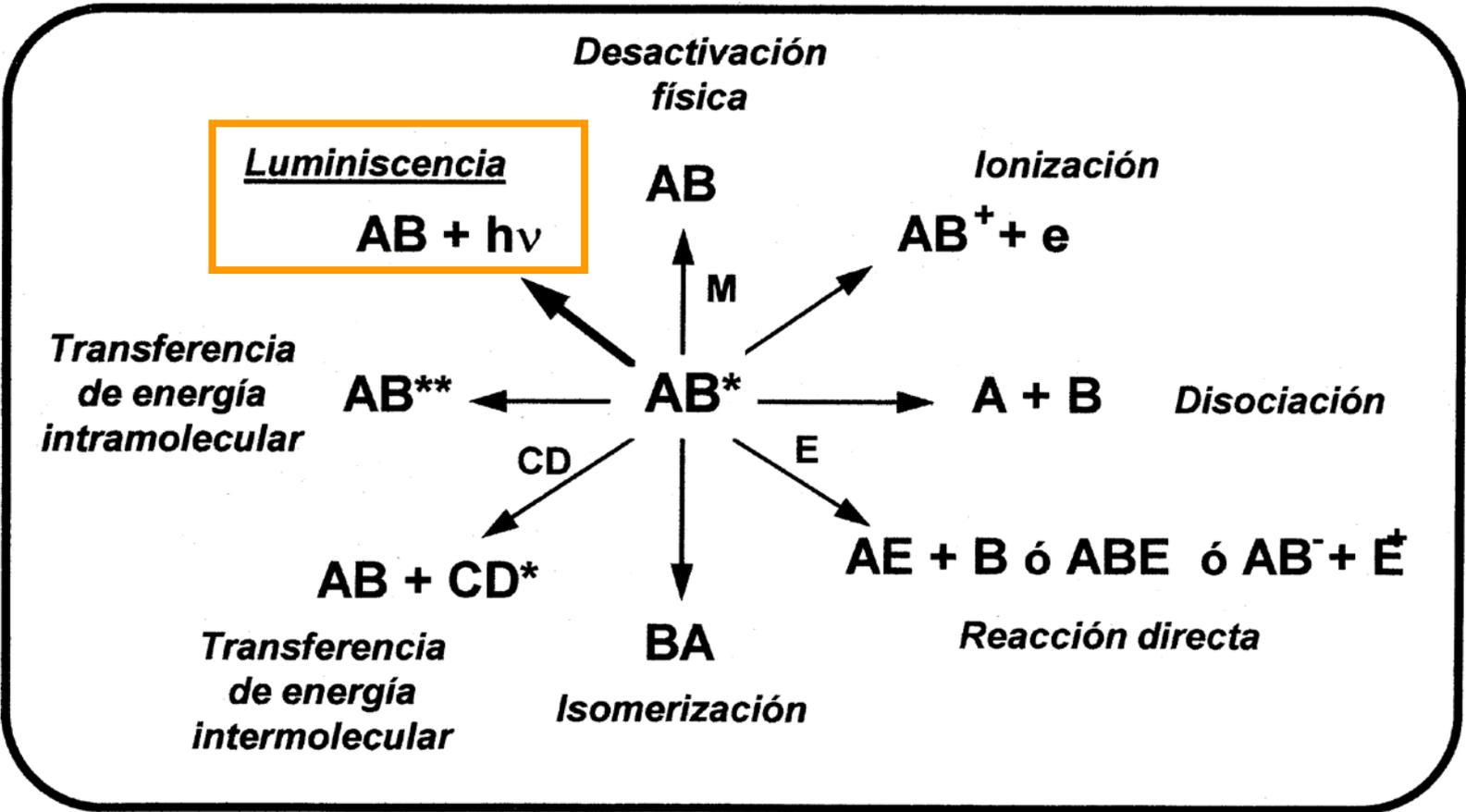


BIBLIOGRAFÍA

1. SKOOG, HOLLER & NIEMAN, “Principios de Análisis Instrumental”, 5^a 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 (01-10-2017)

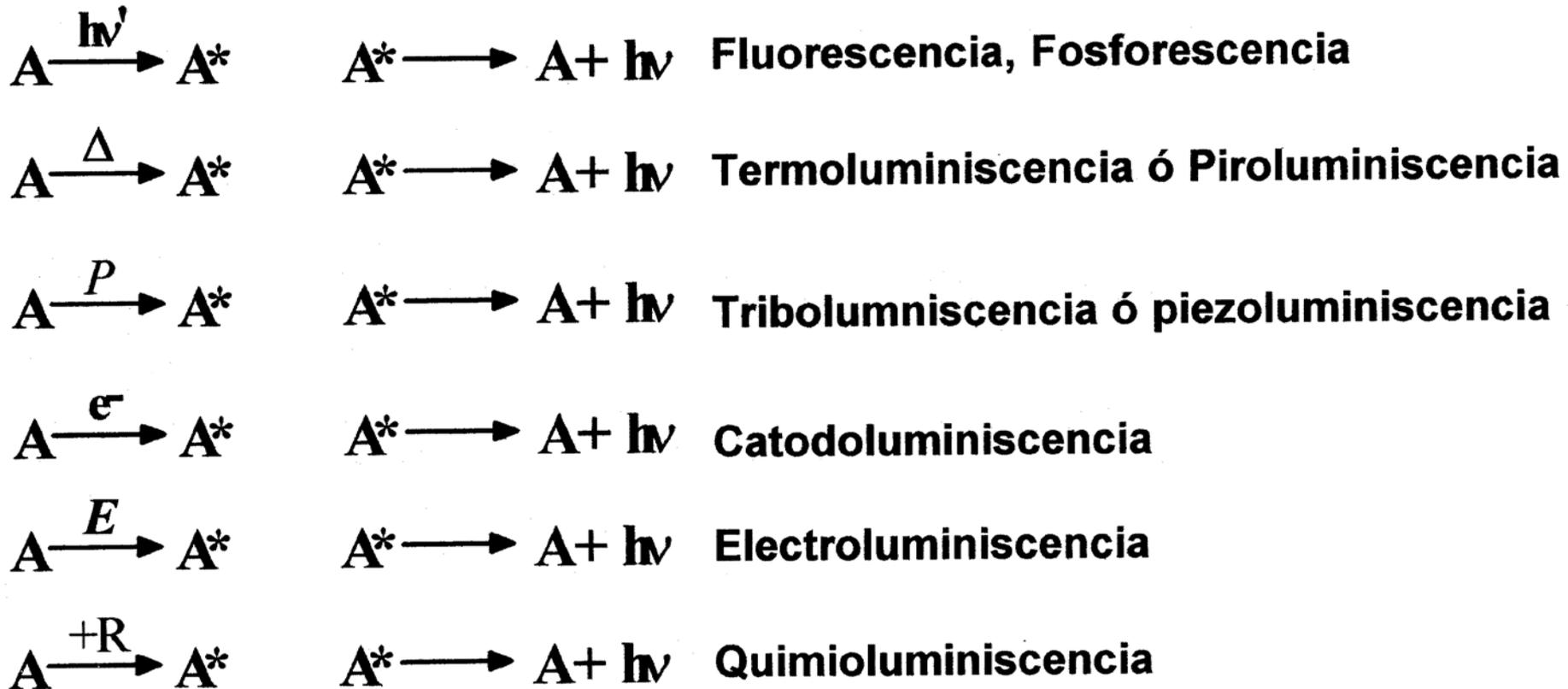


**Emisión
de la
adiación**



Luminiscencia

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

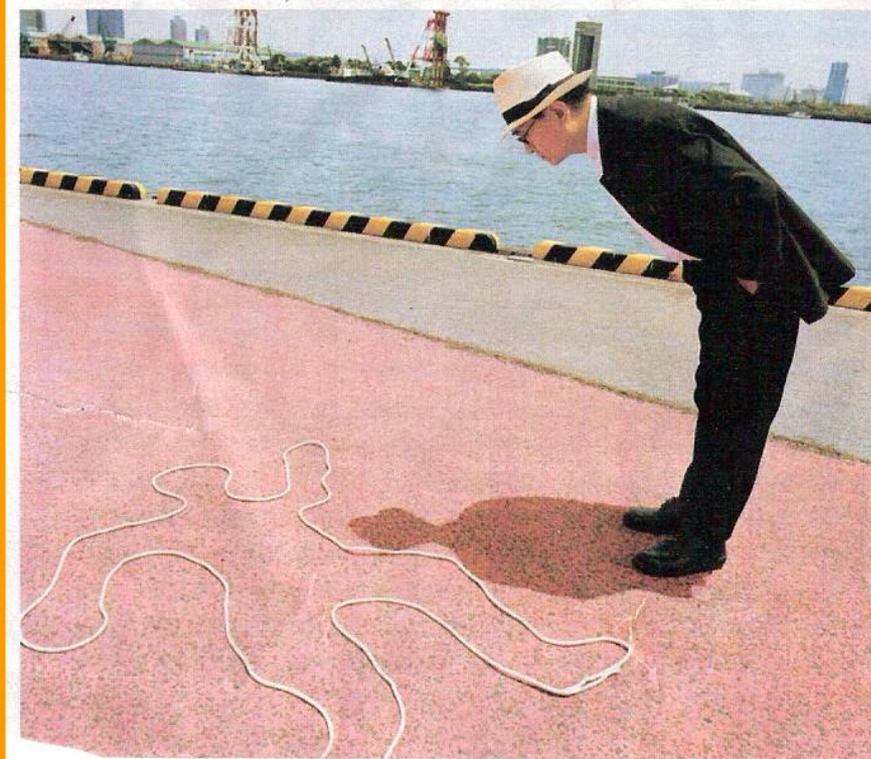


Quimioluminiscencia

¿Qué es el luminol?

FERNANDO SUR K. CORREO ELECTRÓNICO

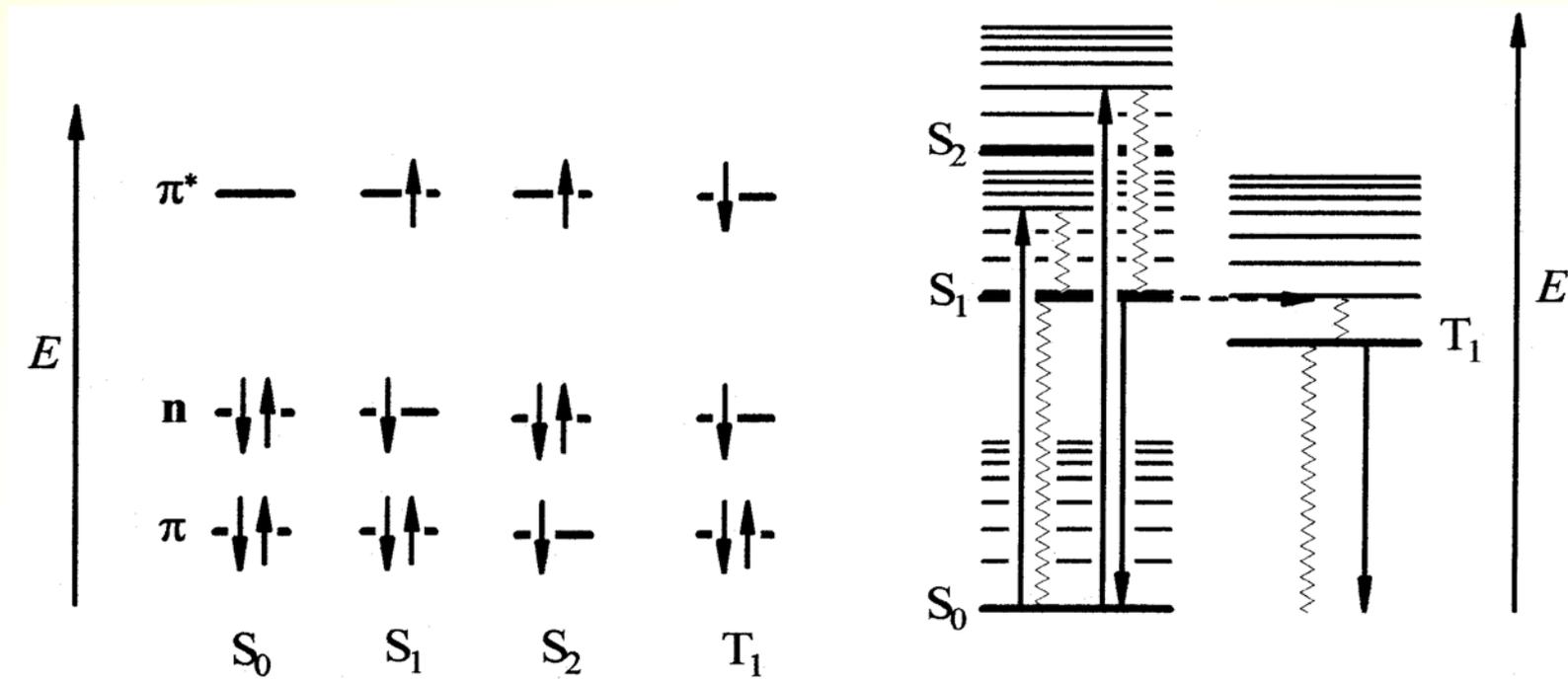
En las series policíacas, como *CSI*, los investigadores rocían con un *spray* el escenario del crimen para detectar manchas de sangre invisibles al ojo desnudo. Se trata del luminol, **un producto que contiene una molécula que, en determinadas condiciones químicas, emite una pequeña luz**. Si la molécula 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. ■



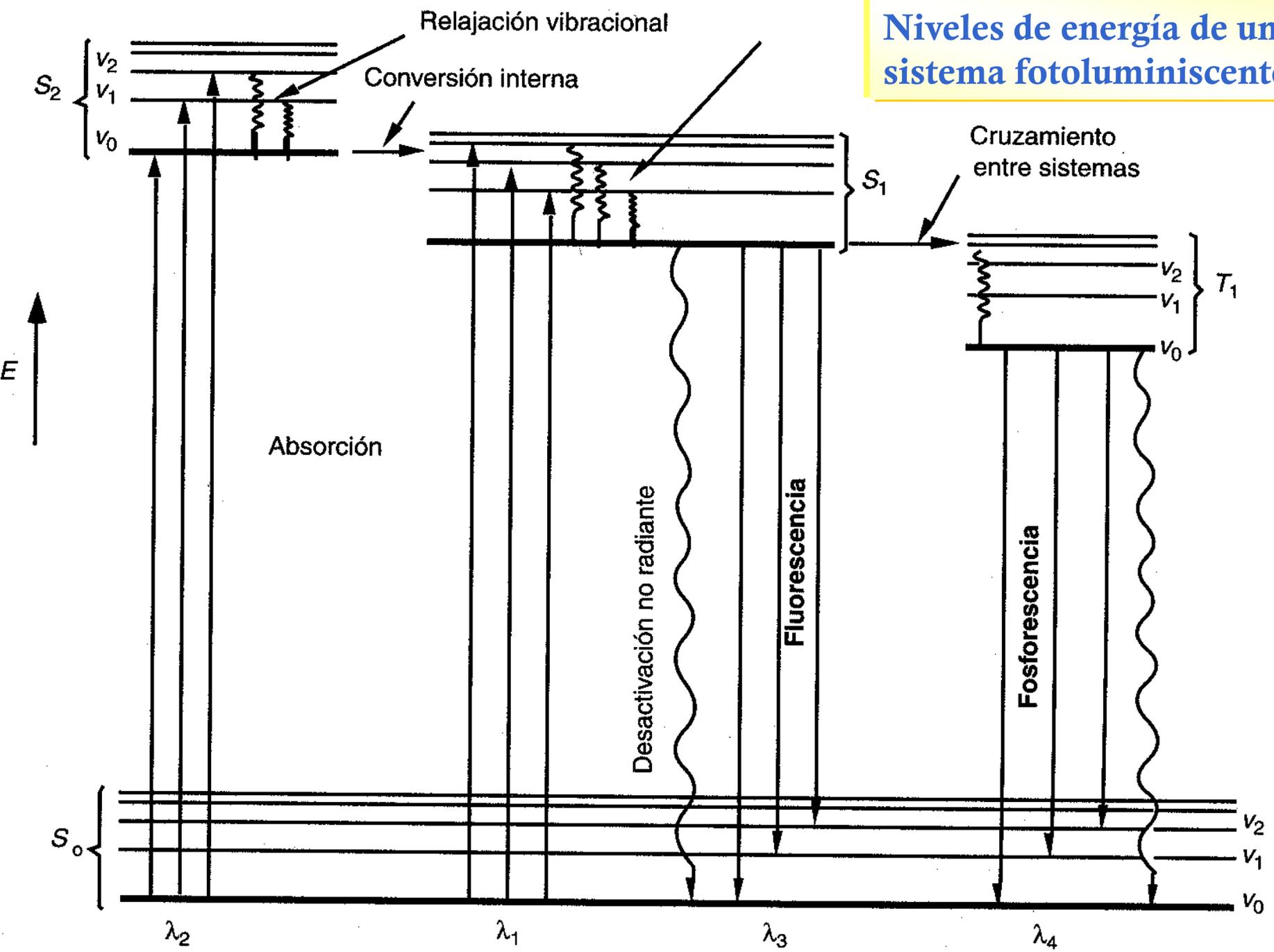
Fundamento

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

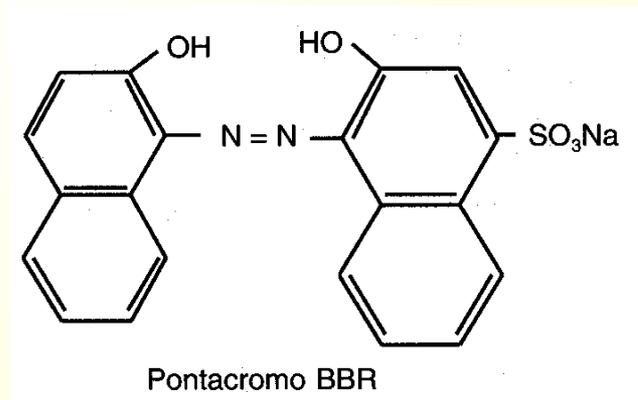
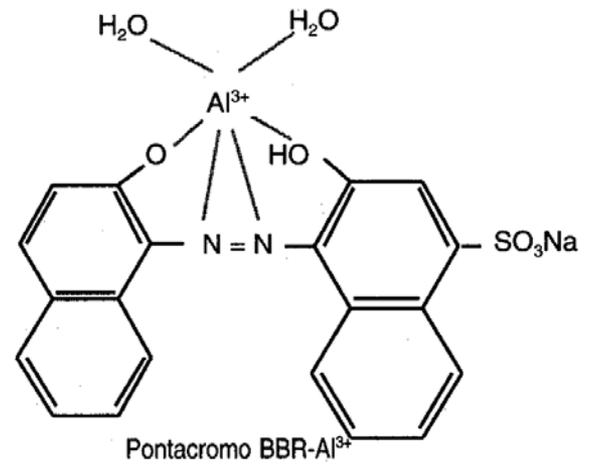
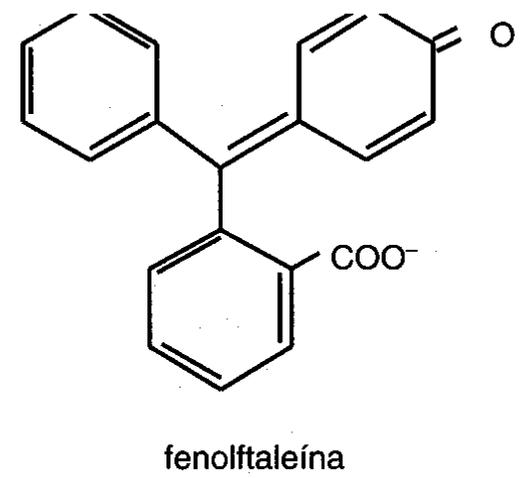
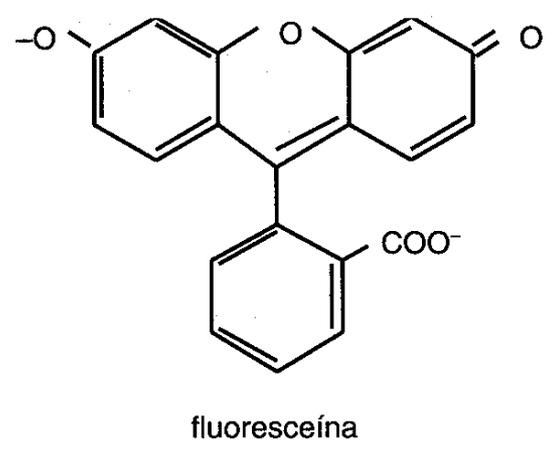
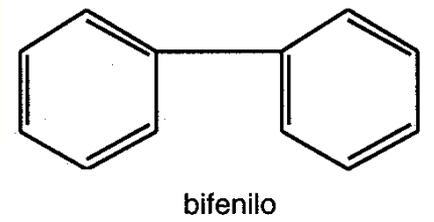
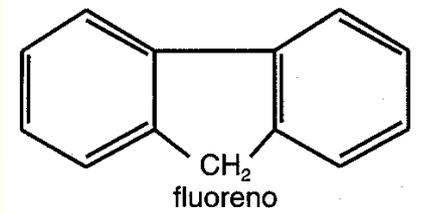
- ✿ multiplicidad de la molécula $M = 2S + 1$
 - **S**: número cuántico de espín = suma de espines de sus e^-
- ✿ moléculas con un número par de e^- $S = 0$ y $M = 1 \Rightarrow$ estado de energía **singlete**
- ✿ **estado singlete fundamental**: estado energético más bajo en el cual todos e^- están 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

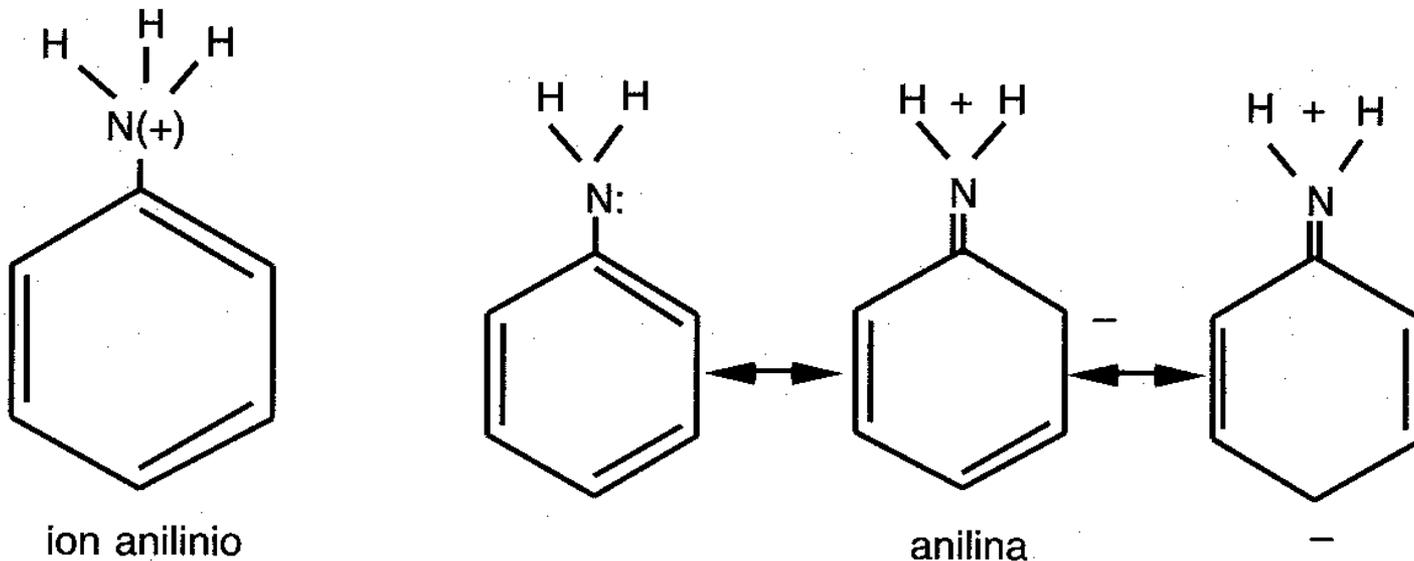


fluorescentes

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

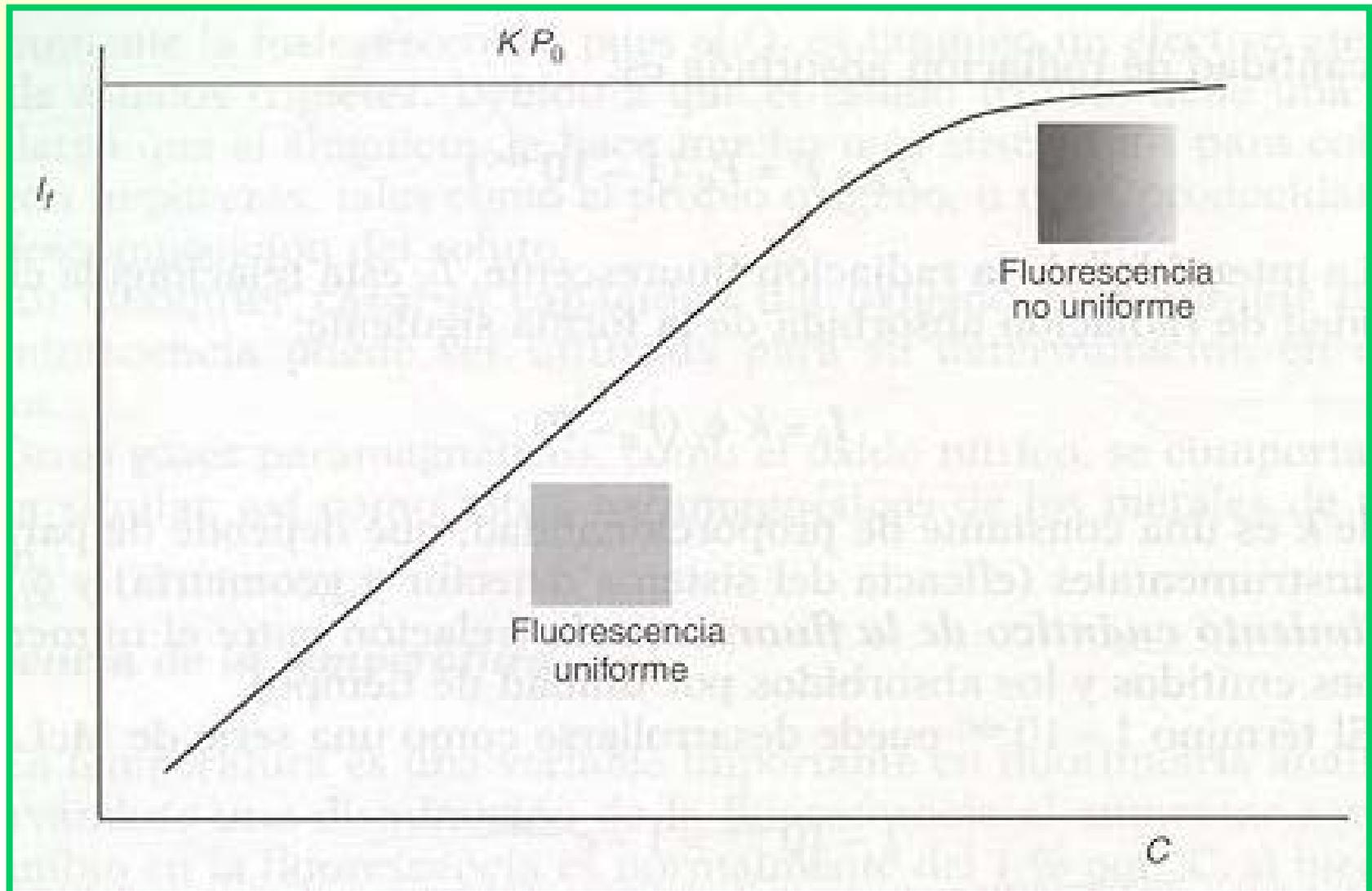
cantidad absorbida $P_0 - P = P_0 (1 - 10^{-\varepsilon b c})$

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

- Φ_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

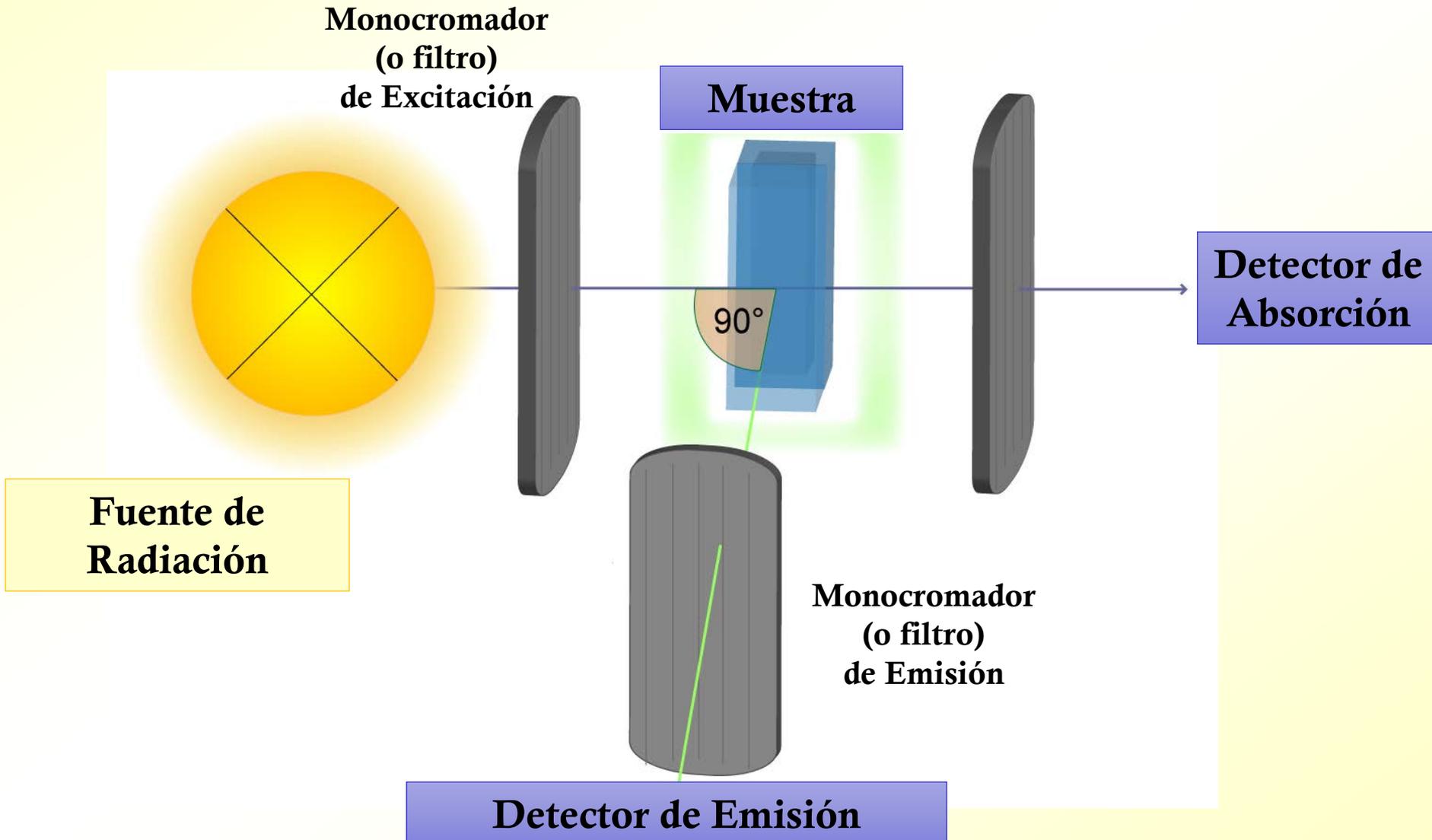
$$I_f \propto []$$

Relación entre intensidad y concentración



INSTRUMENTACION

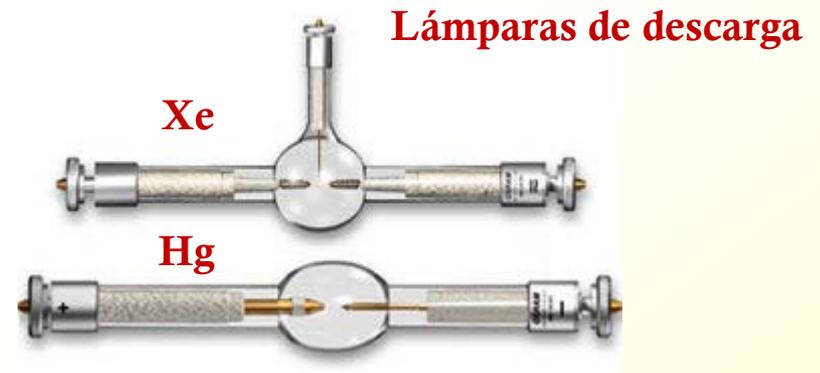
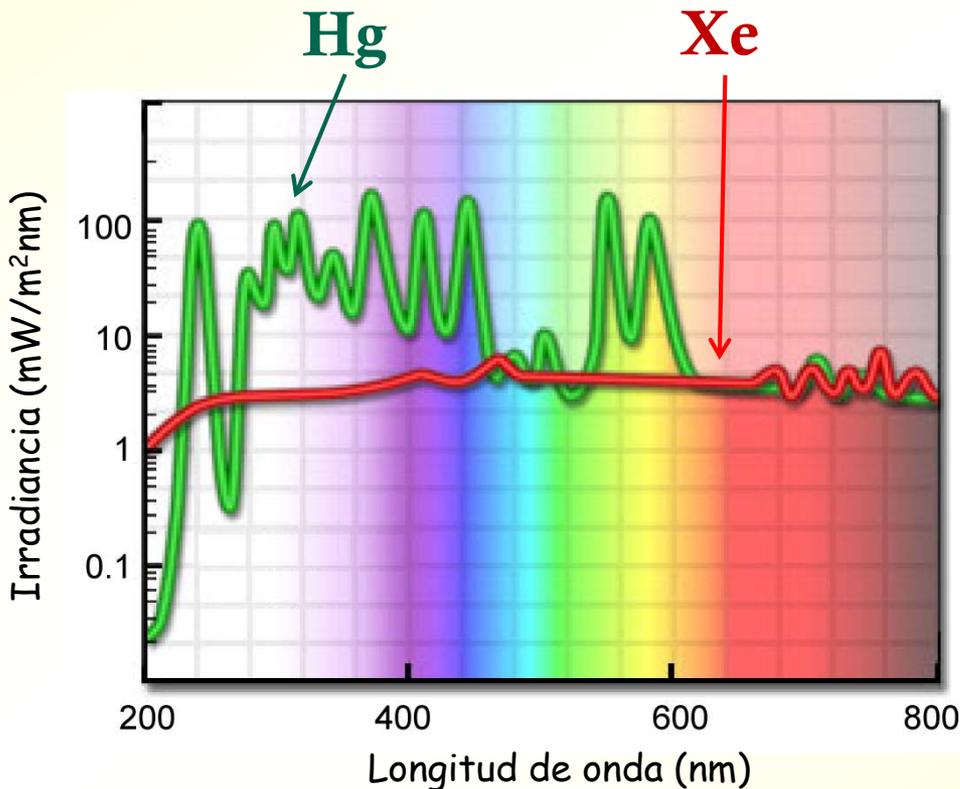
Componentes básicos de un fluorímetro



INSTRUMENTACION

Fuente de Radiación

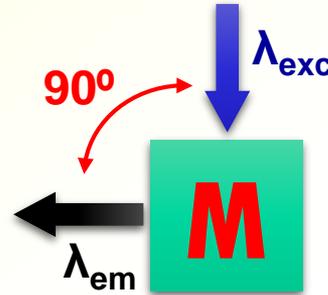
- Lámpara de arco de mercurio (Fluorímetros de filtro)
- Lámpara de descarga de xenón a alta presión (15 - 40 W)
- Lámpara pulsada de xenón (0,1 - 10 Hz)
- Láser



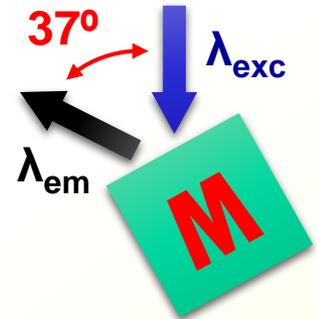
INSTRUMENTACION

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 λ_{ex} a una determinada λ_{em}

- se fija λ_{em} y se varía λ_{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 λ_{em} a una λ_{ex} fija

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

