

Tema 5.- Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de emisión molecular en la zona UV-visible: Espectrofluorimetría

El instrumento: parámetros de interés y calibración.-
Descripción de aplicaciones frecuentes.- Selección de procedimientos adecuados para problemas concretos.-
Uso de la espectrofluorimetría como sistema de detección en otras técnicas instrumentales

Variables que afectan a la fluorescencia y a la fosforescencia

Tanto la estructura molecular como el entorno químico van a influir en que una sustancia sea o no luminiscente

Estos factores también determinan la intensidad de emisión cuando tiene lugar la fotoluminiscencia.

Rendimiento cuantico

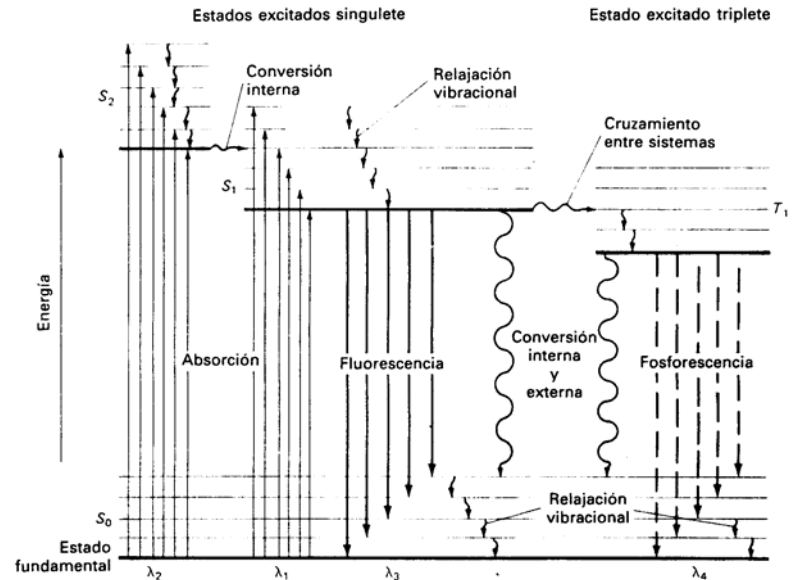
El *rendimiento cuantico*, o la *eficacia cuántica*, de fluorescencia o de fosforescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten luminiscencia respecto al número total de moléculas excitadas.

Para moléculas altamente fluorescentes como la fluoresceína, la eficacia cuantica, bajo determinadas condiciones, se aproxima a la unidad.

Las especies químicas que no presentan una fluorescencia apreciable tienen eficacias que se aproximan a cero.

El rendimiento cuántico de fluorescencia ϕ para un compuesto se puede calcular a partir de las constantes de velocidad relativas k_x de los procesos por los que el estado singulete excitado más bajo se desactiva:

- fluorescencia (k_f), cruce entre sistemas (k_{ces}), conversión externa (k_{ce}), conversión interna (k_{ci}), predissociación (k_{pd}) y disociación (k_d)



$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ces} + k_{ce} + k_{ci} + k_{pd} + k_d}$$

Tipos de transiciones en fluorescencia

- Es importante resaltar que la fluorescencia rara vez es consecuencia de la absorción de radiación ultravioleta de longitud de onda menor de 250 nm, ya que tal radiación es suficientemente energética como para producir la desactivación de los estados excitados por predisociación o disociación.
- Por ejemplo, una radiación de 200 nm corresponde a aproximadamente 140 kcal/mol; la mayoría de las moléculas tienen al menos algún enlace que se puede romper con energías de esta magnitud. Como consecuencia, rara vez se observa fluorescencia causada por transiciones σ, σ^* .
- Este proceso de emisión está asociado a transiciones menos energéticas Π^*, Π , y Π^*, n .
- Como ya se ha dicho, una molécula en su estado electrónico excitado normalmente pasa a su *estado excitado más bajo* mediante una serie de relajaciones vibracionales rápidas y conversiones internas que no producen emisión de radiación.
- La fluorescencia surge, generalmente, de una transición desde el nivel vibracional más bajo del primer estado electrónico excitado a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental.
- Para la mayoría de los compuestos fluorescentes, la radiación se produce por una transición n, Π^* o Π, Π^* , dependiendo de cuál de ellas sea la menos energética.

Eficacia cuántica y tipo de transición

- Empíricamente se observa que la fluorescencia se encuentra con más frecuencia en los compuestos con transiciones de más baja energía es del tipo Π, Π^* . Las transiciones de menor energía, n, Π^* , están menos favorecidas. Por tanto la eficiencia cuántica es más elevada para transiciones Π, Π^* .
- La mayor eficacia cuántica asociada a la transición Π, Π^* , se explica de dos maneras:
 - la absorptividad molar de una transición Π, Π^* es normalmente de 100 a 1.000 veces superior que a la de un proceso n, Π^* , y este valor representa una medida de la probabilidad de la transición en ambas direcciones. El tiempo de vida inherente asociado con una transición Π, Π^* es más corto (10^{-9} a 10^{-7} s comparado con 10^{-7} a 10^{-5} s para una transición n, Π^*).
 - Consideraciones termodinámicas sugieren que la constante de velocidad del cruce entre sistemas *k_{ces}* es menor para estados excitados Π, Π^* ya que la diferencia de energía entre los estados singulete/triplete es grande; esto es, se requiere más energía para desaparecer los electrones del estado excitado Π^* . Como consecuencia, el solapamiento de los niveles vibracionales del triplete con los del estado singulete es menor y la probabilidad de que ocurra un cruce entre sistemas es menor.
- En resumen, la fluorescencia está más asociada con transiciones Π, Π^* , ya que tales transiciones presentan tiempos de vida medios más cortos y porque es menos probable que tengan lugar los procesos de desactivación que compiten con la fluorescencia

Fluorescencia y estructura

- La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de baja energía.
- Los compuestos que contienen grupos carbonilo en estructuras alifáticas y alicíclicas o estructuras con dobles enlaces altamente conjugados también pueden presentar fluorescencia, pero el número de estos compuestos es pequeño comparado con el número de sistemas aromáticos.
- La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica normalmente aumenta con el número de anillos y con su grado de condensación.
- Los heterociclos sencillos, como la piridina, el furano, el tiofeno y el pirrol, no presentan fluorescencia; por otro lado, las estructuras condensadas con estas normalmente sí la presentan.
- En los heterociclos con nitrógeno, se cree que la transición electrónica de más baja energía implica a un sistema $n \rightarrow \pi^*$ que rápidamente se transforma en un estado triplete e impide la fluorescencia. Sin embargo, la condensación de anillos bencénicos para dar núcleos heterocíclicos, da lugar a un aumento en la absorptividad molar del pico de absorción.
- En estas estructuras, el tiempo de vida del estado excitado es más corto, así, se observa fluorescencia en compuestos como la quinolina, la isoquinolina y el indol.



Efectos de la sustitución en el anillo

- La sustitución en el anillo bencénico provoca desplazamientos en la longitud de onda de los máximos de absorción y los correspondientes cambios en los picos de fluorescencia.
- Además, la sustitución afecta frecuentemente a la eficacia de la fluorescencia; alguno de estos efectos se ilustran con los datos de los derivados bencénicos de la Tabla.
- La influencia de la introducción de halógenos es sorprendente. El descenso de fluorescencia se produce al aumentar el número atómico del halógenos debido, en parte, al efecto del átomo pesado, que aumenta la probabilidad para el cruce entre sistemas hacia el estado triplete.
- Se cree que la predisiociación juega un papel importante tanto en el iodobenceno como en los nitroderivados; estos compuestos tienen enlaces de fácil ruptura que pueden absorber la energía de excitación seguida de una conversión interna.
- La adición de un ácido carboxílico o de un grupo carbonilo en un anillo aromático generalmente inhibe la fluorescencia. En estos compuestos, la energía de la transición $n \rightarrow \pi^*$ es menor que la de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Por ello, el rendimiento de la fluorescencia es normalmente menor para el sistema del primer tipo.

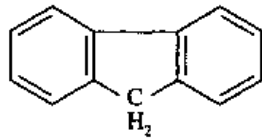
Efecto de la sustitución en la fluorescencia

TABLA 15-1. Efecto de los sustituyentes en la fluorescencia del benceno^a

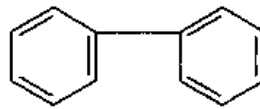
Compuesto	Fórmula	Longitud de onda de fluorescencia, nm	Intensidad de fluorescencia relativa
Benceno	C_6H_6	270-310	10
Tolueno	$C_6H_5CH_3$	270-320	17
Propilbenceno	$C_6H_5C_3H_7$	270-320	17
Fluorobenceno	C_6H_5F	270-320	10
Clorobenceno	C_6H_5Cl	275-345	7
Bromobenceno	C_6H_5Br	290-380	5
Yodobenceno	C_6H_5I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

Efecto de la rigidez estructural

- Empíricamente se comprueba que la fluorescencia está favorecida en moléculas con estructuras rígidas.
- Las eficacias cuánticas para el fluoreno y el bifenilo son proximas a 1,0 y 0,2, respectivamente, bajo condiciones de medida similares.
- La diferencia en el comportamiento es el aumento en la rigidez proporcionado por el puente que forma el grupo metileno en el fluoreno. Se pueden citar muchos ejemplos similares.

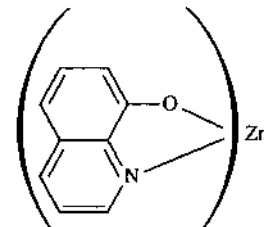


Fluoreno



Bifenilo

- También se ha recurrido a la influencia de la rigidez estructural para explicar el aumento de la fluorescencia de ciertos agentes quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico.
- La intensidad de fluorescencia de la 8-hidroxiquinolina es mucho menor que la de su complejo con cinc:



Efecto de la rigidez

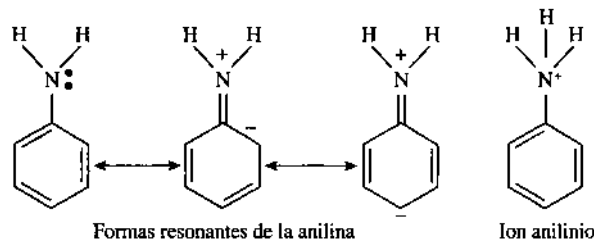
- La falta de rigidez de una molécula probablemente provoca un aumento de la velocidad de conversión interna y un aumento en la probabilidad de desactivación no radiante.
- Una parte de una molécula no rígida puede sufrir vibraciones de baja frecuencia respecto a sus otras partes y tales movimientos indudablemente explican ciertas pérdidas de energía no radiantes.

Efectos de la temperatura y del disolvente

- La eficacia cuántica de fluorescencia disminuye en la mayoría de las moléculas al aumentar la temperatura, ya que al aumentar la frecuencia de las colisiones, cuando la temperatura es elevada, aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa.
- Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de la conversión externa y conduce al mismo resultado.
- La fluorescencia de una molécula se reduce en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con dichos átomos en su estructura; como por ejemplo, el tetrabromuro de carbono y el yoduro de etilo. El efecto es similar al observado cuando se introducen, por sustitución de átomos pesados en compuestos fluorescentes
- En estos casos, las interacciones espín-orbital provocan un aumento en la velocidad de formación de tripletes y en la correspondiente disminución de la fluorescencia.
- Cuando se desea exaltar la fosforescencia se incorporan con frecuencia a los disolventes compuestos que contienen átomos pesados

Efecto del pH en la fluorescencia

- La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos y básicos en el anillo depende del pH
- Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para las formas ionizadas o no ionizadas del compuesto. La Tabla anterior ilustra este efecto con datos para el fenol y la anilina.
- Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo surgen del distinto número de especies resonantes asociadas con las formas ácidas y básicas de las moléculas.
- Por ejemplo, la anilina tiene varias formas resonantes mientras que el ion anilinio sólo una. Esto es,



Efecto del pH en la fluorescencia

- Cuanto mayor es el número de formas resonantes, mayor es la estabilidad del primer estado excitado; la consecuencia es una fluorescencia en la región ultravioleta.
- La influencia del pH en la fluorescencia de ciertos compuestos se ha utilizado para la detección de puntos finales en valoraciones ácido/base.
- Por ejemplo, la fluorescencia de la forma fenólica del ácido 1-naftol-4-sulfónico no es detectable por el ojo humano, ya que tiene lugar en la región ultravioleta. Sin embargo, cuando el compuesto se convierte en ion fenolato debido a la adición de una base, el pico de emisión se desplaza hacia longitudes de onda de la región visible donde puede verse claramente.
- Es interesante resaltar que este cambio tiene lugar a un pH diferente al esperado por la constante de disociación del compuesto. La explicación de esta discrepancia es que la constante de disociación ácida para la molécula *excitada* difiere de la constante de la misma especie en el estado fundamental.
- Los cambios en las constantes de disociación de ácidos y bases con la excitación son normales y algunas veces son hasta cuatro o cinco órdenes de magnitud superiores

Efecto del oxígeno disuelto

- La presencia de oxígeno disuelto suele reducir la intensidad de fluorescencia de una disolución.
- Este efecto puede ser el resultado de una oxidación de las especies fluorescentes inducida fotoquímicamente.
- Sin embargo, con más frecuencia la amortiguación (*quenching*) tiene lugar como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, que favorecen el cruce entre sistemas y la conversión de las moléculas excitadas al estado triplete.
- Otras especies paramagnéticas también tienden a amortiguar la fluorescencia

Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia

- La potencia de la emisión fluorescente F es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación absorbido por el sistema.

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

- donde P_0 es la potencia del haz que incide sobre la disolución y P es su potencia después de atravesar una longitud b del medio.
- La constante K' depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia.
- Con el objeto de relacionar F con la concentración c de la especie fluorescente, se escribe la ley de Beer de la forma

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-abc}$$

- donde ε es la absorptividad molar de las moléculas fluorescentes y εbc es la absorbancia, A .
- Sustituyendo una ecuación en la otra se tiene:

$$F = K' P_0 (1 - 10^{-\varepsilon bc})$$

- El término exponencial puede desarrollarse como una serie de Maclaurin

$$F = K' P_0 \left[2,303 \varepsilon bc - \frac{(2,303 \varepsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303 \varepsilon bc)^3}{3!} \dots \right]$$

- Siempre que $2,303 \varepsilon bc = A < 0,05$, los términos posteriores del corchete son despreciables respecto al primero
- En estas condiciones, el error relativo máximo cometido al despreciar todos los términos excepto el primero es de 0,13 por 100.
- Por ello, se puede escribir

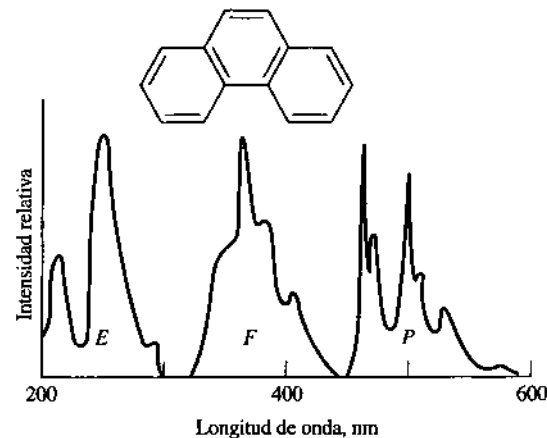
$$F = 2,3 K' \varepsilon bc P_0$$

$$F = Kc$$

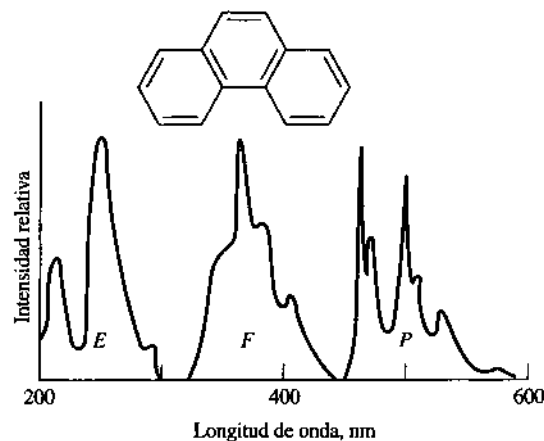
- La representación gráfica de la potencia fluorescente de una disolución frente a la concentración de las especies emisoras debería ser lineal a bajas concentraciones.
- Cuando c es tan elevada que la absorbancia es mayor que aproximadamente 0,05, los términos de mayor orden de la ecuación anterior adquieren importancia y la linealidad se pierde; entonces F toma un valor inferior al obtenido en la extrapolación de la línea recta de la representación gráfica.
- Otros dos factores, responsables también de las desviaciones negativas de la linealidad a elevadas concentraciones, son la *autoamortiguación* y la *autoabsorción*.
 - El primero es el resultado de colisiones entre moléculas excitadas. La transferencia de energía por vía no radiante sucede, quizás, de una manera análoga, a como ocurre la transferencia de energía a las moléculas del disolvente en una conversión externa. Se puede esperar que la autoamortiguación aumente con la concentración debido a la mayor probabilidad de que tengan lugar colisiones.
 - La autoabsorción tiene lugar cuando la longitud de onda de emisión se solapa con un pico de absorción; la fluorescencia, entonces, disminuye porque la radiación emitida atraviesa la disolución y es reabsorbida por otras moléculas fluorescentes.

Espectros de emisión y excitación

- La Figura muestra los tres tipos de espectros fotoluminiscentes del fenantreno.
- Los espectros de *excitación* (*E* en la figura) se obtienen midiendo la intensidad luminiscente a una longitud de onda fija mientras se varia la longitud de onda de excitación
- Como la primera etapa en la generación de la emisión fluorescente es la absorción de radiación, para crear los estados excitados, un espectro de excitación es prácticamente idéntico a un espectro de absorción realizado bajo las mismas condiciones.
- Por otro lado, los espectros de fluorescencia y de fosforescencia (*F* y *P*, respectivamente), suponen la excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la intensidad de emisión como función de la longitud de onda.

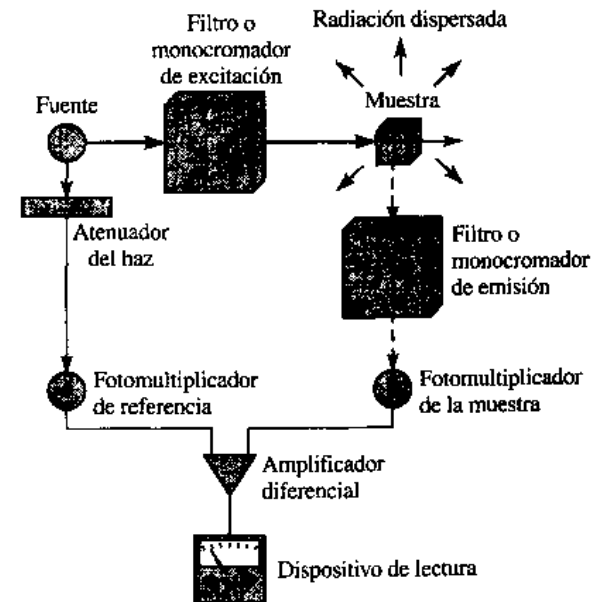


- Como ya se ha señalado, la fotoluminiscencia normalmente tiene lugar a longitudes de onda más largas que las longitudes de onda de excitación.
- Además, las bandas fosforescentes se encuentran, en general, a longitudes de onda más largas que las bandas de fluorescencia, ya que, en la mayoría de los casos, el estado triplete excitado tiene menor energía que el correspondiente estado singulete.
- De hecho, la diferencia de longitudes de onda entre los dos proporciona una medida útil de la diferencia de energía entre los estados excitados singulete y triplete.



INSTRUMENTOS PARA LA MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA Y LA FOSFORESCENCIA

- Los distintos componentes de los instrumentos para la medida de la fotoluminiscencia son similares a los que se encuentran en los fotómetros o espectrofotómetros ultravioleta/visible.
- La Figura muestra una configuración característica de estos componentes en los *fluorómetros* y los *espectrofluorímetros*.
- Casi todos los instrumentos de fluorescencia utilizan ópticas de doble haz tal como se muestra, para compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente.
- El haz de la muestra pasa primero a través de un filtro o un monocromador de excitación, que transmite la radiación que provocara la fluorescencia pero excluye o limita la radiación de la longitud de onda de la emisión fluorescente.



APLICACIONES Y METODOS FOTOLUMINISCENTES

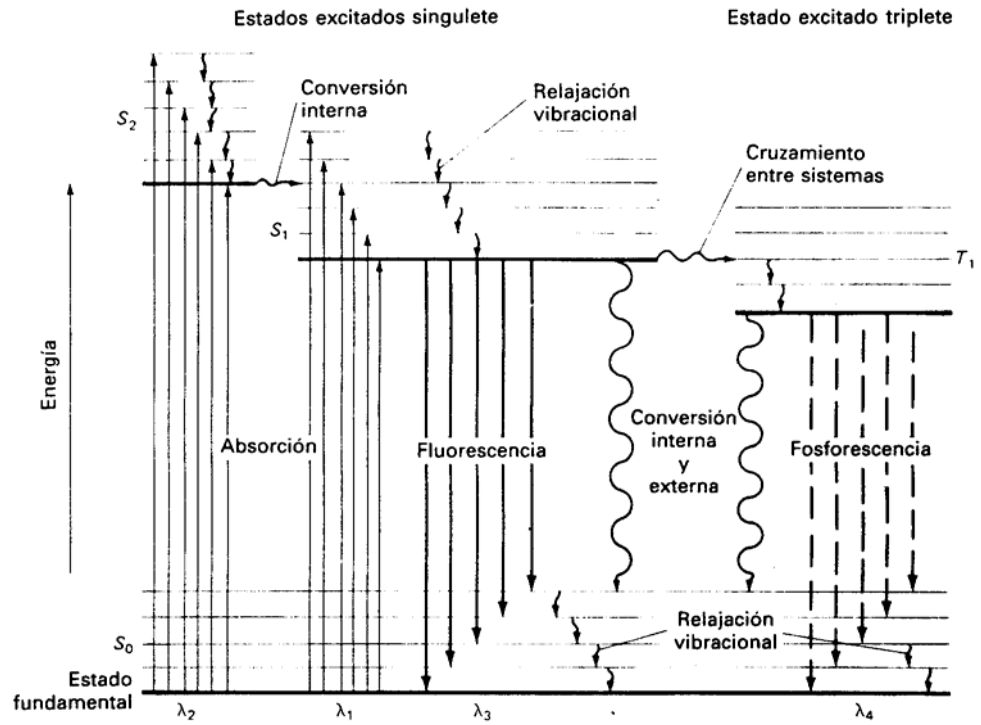
- Es inherente a los métodos fluorescentes y fosforescentes el ser aplicables a intervalos de concentración más bajos que las medidas espectrofotométricas de absorción y se encuentran entre las técnicas analíticas más sensibles.
- El aumento de sensibilidad se debe a que el parámetro relacionado con la concentración en fluorimetría y en fosforimetría F se puede medir independientemente de la potencia de la fuente P_0 .
- Por el contrario, una medida de absorbancia requiere la evaluación de P_0 y de P , ya que la absorbancia, que es proporcional a la concentración, depende de la relación entre estas dos cantidades.
- La sensibilidad de un método fluorimétrico puede mejorarse aumentando P_0 o mediante la amplificación adicional de la señal de fluorescencia.
- Por el contrario, en espectrofotometría, un aumento en P_0 da lugar a un cambio proporcional en P y, por ello, no afecta a la A .
- Por tanto, los métodos fluorimétricos tienen, generalmente, sensibilidades que son de uno a tres órdenes de magnitud superiores a los correspondientes de absorción.
- La precisión y la exactitud de los métodos fotoluminiscentes son habitualmente más pobres que las de los procedimientos espectrofotométricos en un factor entre, quizás, dos y cinco. Generalmente, los métodos fosforescentes son menos precisos que sus correspondientes métodos fluorescentes.

Determinación fluorimétrica de especies inorgánicas

- Los métodos inorgánicos fluorimétricos son de dos tipos.
 - Métodos directos que conllevan la formación de un quelato fluorescente y la medida de su emisión.
 - Métodos basados e basa en el descenso de la fluorescencia que resulta de la acción amortiguadora de la sustancia que va a ser determinada.
- La ultima técnica se ha utilizado más en la determinación de aniones.

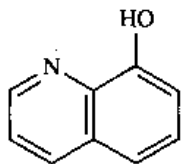
Cationes que forman quelatos fluorescentes

- Existen dos factores que limitan enormemente el número de iones de metales de transición que forman quelatos fluorescentes.
- En primero lugar, muchos de estos iones son paramagnéticos; esta propiedad aumenta la velocidad de cruce entre sistemas al estado triplete. Por tanto, la desactivación por fluorescencia es poco probable, aunque puede observarse fosforescencia.
- Un segundo factor es que los complejos de los metales de transición se caracterizan por presentar muchos niveles de energía poco espaciados, que aumenta la probabilidad de desactivación por conversión interna.
- Los iones de los metales que no son de transición son menos susceptibles a los procesos de desactivación; y es para estos elementos, para los que se han desarrollado las principales aplicaciones inorgánicas de la fluorimetría.
- Hay que señalar que los cationes de los metales que no son de transición son generalmente incoloros y tienden a formar quelatos que también lo son. Por ello, la fluorimetría a menudo complementa a la espectrofotometría.

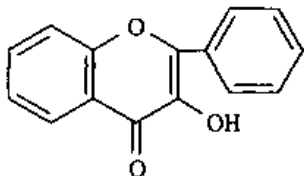


Reactivos fluorimetricos

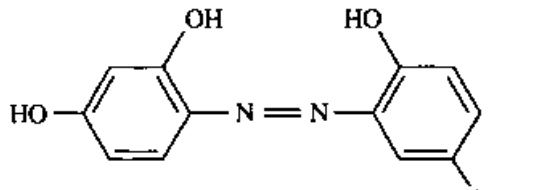
- Los reactivos fluorimetricos más utilizados en el análisis de cationes son los que presentan estructuras aromáticas con dos o mas grupos funcionales dadores que permitan la formación de quelatos con el ion metálico.
- A continuación se muestran las estructuras de los cuatro reactivos más utilizados:



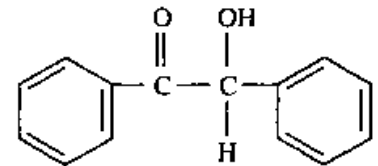
8-hidroxiquinolina
(reactivo para Al, Be
y otros iones metálicos)



Flavanol (reactivo para Zr y Sn)



Granate de alizarina R
(reactivo para Al, F⁻)



Benzoina
(reactivo para B, Zn, Ge y Si)

TABLA 15-2. Selección de métodos fluorimétricos para especies inorgánicas

Ion	Reactivo	Longitud de onda, nm		Sensibilidad μg/mL	Interferencias
		Absorción	Fluorescencia		
Al ³⁺	Granate de alizarina R	470	500	0,007	Be, Co, Cr, Cu, F ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ni, PO ₄ ³⁻ , Th, Zr
F ⁻	Complejo de Al con granate de alizarina R (amortiguación)	470	500	0,001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO ₄ ³⁻ , Th, Zr
B ₄ O ₇ ²⁻	Benzoína	370	450	0,04	Be, Sb
Cd ²⁺	2-(<i>o</i> -Hidroxifenil)- benzoxazol	365	Azul	2	NH ₃
Li ⁺	8-Hydroxiquinolina	370	580	0,2	Mg
Sn ⁴⁺	Flavanol	400	470	0,1	F ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Zr
Zn ²⁺	Benzoína	—	Verde	10	B, Be, Sb, Iones coloreados

Determinación fluorimétrica de especies orgánicas

- El número de aplicaciones del análisis fluorimétrico a especies orgánicas y bioquímicas es impresionante.
- Se han recopilado los métodos para la determinación de más de 200 sustancias, incluyendo una amplia variedad de compuestos orgánicos, enzimas y coenzimas, agentes medicinales, productos naturales, esteroides y vitaminas.
- Es incuestionable que las aplicaciones más importantes de la fluorimetría se encuentran en el campo del análisis de productos alimentarios, farmacéuticos, muestras clínicas y productos naturales.
- La sensibilidad y la selectividad del método hacen que sea una herramienta particularmente valiosa en estos campos.

Métodos fosforimétricos

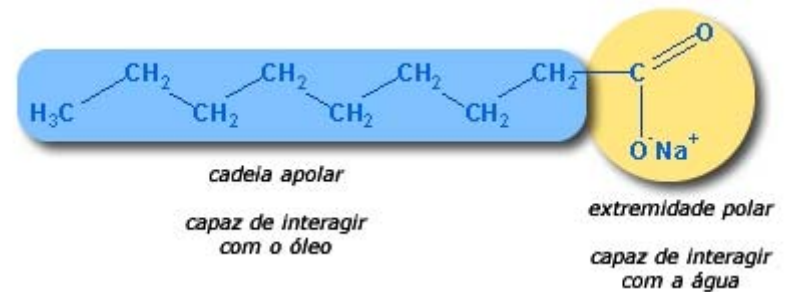
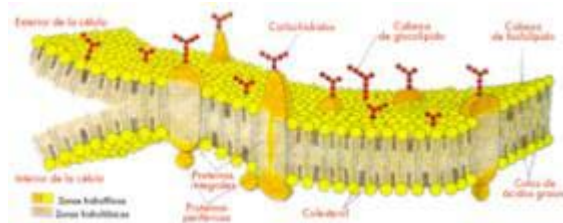
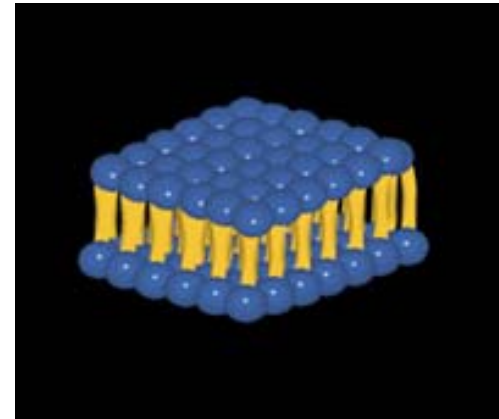
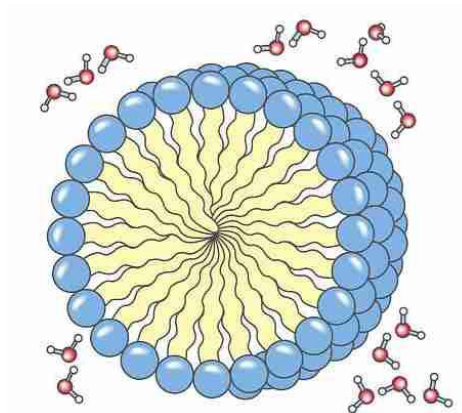
- Los métodos fosforescentes y fluorescentes tienden a ser complementarios, ya que los compuestos fuertemente fluorescentes presentan una débil fosforescencia y viceversa.
- Por ejemplo, entre los hidrocarburos aromáticos con anillos condensados, aquellos que contienen átomos pesados como halógenos o azufre, con frecuencia presentan una fuerte fosforescencia; por otro lado, los mismos compuestos sin la presencia del átomo pesado tienden a presentar fluorescencia en lugar de fosforescencia.
- La fosforimetría se ha utilizado para determinar una gran variedad de especies orgánicas y bioquímicas que incluyen sustancias como ácidos nucleicos, aminoácidos, purina y pirimidina, enzimas, hidrocarburos del petróleo y pesticidas. Sin embargo, el método no ha alcanzado el uso tan difundido de la fluorimetría, quizás debido a la necesidad de bajas temperaturas y a la, generalmente, peor precisión de las medidas fosforescentes.
- Por otro lado, es atractiva la mayor selectividad potencial de los procedimientos de fosforescencia. La razón de estas diferencias de comportamiento se debe a que la fosforescencia eficaz necesita el cruce entre sistemas rápido para poblar el estado triplete excitado, que, vuelve a reducir la concentración de moléculas en el singulete excitado y, por tanto, aumenta la intensidad de fosforescencia.

Fosforimetría a temperatura ambiente

- Durante las últimas dos décadas, se ha dedicado un esfuerzo considerable al desarrollo de métodos fosforimétricos que puedan llevarse a cabo a temperatura ambiente.
- Se utilizan dos procedimientos generales:
 - Fosforescencia de los compuestos adsorbidos en la superficie de sólidos, como puede ser un filtro de papel. En estas aplicaciones, se dispersa una disolución de analito sobre el sólido y se evapora el disolvente. Se mide, entonces, la fosforescencia de la superficie. La matriz rígida minimiza la desactivación del estado triplete por amortiguación colisional. La amortiguación colisional afecta mucho más a la fosforescencia que a la fluorescencia debido al mayor tiempo de vida del estado triplete.
 - El segundo método a temperatura ambiente supone la solubilización del analito en micelas formadas por detergente, en presencia de iones metálicos pesados.
 - Las micelas aumentan la proximidad entre los iones de los metales pesados y el fosforóforo, aumentando así la fosforescencia.

Micelas

- Se emplean detergentes o moléculas con extremo hidrofílico y otro hidrofóbico

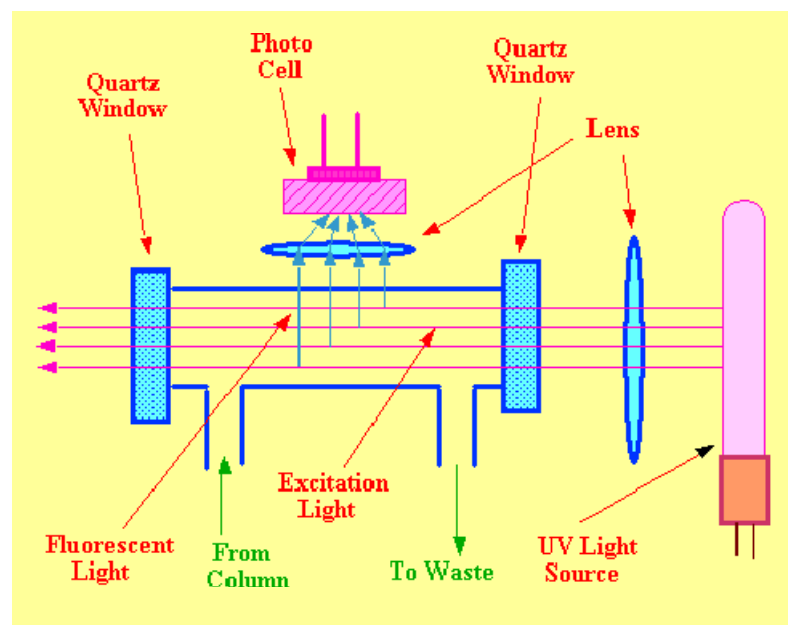


para la detección en cromatografía líquida

- Las medidas de fotoluminiscencia proporcionan un importante método para la detección y determinación de los componentes de una muestra que eluyen de columnas cromatográficas o en electroforesis capilar.
- **Medidas de tiempos de vida**
- La medida de los tiempos de vida en luminiscencia estaba restringida inicialmente a sistemas fosforescentes, donde los tiempos de desactivación eran suficientemente largos para permitir una fácil medida de la intensidad emitida en función del tiempo.
- Varios fabricantes de instrumentos ofrecen un equipo para el estudio de las velocidades de desactivación de la luminiscencia en la escala de tiempos de fluorescencia (10^{-5} a 10^{-8} s). Este equipo emplea láseres pulsantes que generan impulsos de radiación con anchuras de 70 a 100 ps para la excitación y tubos foto-multiplicadores de tiempo de barrido rápido para la detección.
- Los instrumentos de este tipo proporcionan información que resulta útil en estudios básicos de transferencia de energía y amortiguación.
- Para el trabajo analítico, las medidas de tiempo de vida incrementan la selectividad de los métodos luminiscentes, ya que permiten el análisis de mezclas que contienen dos o más especies luminiscentes con diferentes velocidades de relajación.

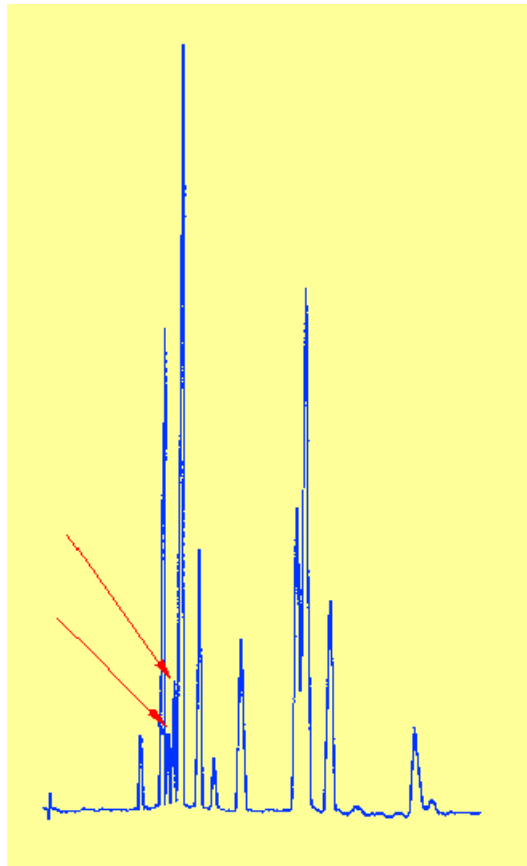
Detector fluorimétrico de haz simple

- Es uno de los detectores más sensibles en HPLC
- La radiación de excitación suele ser generada por una lámpara de vapor de mercurio que proporciona una radiación intensa a 253.7 nm.
- Numerosas sustancias fluorescentes se excitan con esta radiación.
- La radiación se enfoca con lentes de cuarzo y la radiación fluorescente se detecta con una fotocélula.
- La sensibilidad del detector permite detectar 1×10^{-9} g/ml de analito con un rango dinámico lineal amplio



- Example of a separation monitored by a simple fluorescence detector
- Separation of a mixture of priority pollutants. The excitation light was approximately monochromatic at 254 nm and all wavelengths of the fluorescent light was sensed by the photo cell.
- Column: 2 Pecosphere™–5C C18 (150 mm x 4.6 mm) in series. Mobile Phase: 90% acetonitrile/10% water. Flow rate: 2.0 ml/min. Detector Fluorescence (Excitation 254 nm total emission sensed). Sample: 20 ml of NBS Standard

- | | | |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Naphthalene | 2. Fluorene | 3. Acenaphthene |
| Phenanthrene | 5. Anthracene | 6. Fluoranthracene |
| Pyrene | 8. Benzo(a)anthracene | 9. Chrysene |
| 10. Benzo(b)fluoranthene | 11. Benzo(k)fluoranthene | 12. Benzo(k)fluoranthene |
| 13. Dibenz(a,h)anthracene | 14. Indeno(1,2,3,cd)pyrene | 15. Benzo(ghi)perylene |

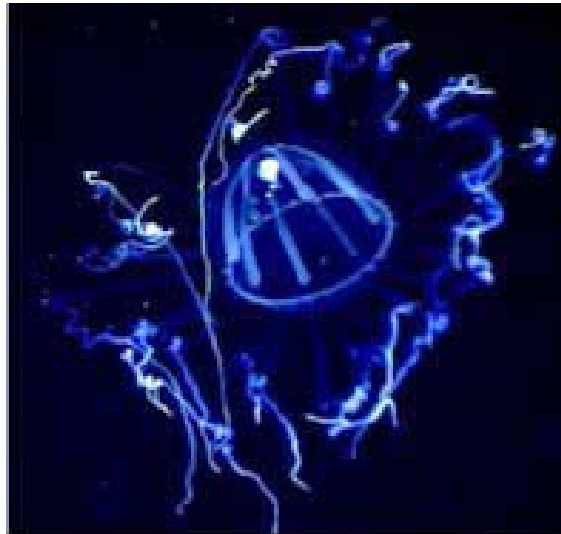


QUIMIOLUMINISCENCIA

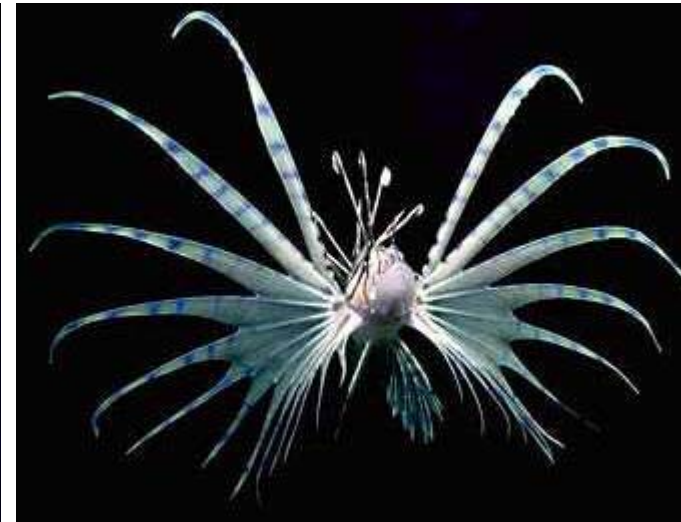
- La aplicación de la quimioluminiscencia a la química analítica es de desarrollo relativamente reciente. Las reacciones químicas que producen quimioluminiscencia son pocas, limitando, así, el procedimiento a un número relativamente pequeño de especies.
- Algunos de los compuestos que reaccionan dando quimioluminiscencia son componentes importantes del medio ambiente.
- Para estos casos, la alta selectividad, la sencillez y la extrema sensibilidad del método son la causa de su creciente utilización

El fenómeno de la quimioluminiscencia

- La quimioluminiscencia se produce cuando una reacción química genera una especie electrónicamente excitada, que emite luz cuando vuelve al estado fundamental o que transfiere su energía a otra especie que, posteriormente, da lugar a una emisión.
- En los sistemas biológicos también se producen reacciones quimioluminiscentes, en estos casos, el proceso se suele denominar *bioluminiscencia*:
 - luciérnagas, ciertas algas y medusas, bacterias, protozoos y crustáceos.
 - La química de los distintos procesos bioluminiscentes naturales no se conoce totalmente.

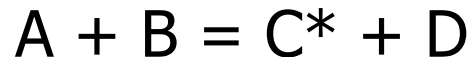


Colobonema



Quimioluminiscencia en el laboratorio

Hace más de un siglo se descubrió que ciertos compuestos orgánicos relativamente sencillos también eran capaces de presentar quimioluminiscencia. El tipo de reacción más sencilla de dichos compuestos para producir quimioluminiscencia se puede formular como:



- C^* representa a la especie C en el estado excitado.
- El espectro de luminiscencia es el del producto de reacción C.
- La mayoría de las reacciones quimioluminiscentes son considerablemente más complicadas de lo que sugieren las reacciones anteriores.

Eficiencia cuántica de la quimioluminiscencia

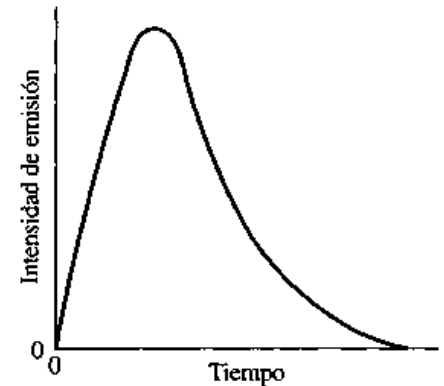
- En quimioluminiscencia, la intensidad de radiación I_{CL} (fotones emitidos por segundo) depende de la velocidad de la reacción química (dC/df) y de la eficacia cuántica de quimioluminiscencia Φ_{CL} (fotones emitidos por molécula que ha reaccionado).
- El último término es igual al producto de la eficacia cuántica de excitación Φ_{EX} (estados excitados por moléculas que han reaccionado) y la eficacia cuántica de emisión Φ_{EM} (fotones por estado excitado).
- Estas relaciones se describen mediante la ecuación.

$$I_{CL} = \Phi_{CL} dC/dt = \Phi_{EX} \Phi_{EM} dC/dt$$

- Los sistemas quimioluminiscentes útiles en análisis, generalmente presentan valores de Φ_{CL} comprendidos entre 0,01 y 0,2.

Medida de la quimioluminiscencia

- La instrumentación para las medidas de la quimioluminiscencia es notablemente sencilla y puede consistir tan sólo en un recipiente de reacción adecuado y un tubo fotomultiplicador.
- Generalmente, no es necesario ningún dispositivo para seleccionar la longitud de onda, ya que la única fuente de radiación es la reacción química entre el analito y el reactivo. Diversos fabricantes de instrumentos ofrecen fotómetros quimioluminiscentes.
- La señal característica de un experimento quimioluminiscente en función del tiempo alcanza rápidamente un máximo cuando la mezcla del analito y del reactivo es completa; a continuación la señal desciende de manera que se ajusta más o menos a una función exponencial
- Normalmente, en el análisis cuantitativo la señal se integra para un período de tiempo fijo y se compara con patrones tratados de forma idéntica.
- Como medida alternativa se utilizan las alturas de los picos. A menudo se obtienen relaciones lineales entre la señal y la concentración, para intervalos de concentración de varios órdenes de magnitud.

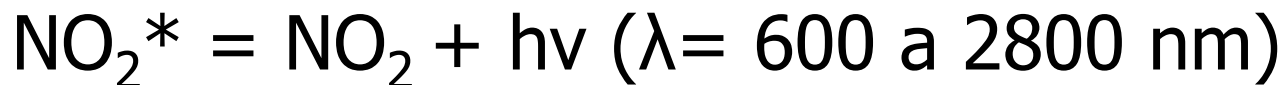
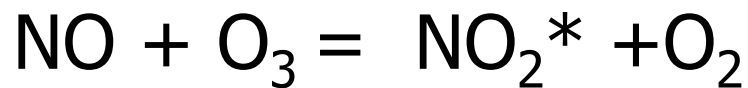


Aplicaciones analíticas de la quimioluminiscencia

- Los métodos quimioluminiscentes tienen, generalmente, una elevada sensibilidad, ya que, en ausencia de ruido, se miden bajos niveles de radiación.
- Además, se evita la atenuación de la radiación que tiene lugar cuando ésta atraviesa un filtro o un monocromador.
- De hecho, los límites de detección vienen determinados, no tanto por la sensibilidad del detector, sino por la pureza de los reactivos.
- Los límites de detección característicos se encuentran dentro del intervalo de partes por billón (o a veces menos) a partes por millón.

Análisis de gases

- Los métodos quimioluminiscentes para la determinación de gases, se originaron por la necesidad de encontrar medios muy sensibles para la determinación de contaminantes atmosféricos como el ozono, los óxidos de nitrógeno y los compuestos azufrados.
- De estos métodos, uno de los más utilizados es el destinado a la determinación de monóxido de nitrógeno; las reacciones son:

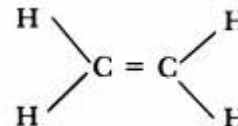
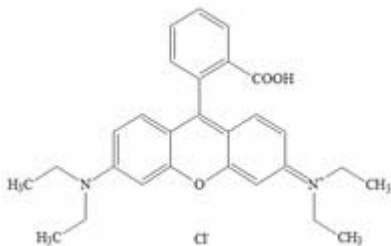


- El ozono procedente de un electrogenerador y las muestras de la atmósfera son arrastrados de forma continua al recipiente de reacción, donde se sigue el curso de la radiación luminiscente mediante un tubo fotomultiplicador.
- Se ha encontrado una respuesta lineal para concentraciones de monóxido de nitrógeno desde 1 ppb hasta 10.000 ppm.
- Este procedimiento se ha convertido en el más utilizado en el control de la concentración de este importante constituyente atmosférico desde el nivel del mar hasta altitudes de 20 km

- La reacción del monóxido de nitrógeno con el ozono se ha utilizado, también, en la determinación de óxidos de nitrógeno de estados de oxidación superiores.
- Por ejemplo, el contenido de dióxido de nitrógeno en los gases de escape de los automóviles se ha determinado por descomposición térmica del gas a 700 °C en un tubo de acero.
- La reacción es: $\text{NO}_2 = \text{NO} + \text{O}$
- Al menos dos fabricantes ofrecen actualmente un instrumento para la determinación de nitrógeno en materiales sólidos o líquidos que contienen entre un 0,1 y un 30 por 100 de nitrógeno. Las muestras se pirolizan en una atmósfera de oxígeno bajo condiciones en las que el nitrógeno se convierte cuantitativamente en monóxido de nitrógeno

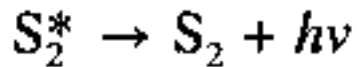
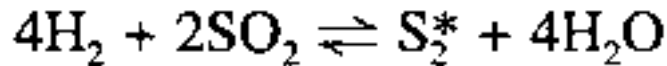
Análisis del ozono

- Para el control del ozono atmosférico se utiliza un método quimioluminiscente
- La determinación se basa en la luminiscencia producida cuando el analito reacciona con el colorante rodamina B, adsorbido sobre una superficie de gel de sílice activada.
- Este procedimiento es sensible a concentraciones de ozono inferiores a 1 ppb; la respuesta es lineal hasta 400 ppb de ozono.
- El ozono también se puede determinar en fase gaseosa como consecuencia de la quimioluminiscencia producida cuando el analito reacciona con el etileno.
- Ambos reactivos son específicos para el ozono.



Análisis de compuestos azufrados en la atmósfera

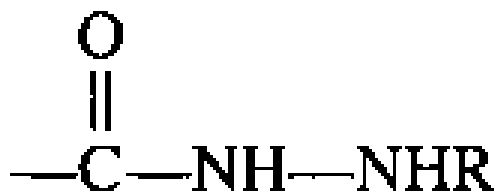
- Otro importante método quimioluminiscente en fase gaseosa se utiliza para la determinación de compuestos azufrados de la atmósfera, como el sulfuro de hidrogeno, el dióxido de azufre y los mercaptanos.
- En estos casos, la muestra se quema en una llama de hidrogeno para dar un dímero de azufre, que posteriormente se descompone emitiendo luz. Por ejemplo, con el dióxido de azufre, las reacciones son:



- Aquí, la radiación emitida cae dentro de la zona azul, con picos a 384 y 394 nm. Su intensidad es proporcional al dímero de azufre excitado.
- De forma similar, la combustión de los compuestos fosforados en una llama de hidrogeno da lugar a la emisión de radiación a 526 nm, debido a HPO^* .
- Se han llegado a obtener curvas de calibrado lineales para intervalos de concentración de más de cuatro decenas. Estas dos técnicas de quimioluminiscencia en llama se emplean para la detección de especies azufradas o fosforadas en el eluyente de las columnas de cromatografía de gases.

Analisis de especies inorganicas en fase líquida

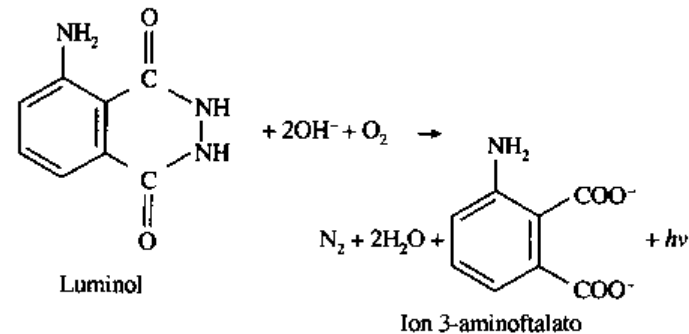
- Muchos de los análisis llevados a cabo en fase líquida utilizan sustancias quimioluminiscentes orgánicas que contienen el grupo funcional



- Estos reactivos reaccionan con el oxígeno, con el peróxido de hidrógeno y con muchos otros agentes oxidantes fuertes dando lugar a un producto de oxidación quimioluminiscente.

Reacción del luminol

- El luminol es el ejemplo más común de este tipo de compuestos.
- Reacciona con oxidantes fuertes, tales como oxígeno, peróxido de hidrógeno, ion hipoclorito o permanganato, en presencia de una base fuerte.
- A veces se necesita un catalizador para que la reacción transcurra a la velocidad adecuada.
- La emisión producida coincide con el espectro de fluorescencia del producto, el anión 3-aminoftalato
- Se produce una quimioluminiscencia azul con máximo a 425 nm.

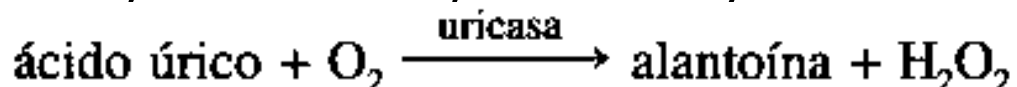


Usos de la reacción del luminol

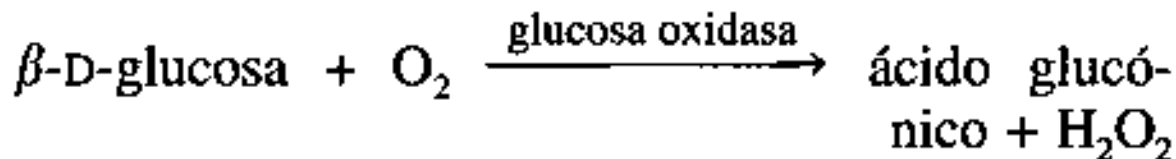
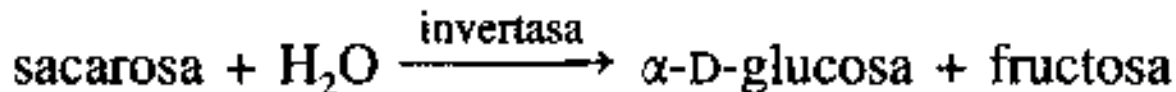
- Dentro de ciertos límites, la intensidad de quimioluminiscencia del luminol es proporcional a la concentración del oxidante, del catalizador o del luminol.
- Como consecuencia, la reacción proporciona un método sensible para determinar cualquiera de estas especies.
- Por ejemplo, si se utiliza peróxido de hidrógeno como oxidante, y como catalizador Co^{2+} , se pueden determinar concentraciones de este elemento inferiores a 0,01 nmol/L
- Si el catalizador es Cr^{3+} , se pueden determinar concentraciones inferiores a 0,5 nmol/L y si es Cu^{2+} , concentraciones inferiores a 1 nmol/L.
- Con algunos cationes tiene lugar una inhibición de la luminiscencia; en esos casos, el descenso en la intensidad permite determinar sus concentraciones.

Análisis de especies orgánicas

- Para aumentar la selectividad de las reacciones quimioluminiscentes y ampliar la quimioluminiscencia a analitos que no participan directamente en las reacciones quimioluminiscentes, es común llevar a cabo una reacción enzimática, como etapa previa a la quimioluminiscente.
- En este caso, el analito a determinar es el sustrato y uno de los productos de la reacción enzimática se detecta por quimioluminiscencia.
- Este método se lleva a cabo, generalmente, en sistemas de flujo con columnas rellenas de la enzima inmovilizada.
- Recientemente se ha dirigido la atención hacia los biosensores que utilizan enzimas unidas a fibras ópticas.
- En la etapa de predetección se suelen utilizar enzimas oxidasas que generan H_2O_2 . No solo puede determinarse el H_2O_2 con distintos sistemas quimioluminiscentes, sino que el oxidante necesario (O_2) está presente en la mayoría de las muestras, especialmente en aquellas que son disoluciones acuosas.
- Asumiendo que por efecto del enzima se consigue una conversión cuantitativa, se pueden determinar los sustratos cuyas concentraciones están por debajo de 10 a 100 nM, lo mismo que el H_2O_2 . Dentro de los sustratos detectados de esta forma se encuentran: glucosa, colesterol, colina, ácido úrico, aminoácidos, aldehídos y lactato.



- La metodología anterior se puede ampliar utilizando etapas enzimáticas secuenciales para convertir finalmente al analito en una cantidad equivalente de producto quimioluminiscente.
- De esta forma se han determinado azúcares distintos de la glucosa, glucosidos, esterres del colesterol, creatinina y acetilcolina.



- El luminol mas una peroxidasa, como catalizador, parece ser el sistema óptimo para la determinación de H_2O_2 . El pico de intensidad luminiscente se alcanza en aproximadamente 100 ms; el disolvente es acuoso pero es compatible con algunos compuestos orgánicos; el limite de detección está próximo a 0,1 pM, con un intervalo de linealidad de tres a cuatro decenas de concentración.