



Universidad
Carlos III de Madrid

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR

DEPARTAMENTO DE CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES E INGENIERÍA
QUÍMICA

PROYECTO FIN DE CARRERA

INGENIERÍA INDUSTRIAL SUPERIOR

**COMPORTAMIENTO FOTOFÍSICO DE LA DANSILCADAVERINA: EFECTO
DE DISOLVENTES**

Autor

Pablo Gordillo Chueca

Directores

Fco. Javier González Benito

Dania Olmos Díaz



2014

El presente Proyecto Fin de Carrera no es fruto de una sola persona, en él han participado más personas de las que son obvias en la portada del mismo.

Quiero agradecer a mis dos tutores Javier y Dania, su paciencia, dedicación y saber hacer en todo.

A mis padres, no por el proyecto en sí, sino por su amor y apoyo desinteresado a lo largo de todos estos años de esfuerzo que han supuesto la Ingeniería Industrial.

A mi hermano, que me ve mejor de lo que soy, y con ello me empuja, sin saberlo, a querer ser mejor en todo.

A Jenny, porque todo es más fácil, cuando tienes algo por lo que luchar.

Gracias a todos.



Índice

1. Introducción	I - 1
1.1. Motivaciones del estudio	I - 1
1.2. Objetivos	I - 2
1.2.1. Objetivos generales	I - 2
1.2.2. Objetivos específicos	I - 2
2. Fundamentos	II - 1
2.1. Fotofísica	II - 1
2.2. Espectros de absorción y emisión.....	II - 5
2.3. Espectros de fluorescencia de estado estacionario	II - 6
2.3.1. Desplazamiento de los espectros	II - 6
2.4. Sondas y marcadores fluorescentes	II - 7
2.4.1. Dansilcadaverina	II - 8
2.5. Parámetros asociados a las distintas propiedades de los disolventes	II - 9
2.5.1. Parámetro de solubilidad	II - 9
2.5.2. Parámetro de Dimroth, Et	II - 10
2.5.3. Parámetro de Kosower, Z	II - 10
2.5.4. Constante dieléctrica, ϵ , y Momento dipolar, μ	II - 11
2.5.5. Índice de refracción, n_d	II - 12
2.5.6. Viscosidad, η	II - 12
2.6. Efecto de los disolventes en los espectros de absorción UV-Vis ..	II - 13
2.7. Efecto de disolventes en los espectros de emisión de fluorescencia	II - 14
2.7.1. Efectos generales y específicos de los disolventes	II - 16
2.7.2. Mecanismos y dinámica de la relajación del disolvente	II - 17



3. Parte Experimental	III - 1
3.1. Materiales	III - 1
3.2. Preparación de disoluciones	III - 4
3.3. Técnicas y métodos experimentales	III - 6
3.3.1. Cubetas de disolución	III - 6
3.3.2. Espectroscopía UV-Vis	III - 6
3.3.3. Espectroscopía de fluorescencia	III - 7
3.4. Programa de análisis de datos	III - 7
3.4.1. Parámetros fotofísicos analizados de los espectros	III - 7
4. Resultados y discusiones	IV - 1
4.1. Espectros de fluorescencia	IV - 1
4.1.1. Dimetil Sulfoxido (CH ₃) ₂ SO	IV - 1
4.1.2. Ciclohexano C ₆ H ₁₂	IV - 3
4.1.3. Acetonitrilo CH ₃ CN	IV - 5
4.1.4. Tetrahidrofurano C ₄ H ₈ O	IV - 7
4.1.5. 2-Butanona CH ₃ C(O)CH ₂ CH ₃	IV - 9
4.1.6. Tolueno C ₆ H ₅ CH ₃	IV - 11
4.1.7. Metanol CH ₃ OH	IV - 13
4.1.8. Multiespectro de emisión	IV - 15
4.1.9. Multiespectro de excitación	IV - 17
4.2. Espectros de absorción UV-Vis	IV - 18
4.3. Análisis de espectros de fluorescencia de emisión	IV - 19
4.3.1. Efecto de la viscosidad	IV - 19
4.3.2. Efecto del índice de refracción	IV - 22
4.3.3. Efecto de la constante dieléctrica	IV - 25
4.3.4. Efecto del momento dipolar	IV - 28
4.3.5. Efecto del parámetro de Dimroth, Z	IV - 31



4.3.6. Efecto del parámetro de Kosower, E_t	IV - 34
4.3.7. Efecto del término dispersivo de la solubilidad	IV - 37
4.3.8. Efecto del término polar de la solubilidad	IV - 40
4.3.9. Efecto del término debido a la asociación por enlaces de hidrógeno	IV - 43
4.3.10. Efecto del parámetro de solubilidad	IV - 46
4.4. Análisis del espectro UV-VIS	IV - 49
4.4.1. Efecto de la viscosidad	IV - 49
4.4.2. Efecto del índice de refracción	IV - 52
4.4.3. Efecto de la constante dieléctrica	IV - 54
4.4.4. Efecto del momento dipolar	IV - 56
4.4.5. Efecto del parámetro de Dimroth, Z	IV - 57
4.4.6. Efecto del parámetro de Kosower, E_t	IV - 59
4.4.7. Efecto del término dispersivo de la solubilidad	IV - 60
4.4.8. Efecto del término polar de la solubilidad	IV - 62
4.4.9. Efecto del término debido a la asociación por enlaces de hidrógeno	IV - 63
4.4.10. Efecto del parámetro de solubilidad	IV - 65
5. Conclusiones	V - 1

Anexo A

Referencias



1. INTRODUCCIÓN

1.1. MOTIVACIONES DEL ESTUDIO

Las moléculas fluorescentes, también llamadas fluoróforos responden a la emisión electromagnética de manera distinta que el resto de las moléculas, absorbiendo fotones de radiación UV/Vis, para después emitir fotones de radiación UV/Vis de mayor o menor longitud de onda que la absorbida. Hoy en día estos fluoróforos tienen una importancia muy relevante en los campos de la bioquímica: estudio de las proteínas, inmunofluorescencia, análisis celular, etc. donde su uso está muy extendido. Pero su uso no está limitado a las ciencias biológicas, y las cualidades y ventajas de estas moléculas se explotan hoy en día en: tintes textiles, abrillantadores ópticos de detergentes, cosmética avanzada, equipamiento de seguridad, diodos orgánicos emisores de luz (OLED), insecticidas, paneles solares, artes plásticas, etc. [10]

El empleo de sondas y marcadores fluorescentes han supuesto un gran avance en el conocimiento, a nivel molecular, de sistemas heterogéneos como los biológicos, superficies modificadas, etc. Sus principales ventajas son su alta sensibilidad y el bajo grado de perturbación sufrido por el sistema en estudio.

Los parámetros fotofísicos de algunos componentes luminiscentes dependen de manera directa del microentorno en el que se encuentran, conocer la variación de estos parámetros en función del microentorno puede proporcionarnos una buena orientación de numérica del entorno en el que se encuentra la sonda, y su comportamiento. [1]

El funcionamiento general, y la estructura química de los fluoróforos son bien conocidos. Pero predecir el comportamiento fotofísico de la molécula en función de su



entorno inmediato es algo que aún no se ha conseguido realizar con precisión. La parametrización de la fotofísica de los fluoróforos es el objetivo a largo plazo de este tipo de estudio, con lo que se podría conseguir conocer con exactitud el microentorno en el que se introduce la molécula, incluso en tiempo real, sin perturbar en demasía el objeto de estudio.

Conocer las propiedades del entorno en el que se encuentra la sonda puede ayudar al estudio de: reacciones de polimerización [16], estudio de transiciones térmicas [17], de polímeros, comportamiento de materiales compuestos...

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivos generales

El objetivo de este proyecto, es proporcionar una base de conocimiento sobre el comportamiento fotofísico de la sonda fluorescente (Dansilcadaverina) en disolución, en función de los parámetros del disolvente en el que se encuentra. El estudio en disolución nos permite controlar con precisión las condiciones del sistema, proporciona datos con menor índice de errores dado que se trata de un sistema homogéneo, y se reducen perturbaciones debidas a interacciones de la sonda con superficies y otros agentes que podrían encontrarse en medios más heterogéneos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Estudio del efecto de los parámetros de los disolventes sobre las características de los espectros de emisión de fluorescencia de la Dansilcadaverina.



- Estudio del efecto de los parámetros de los disolventes sobre las características de los espectros de excitación de fluorescencia de la Dansilcadaverina.
- Estudio del efecto de los parámetros de los disolventes sobre las características de absorción ultravioleta-visible de la Dansilcadaverina.

Las propiedades físico-químicas estudiadas de los disolventes son:

- Viscosidad
- Índice de refracción
- Constante dieléctrica
- Momento dipolar
- Parámetro de solubilidad, evaluando el efecto de sus tres contribuciones (dispersiva, polar y contribución por enlaces de hidrógeno)

Se espera que los resultados de este proyecto puedan servir como base para futuros estudios del comportamiento de sondas fluorescentes en otro tipo de sistemas más complejos, como por ejemplo: seguimientos de polimerizaciones, procesos de curado polimérico, etc.



2. FUNDAMENTOS

En este capítulo se hablará de los aspectos fotofísicos básicos necesarios para interpretar el estudio aquí realizado. También se describirán los aspectos básicos de la especie fluorescente utilizada y los parámetros relacionados con el comportamiento químico-físico de los disolventes que se utilizan en el este proyecto fin de carrera.

2.1. FOTOFÍSICA

La absorción y emisión de luz de una especie química puede ilustrarse de manera sencilla mediante el diagrama de energías propuesto por Jablonksi [3] que se presenta en la figura 2.1.1. Los estados electrónicos fundamental, primero y segundo excitado se denotan como S_0 , S_1 y S_2 respectivamente. En cada uno de estos niveles energéticos, las especies capaces de absorber energía para posteriormente perderla en forma de fluorescencia, pueden encontrarse a su vez en algún nivel vibracional, 0,1,2, etc. En este diagrama se han excluido los efectos del disolvente, que se considerarán más detalladamente en posteriores apartados.

Los fluoróforos (especies capaces de emitir fluorescencia tras la correspondiente excitación a partir de una radiación electromagnética) se suelen excitar a algún nivel vibracional, de S_1 ó S_2 por absorción de energía (principio de Franck-Condon). Salvo raras excepciones, las moléculas excitadas en fases condensadas pierden energía (se relajan) rápidamente en forma de calor o sonido, debido al choque entre moléculas, pasando al nivel vibracional fundamental de S_1 . Este proceso se denomina conversión interna y suele tardar aproximadamente 10^{-12} s.

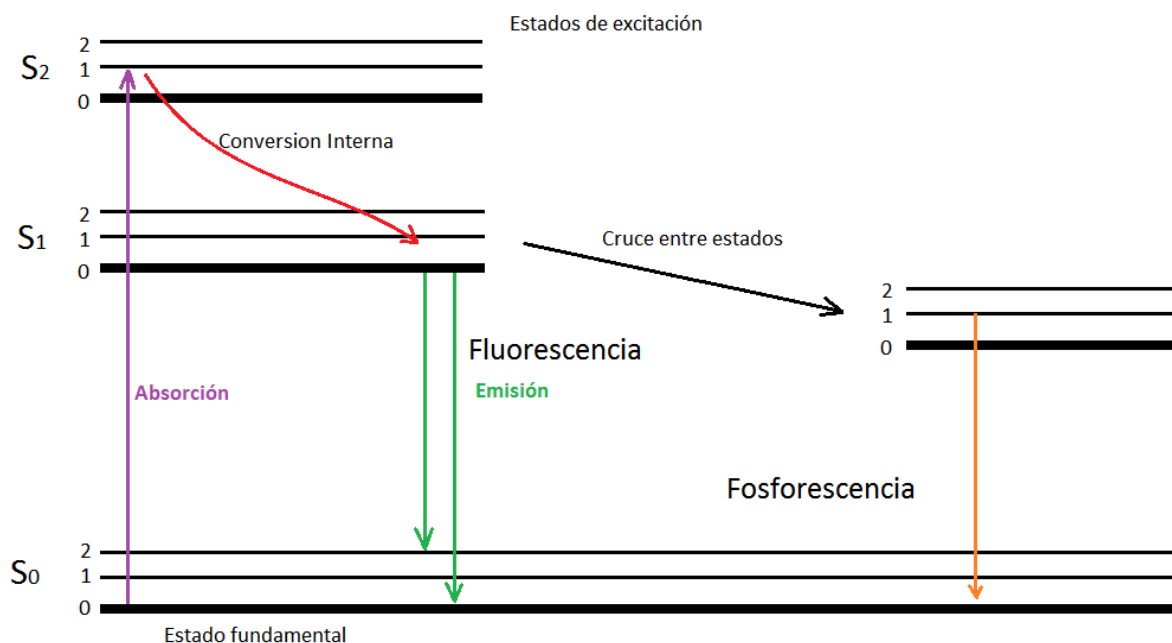


Figura 2.1.1.- Diagrama de Jablonski.

La transición electrónica desde el nivel vibracional fundamental del primer estado excitado al estado electrónico S₀ con emisión de un fotón, se denomina fluorescencia. Como los tiempos de vida de la fluorescencia son del orden de 10⁻⁹s, la conversión interna (CI) se completa antes de la emisión. Por tanto, la emisión fluorescente generalmente procede de los estados excitados en equilibrio térmico con el medio.

Puesto que el estado final del fluoróforo puede ser cualquier nivel vibracional del estado electrónico fundamental, el espectro de emisión refleja los niveles vibracionales del estado S₀, mientras que el espectro de absorción refleja los niveles vibracionales del primer estado excitado.

Por otro lado, las moléculas en el estado S₁ pueden sufrir conversión al primer triplete T₁, cruce entre sistemas (Intersystem crossing o ISC), pudiendo posteriormente perder energía radiativa hasta S₀, a este proceso se le denomina fosforescencia. Aunque esta transición está prohibida por las reglas de selección [4] esto no implica que no pueda tener lugar, sino que este tránsito es muy lento, con un tiempo de vida que oscila entre los microsegundos y los segundos.



Aunque no se han indicado explícitamente en la figura 2.1.1., la emisión de fluorescencia puede venir afectada por otros factores. Estos factores incluyen, entre otros, los efectos del disolvente. [3]

La diferencia (en unidades de energía) entre el máximo de absorción y el máximo de emisión ($\Delta\nu$) se denomina desplazamiento de Stokes (Figura 2.1.2). Cuando la molécula excitada interactúa (por ejemplo por acoplamiento dipolar) con el medio, la energía, del estado excitado puede disminuir y el espectro de emisión se desplazaría al rojo (menor energía ó mayor longitud de onda). En estos casos, el desplazamiento de Stokes suele ser grande. Después de la excitación S_1 , el exceso de energía se disipa muy rápidamente, llevando rápidamente al fluoróforo al nivel vibracional más bajo en energía de S_1 . Debido a esta rápida relajación, el espectro de emisión es normalmente independiente de la longitud de onda de excitación.

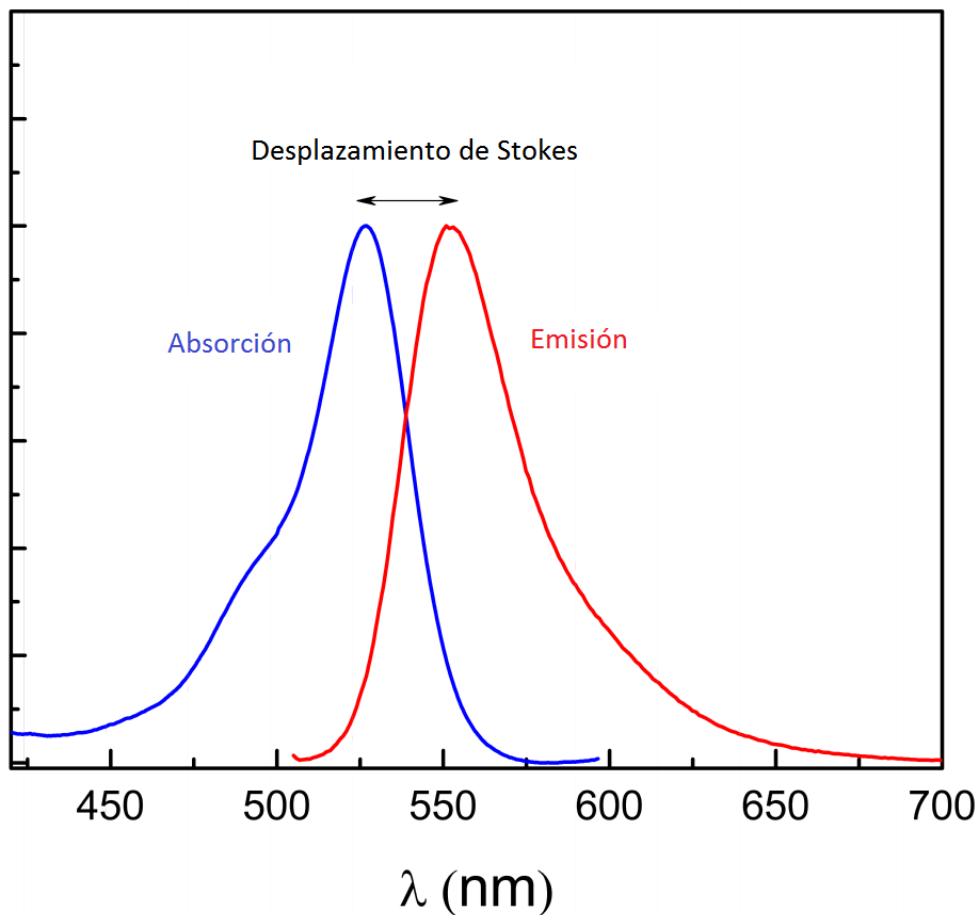


Figura 2.1.2 Desplazamiento de Stokes.



Existen excepciones cuando el fluoróforo puede emitir a partir de estados electrónicos excitados superiores a S_1 , como por ejemplo S_2 , y cuando la excitación se produce en el extremo rojo del espectro de absorción, dando lugar a desplazamientos al rojo en el espectro de emisión debido a que se están seleccionando aquellos fluoróforos que interaccionan en mayor medida con el disolvente o entorno próximo.

En muchas moléculas los niveles de energía implicados en las transiciones de emisión o absorción no se ven alterados por la diferente distribución electrónica de S_0 y S_1 . Según el principio de Franck-Condon, todas las transiciones electrónicas ocurren sin cambios en la posición de los núcleos atómicos. Como resultado, si la probabilidad de una transición particular entre dos niveles vibracionales es la de mayor en absorción, la transición recíproca también será la más probable en emisión. Por ello, el espectro de emisión de fluorescencia suele ser la imagen especular del espectro de excitación y del de absorción.

Las excepciones a esta regla indican la diferente organización geométrica nuclear en el estado excitado en comparación con la del estado fundamental. Por ejemplo, pueden ocurrir desplazamientos nucleares antes de la emisión si el tiempo de vida del estado excitado es relativamente alto. Pero, en general, son las reacciones en el estado excitado las que suelen dar lugar a excepciones en la regla mencionada anteriormente. [1]



2.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN

El espectro de absorción representa la fracción de radiación incidente que absorbe un determinado material en un rango de frecuencias. Esta fracción depende principalmente de la estructura electrónica y molecular, y de las interacciones intermoleculares de la muestra.

El espectro de emisión representa el espectro de frecuencias de radiación electromagnética emitidas debidas a la transición de las especies de un estado de alta energía a otro de baja energía. La energía del fotón emitido es la diferencia entre ambos estados. Existen muchas posibilidades de transición de cada átomo, y cada transición tiene una diferencia de energía. Este catálogo de diferentes transiciones nos lleva a las distintas longitudes de onda emitidas que generan el espectro de emisión.

Como se puede prever por la definición de ambos espectros, se espera encontrar poca o ninguna relación con el entorno y el espectro de absorción. En cambio sí que se debería poder observar cambios en los espectros de emisión con la variación de las propiedades del entorno, ya que efectos como la polaridad, pH, microviscosidad pueden, sin duda, afectar al proceso de transición energético que se produce durante la emisión, dando por consiguiente variaciones en los espectros.

La energía del fotón absorbido o emitido tiene un valor relacionado únicamente con la longitud de onda de la correspondiente radiación, mediante la siguiente ecuación de Planck.

$$\Delta E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.1.)$$

Siendo h la constante de Planck ($h=6.626176 \times 10^{-34}$ J·s) y c la velocidad de la luz en el vacío ($c=2.99792458 \times 10^8$ m·s⁻¹).



2.3. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE ESTADO ESTACIONARIO

Estos espectros se obtienen de la excitación de la muestra con una fuente de luz continua.

En el espectro de emisión se representa la intensidad de emisión de la muestra, excitada a una cierta longitud de onda constante. En el espectro de excitación se representa la intensidad de emisión a una sola longitud de onda en función de la longitud de onda de excitación.

2.3.1. Desplazamiento de los espectros

Debido al efecto de conversión interna del estado S_2 al S_1 que se explica en el apartado 2.1, experimentalmente se observa una pérdida, entre las energías de excitación y emisión de los fluoróforos en disolución. Esta pérdida de energía se traduce en un desplazamiento del espectro por la dependencia de la energía con respecto a la longitud de onda, y se conoce como cambios en el desplazamiento de Stokes o simplemente desplazamiento de Stokes.

Otros desplazamientos, que son los que nos interesan e intentaremos analizar, son debidos a interacciones del estado de excitación con el disolvente.



2.4. SONDAS Y MARCADORES FLUORESCENTES

La idea básica asociada al uso de sondas y marcadores fluorescentes en sistemas supramoleculares es que, las propiedades de estos sistemas anfitriones se ven reflejadas en la respuesta luminiscente de estas especies. [5]

Entre las principales ventajas que nos ofrece el empleo de sondas y marcadores fluorescentes podemos destacar [6]:

- a) Su alta sensibilidad. Con la disponibilidad actual de espectrómetros, con capacidad para detectar luminiscencias muy débiles en compuestos, no es necesario utilizar concentraciones superiores a 10^{-6} M.
- b) Gran sensibilidad a cambios en el entorno por lo que se pueden emplear para el seguimiento de cualquier cambio físico-químico, por ejemplo, de reacciones químicas.
- c) Proporcionan información local (polaridad, rigidez, viscosidad), pudiéndose emplear para obtener información del lugar en el que se sitúa la sonda, por ejemplo en la interfase de un material compuesto o en dominios concretos de sistemas heterogéneos.
- d) Permiten el seguimiento de reacciones químicas y cambios físicos “in situ” y en tiempo real
- e) Es una técnica de análisis no destructivo;
- f) Puede estudiarse un gran intervalo dinámico de escalas temporales.

A lo largo de este proyecto se analizarán las variaciones de las respuestas fluorescentes de la sonda a las diferentes propiedades de los disolventes estudiados, con objeto de poder extrapolar esas propiedades estudiadas a otros entornos cuyas propiedades queramos estudiar, por ejemplo en sistemas más complejos como pueden ser: polímeros, mezclas de polímeros y materiales compuestos.



2.4.1. Dansilcadaverina

La Dansilcadaverina [N-(5-Amino-pentil)-5-dimetil-amino-nafta-leno-1-sulfonamida], es una sonda fluorescente ampliamente utilizada que destaca por tener una fluorescencia altamente sensible a la variabilidad de su entorno. Esta es la principal razón por la cual se eligió esta sonda en este estudio. Su estructura química se muestra en la Figura 2.4.1.

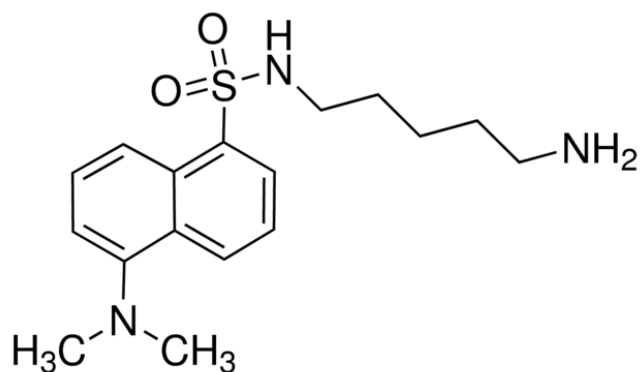


Figura 2.4.1. Estructura química de la Dansilcadaverina (N-(5-Amino-pentil)-5-dimetil-amino-nafta-leno-1-sulfonamida)



2.5. PARÁMETROS ASOCIADOS A DISTINTAS PROPIEDADES DE LOS DISOLVENTES

Los espectros de emisión de fluorescencia de muchos fluoróforos cambian en función de la polaridad, viscosidad, pH, etc. de su entorno más inmediato.

Generalmente, la sensibilidad del cromóforo a disolventes se utiliza para detectar si se encuentra enlazado, dónde, e inferir la polaridad y otras propiedades químico-físicas del lugar del enlace o de localización si no existiera enlace químico.

Los orígenes físicos de estas dependencias con la polaridad pueden ser:

- i) interacciones del momento dipolar del estado excitado con campos inducidos en los alrededores del disolvente;
- ii) interacciones químicas específicas entre el fluoróforo y una o más moléculas de disolvente. Estas interacciones están sujetas a una reorganización del disolvente alrededor del fluoróforo y, por tanto, poseen una dependencia temporal. Por ejemplo, en disolventes no viscosos a temperatura ambiente, la reorganización de la esfera de solvatación del cromóforo ocurre antes de producirse la emisión.
- iii) Interacciones dipolo-dipolo inducido entre el disolvente y modos vibracionales del fluoróforo con una simetría determinada. [1]

2.5.1. Parámetro de solubilidad (δ)

El parámetro de solubilidad (δ) describe bien el cambio de entalpia en las disoluciones de disolventes no polares. Es por lo tanto ampliamente utilizado a la hora de buscar un disolvente adecuado, pero no siempre da resultados fiables cuando se extiende a un sistema polar. Existen varias aproximaciones para la estimación del δ , que han dado lugar a la definición de diferentes parámetros de solubilidad, entre los cuales destaca el parámetro de solubilidad de Hansen. El cual se fundamenta en el hecho que al evaporarse una sustancia todos los enlaces intermoleculares de una



sustancia se rompen. Estos incluyen los enlaces no polares o de dispersión, los enlaces polares, y la asociación entre enlaces. Es por ello que Hansen divide el parámetro de solubilidad en tres contribuciones de la siguiente manera:

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (2.2)$$

Siendo: δ_d El término dispersivo, δ_p el término polar y δ_h la contribución debida a la asociación entre enlaces, incluyendo los enlaces de hidrógeno y los dipolos permanentes e inducidos.

Los parámetros de Hansen explican mejor la solubilidad de los sistemas, donde se observa que el término dispersivo aumenta con el tamaño molecular, y el polar disminuye. [8]

2.5.2. Parámetro de Dimroth, E_t

Es un parámetro que permite proponer una escala de polaridad basada en la banda solvatocrómica de los cromóforos pridinio-N-fenolbetaínas. El valor de E_t corresponde simplemente a la energía de transición ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) de la banda de transferencia de carga intramolecular de aquellas especies. [1]

2.5.3. Parámetro de Kosower, Z

Permite establecer una escala de polaridad basada en la banda solvatocrómica del yoduro de 1-etil-4-carbometoxipiridinio. Kosower realizó el espectro de absorción UV-VIS de este soluto en varios disolventes y denominó el valor de Z , a la energía de transición ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) correspondiente a la de mayor absorción. [1]



2.5.4. Constante dieléctrica, ϵ , y Momento dipolar, μ

La constante dieléctrica y el momento dipolar son propiedades complementarias de una sustancia. La constante dieléctrica es un índice de la capacidad de una sustancia para atenuar la transmisión de la fuerza electrostática entre una molécula y otra, es decir, mide la capacidad de una sustancia de aislar cargas unas de otras y por tanto de orientarse ante la acción de un campo eléctrico. El momento dipolar se asocia a la distribución asimétrica de los electrones en una especie química.

Esta distribución asimétrica procede a su vez del promedio asociado a la asimetría electrónica existente en los diferentes enlaces que se encuentran en la propia especie. En principio se puede determinar a partir del producto de la carga (negativa y positiva) distribuida asimétricamente por la distancia que las separa. Con frecuencia se utilizan ambas constantes físicas para caracterizar su polaridad, aunque el momento dipolar no representa la polaridad real de un disolvente pues está asociada a una única especie.

Cuando se quiere decir que una molécula es polar, se quiere decir que tiene un elevado momento dipolar. Sin embargo, cuando se dice que un disolvente es polar, significa que tiene una elevada constante dieléctrica. En otras palabras, la polaridad de un disolvente o constante dieléctrica, es una propiedad macroscópica (a nivel macroscópico), mientras que la polaridad molecular o momento dipolar es una propiedad de moléculas aisladas.



2.5.5. Índice de refracción, n_d

El índice de refracción es un parámetro que cuantifica la reducción de la velocidad de la luz al propagarse por un medio homogéneo. De forma más precisa, el índice de refracción de un determinado medio (disolvente en el caso que nos ocupa) se define como el cociente de la velocidad (c) de un fenómeno ondulatorio como la luz o sonido en un medio de referencia (por ejemplo vacío o aire) y la velocidad de dicha radiación (v_p) en dicho medio (disolvente):

$$n = \frac{c}{v_p}. \quad (2.3.)$$

2.5.6. Viscosidad, η

La viscosidad se define como la oposición que ofrece un fluido a las deformaciones tangenciales, y depende de las fuerzas de cohesión moleculares y la temperatura. Es de esperar que la viscosidad tendrá algún efecto sobre la facilidad de orientación de los dipolos asociados a las moléculas de los disolventes por lo que, en principio, debería tener alguna repercusión sobre las interacciones finales del medio con el fluoróforo y por tanto sobre el estado excitado del mismo afectando a la emisión fluorescente correspondiente.



2.6. EFECTO DE LOS DISOLVENTES EN LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VIS [14]

Los espectros de absorción UV-Vis obtenidos en diferentes disolventes de distinta polaridad ven modificada su posición, intensidad y forma en función de estos. Normalmente los desplazamientos espectrales se atribuyen a interacciones específicas soluto-soluto y soluto-disolvente, o a variaciones de las propiedades del disolvente.

La magnitud del desplazamiento espectral en los distintos disolventes depende principalmente de la fuerza de los enlaces intermoleculares de hidrógeno entre las distintas especies espectralmente activas y los grupos $-OH$ o grupos $-NH$, de las moléculas del disolvente.

Para los sistemas moleculares carentes de enlaces de hidrógeno los desplazamientos espectrales son sensibles a la polaridad del disolvente.

Los efectos de los disolventes se pueden atribuir a:

- i) Enlaces de hidrógeno que asisten a la migración electrónica en las moléculas
- ii) Estabilización del estado vibrónico debido a la permitividad eléctrica o su tendencia a donar un electrón
- iii) Interacción dipolo-dipolo



2.7. EFECTO DE DISOLVENTES EN LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA [1]

Los espectros de emisión de fluorescencia de muchos fluoróforos cambian en función de la polaridad de su entorno más inmediato.

Generalmente, la sensibilidad del cromóforo a disolventes se utiliza para detectar si se encuentra enlazado, dónde, e inferir la polaridad del lugar donde se encuentre.

Los orígenes físicos de estas dependencias con la polaridad pueden ser:

- iv) Interacciones del momento dipolar del estado excitado con campos inducidos por reorientación de dipolos de las moléculas de disolvente alrededor del cromóforo. Estas interacciones están sujetas a una reorganización del disolvente alrededor del fluoróforo y, por tanto, poseen una dependencia temporal. Por ejemplo, en disolventes no viscosos a temperatura ambiente, la reorganización de la esfera de solvatación del cromóforo ocurre antes de producirse la emisión.
- v) Interacciones químicas específicas entre el fluoróforo y una o más moléculas de disolvente. En este caso se pueden generar complejos tanto en estado fundamental como excitado que tengan como consecuencia el cambio en el correspondiente estado excitado.
- vi) Interacciones dipolo-dipolo inducido entre el disolvente y modos vibracionales del fluoróforo con una simetría determinada.



Desplazamiento de Stokes y relajación de disolvente

La emisión de fluorescencia generalmente ocurre a longitudes de onda que son mayores que las correspondientes a la absorción. Esta pérdida de energía entre la absorción y la reemisión de luz, o desplazamiento de Stokes, es el resultado de varios procesos dinámicos: i) pérdida energética debido a disipación de energía vibracional; ii) redistribución de electrones alrededor de las moléculas de disolvente inducida por el momento dipolar alterado del fluoróforo excitado; iii) reorientación de las moléculas de disolvente alrededor del dipolo de estado excitado y: iv) interacciones específicas entre el fluoróforo y el disolvente o solutos. Estas interacciones específicas incluyen enlaces de hidrógeno y formación de complejos de transferencia de carga, etc. [3,11]

La absorción de luz ocurre a unos 10^{-15} s, un tiempo demasiado corto como para que existan desplazamientos nucleares (principio de Frank-Condon) aunque suficiente para la redistribución de electrones. Generalmente, los estados electrónicos excitados de compuestos aromáticos poseen momentos dipolares (μ^*) que son mayores que los del estado fundamental- (μ). Por tanto, la absorción de un fotón por parte del fluoróforo dará lugar a la creación instantánea de un dipolo que perturbará su entorno inmediato. Posterior a la excitación, el disolvente responde mediante una reorganización alrededor de dicho dipolo. Este proceso se denomina relajación del disolvente (figura 2.6.), cuya escala temporal depende tanto de las propiedades físicas como químicas del disolvente. La consecuencia de este fenómeno es la disminución de la energía asociada al estado excitado del fluoróforo con el consiguiente efecto de un aumento de la longitud de onda de la emisión.

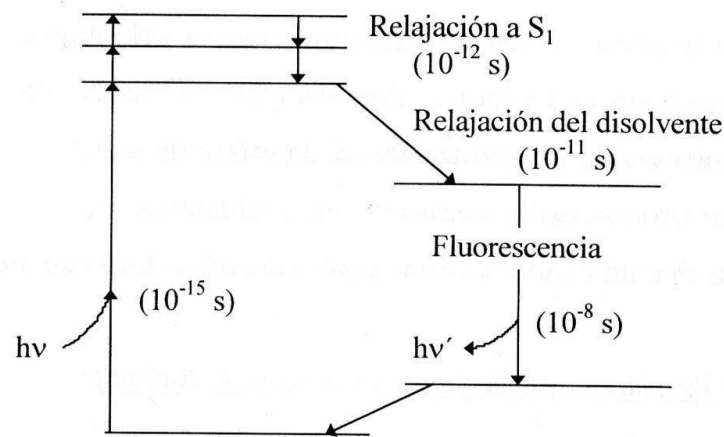


Figura 2.7.- Diagrama de Jablonski para el fenómeno de fluorescencia. [1]

2.7.1. Efectos generales y específicos de los disolventes

Por efectos generales se conocen aquellos que dependen del índice de refracción (η) y de la constante dieléctrica (ϵ) del disolvente y siempre están presentes. Los efectos específicos del disolvente se refieren a interacciones químicas específicas entre el fluoróforo y las moléculas del disolvente, como formación de enlaces de hidrógeno y complejos, reacciones ácido-base, y dependen tanto de la estructura química del disolvente como de la del fluoróforo.

Los efectos específicos del disolvente pueden ser debidos a enlaces de hidrógeno, reacciones ácido-base, o interacciones de transferencia de carga, por nombrar algunas. Los desplazamientos espectrales debidos a este tipo de interacciones pueden ser bastante importantes, y si no se reconocen, la interpretación de los espectros de emisión será limitada.

La manifestación más clara de este efecto corresponde a un drástico incremento en el tiempo de vida de la fluorescencia cuando pasamos de medios próticos a apróticos. El efecto particular producido por la formación de enlaces de hidrógeno a causa del disolvente corresponde a una variación en la diferencia de



energía entre los estados singlete y triplete, S-T. Las velocidades de cruce entre sistemas son bastante sensibles a esta diferencia de energía y, por tanto, una disminución en dicha diferencia al aumentar la polaridad del disolvente favorecerá el cruce entre sistemas (figura 2.7.1).

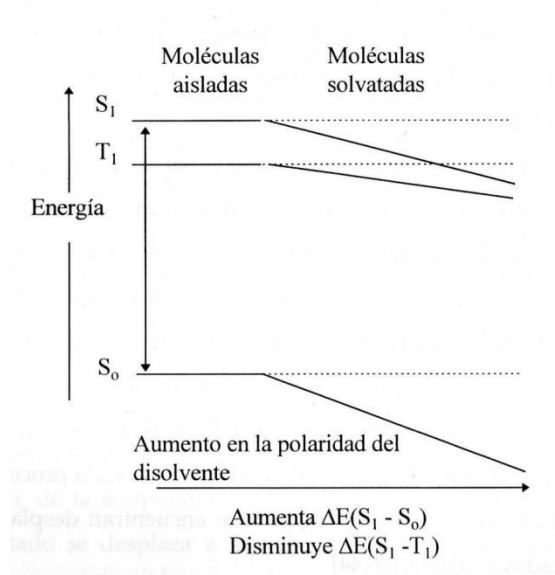


Figura 2.7.1.- Diagrama de energía que representa el efecto de la polaridad del disolvente en la estabilidad de los niveles. [1]

2.7.2. Mecanismos y dinámica de la relajación del disolvente

Hasta ahora hemos visto los mecanismos por los cuales los disolventes interactúan con fluoróforos y los efectos de estas interacciones en los espectros de emisión. Estos espectros de emisión pueden desplazarse a más bajas energías, debido a efectos generales del disolvente y/o, a efectos específicos basados en interacciones químicas entre el fluoróforo y el disolvente.

Anteriormente se supuso que el fluoróforo se encontraba en un disolvente fluido, y que los tiempos de relajación del disolvente (τ_s) eran mucho más pequeños que el tiempo de vida de la fluorescencia (τ_f). Como resultado, La emisión procedía de estados relajados donde el disolvente estaba en equilibrio con la nueva distribución



electrónica del fluoróforo excitado. La reorganización del disolvente alrededor del dipolo de estado excitado se puede considerar como una reacción de estado excitado.

La cinética de la relajación del disolvente se manifiesta más frecuentemente en la dependencia con la temperatura de los espectros de emisión de la fluorescencia. Un ejemplo es el bien conocido desplazamiento al azul de los espectros de emisión en disolventes vitrificados a bajas temperaturas. [12]

La relajación es el resultado de multitud de interacciones fluoróforo-disolvente. La emisión puede ocurrir desde el estado no relajado F, Desde el relajado R o a partir de estados parcialmente relajados, como se ilustra en la figura 2.7.2. [13].

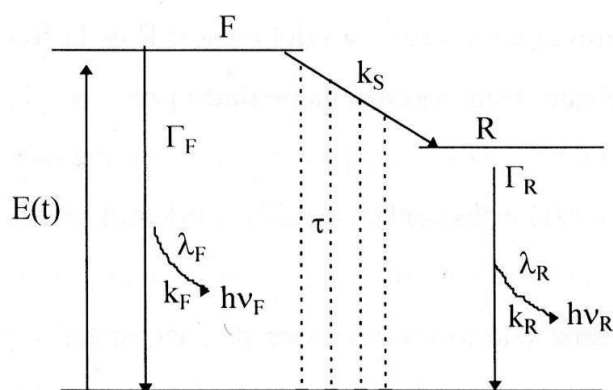


Figura 2.7.2.- Representación esquemática de la relajación del disolvente. Los estados F y R representan los estados inicialmente excitado y relajado, respectivamente. El espectro de emisión de estado estacionario esperado cuando $\tau = \tau_S$ se muestra como línea punteada. [1]

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES

A continuación se describirán todos los materiales utilizados en el estudio.

ii. Disolventes

Todos los disolventes utilizados fueron de la empresa Sigma-Aldrich, de la gama CHROMASOLV® Plus para HPLC (High-performance liquid chromatography)

- **Dimetil Sulfoxido (CH₃)₂SO, DMSO**

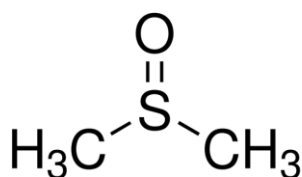


Figura 3.1.1.- Fórmula química del DMSO [2]

- **Ciclohexano C₆H₁₂, Chx**

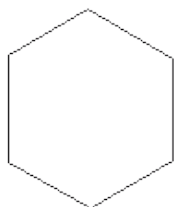


Figura 3.1.2.- Estructura química del Chx.



- Acetonitrilo CH_3CN , AcN

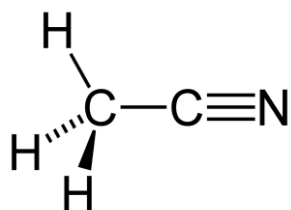


Figura 3.1.3.- Estructura química del AcN.

- Tetrahidrofurano $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$, THF

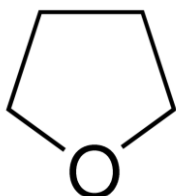


Figura 3.1.4.- Estructura química del THF.

- 2-Butanona $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$, MEK

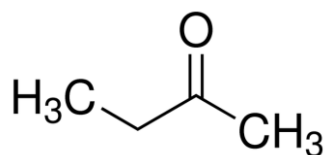


Figura 3.1.5.- Estructura química del MEK.

- Tolueno $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, Tol

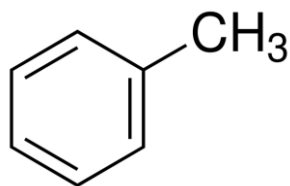


Figura 3.1.6.- Estructura química del Tol.



- Methanol CH₃OH, MeOH

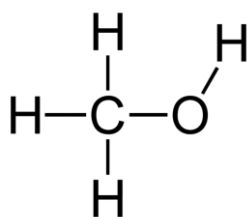


Figura 3.1.7.- Estructura química del MeOH.

A continuación se muestra una tabla con las propiedades de los disolventes utilizados en el estudio.

Parámetro/Propiedad	DMSO	Chx	AcN	THF	MEK	Tol	MeOH
M _w (g/mol)	78.129	82.145	41.052	72.107	72.107	92.140	32.420
η (kg/(m·s)) (25°C)	0.001991	0.000629	0.000341	0.000460	0.000378	0.000553	0.000551
n _d (25°C)	1.478	1.444	1.342	1.405	1.377	1.494	1.327
Z (kcal/mol)	70.2	60.1	71.3	58.8	64.0	-	83.6
E _t (kcal/mol)	45.0	31.2	46.0	37.4	41.3	33.9	55.5
ε (25°C)	46.450	1.989	35.940	7.580	18.510	2.381	32.660
δ _d (25°C) [MPa ^{1/2}]	18.4	16.8	15.3	16.8	16.0	18.0	15.1
δ _p (25°C) [MPa ^{1/2}]	16.4	0.0	18.0	5.7	9.0	1.4	12.3
δ _h (25°C) [MPa ^{1/2}]	10.4	0.2	6.1	8.0	5.0	2.0	22.3
δ (25°C) [Mpa ^{1/2}]	26.6	16.8	24.6	19.4	19.0	18.2	29.7
μ (25°C)	4.06	0.28	3.53	1.75	2.76	0.31	1.70

Tabla 3.1. Propiedades de estudio de los disolventes utilizados.[7],[8]y[9]

ii. Sonda fluorescente

- Dansilcadaverina

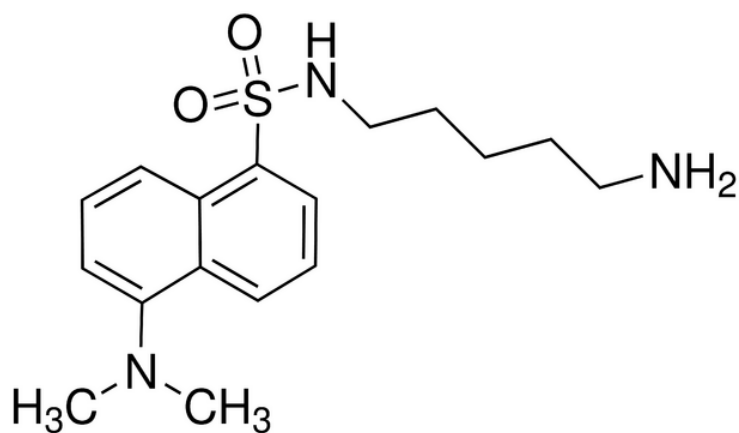


Figura 3.2.- Estructura química de la Dansilcadaverina. [2]

3.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

Se prepararon 100ml de disolución con cada disolvente con una concentración de sonda de 10^{-4} molar, que resulta de la disolución de 3,355mg de sonda en los 100ml de disolvente. Para pesar la sonda se utilizó una microbalanza Perkin-Elmer AD-4 Autobalance consiguiéndose estos valores para cada disolución.



Disolvente	Peso de sonda (mg)
Dimetil Sulfoxido	3,420
Ciclohexano	3,431
Acetonitrilo	3,450
THF	3,345
2-Butanona	3,475
Tolueno	3,380
Methanol	3,373

Tabla 3.2. Masas de la sonda fluorescente pesadas para preparar cada una de las disoluciones en los distintos disolventes seleccionados para este estudio.

Introduciendo la sonda en un matraz aforado de 100ml con una gran parte de disolvente, agitamos con un agitador magnético hasta la completa disolución de la sonda. Tras extraer el agitador, se enrasa la disolución para obtener la solución final. Las sondas preparadas se analizaron con la mayor prontitud posible, almacenando el resto en un refrigerador.



3.3. TÉCNICAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.3.1. Cubetas de disolución

Las cubetas utilizadas en ambos análisis fueron: Precision Cells hechas de Quartz Suprasil®, de la marca Hellma, (light path 10mm). Utilizando estas células de alta calidad y precisión nos permite asegurar un buen rendimiento óptico dado su alta transmisibilidad.

3.3.2. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis)

Los espectros de UV-VIS se realizaron en un espectrómetro Lambda14P de la marca Perkin Elmer. Se analizaron espectros entre 500 y 250nm en intervalos de 1nm a una velocidad de análisis de 60nm/min.

El proceso realizado fue el siguiente. Se introducen dos cubetas idénticas con el disolvente sin la sonda, para realizar el blanco. Una vez tenemos el blanco se realiza el análisis sobre la disolución con la sonda.

Los espectros de absorción de la 2-butanona y el tolueno no se consiguieron realizar con éxito, dado que presentaban una absorción propia demasiado alta, por lo que el espectrómetro no era capaz de eliminar la componente participativa del disolvente y generaba errores en el espectro.



3.3.3. Espectroscopia de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia fueron tomados mediante el fluorímetro de *Edinburgh Instruments Co. CD920*, con una lámpara de xenón de 450W Xe900 refrigerada con un PMT Cooler Controller ambos de la misma empresa. Las rendijas de emisión y excitación se fijaron para el estudio en 1,8nm.

Para la obtención del espectro final, se realizó la búsqueda del λ_{\max} de excitación en el espectro de emisión, posteriormente se hicieron medidas por encima y por debajo del máximo para comprobar la no existencia de otras partículas participativas que pudieran haberse introducido en la disolución por accidente.

3.4. PROGRAMA ANÁLISIS DE DATOS.

Como parte de la realización de este proyecto, se vio la necesidad de desarrollar una herramienta para el procesado de los múltiples datos obtenidos de los instrumentos de medida. Tanto la importación de los datos como su procesamiento es una tarea repetitiva y tediosa que con un pequeño programa en MatLab dejaría de ser un problema.

Se eligió MatLab porque todos los estudiantes de la escuela de ingeniería superior de la universidad Carlos III de Madrid, tienen conocimientos sobre este software dado que ha sido utilizado en varias asignaturas, y de esta manera sería fácil para cualquiera de ellos modificar o añadir funcionalidades al programa.

El programa requiere de la instalación del compilador de MatLab en el PC para poder funcionar.

Una descripción más detallada del funcionamiento del programa, incluido su código, se encuentra en el anexo A.



3.4.1. Parámetros fotofísicos analizados de los espectros.

A continuación se describen los parámetros fotofísicos extraídos de los espectros de fluorescencia y UV a partir de su análisis con la correspondiente rutina elaborada en MATLAB. Estos parámetros fueron procesados por el programa diseñado específicamente para este proyecto. El proceso de obtención de los datos se detalla en el anexo A.

i) Posición del valor de intensidad máxima

Es la longitud de onda λ en nm donde se registra el valor de intensidad máxima. Nos interesa para saber el desplazamiento del espectro en la banda directamente relacionado con la polaridad y microviscosidad del entorno de la sonda.

ii) Anchura a media altura

Es el ancho de la “colina” del espectro, a la altura de la mitad de la intensidad máxima. Este parámetro nos informa, entre otras cosas, de la heterogeneidad en términos de la localización de la sonda en el interior del disolvente o de microentornos o de tipo de interacciones. Al mismo tiempo una mayor anchura puede deberse a emisión por de excitación desde el estado electrónico excitado hacia mayor número de niveles vibracionales del estado electrónico fundamental o a absorción hasta mayor número de niveles vibracionales del estado electrónico correspondiente.



iii) Integral bajo el espectro.

En el caso de los espectros de absorción se hablará de absorbancia integrada y en el caso de los espectros de emisión de intensidad integrada. Representa el área bajo la curva de los espectros.

$$\langle I \rangle_{int} = \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} I(\lambda) \cdot d\lambda \quad (3.1)$$

iv) Lambda promedio.

Es el promedio de las longitudes de emisión o absorción según el caso. Al igual que la posición de la intensidad máxima, nos servirá para analizar el desplazamiento de todo el espectro en la banda.

$$\bar{\lambda} = \frac{\sum I(\lambda_i) \cdot \lambda_i}{\sum I(\lambda_i)} \quad (3.2)$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

A continuación se presentan los datos obtenidos experimentalmente de los espectros de emisión y excitación de la sonda en distintos disolventes, así como unas figuras de conjunto con los espectros de emisión y excitación máxima en todos los disolventes estudiados.

4.1.1. Dimetil Sulfóxido (CH₃)₂SO

En la figura 4.1.1.a) se muestran los espectros de emisión de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de excitación.

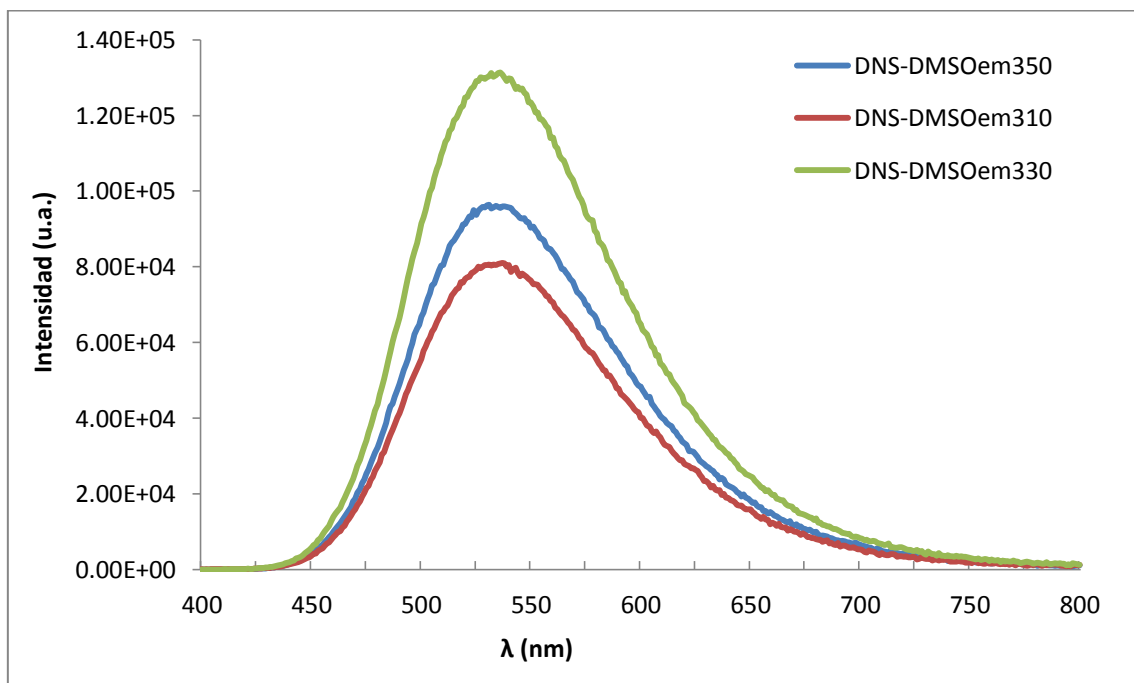


Figura 4.1.1.a) Espectros de emisión en función de la longitud de onda de excitación (350, 310 y 330nm) para Dimetil Sulfóxido.



Independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada se puede observar una única banda ancha de emisión centrada a unos 530 nm característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida en entornos polares o relativamente polares. La única diferencia corresponde a la intensidad de emisión como era de esperar se elige una energía de excitación para la que se consigue menos población del estado excitado correspondiente (probabilidad de absorción menor).

En la figura 4.1.1.b) se muestran los espectros de excitación de la Dansilcadaverina en DMSO para tres longitudes de onda de emisión.

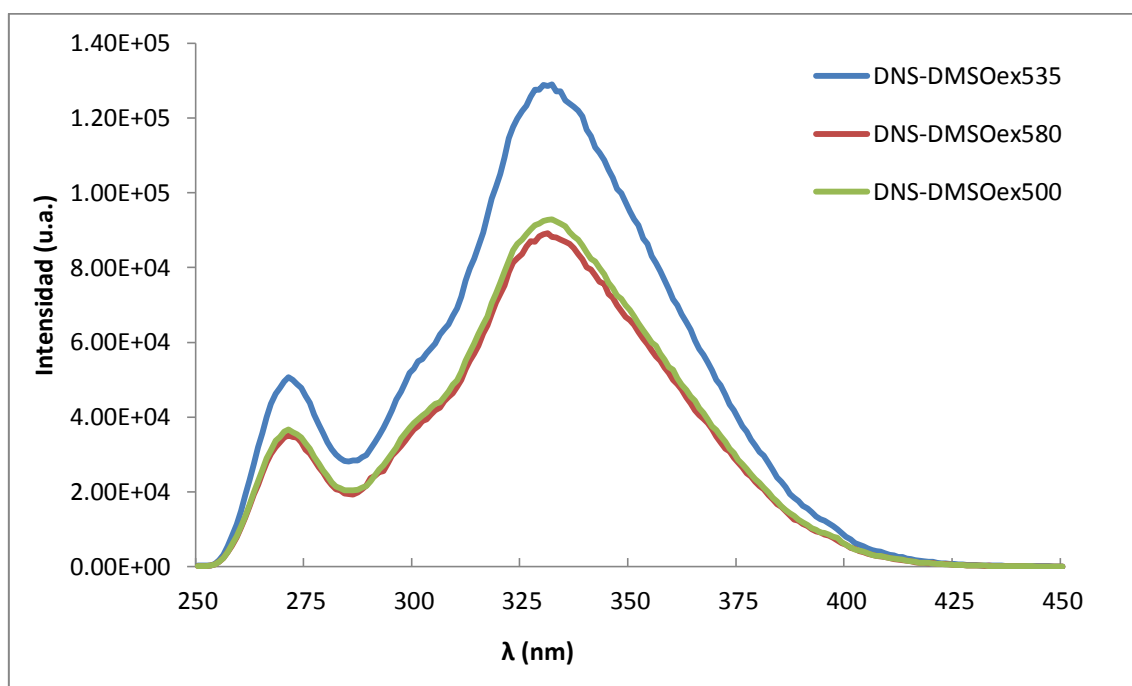


Figura 4.1.1.b) Espectros de excitación en función de la emisión (535, 580 y 500nm) para Dimetil Sulfoxido.

Se puede observar que independientemente de la longitud de onda de emisión utilizada existend dos bandas anchas de excitación centradas a unos 270 nm y 334 nm, que se pueden asociar a transiciones del segundo y primer singlete excitado respectivamente, características de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida. La única diferencia observada entre los espectros de la Figura 4.1.1.b)



corresponde a la intensidad recogida, como era de esperar si se elige una longitud de onda de emisión para la que la población del nivel excitado es mayor o menor según corresponda.

4.1.2. Ciclohexano C₆H₁₂

En la figura 4.1.2.a) se muestran los espectros de emisión de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de excitación.

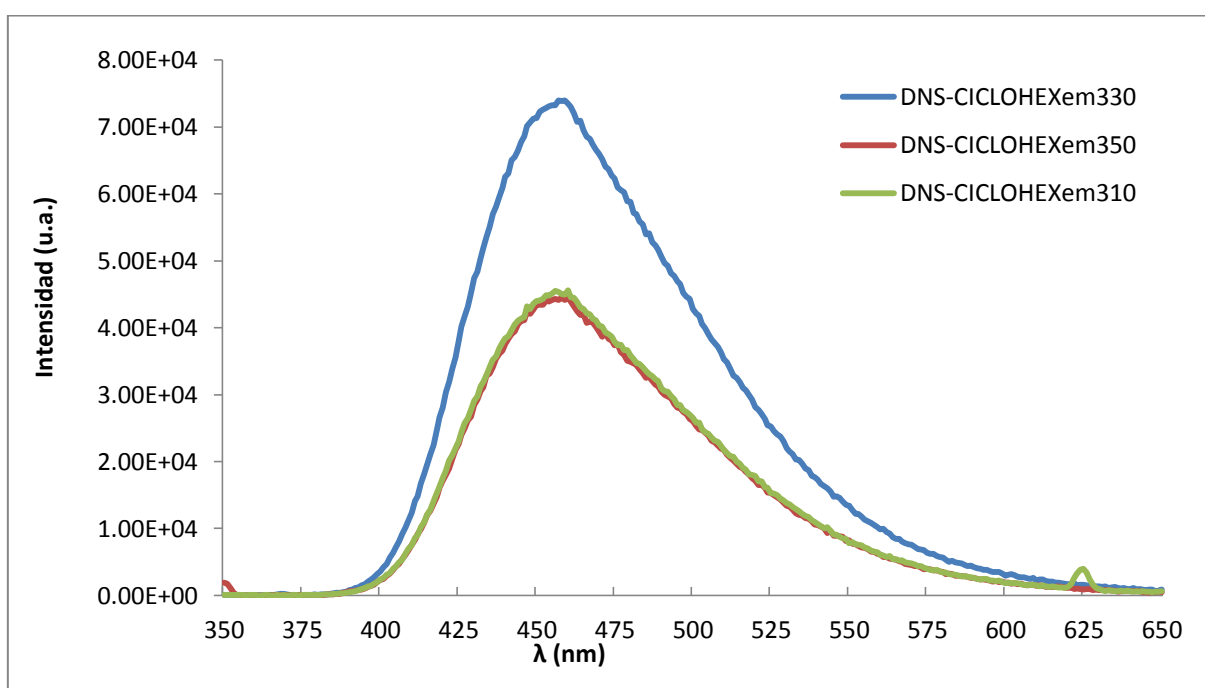


Figura 4.1.2.a) Espectros de emisión en función de la excitación (330,350 y 310nm) para Ciclohexano.

Independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada se puede observar una única banda ancha de emisión centrada a unos 450 nm característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida en entornos poco polares. La única diferencia corresponde a la intensidad de emisión como era de esperar se elige una energía de excitación para la que se consigue menos población del estado excitado correspondiente (probabilidad de absorción menor).



En la figura 4.1.2.b) se muestran los espectros de excitación de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de emisión.

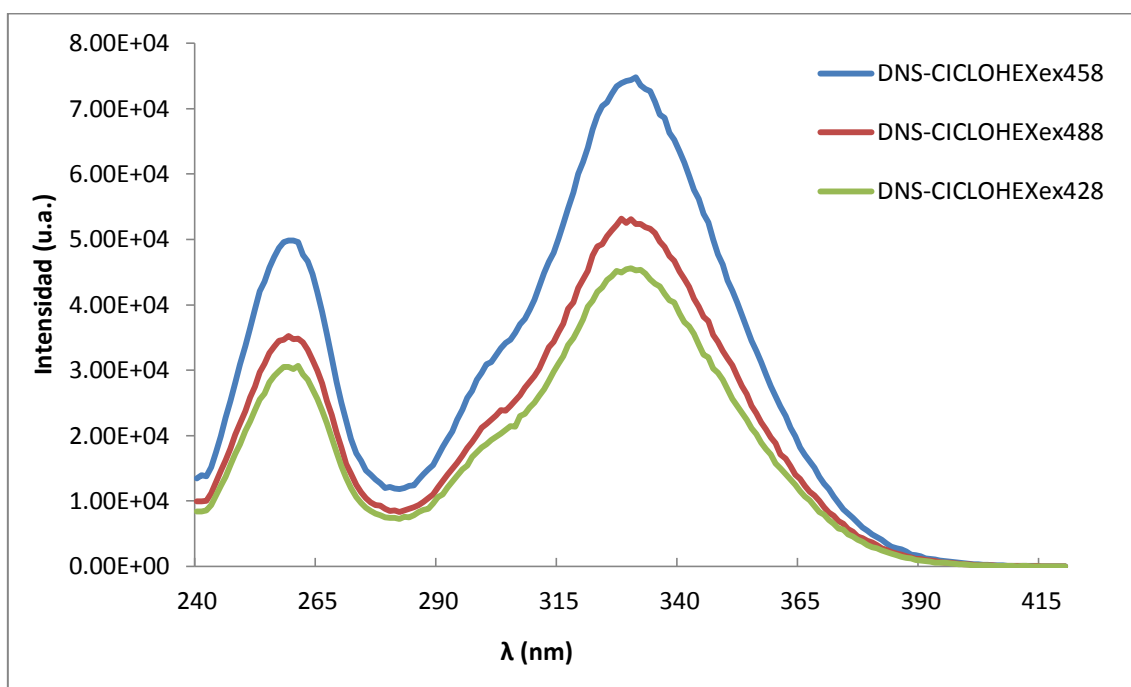


Figura 4.1.2.b) Espectros de excitación en función de la emisión (458,488 y 428nm) para Ciclohexano.

Independientemente de la longitud de onda de emisión utilizada se pueden observar dos bandas anchas de excitación centradas a unos 260 nm y 330 nm y que se pueden asociar a transiciones del segundo y primer singlete excitado respectivamente, características de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida. La única diferencia observada entre los espectros de la Figura 4.1.2.b) corresponde a la intensidad recogida, como era de esperar si se elige una longitud de onda de emisión para la que la población del nivel excitado es mayor o menor según corresponda.

4.1.3. Acetonitrilo CH₃CN

En la figura 4.1.3.a) se muestran los espectros de emisión de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de excitación.

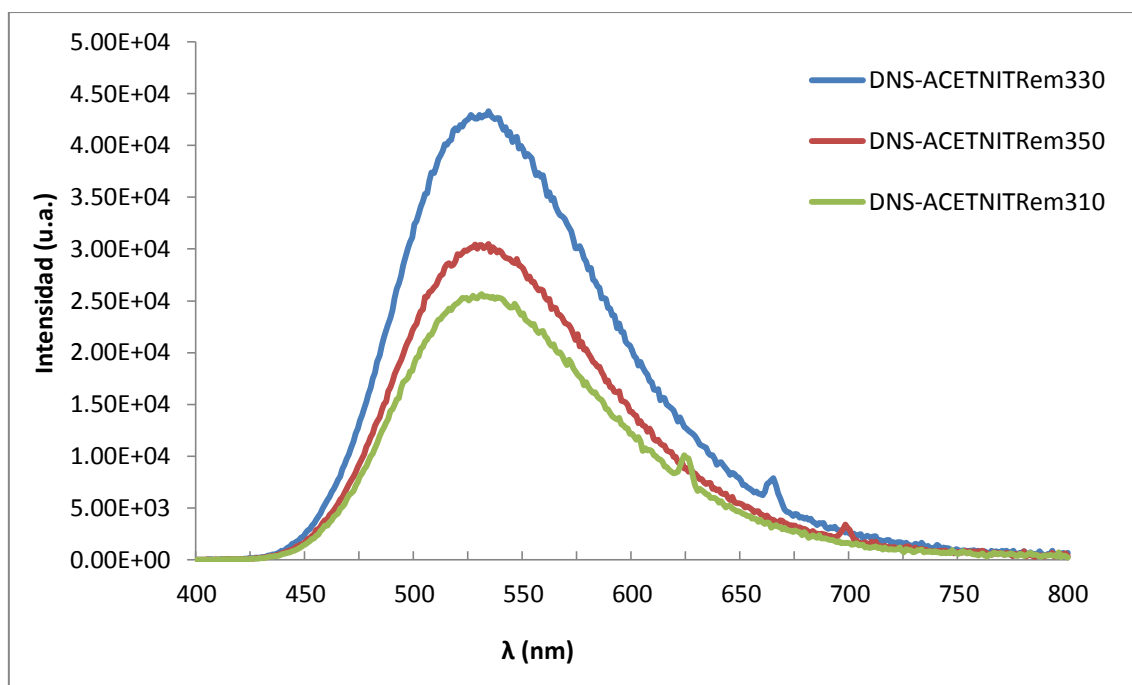


Figura 4.1.3.a) Espectros de emisión en función de la excitación (330, 350 y 310nm) para Acetonitrilo.

Independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada se puede observar una única banda ancha de emisión centrada a unos 530 nm característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida en entornos polares o relativamente. La única diferencia corresponde a la intensidad de emisión como era de esperar se elige una energía de excitación para la que se consigue menos población del estado excitado correspondiente (probabilidad de absorción menor). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos para otros disolventes, como por ejemplo el DMSO (Figura 4.1.1.a)) o el Chx(Figura 4.1.2.a)). La diferencia más significativa se encuentra en la longitud de onda del máximo de emisión que dependerá del disolvente seleccionado. Los pequeños picos observados a longitudes de onda largas corresponden claramente a segundas reflexiones como se puede fácilmente

comprobar del hecho de que aparecen al doble de la longitud de onda de excitación correspondiente.

En la figura 4.1.3.b) se muestran los espectros de excitación de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de emisión.

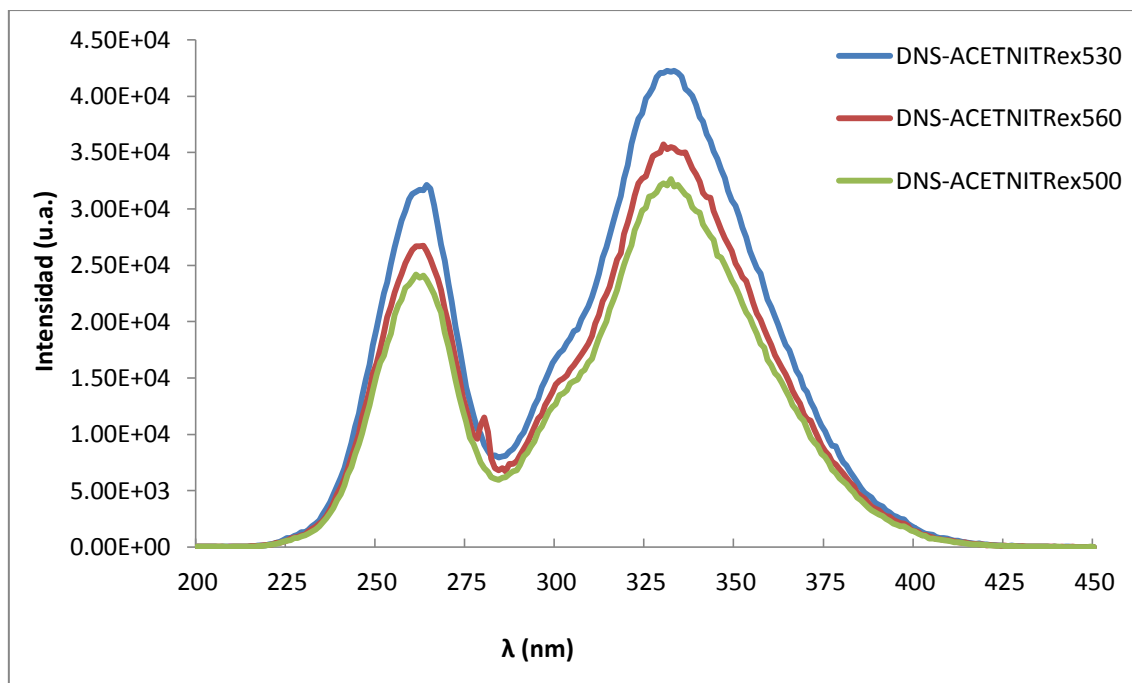


Figura 4.1.3.b) Espectros de excitación en función de la emisión (530,560 y 500nm) para Acetonitrilo.

Independientemente de la longitud de onda de emisión utilizada se pueden observar dos bandas anchas de excitación centradas a unos 260 nm y 330 nm y que se pueden asociar a transiciones del segundo y primer singlete excitado respectivamente, características de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida. La única diferencia observada entre los espectros de la Figura 4.1.3.b) corresponde a la intensidad recogida, como era de esperar si se elige una longitud de onda de emisión para la que la población del nivel excitado es mayor o menor según corresponda. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos para otros disolventes, como por ejemplo el DMSO (Figura 4.1.1.b)) o el Chx(Figura 4.1.2.b)). La diferencia más significativa se encuentra en la longitud de onda a la que aparecen los dos máximos de excitación (que dependerá del disolvente seleccionado).

4.1.4. Tetrahidrofurano C₄H₈O

En la figura 4.1.4.a) se muestran los espectros de emisión de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de excitación.

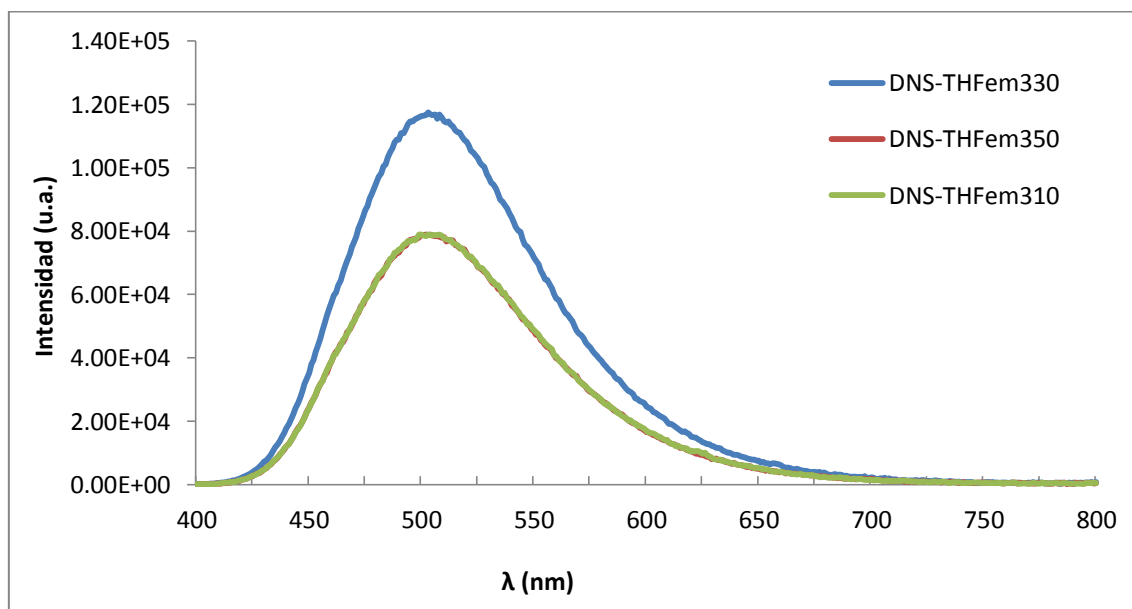


Figura 4.1.4.a) Espectros de emisión en función de la excitación (330, 350 y 310nm) para THF.

El espectro presenta una banda ancha con un máximo de emisión, siendo la forma muy similar a la observada en los otros disolventes estudiados. Independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada se puede observar una única banda ancha de emisión centrada a unos 500 nm característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida en entornos poco polares. La única diferencia corresponde a la intensidad de emisión como era de esperar se elige una energía de excitación para la que se consigue menos población del estado excitado correspondiente (probabilidad de absorción menor).

En la figura 4.1.4.b) se muestran los espectros de excitación de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de emisión.

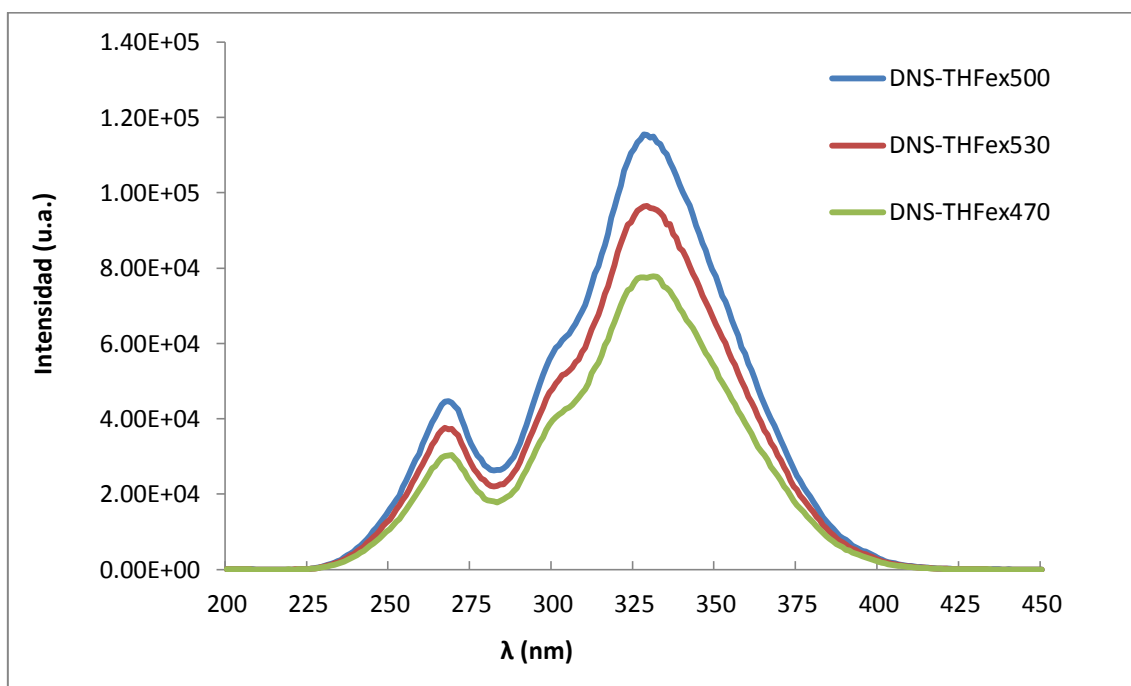


Figura 4.1.4.b) Espectros de excitación en función de la emisión (500,530 y 470nm) para THF.

Independientemente de la longitud de onda de emisión utilizada se pueden observar dos bandas anchas de excitación centradas a unos 270 nm y 330 nm y que se pueden asociar a transiciones del segundo y primer singlete excitado respectivamente, características de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida. La única diferencia observada entre los espectros de la Figura 4.1.4.b) corresponde a la intensidad recogida, como era de esperar si se elige una longitud de onda de emisión para la que la población del nivel excitado es mayor o menor según corresponda.

4.1.5. 2-Butanona $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$

En la figura 4.1.5.a) se muestran los espectros de emisión de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de excitación en 2-butanona o metil-etilcetona (MEK).

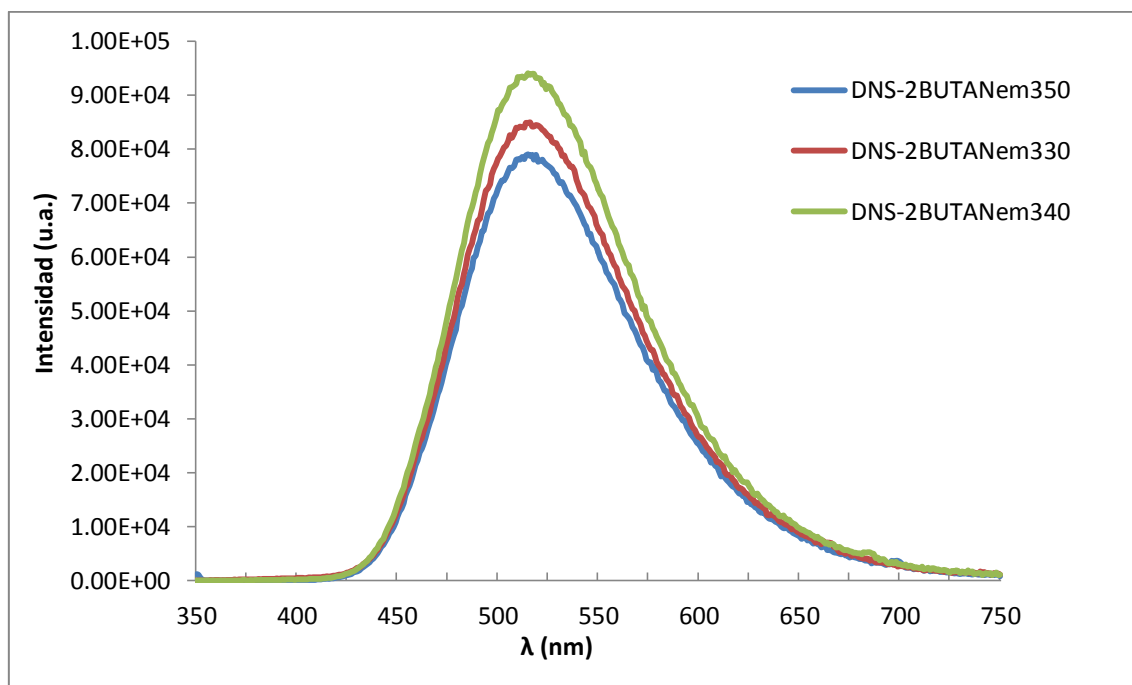


Figura 4.1.5.a) Espectros de emisión en función de la excitación (350, 330 y 340nm) para 2-Butanona.

Independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada se puede observar una única banda ancha de emisión centrada a unos 520 nm característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida en entornos polares o relativamente. La única diferencia corresponde a la intensidad de emisión como era de esperar se elige una energía de excitación para la que se consigue menos población del estado excitado correspondiente (probabilidad de absorción menor).

En la figura 4.1.5.b) se muestran los espectros de excitación de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de emisión.

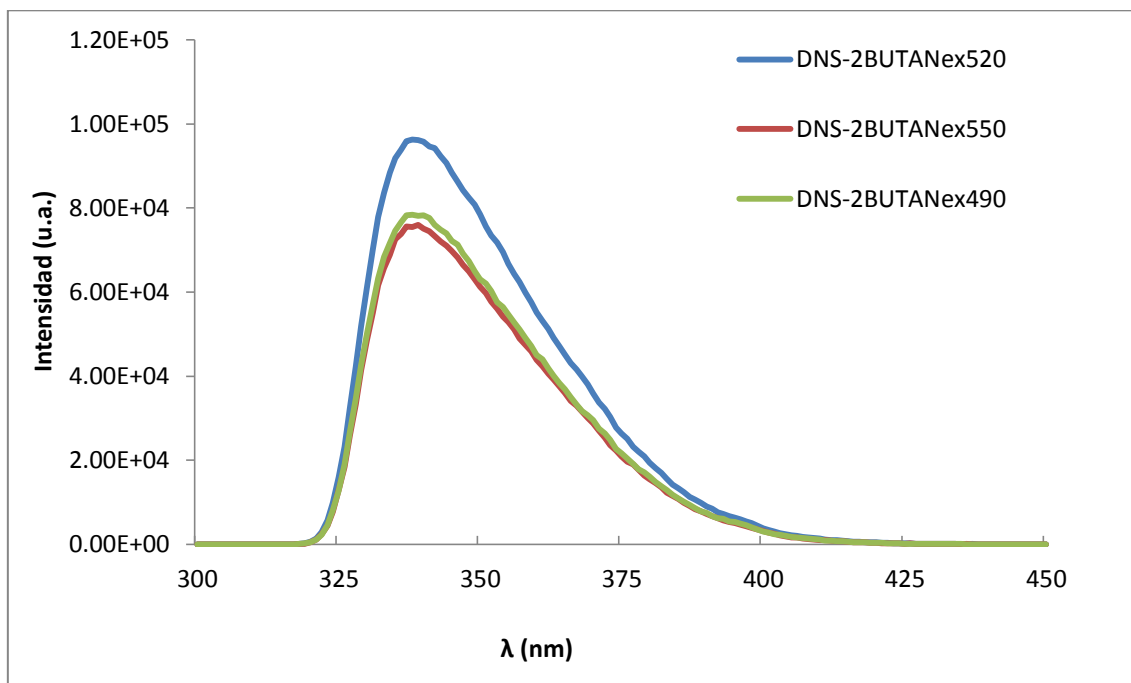


Figura 4.1.5.b) Espectros de excitación en función de la emisión (520,550 y 490nm) para 2-Butanona.

Independientemente de la longitud de onda de emisión utilizada se puede observar una banda ancha de excitación centrada a unos 350 nm y que se puede asociar a transiciones del primer singlete excitado, característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida. La única diferencia observada entre los espectros de la Figura 4.1.5.b) corresponde a la intensidad recogida, como era de esperar si se elige una longitud de onda de emisión para la que la población del nivel excitado es mayor o menor según corresponda.

4.1.6. Tolueno $C_6H_5CH_3$

En la figura 4.1.6.a) se muestran los espectros de emisión de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de excitación.

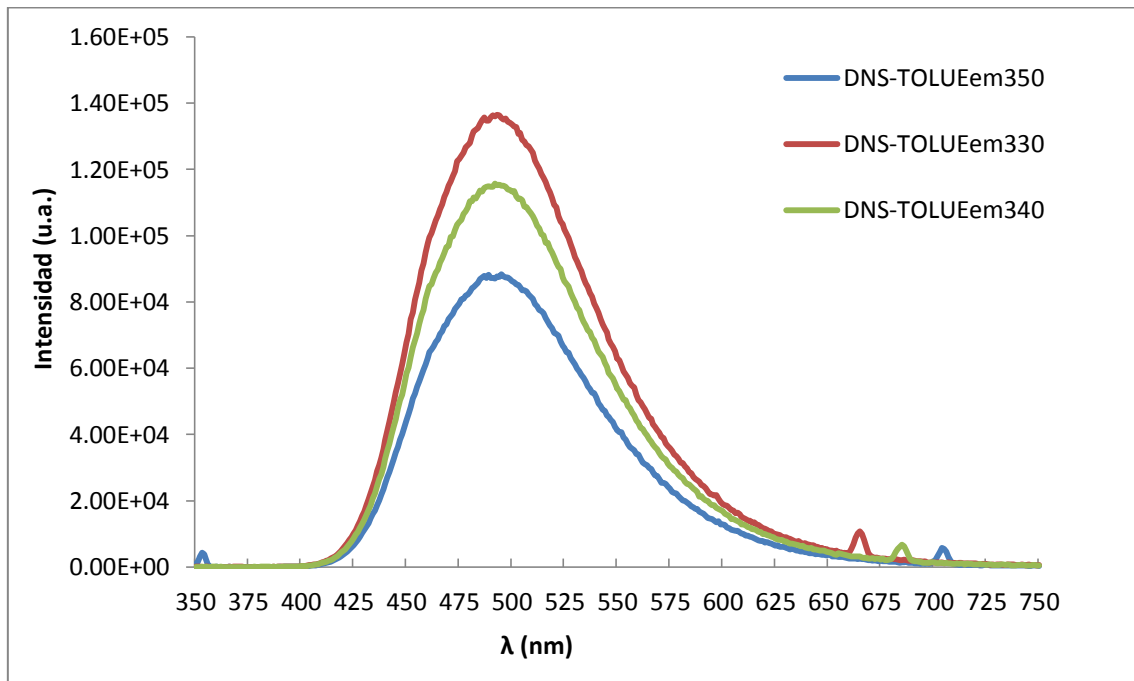


Figura 4.1.6.a) Espectros de emisión en función de la excitación (350, 330 y 340nm) para Tolueno.

Independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada se puede observar una única banda ancha de emisión centrada a unos 520 nm característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida en entornos poco polares. La única diferencia corresponde a la intensidad de emisión como era de esperar se elige una energía de excitación para la que se consigue menos población del estado excitado correspondiente (probabilidad de absorción menor).

En la figura 4.1.6.b) se muestran los espectros de excitación de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de emisión.

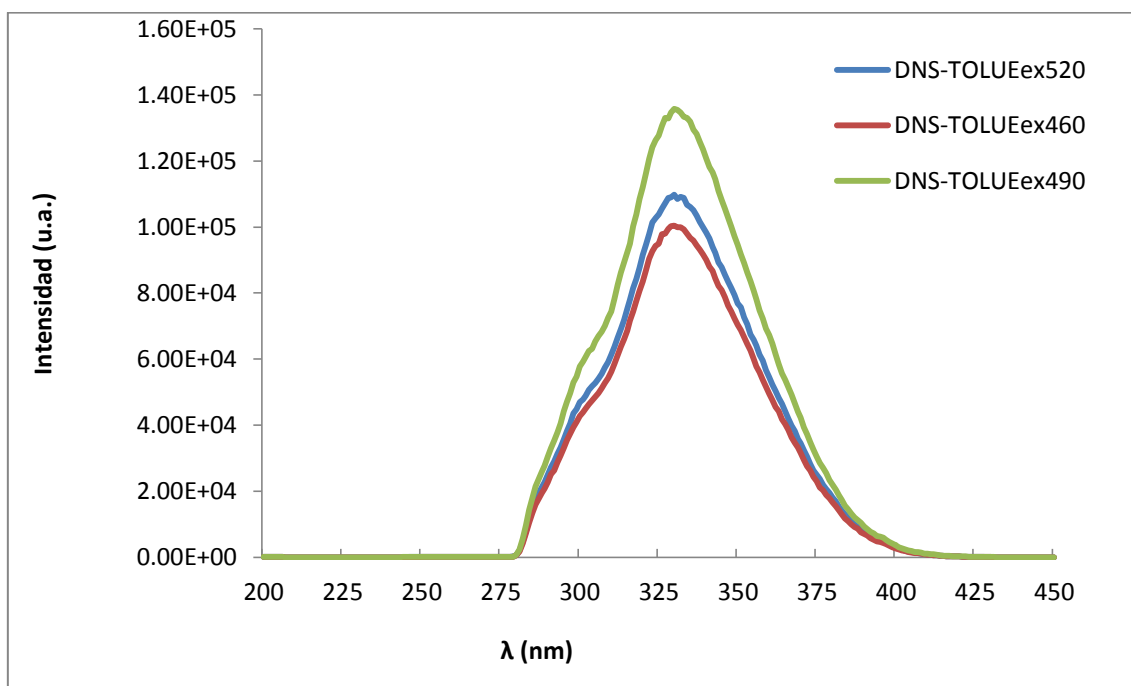


Figura 4.1.6.b) Espectros de excitación en función de la emisión (520,460 y 490nm) para 2- Tolueno.

Independientemente de la longitud de onda de emisión utilizada se puede observar una banda ancha de excitación centrada a unos 330 nm y que se puede asociar a la transición del primer singlete excitado, característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida. La única diferencia observada entre los espectros de la Figura 4.1.6.b) corresponde a la intensidad recogida, como era de esperar si se elige una longitud de onda de emisión para la que la población del nivel excitado es mayor o menor según corresponda.

4.1.7. Methanol CH₃OH

En la figura 4.1.7.a) se muestran los espectros de emisión de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de excitación.

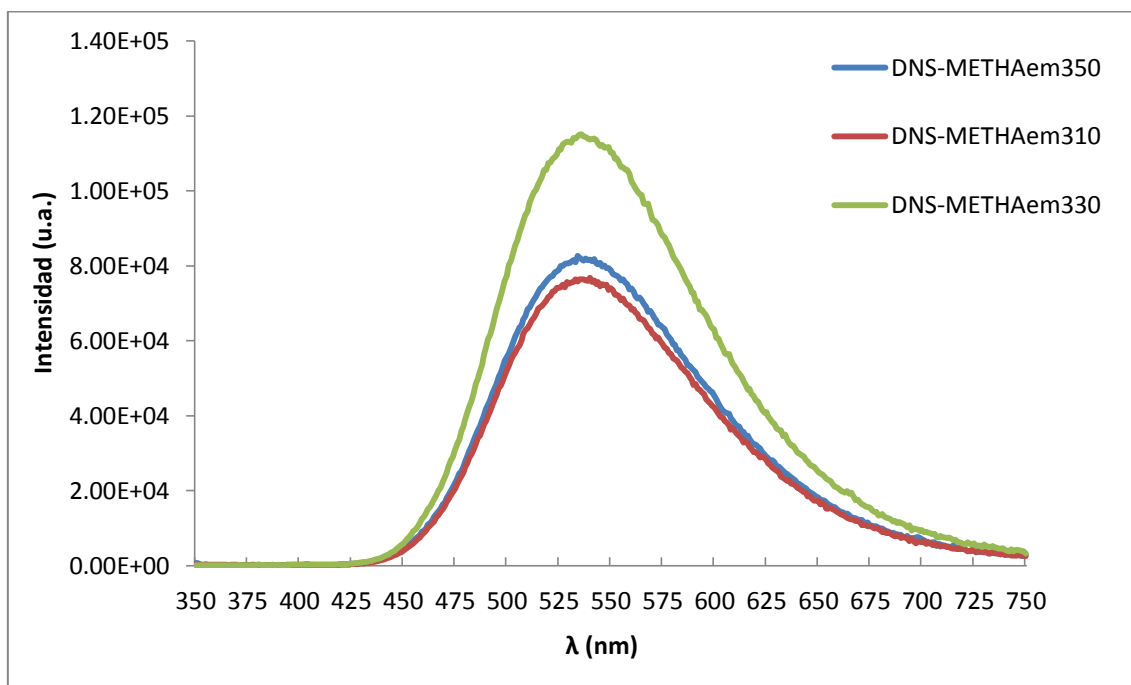


Figura 4.1.7.a) *Espectros de emisión en función de la excitación (350, 310 y 330nm) para Metanol.*

Independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada se puede observar una única banda ancha de emisión centrada a unos 570 nm característica de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida en entornos polares o relativamente. La única diferencia corresponde a la intensidad de emisión como era de esperar se elige una energía de excitación para la que se consigue menos población del estado excitado correspondiente (probabilidad de absorción menor).

En la figura 4.1.7.b) se muestran los espectros de excitación de la dansilcadaverina para tres longitudes de onda de emisión.

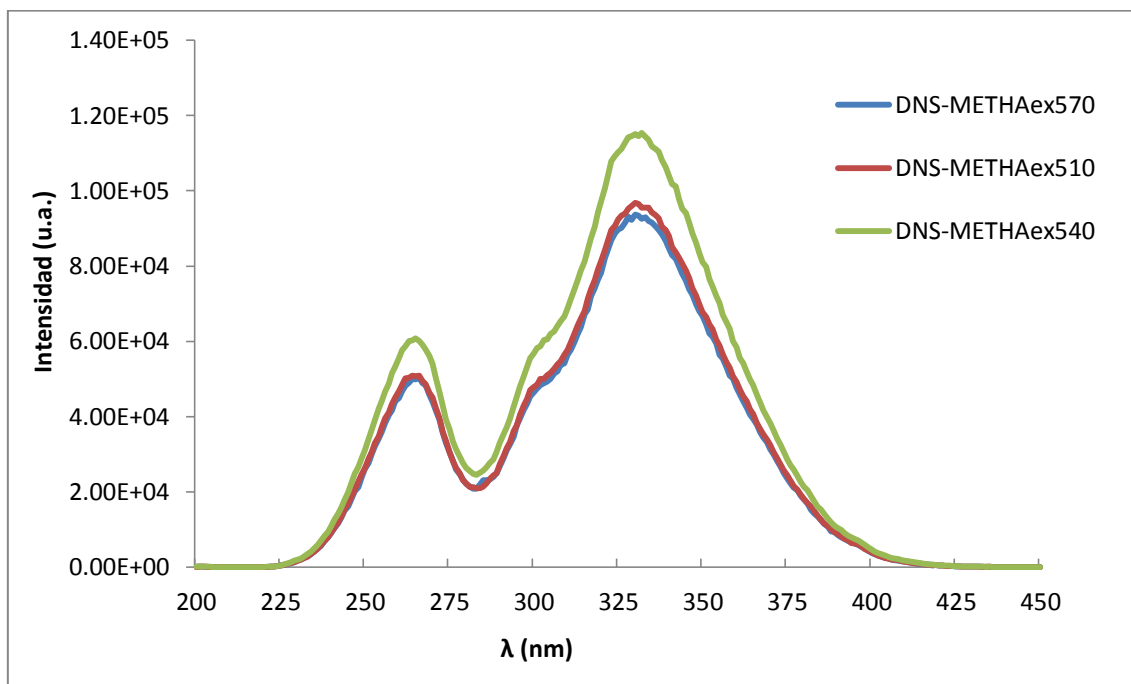


Figura 4.1.7.b) Espectros de excitación en función de la emisión (570,510 y 540nm) para Metanol.

Independientemente de la longitud de onda de emisión utilizada se pueden observar dos bandas anchas de excitación centradas a unos 270 nm y 330 nm y que se pueden asociar a transiciones del segundo y primer singlete excitado respectivamente, características de los derivados del dimetilamino naftalen sulfonamida. La única diferencia observada entre los espectros de la Figura 4.1.7.b corresponde a la intensidad recogida, como era de esperar si se elige una longitud de onda de emisión para la que la población del nivel excitado es mayor o menor según corresponda.

4.1.8. Multiespectro Emisión

En la figura 3.4.1.8.a) se observa la variación de la emisión de la sonda en función del disolvente. En el apartado 4.3 analizaremos distintos parámetros de los espectros en función de aquellos de los disolventes para poder descubrir cualquier correlación.

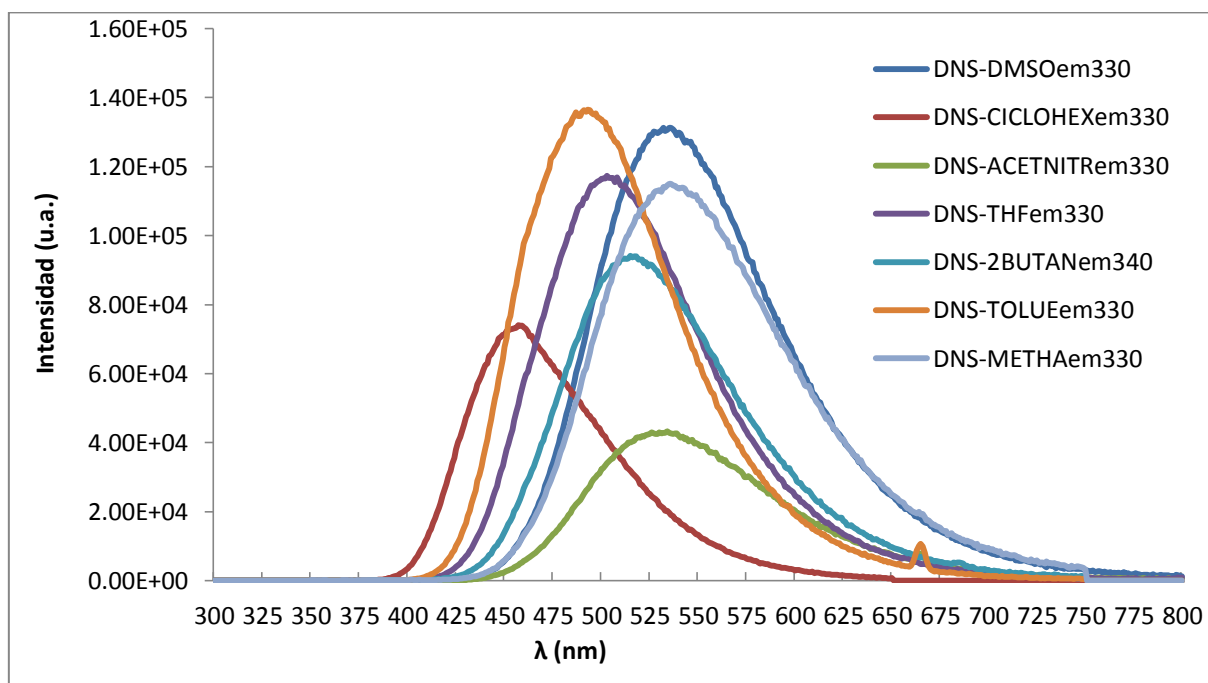


Figura 4.1.8.a) Espectros de emisión para todos los disolventes para su excitación máxima.

A primera vista, los datos normalizados de la figura 4.1.8.b) muestran un desplazamiento de los espectros en los disolventes que conocemos más polares hacia longitudes de onda mayores. Por ejemplo, en el ciclohexano, que es el disolvente menos polar de los estudiados, el máximo del espectro de emisión se encuentra a unos 450 nm, mientras que en el caso del metanol, que es uno de los disolventes más polares, el máximo del espectro de emisión aparece a unos 550nm. Este desplazamiento de unos 100nm es un claro ejemplo del efecto solvatocrómico producidos por las características del disolvente.



Apreciar los cambios en el ancho de la banda es más difícil, pero sabemos que la anchura de banda está relacionada con la heterogeneidad del medio, es decir el número de lugares (distintos microentornos) en los que se puede encontrar el fluoróforo, en este caso al tratarse de un disolvente trataremos la microheterogeneidad del entorno a escala molecular.

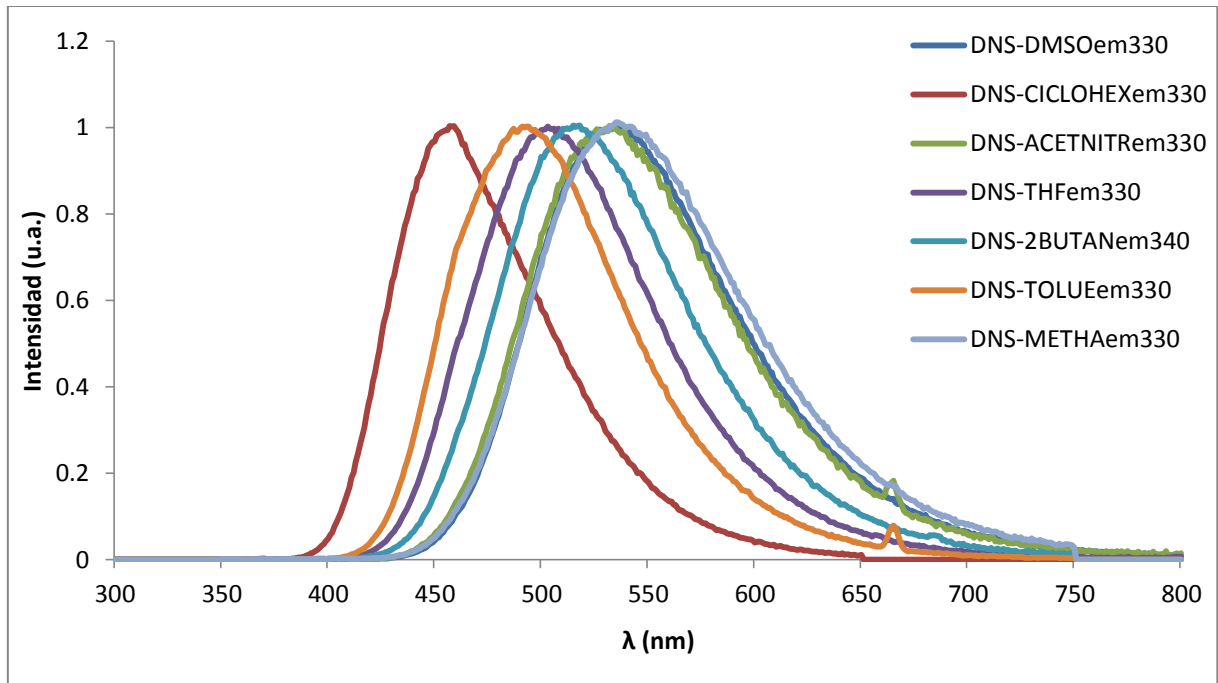


Figura 4.1.8.a) Espectros normalizados de emisión para todos los disolventes para su excitación máxima.

4.1.9. Multiespectro Excitación

En la figura 4.1.9. se muestran los espectros de excitación de la sonda a una longitud de onda de emisión para todos los disolventes considerados. Como se observa, no existe variación importante entre el comportamiento de la sonda en los distintos disolventes. Esto era de esperar ya que el espectro de excitación muestra la diferencia de energías entre el estado fundamental S_0 y el primer estado excitado S_1 que debería ser constante independientemente del medio en el que se encuentre la especie. En este caso se tienen en cuenta procesos que ocurren en una escala de tiempos inferiores a las necesarias para que se produzcan las relajaciones del disolvente y por tanto las interacciones que dan lugar a estabilizaciones de estados excitados. Es decir, las energías de los estados apenas varían.

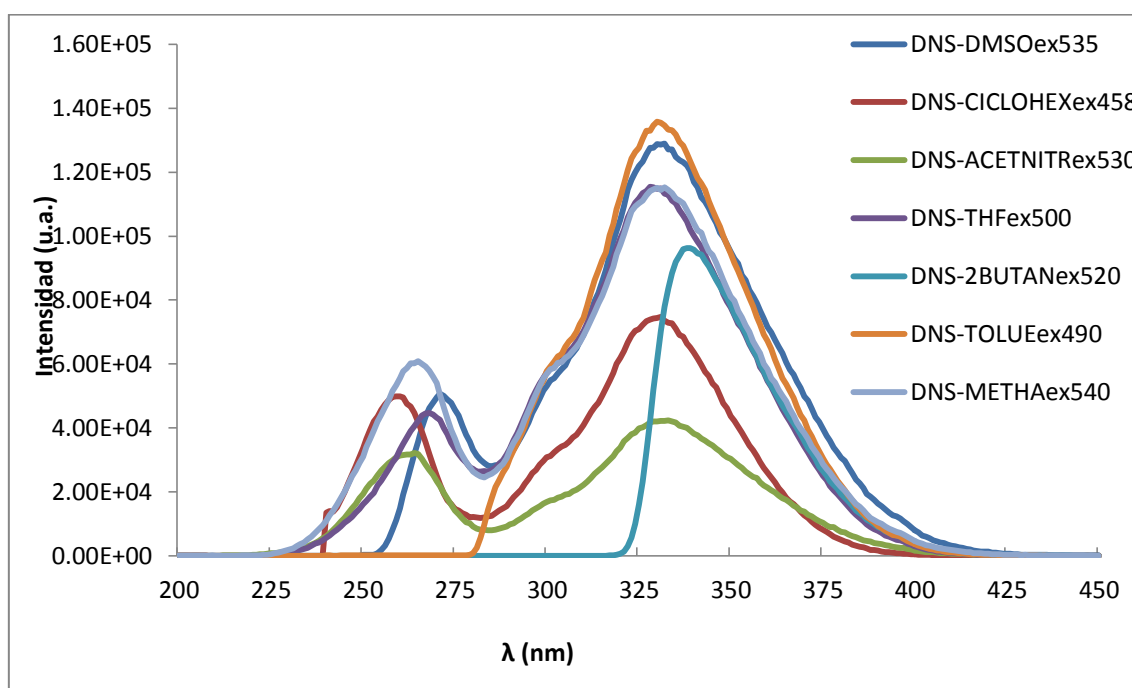


Figura 4.1.9. Espectros de excitación para todos los disolventes para su emisión máxima.

4.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VIS

En la figura 4.2. se observa la variación de la absorción de la sonda en función del disolvente. En el apartado de resultados analizaremos distintos parámetros de los espectros en función de aquellos de los disolventes para poder descubrir cualquier correlación.

El espectro de absorción nos muestra la diferencia de energías entre el estado fundamental S_0 y los distintos estados excitados S_1, S_2, S_3 , etc. Por lo que el espectro de absorción y el de excitación solo coincidirá en aquellos en los que la diferencia entre estados excitados distintos sea inapreciable. En los casos estudiados sí que existe esta diferencia, y analizaremos este comportamiento en el apartado 4.4.

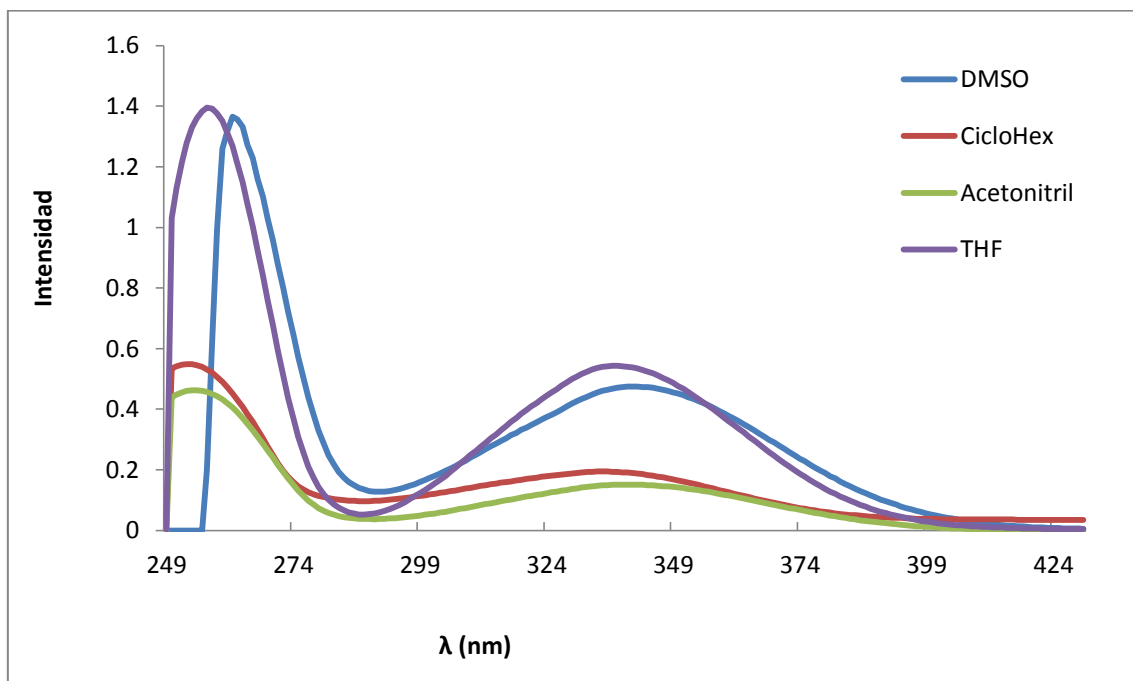


Figura 4.2. Espectros de UV-Vis.



4.3. ANÁLISIS DE ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE EMISIÓN

Las características de emisión fluorescente de nuestro cromóforo son dependientes del microentorno. Aquí se presenta la influencia de los distintos parámetros estudiados de los disolventes sobre los espectros de emisión.

4.3.1. Efecto de la viscosidad

En las siguientes figuras se observa el comportamiento del espectro en función de la viscosidad del disolvente. A la vista de los resultados se puede establecer que existe una tendencia al desplazamiento hacia el ultravioleta, menor longitud de onda (Figura 4.3.1.a) y al estrechamiento de la banda (Figura 4.3.1.b) que aumenta con el aumento de la viscosidad.

Este comportamiento puede ser debido a que la relajación del disolvente se produce en un tiempo menor, debido a la mayor “rigidez” del microentorno molecular. Esto debe implicar un acoplamiento dipolar menos efectivo y por tanto menor desestabilización del estado excitado lo que debería dar lugar a la de excitación radiativa desde un nivel de mayor energía. De esta manera, por lo explicado en el apartado 2.7 del capítulo de fundamentos, la emisión se desplaza menos hacia el rojo, emitiendo en una longitud de onda menor.

El descenso del ancho de la banda (Figura 4.3.1.b) con el aumento de la viscosidad apunta a que la viscosidad produce una distribución más homogénea de los distintos entornos moleculares, produciéndose una emisión de todas las moléculas de disolvente más concentradas en el entorno al máximo de emisión.

El valor de la integral del espectro (Figura 4.3.1.c) parece no seguir ninguna tendencia clara con la variación de la viscosidad del disolvente.

Por último, el valor de la longitud de onda promedio (Figura 4.3.1.d) con la viscosidad del disolvente sigue una tendencia similar a la longitud de onda del máximo de emisión (Figura 4.3.1.a), pudiendo emplearse un razonamiento similar para explicar este comportamiento.



Cabe destacar que no se incluye el dato para el DMSO en este apartado, ya que presenta una viscosidad un orden de magnitud superior al resto y su comportamiento en función de la viscosidad no se ajusta a la tendencia explicada aquí.

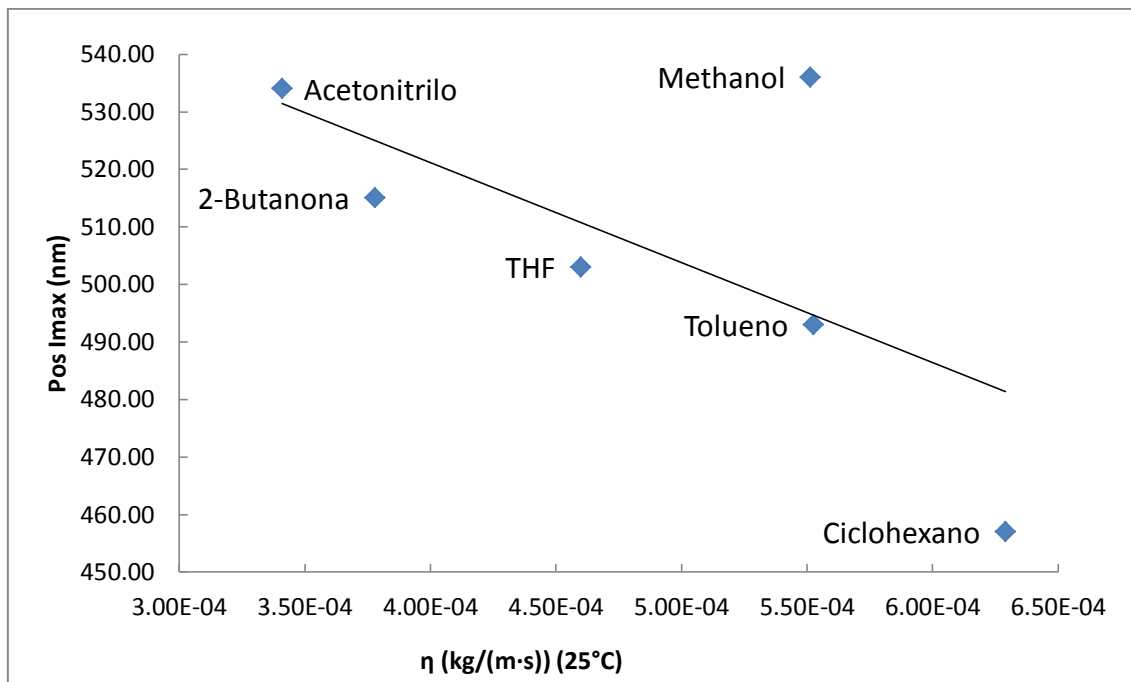


Figura 4.3.1. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de la viscosidad del disolvente.

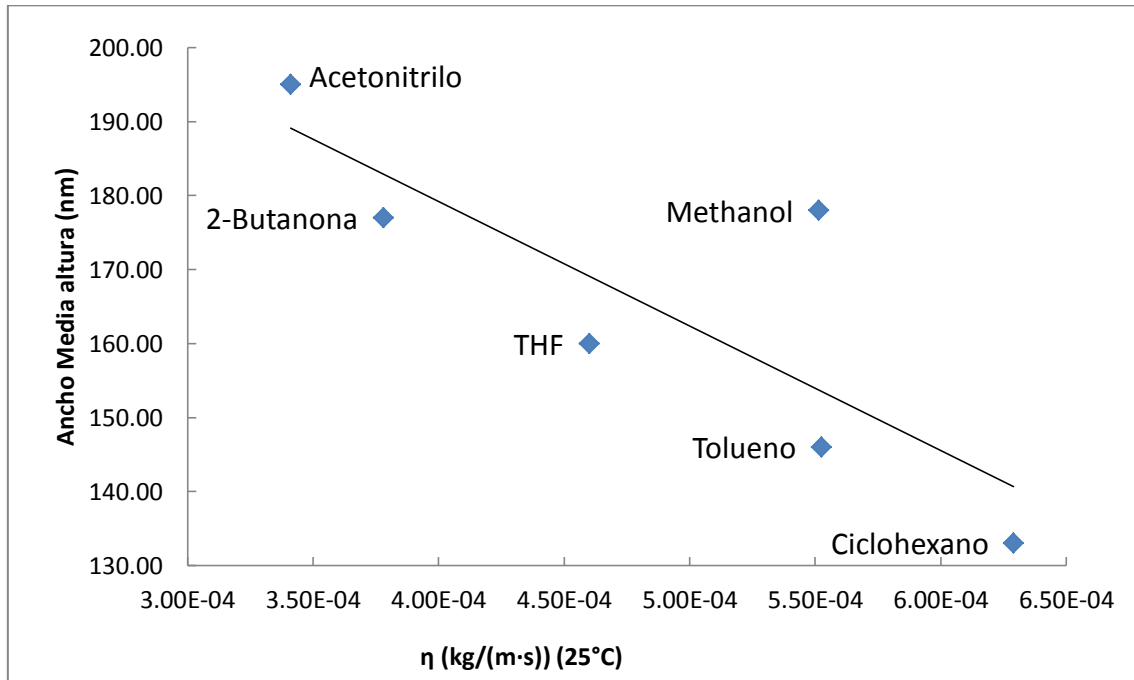


Figura 4.3.1. b) Variación del ancho a media altura en función de la viscosidad del disolvente.

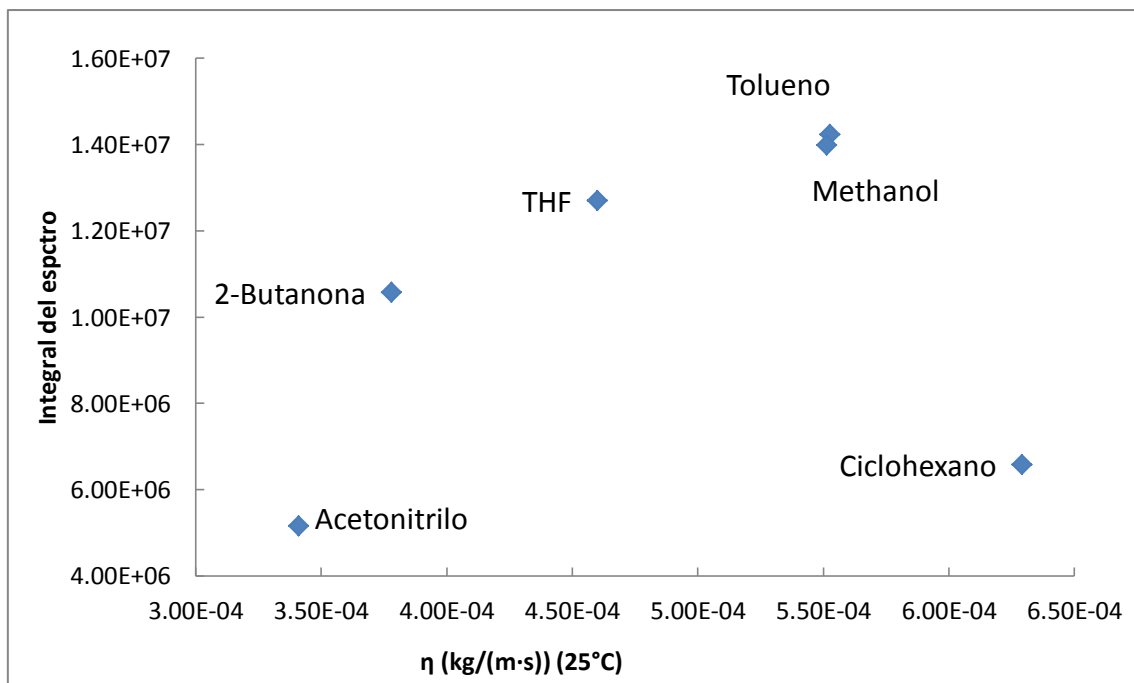


Figura 4.3.1. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función de la viscosidad del disolvente.

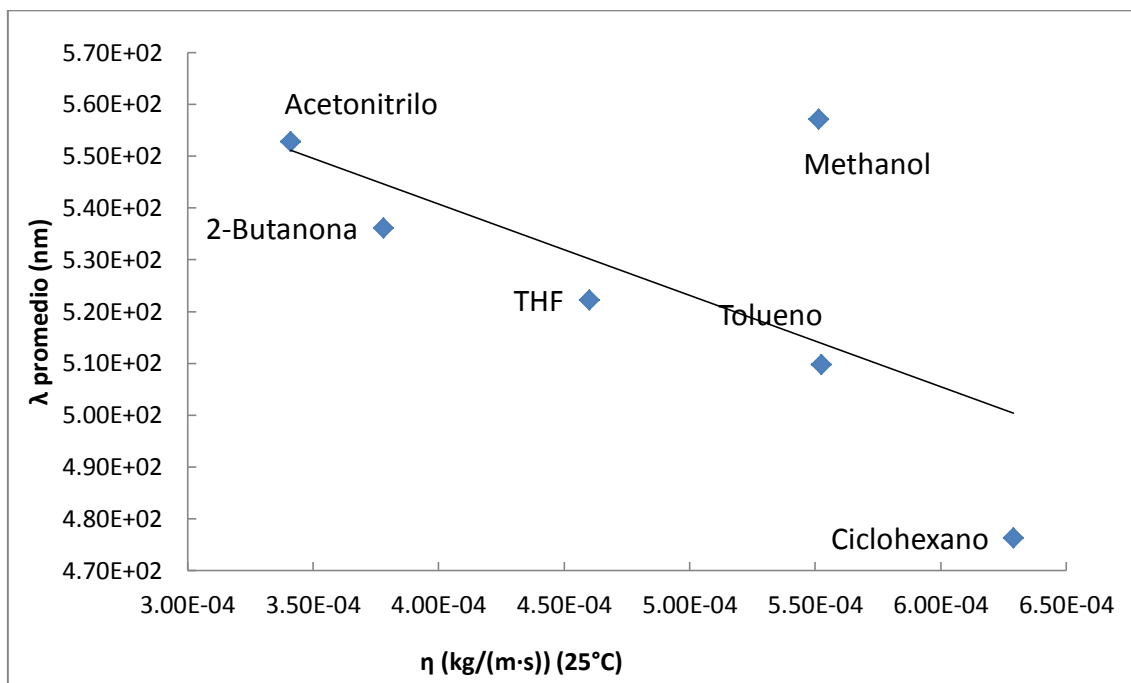


Figura 4.3.1.d) Variación de λ promedio en función de la viscosidad del disolvente.

4.3.2. Efecto del índice de refracción

En las siguientes figuras se observa el comportamiento del espectro en función del índice de refracción del disolvente. A la vista de los resultados se puede establecer que existe una influencia sobre los espectros parecida a la observada en la viscosidad, es decir, una tendencia de estrechamiento (Figura 4.3.2.b), y desplazamiento hacia el ultravioleta (Figura 4.3.2.a) que aumenta con el aumento del índice de refracción.

El índice de refracción forma parte, junto con la constante dieléctrica, de la ecuación que define la polarizabilidad del disolvente. Por los resultados obtenidos parece que su efecto es contrario al que produce la constante dieléctrica, pero siendo sus efectos sobre los espectros menos significativos que los de ésta.

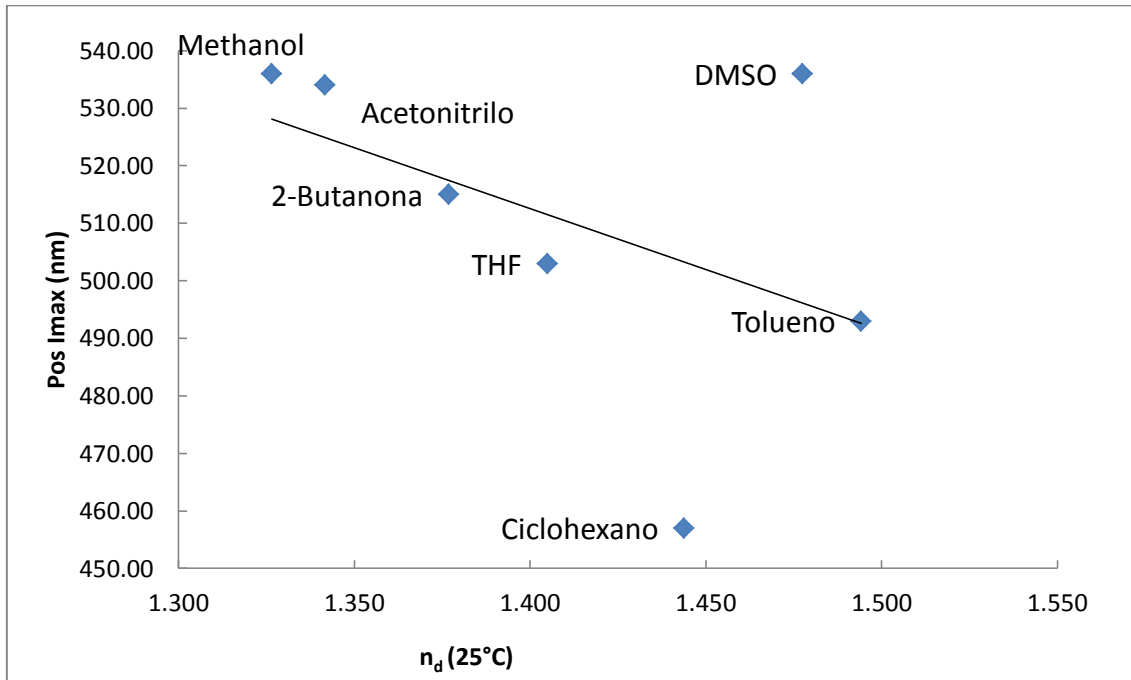


Figura 4.3.2. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función del índice de refracción del disolvente.

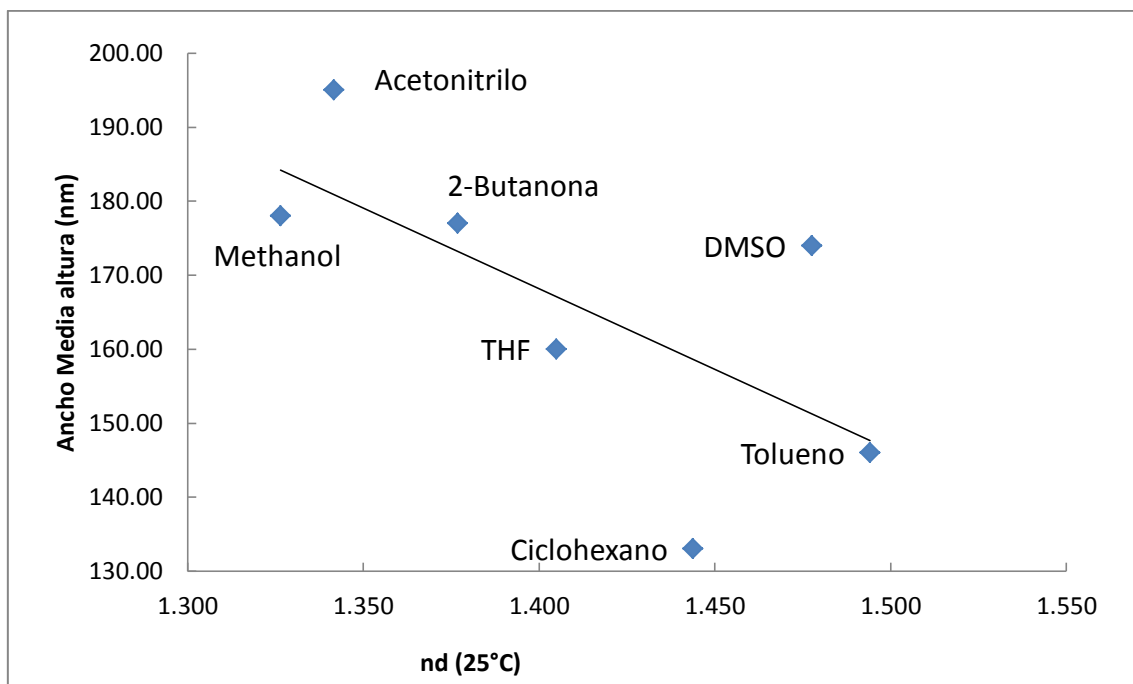


Figura 4.3.2. b) Variación del ancho a media altura en función del índice de refracción del disolvente.

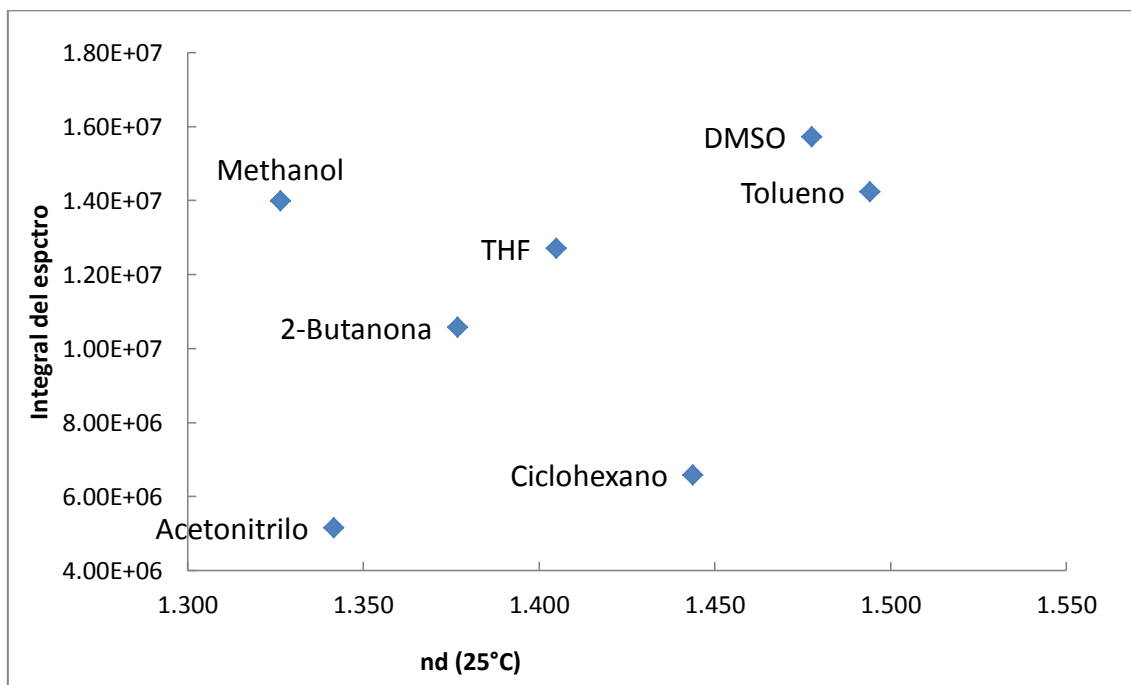


Figura 4.3.2. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función del índice de refracción del disolvente.

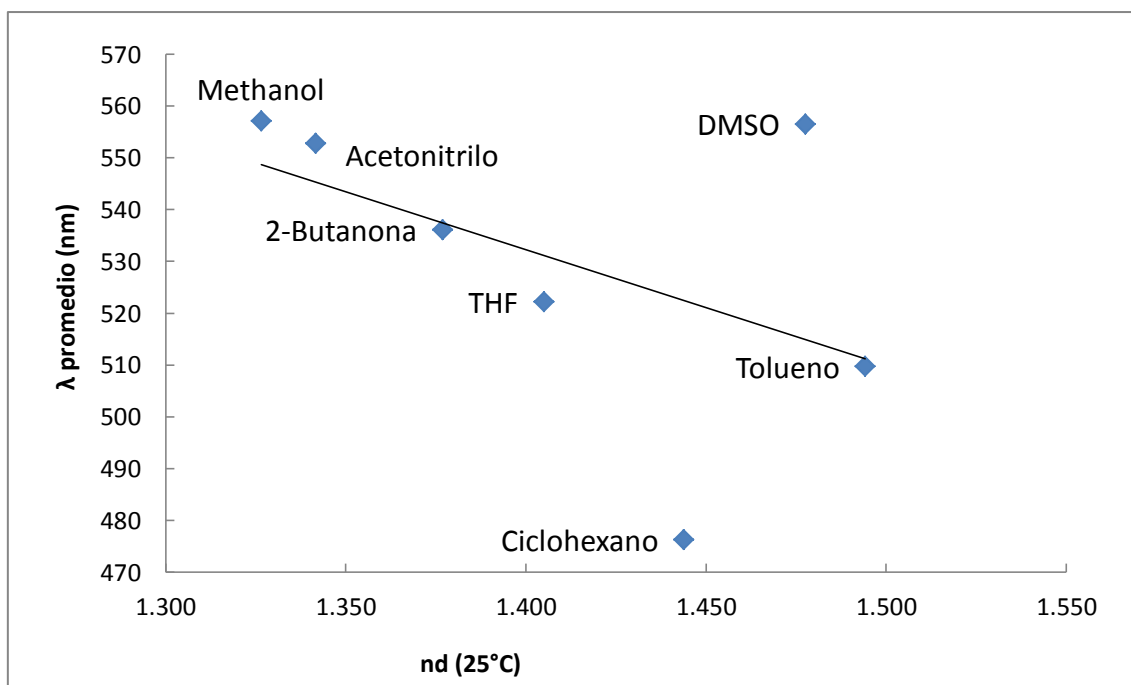


Figura 4.3.2. b) Variación de λ promedio en función del índice de refracción del disolvente.



4.3.3. Efecto de la constante dieléctrica

La absorción de un fotón por parte de la sonda da lugar a la creación instantánea de un dipolo que perturba su entorno inmediato. Después de la excitación, el disolvente responde mediante una reorganización molecular alrededor del fluoróforo. Este proceso se denomina relajación del disolvente, cuyo efecto es el de estabilizar el nuevo estado excitado del fluoróforo [3]. Es decir, existe menor diferencia de energía entre el estado fundamental y el excitado por acción del disolvente. Este efecto es tanto mayor cuanto mayor sea la constante dieléctrica del disolvente puesto que el acoplamiento dipolar debería ser mucho más efectivo.

Este efecto se puede observar en las gráficas 4.3.3.a) y 4.3.3.d) donde los dos parámetros (la posición de la longitud de onda del máximo y la longitud de onda promedio) se alejan del violeta debido al efecto antes explicado. El crecimiento se ajusta muy bien a una tendencia logarítmica.

El ancho a media altura también tiene una tendencia creciente con el aumento de la constante dieléctrica (gráfica 4.3.3.b)), lo que implica un ensanchamiento del espectro, debida a la heterogeneidad de la distribución de distintos entornos moleculares. Nuevamente, este crecimiento se ajusta muy bien a una tendencia logarítmica.

El valor de la integral del espectro no presenta una correlación clara con los datos de los que se dispone.

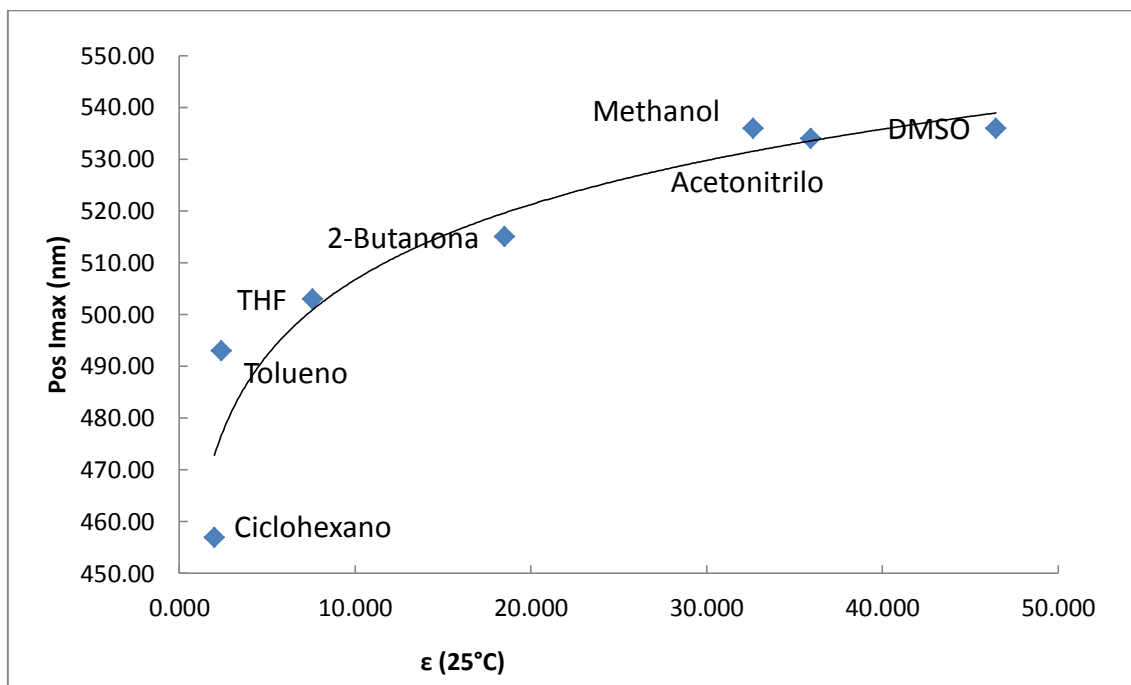


Figura 4.3.3. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de la constante dieléctrica del disolvente.

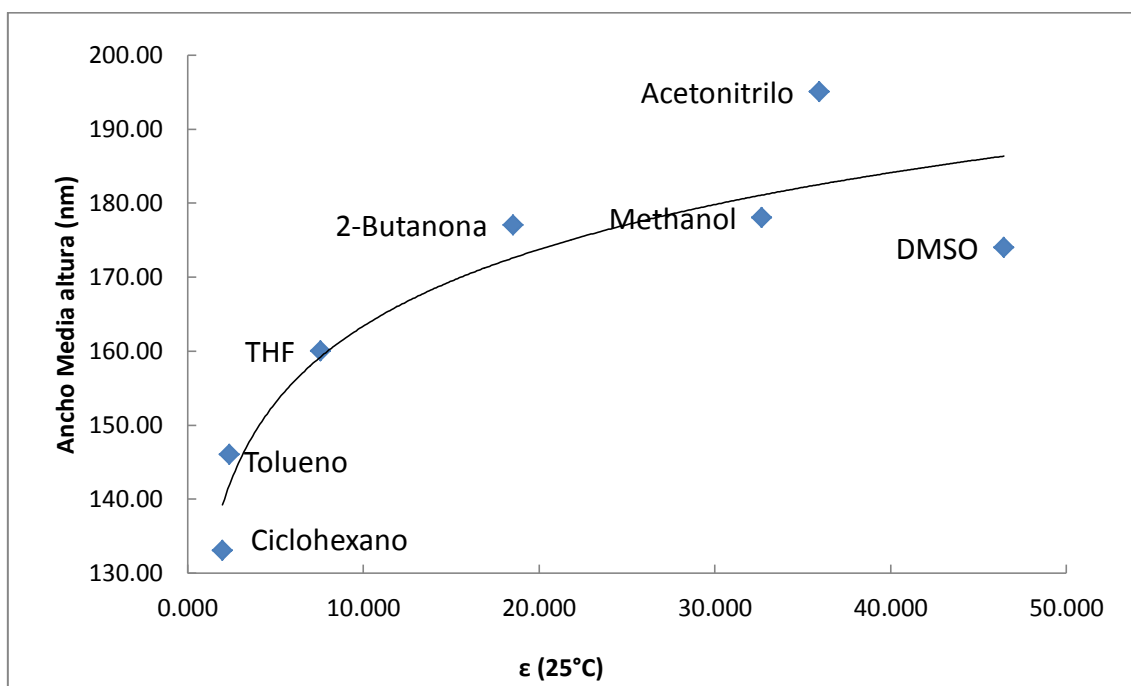


Figura 4.3.3. b) Variación del ancho a media altura en función de la constante dieléctrica del disolvente.

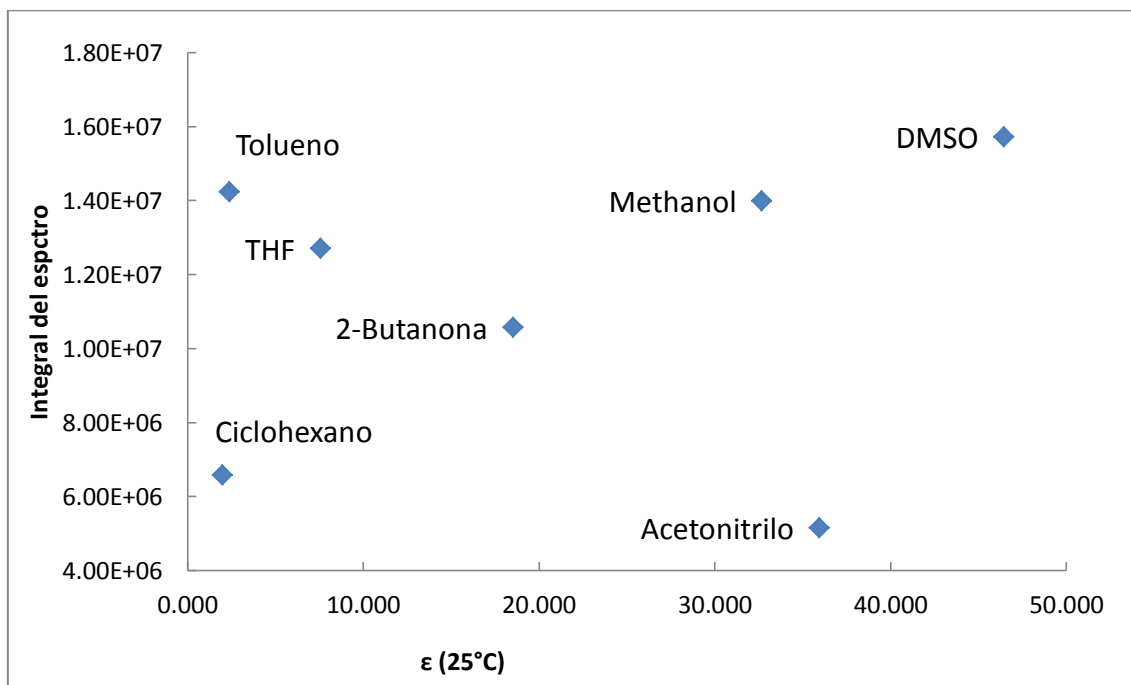


Figura 4.3.3. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función de la constante dieléctrica del disolvente.

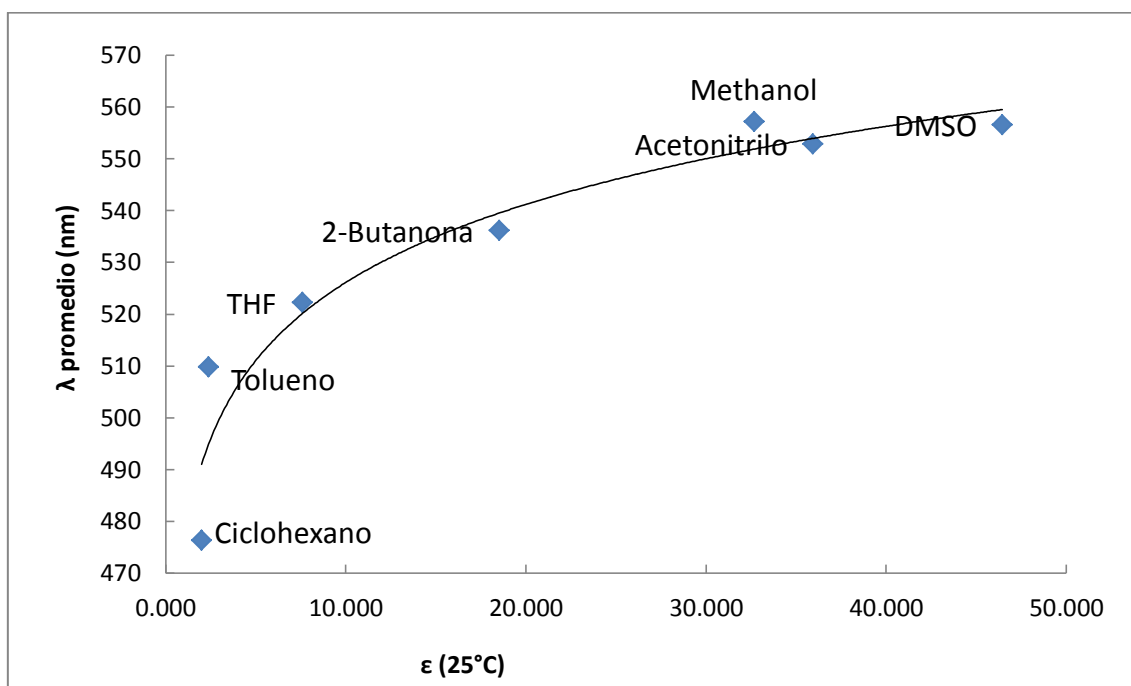


Figura 4.3.3. d) Variación de λ promedio en función de la constante dieléctrica del disolvente.



4.3.4. Efecto del momento dipolar

Como se explicó en el apartado de fundamentos, el momento dipolar está relacionado con la constante dieléctrica a la hora de establecer la polaridad del disolvente. Por esto se observan tendencias bastante similares a las descritas en la constante dieléctrica. Es decir, ensanchamiento y desplazamiento del espectro hacia el rojo con el aumento del momento dipolar. Es importante comentar que en el único disolvente que más se aleja del comportamiento descrito en el caso de la constante dieléctrica es el metanol. Una posible explicación es la contribución del índice de refracción del metanol en el momento dipolar del disolvente (Véase Figura 4.3.2.a), lo que explicaría que la tendencia observada con el momento dipolar (Figura 4.3.4.a) no coincida exactamente con la observada para el estudio en función de la constante dieléctrica (Figura 4.3.3.a). Además, hay que tener en cuenta que el metanol presenta la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno por lo que hay que tener en cuenta que estas interacciones de carácter más específico pueden tener un efecto importante.

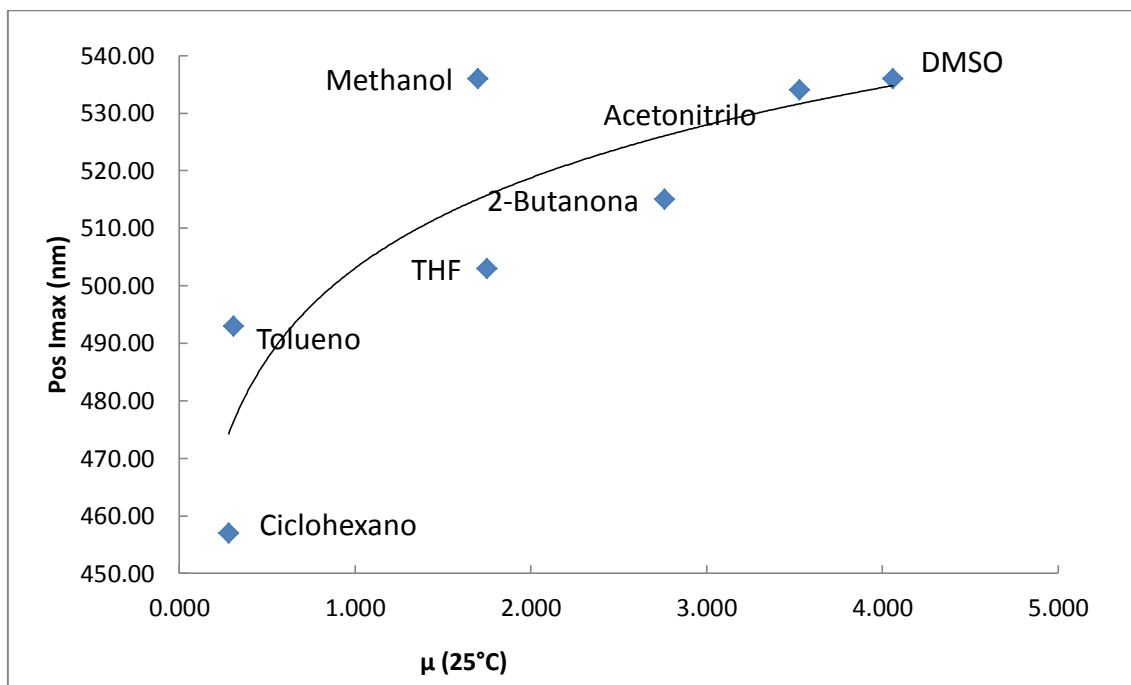


Figura 4.3.4. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función momento dipolar del disolvente.

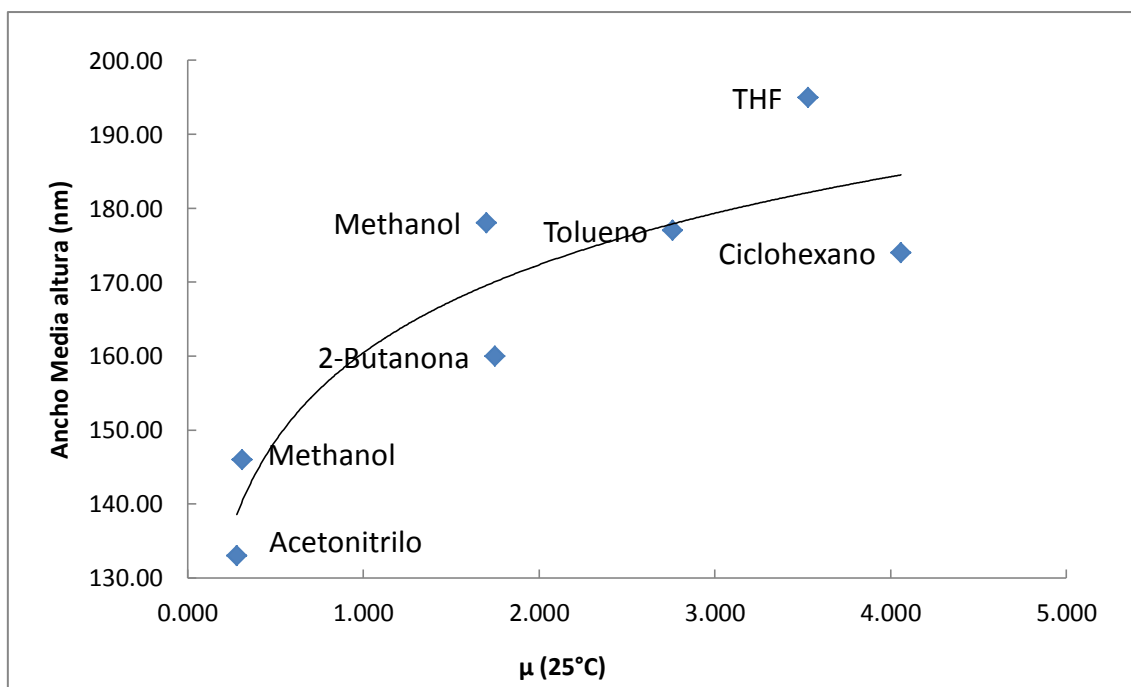


Figura 4.3.4. b) Variación del ancho a media altura en función del momento dipolar del disolvente.

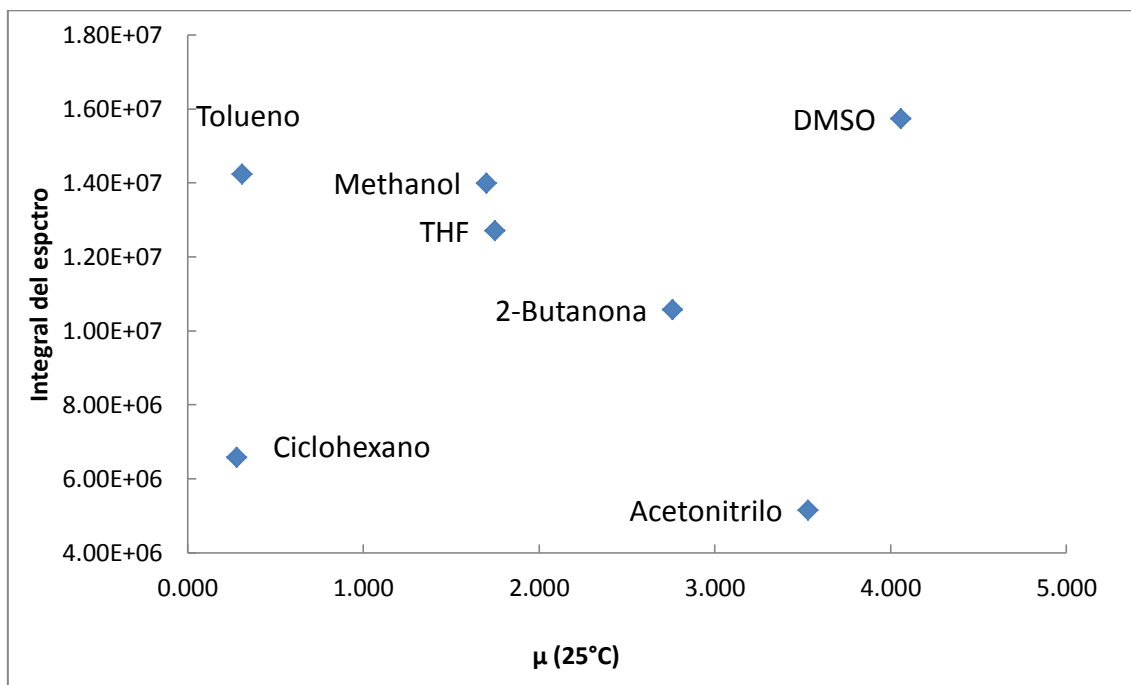


Figura 4.3.4. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función del momento dipolar del disolvente.

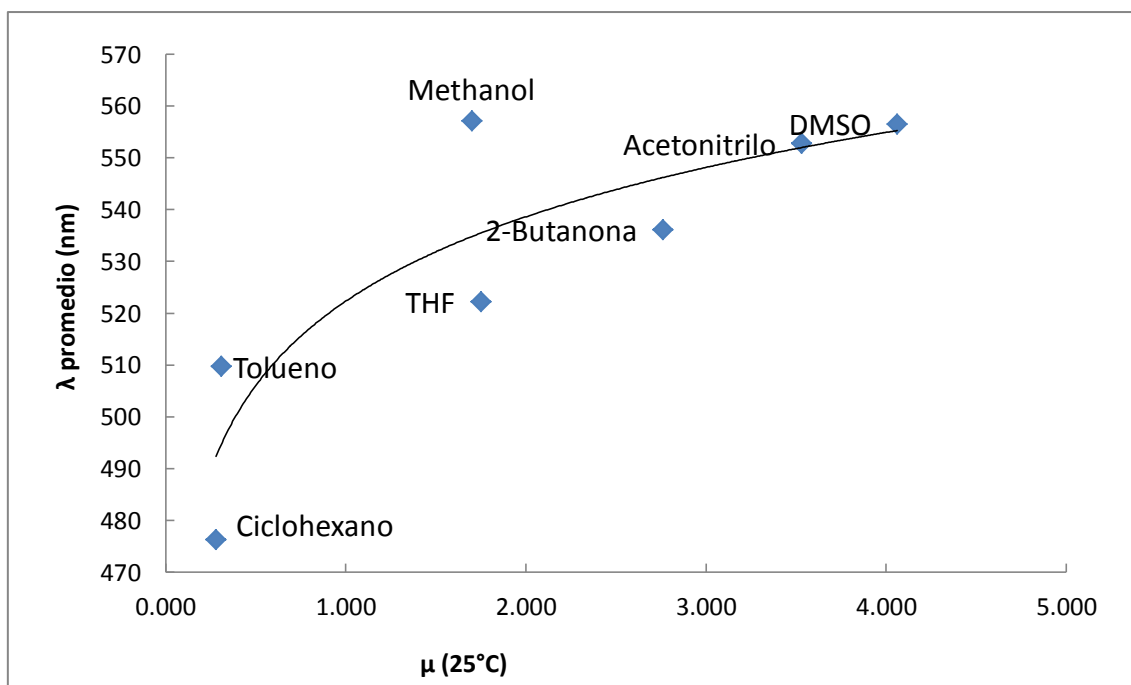


Figura 4.3.4. d) Variación de λ promedio en función del momento dipolar del disolvente.

4.3.5. Efecto del parámetro de Dimroth, Z

El valor Z de Dimroth es, como se explicó en el apartado de fundamentos, una medida de polaridad, basada en espectros de un fluoróforo en distintos disolventes. Con este valor, se debería poder expresar mejor las correlaciones de los efectos asociados al acoplamiento sonda-disolvente que con la constante dieléctrica y el momento dipolar.

A la vista de los resultados no se puede destacar un mejor entendimiento de las tendencias, ya que se obtienen resultados muy similares al compararlos con los dos anteriores. Es decir, ensanchamiento y desplazamiento del espectro hacia el infrarrojo con el aumento del valor de Z, si bien, estos desplazamientos no siguen una correlación lineal como lo observado por ejemplo, en el caso de la viscosidad (Figura 4.3.1.a) si no, más bien exponencial (Figura 4.3.5.a).

Nuevamente la integral no muestra ningún tipo de correlación con estos datos estudiados.

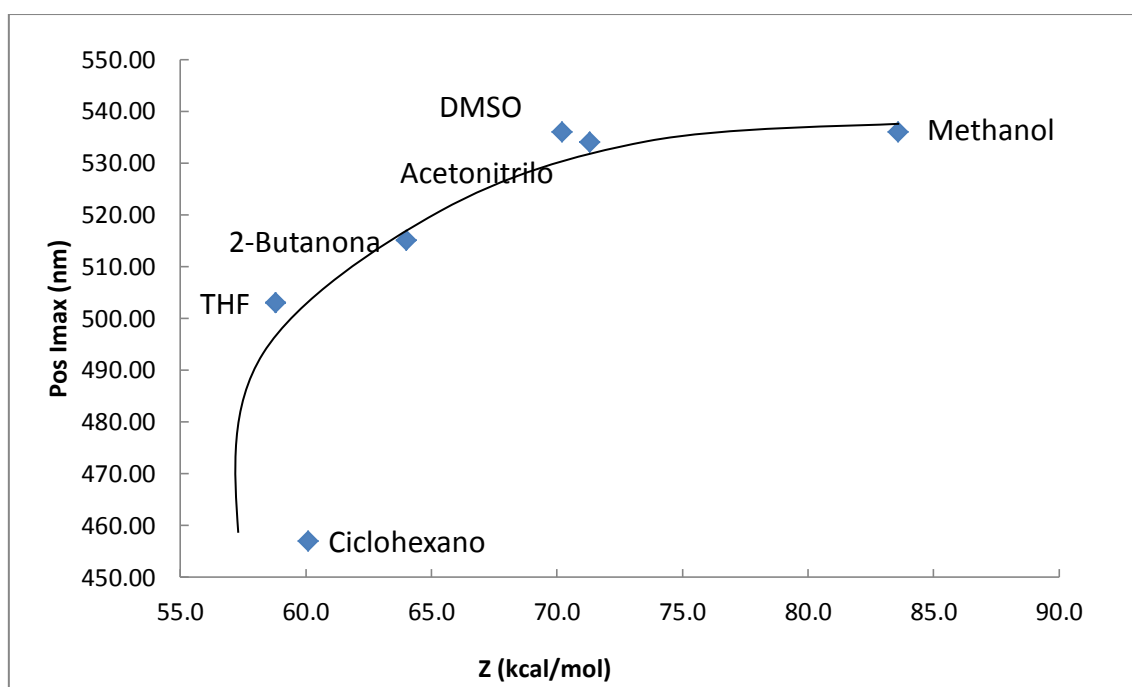


Figura 4.3.5. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de Z del disolvente.

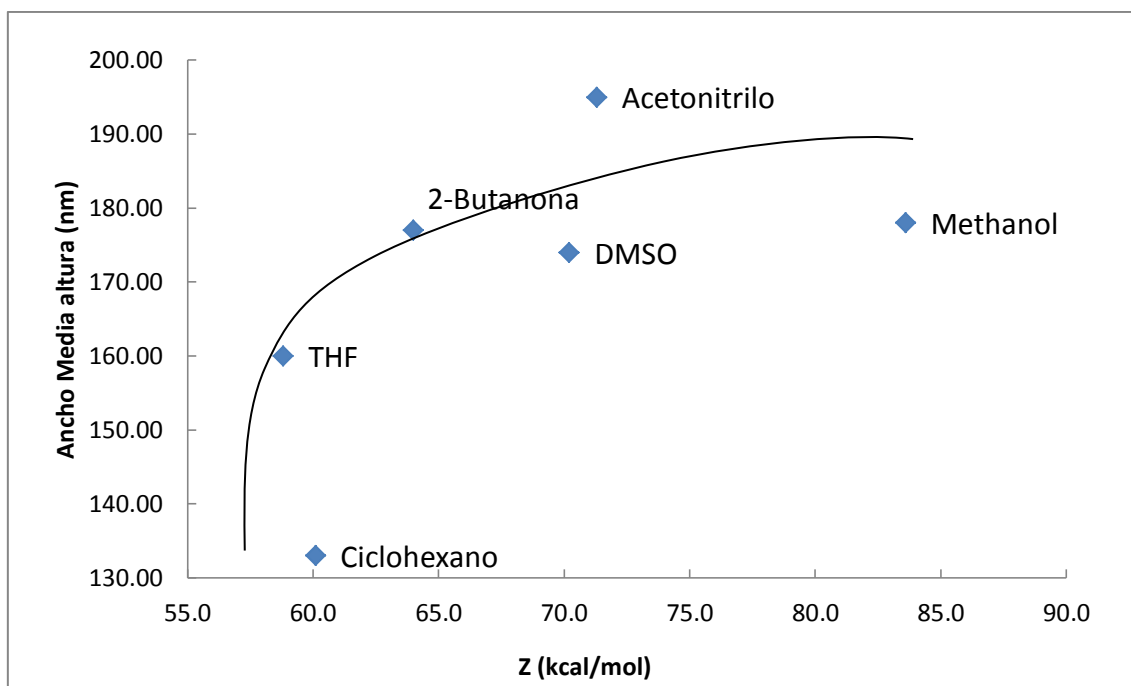


Figura 4.3.5. b) Variación del ancho a media altura en función de Z del disolvente.

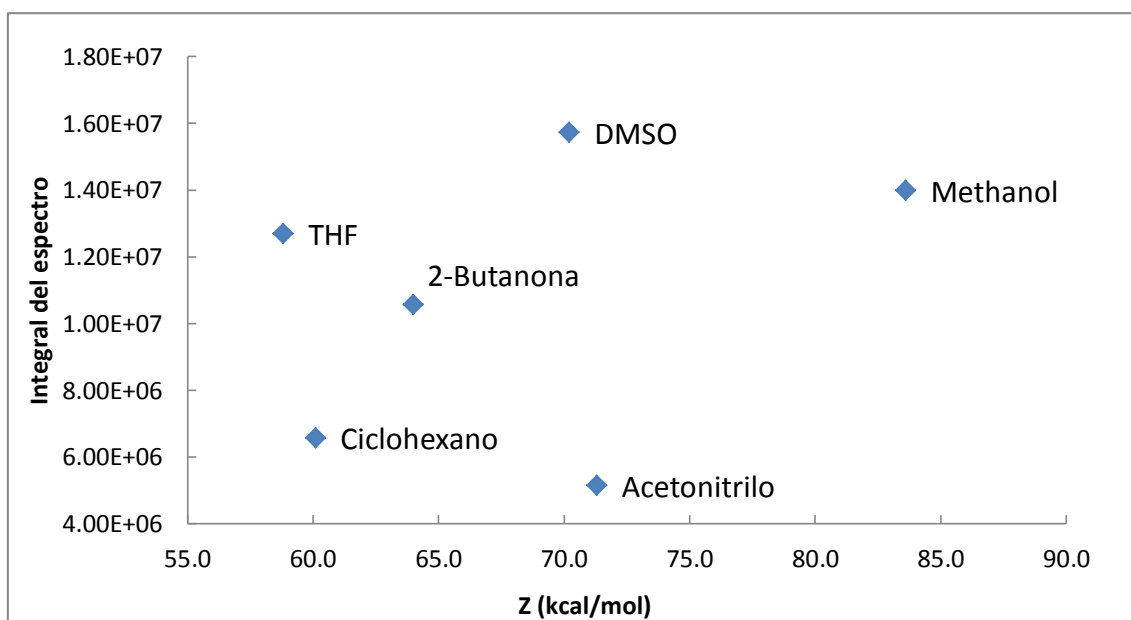


Figura 4.3.5. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función de Z del disolvente.

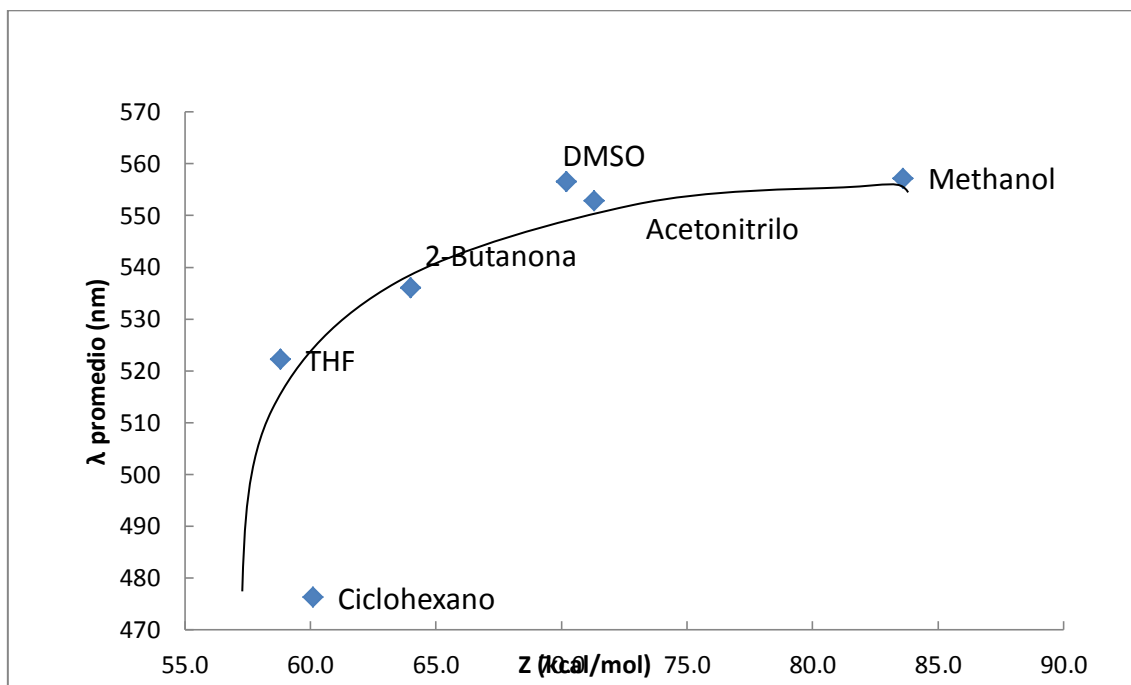


Figura 4.3.5. d) Variación de λ promedio en función de Z del disolvente.

4.3.6. Efecto del parámetro de Kosower, E_t

El parámetro de Kosower (E_t) representa la energía de transición de la banda de transferencia de carga intramolecular de las moléculas de un cromóforo concreto en distintos disolventes (como se explica en el capítulo de fundamentos).

Este valor genera unas correlaciones mucho más lineales y limpias de los parámetros estudiados. Siendo el comportamiento el mismo que para las propiedades anteriores, podemos concluir que con el aumento de la polaridad se produce un desplazamiento de la banda hacia el rojo y un ensanchamiento de la banda.

Al igual que en los anteriores, la integral del espectro no parece seguir ninguna correlación observable con los datos de los que se disponen.

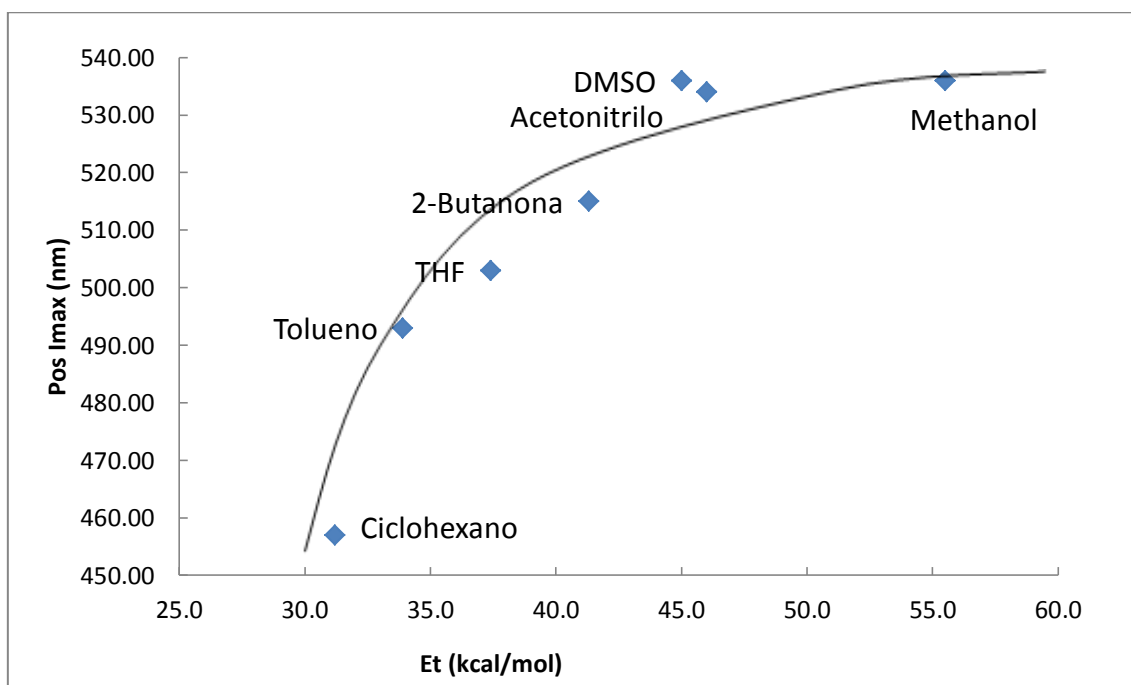


Figura 4.3.6. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de E_t del disolvente.

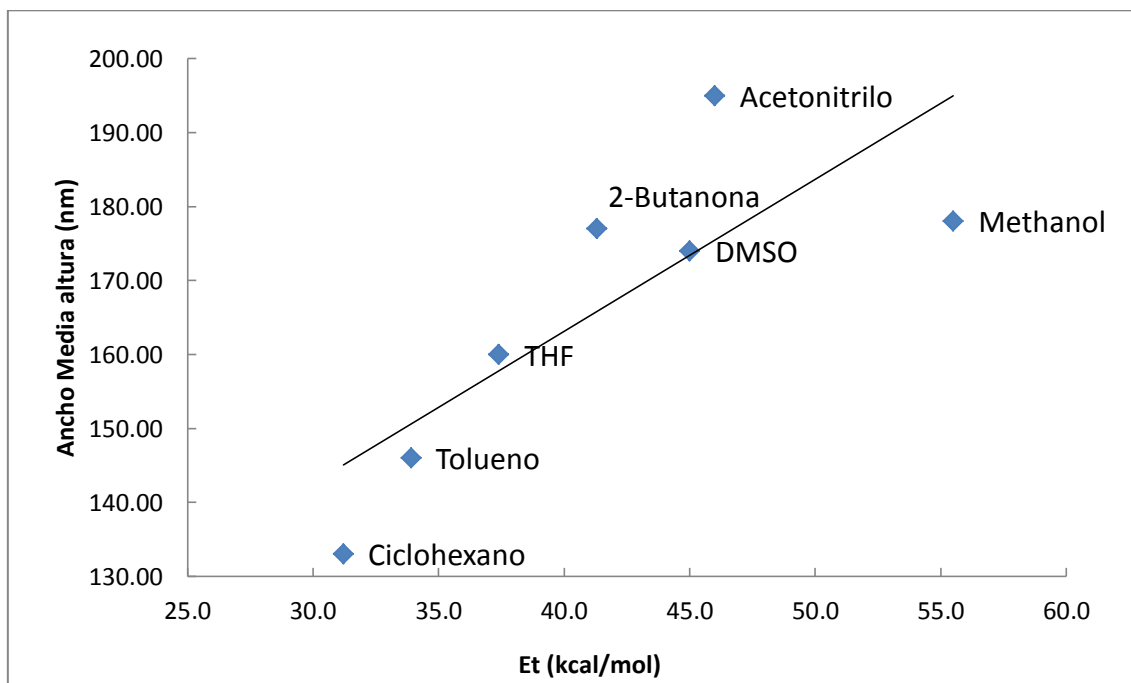


Figura 4.3.6. b) Variación del ancho a media altura en función de Et del disolvente.

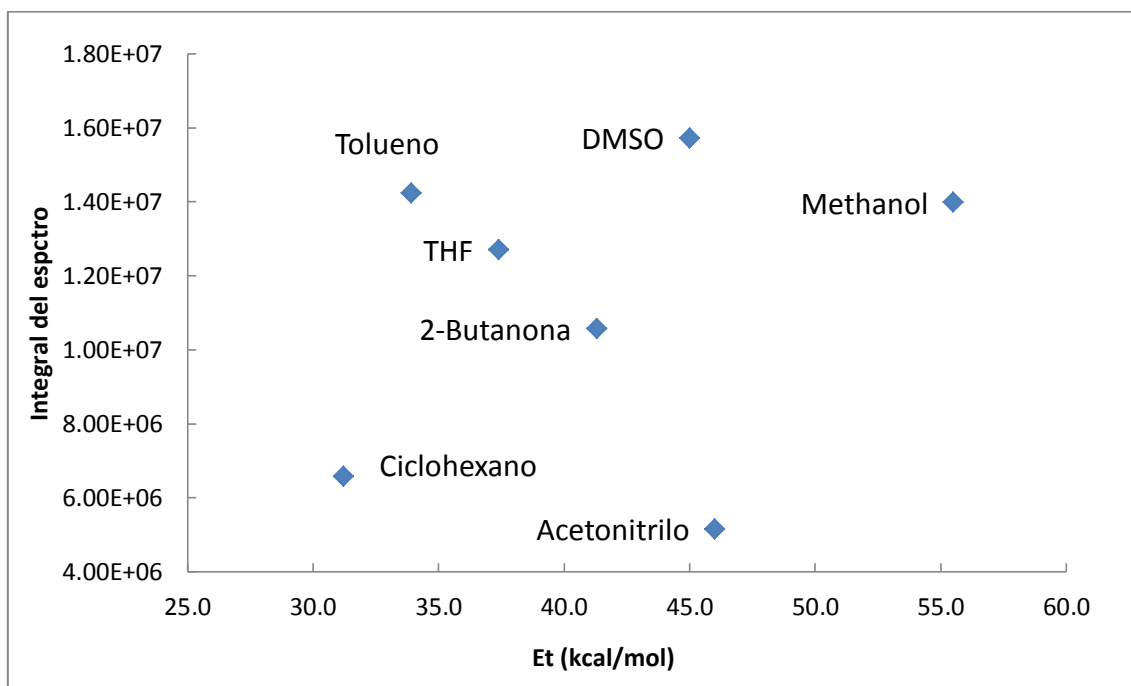


Figura 4.3.6. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función de Et del disolvente.

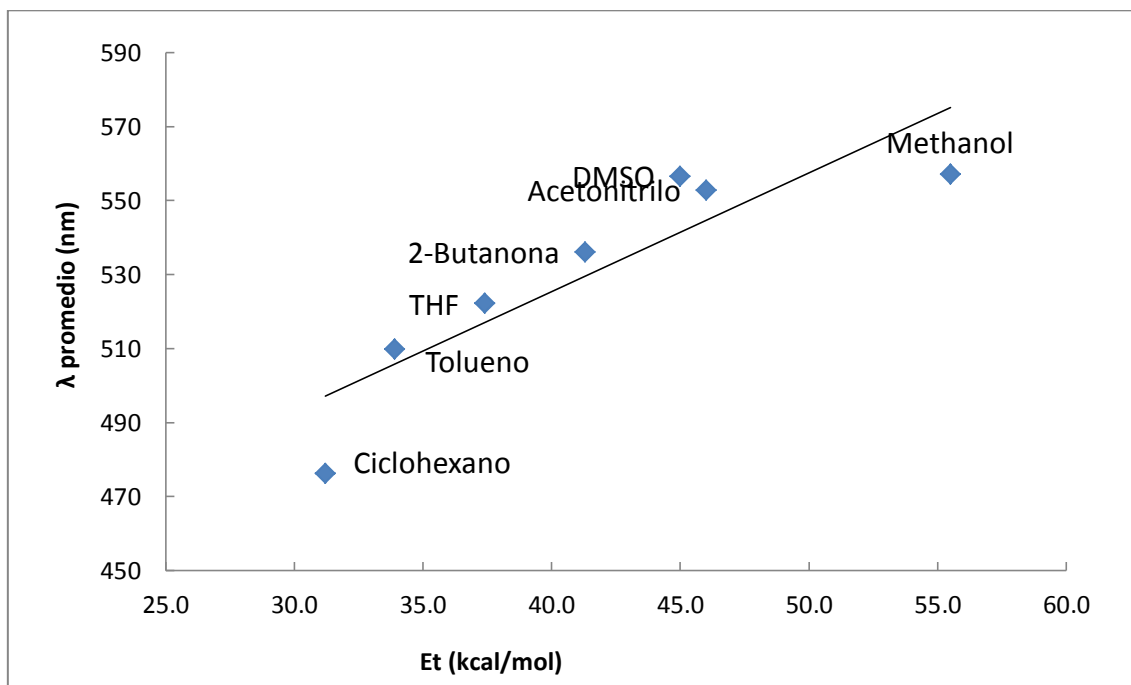


Figura 4.3.6. d) Variación de λ promedio en función de Et del disolvente.

4.3.7. Efecto del término dispersivo de la solubilidad

El término dispersivo mide la contribución de las fuerzas dispersivas de van der Waals, que representa la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas entre las moléculas del disolvente distintas de las interacciones electrostáticas y covalentes.

Por la definición de este término se asocia inmediatamente esta contribución con la viscosidad anteriormente estudiada. Es por esto por lo que se observa una tendencia similar a la observada en el apartado 4.3.1., donde para un aumento del término dispersivo existe una tendencia de desplazamiento de la banda del espectro hacia longitudes de onda menores.

Este término también coincide con la viscosidad en el estrechamiento de la banda, lo que nos lleva a concluir que estas interacciones producen una mayor homogeneidad en los distintos entornos a escala molecular.

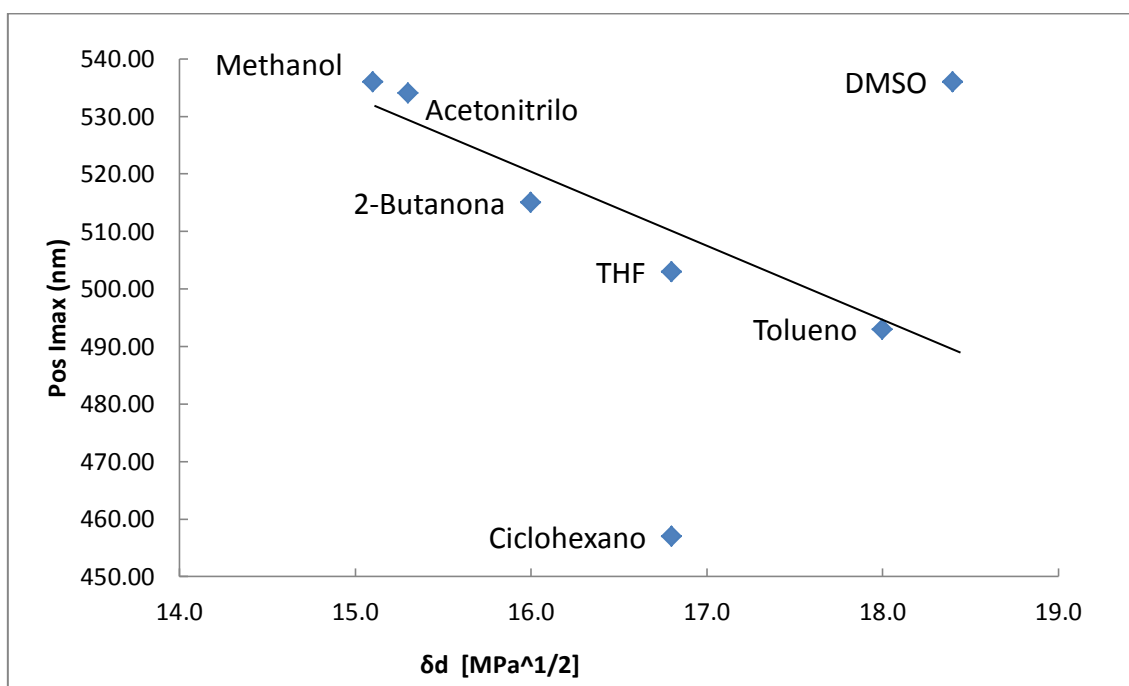


Figura 4.3.7. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de δ_d del disolvente.

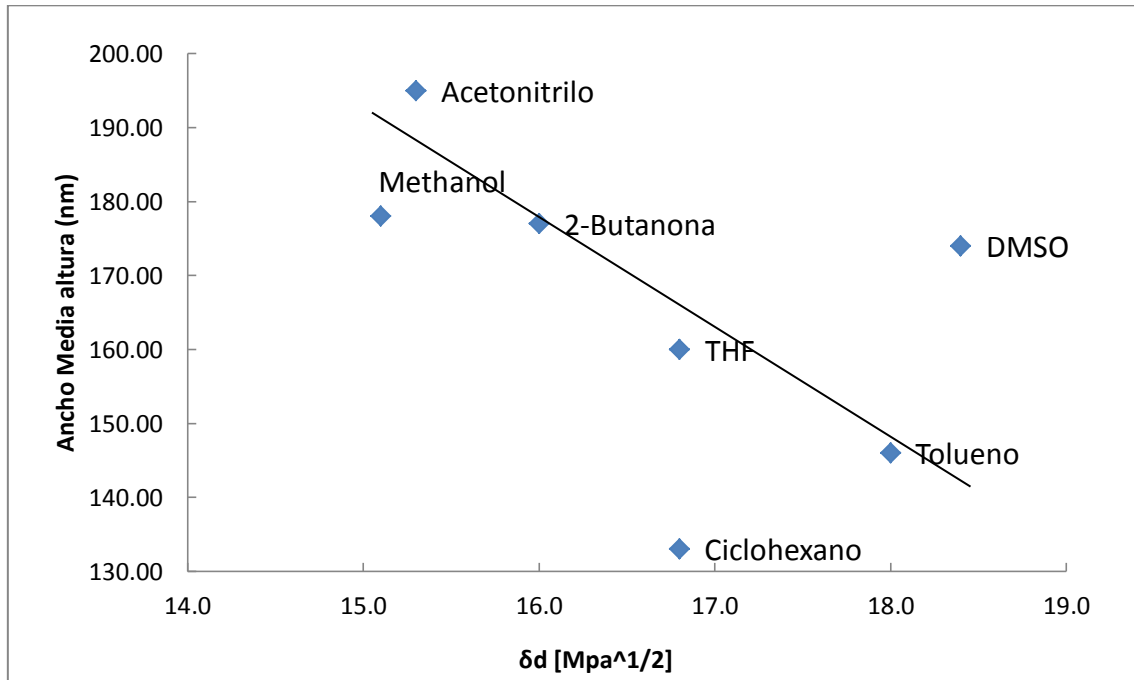


Figura 4.3.7. b) Variación del ancho a media altura en función de δd del disolvente.

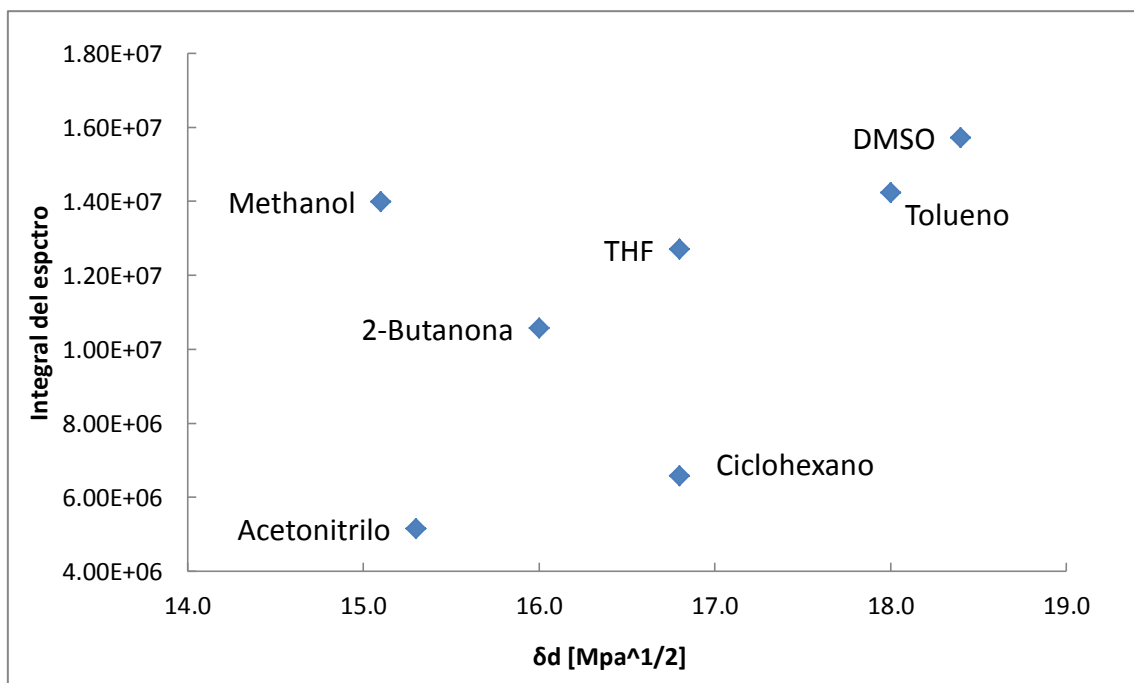


Figura 4.3.7. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función de δd del disolvente.

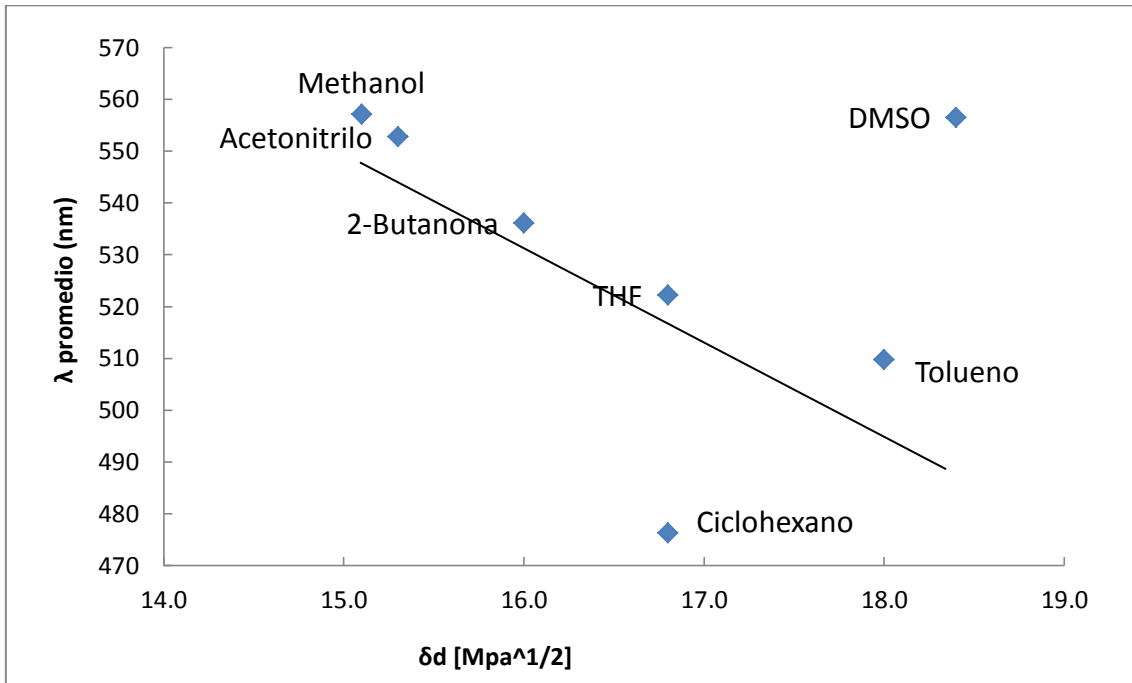


Figura 4.3.7. d) Variación de λ promedio en función de δd del disolvente.

4.3.8. Efecto del término polar de la solubilidad

Como era de esperar, el término polar de la solubilidad presenta un comportamiento idéntico al de las anteriores medidas de la polaridad. Es decir, ensanchamiento y desplazamiento del espectro hacia el infrarrojo con el aumento del término polar. En concreto, se observa un comportamiento bastante similar al descrito en el caso de la constante dieléctrica. Por ejemplo, fijándonos en las Figuras 4.3.3.a y Figura 4.3.8.a) que se corresponden con la variación de la posición de la longitud de onda del máximo de emisión con la constante dieléctrica y δ_p respectivamente, vemos que en ambos casos existe un comportamiento exponencial con el aumento del parámetro estudiado.

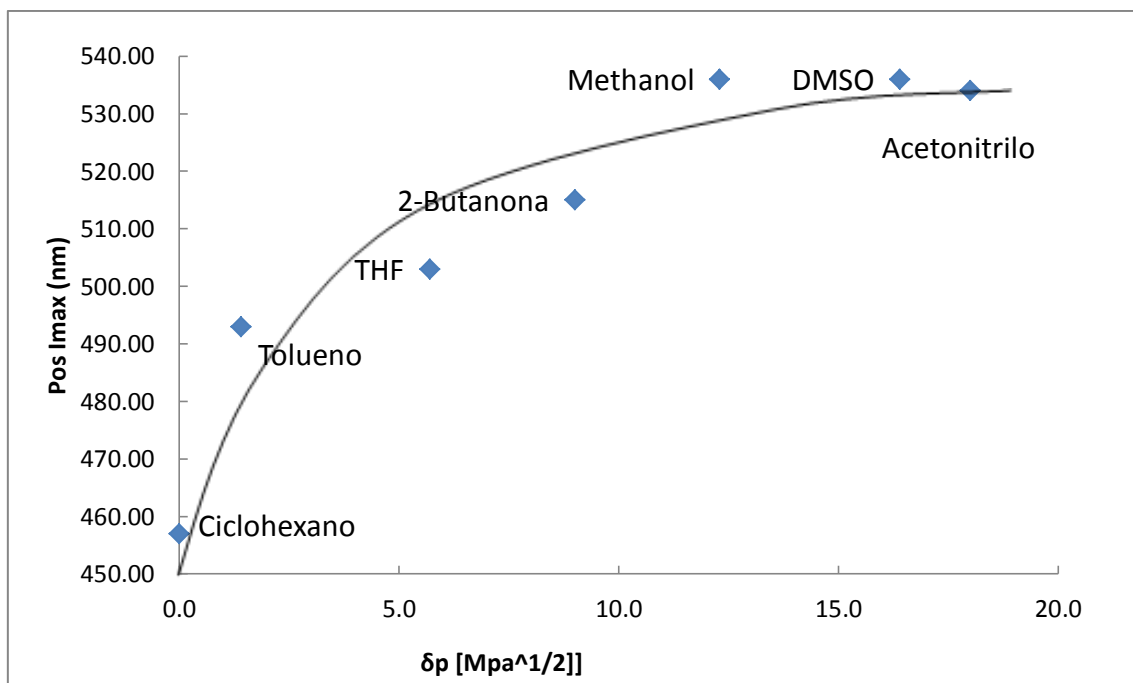


Figura 4.3.8. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de δ_p del disolvente.

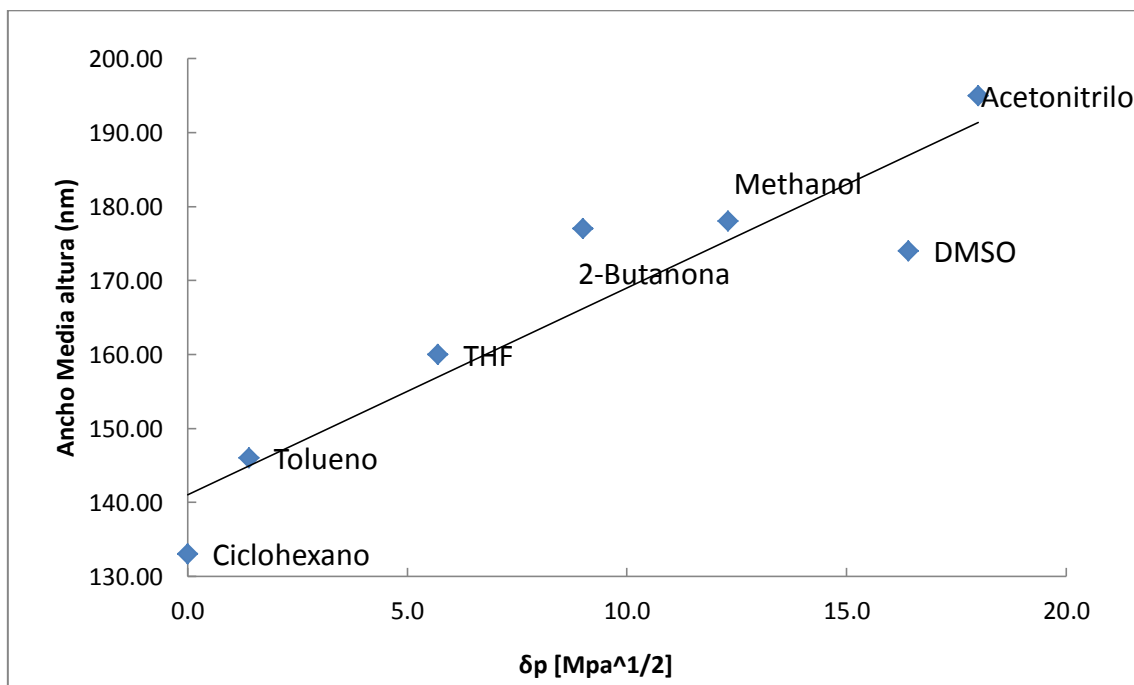


Figura 4.3.8. b) Variación del ancho a media altura en función de δp del disolvente.

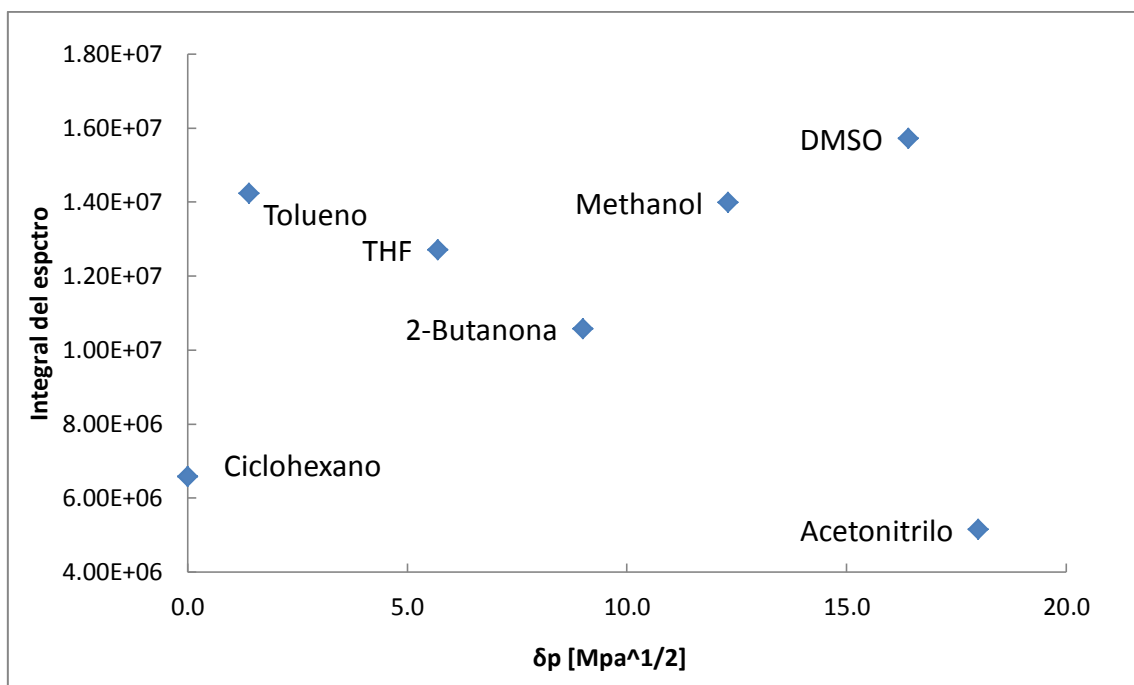


Figura 4.3.8. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función de δp del disolvente.

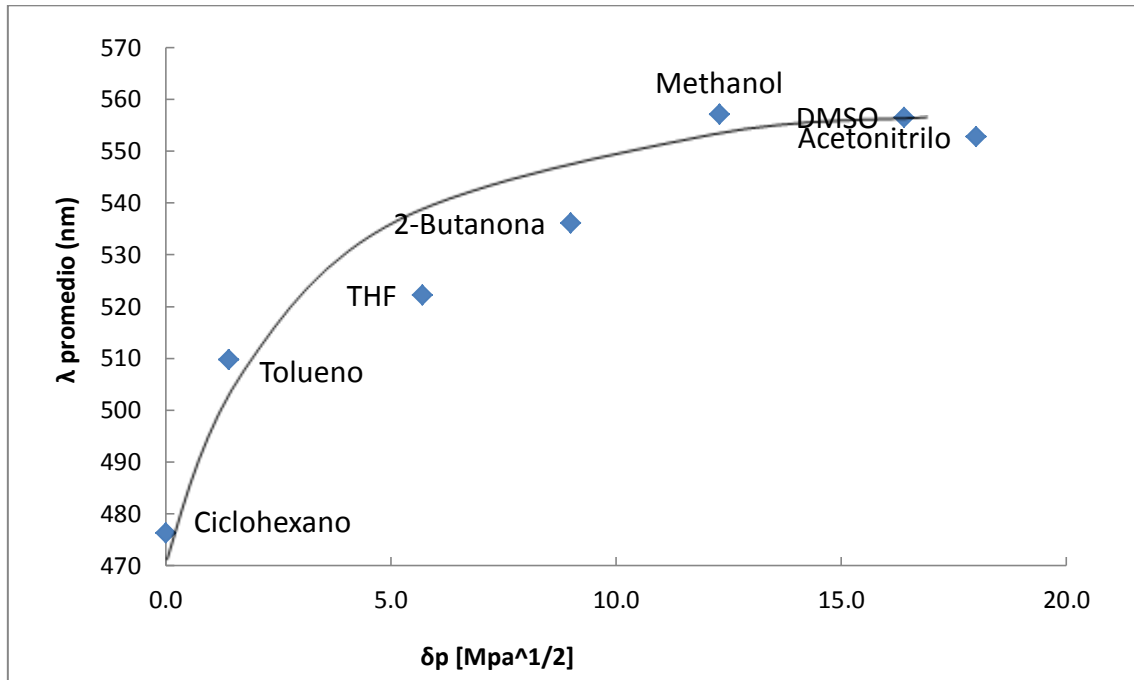


Figura 4.3.8. d) Variación de λ promedio en función de δp del disolvente.

4.3.9. Efecto del término de la solubilidad debido a la asociación por enlaces de hidrógeno

El término de debido a la asociación entre enlaces nos da una idea de la facilidad de formar enlaces de hidrogeno sonda-disolvente. A la vista de los resultados se observa una tendencia parecida a la observada en los parámetros polares, es decir este tipo de enlace genera un comportamiento similar al debido la polaridad del disolvente, pero parece existir una correlación más lineal, mientras que en las contribuciones polares se observaba una correlación logarítmica.

El Metanol tiene un comportamiento muy distinto por ser el único con capacidad de formar enlaces de hidrógeno entre sus moléculas. La sonda fluorescente, debido a su estructura molecular, puede interaccionar mediante los grupos amino (NH y NH₂) formando enlaces de hidrógeno con el disolvente, lo que podría ser una explicación a este comportamiento observado y a la desviaciones tan grandes que existen con respecto al resto de los disolventes.

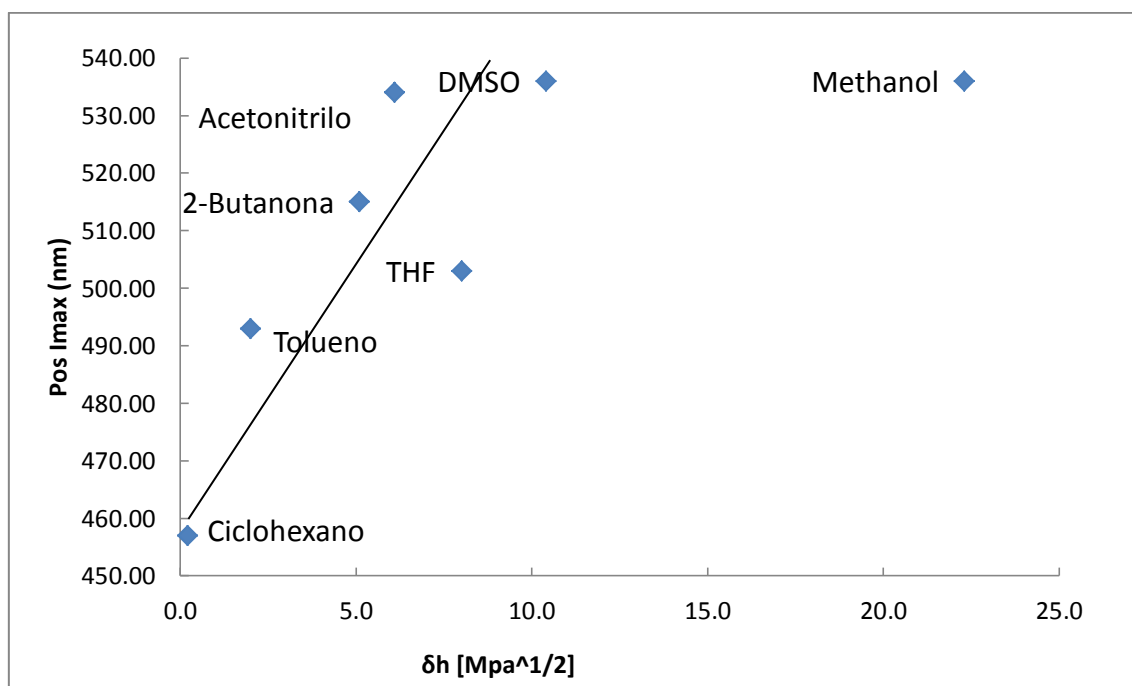


Figura 4.3.9. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de δ_h del disolvente.

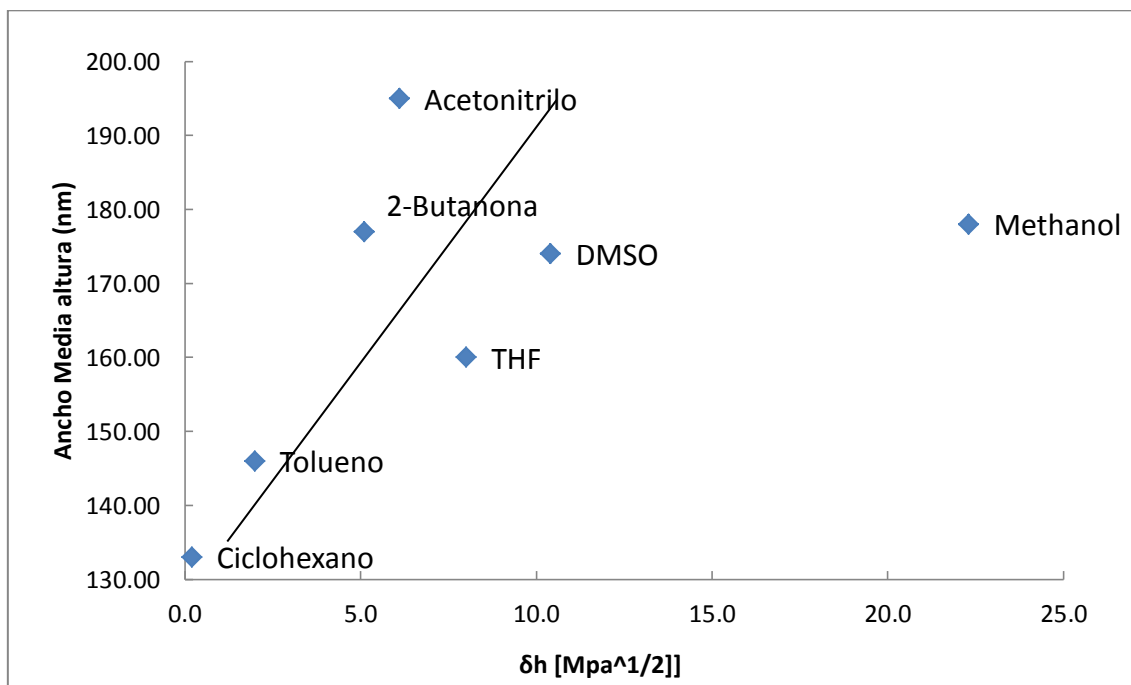


Figura 4.3.9. b) Variación del ancho a media altura en función de δh del disolvente.

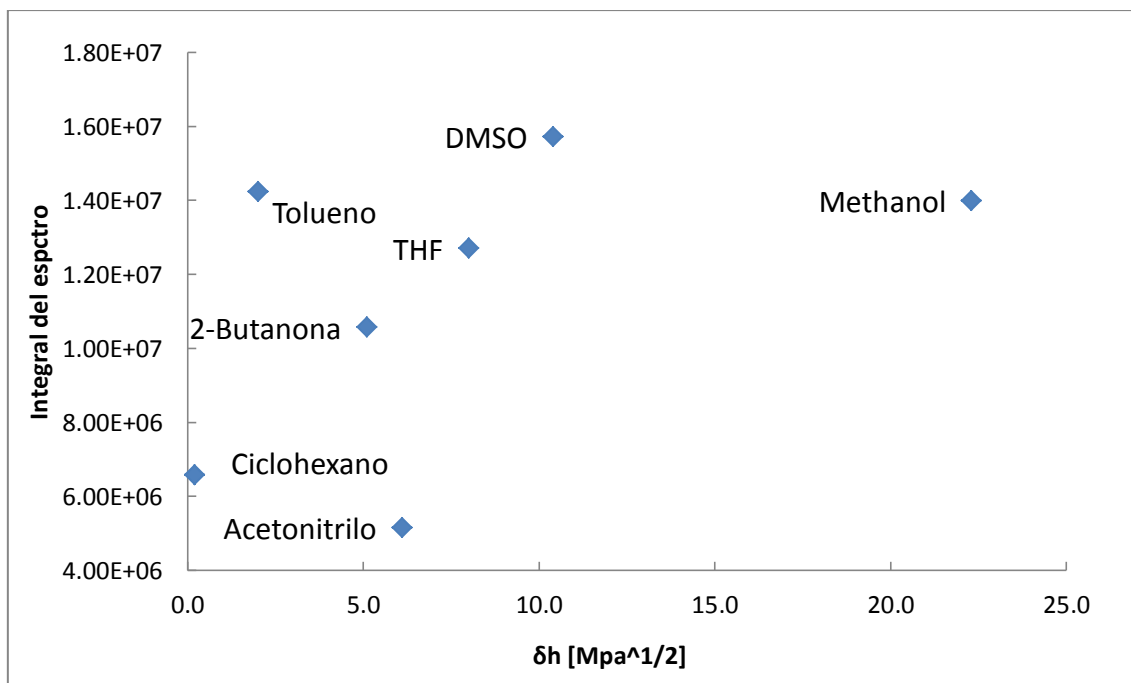


Figura 4.3.9. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función de δh del disolvente.

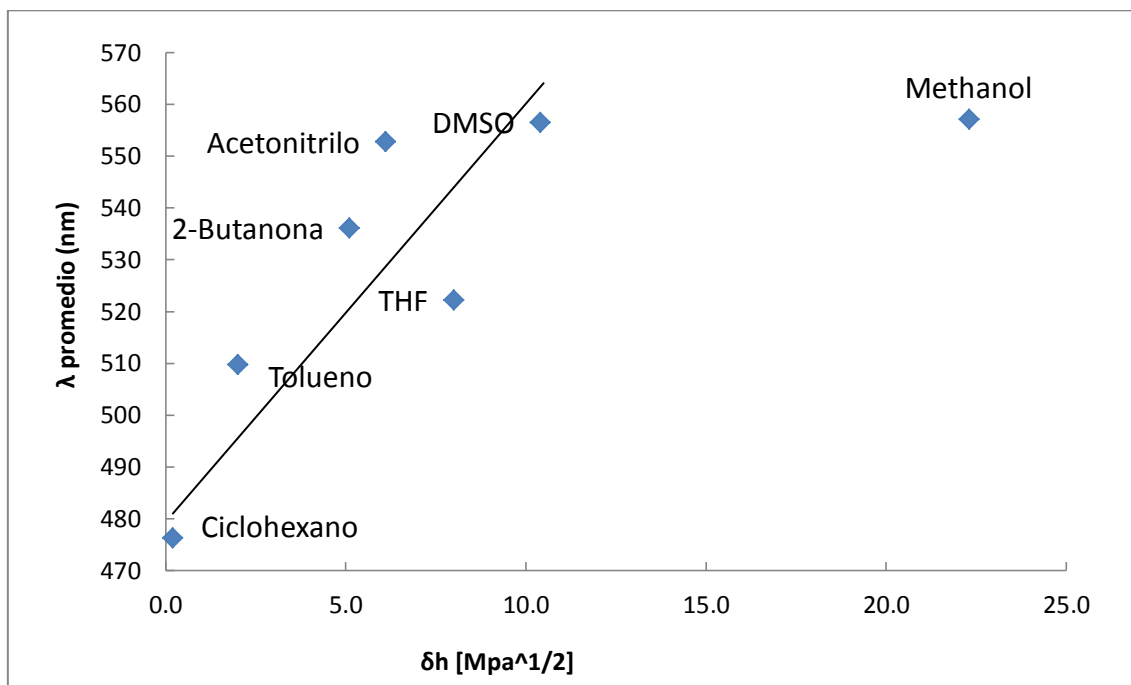


Figura 4.3.9. d) Variación de λ promedio en función de δh del disolvente.

4.3.10. Efecto del parámetro de solubilidad

El parámetro de solubilidad es simplemente que raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de los valores anteriores, como se vio en el apartado de fundamentos (ecuación 2.2).

La comparación con los distintos valores que conforman este parámetro establecerá cuál de las componentes es la más predominante.

A la vista de los resultados, y determinado que las siguientes figuras son muy parecidas a las obtenidas en el apartado 4.3.8. se puede concluir que la componente polar de la solubilidad es la que tiene más efecto sobre el espectro de emisión de la sonda fluorescente.

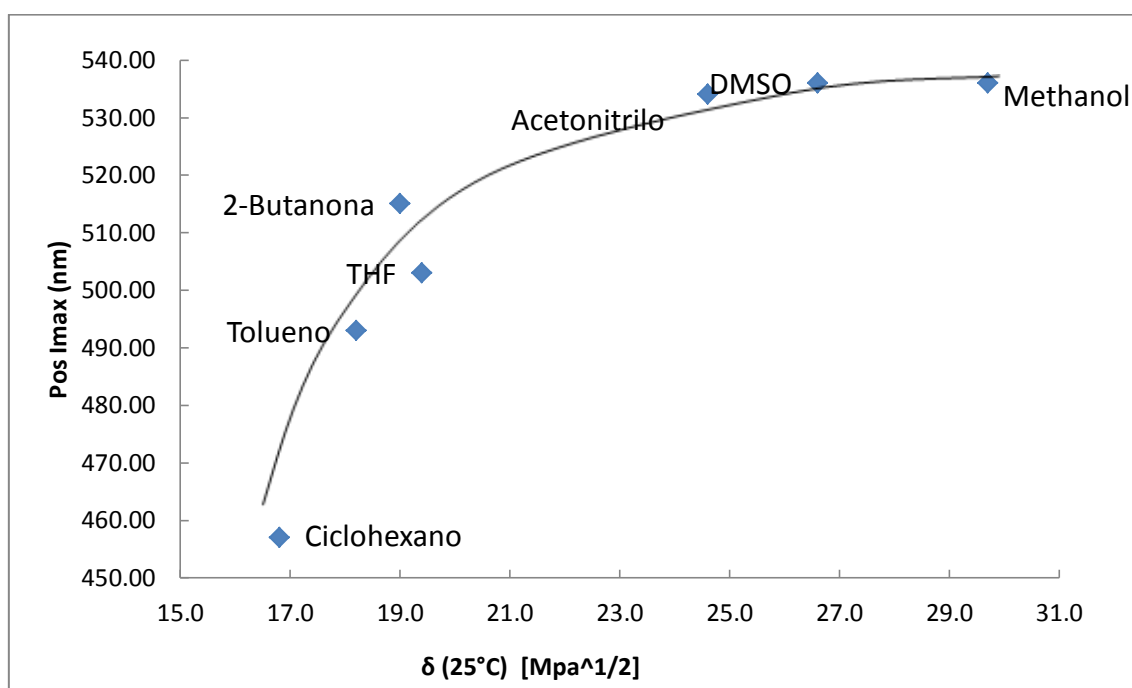


Figura 4.3.10. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función del parámetro de solubilidad del disolvente.

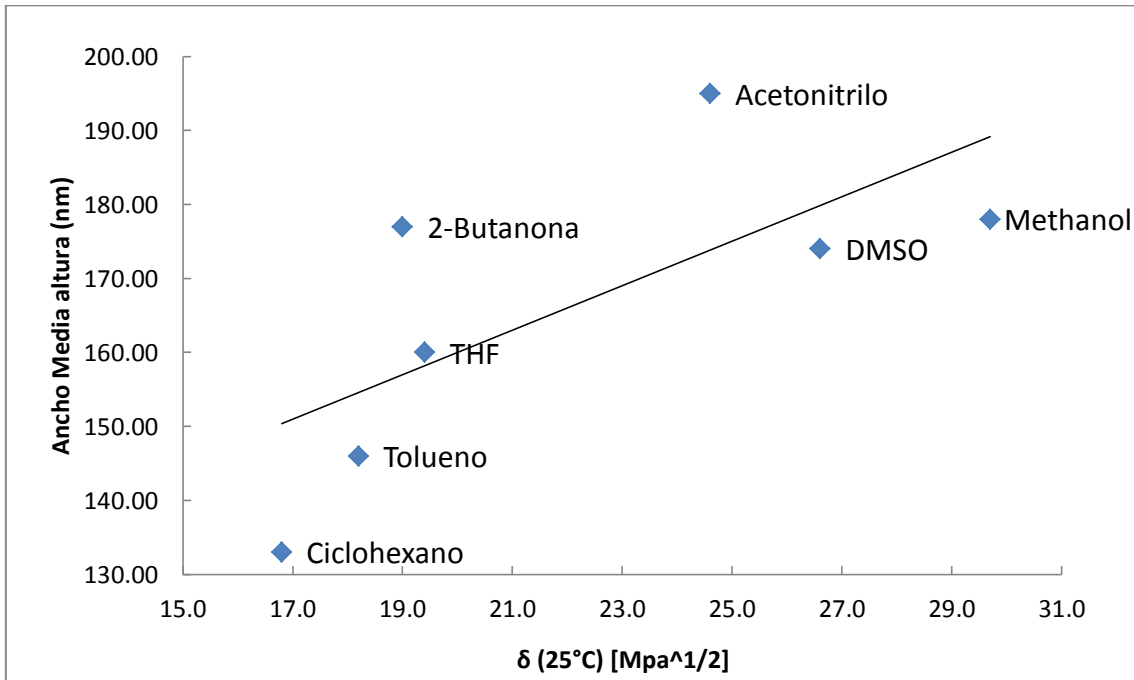


Figura 4.3.10. b) Variación del ancho a media altura en función del parámetro de solubilidad del disolvente.

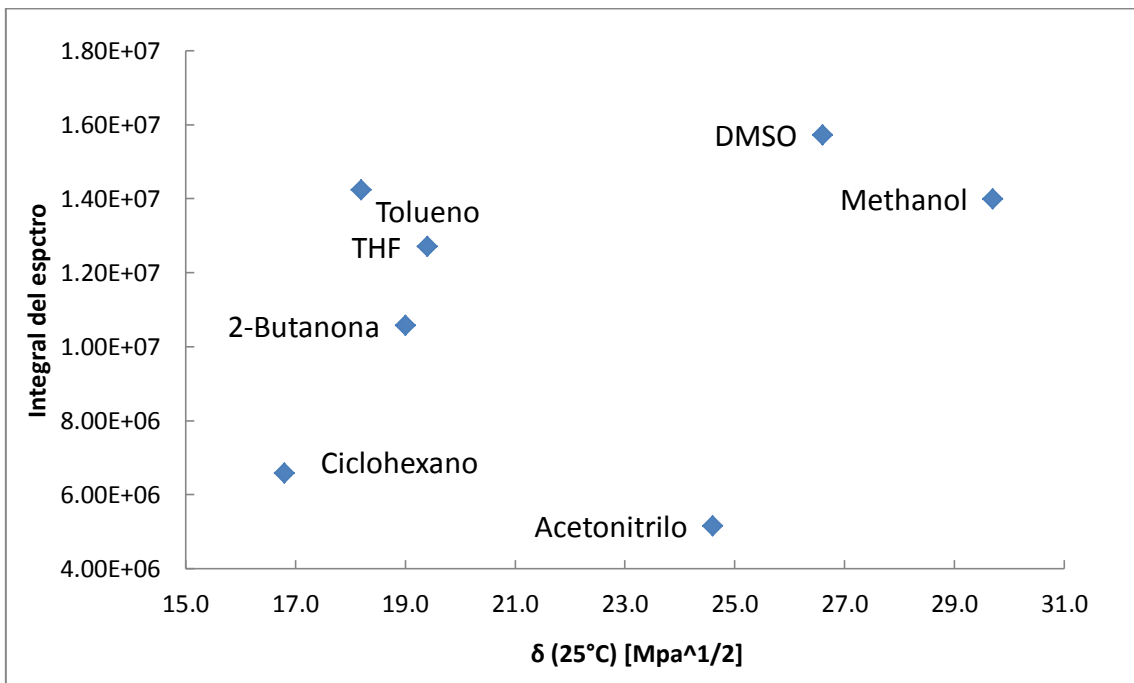


Figura 4.3.10. c) Variación de la integral del espectro de emisión máxima en función del parámetro de solubilidad del disolvente.

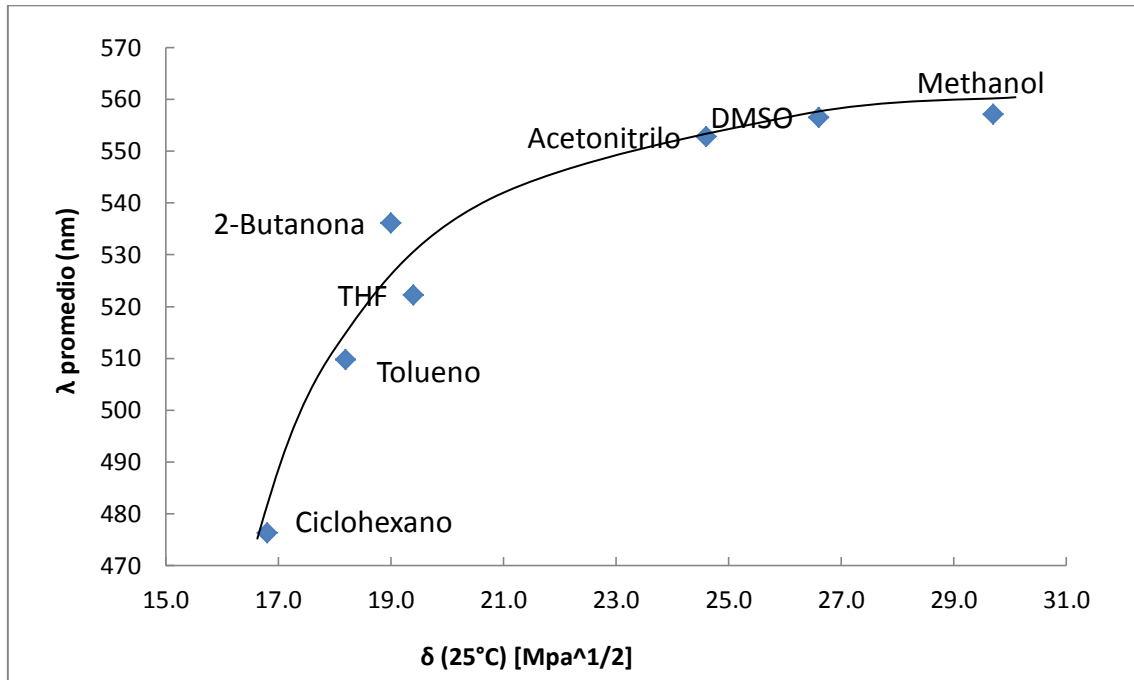


Figura 4.3.10. d) Variación de λ promedio en función del parámetro de solubilidad del disolvente.



4.4. ANÁLISIS DEL ESPECTRO UV-VIS

Las características de absorción UV-VIS son dependientes del microentorno. Aquí, presentaremos las variaciones en función de los distintos parámetros de los disolventes, y analizaremos el resultado. Dado la naturaleza incompleta de los espectros solo se ha analizado la el máximo de absorción que está localizado a mayores longitudes de onda.

4.4.1. Efecto de la viscosidad

En las siguientes figuras se observa el comportamiento del espectro en función de la viscosidad del disolvente. A la vista de los resultados se puede establecer que existe una tendencia de estrechamiento, y desplazamiento hacia el ultravioleta que aumenta con el aumento de la viscosidad.

En general, los cambios en los espectros de absorción UV-Visible debidos al efecto del disolvente son muy inferiores a los observados en los espectros de emisión, por lo que en muchas ocasiones se considera que los espectros de absorción son independientes de la polaridad del disolvente. Por ejemplo, en la Figura 4.3.1.a) encontramos un cambio de unos 100 nm de desplazamiento de la longitud de onda del máximo de emisión con la viscosidad del disolvente en función de la polaridad del mismo. Si ahora nos fijamos en la representación equivalente para los espectros de absorción (Figura 4.4.1.a) vemos que el cambio en la longitud de onda del máximo de absorción es de unos 7 nm.

Aunque las variaciones en el espectro de absorción debidas a las propiedades físico-químicas del disolvente son relativamente pequeñas, según varios autores [15] los desplazamientos batocrómicos (o hacia mayores longitudes de onda) están relacionados con un aumento del momento dipolar del soluto durante la transición del estado fundamental al estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1$), lo que resulta en una estabilización



inducida del estado excitado del disolvente con respecto al estado fundamental, que aumenta con la polaridad del disolvente. Esta explicación está de acuerdo con lo observado en la figura 4.4.1.a), a medida que aumenta la polaridad del disolvente, se observa un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda de absorción. Esto significa que la diferencia de energía entre el estado fundamental y el estado excitado disminuye con la polaridad del disolvente, por lo explicado anteriormente.

El efecto de la viscosidad no parece ser muy significativo. Por ejemplo, si nos fijamos en dos disolventes altamente polares como el AcN y el DMSO, entre los que existe una diferencia grande en términos de viscosidad, observamos que existen unos 2 nm de diferencia en el máximo de absorción. Esto puede ser debido a que estamos trabajando en disolución y por tanto, las diferencias en términos de viscosidad no son tan grandes como para que se llegue a notar de forma apreciable en el espectro de absorción.

El descenso del ancho de la banda con el aumento de la viscosidad apunta a que la viscosidad produce una distribución más homogénea de los distintos entornos moleculares, produciéndose una absorción por parte de todas las moléculas de disolvente más concentradas en el entorno al máximo absorción.

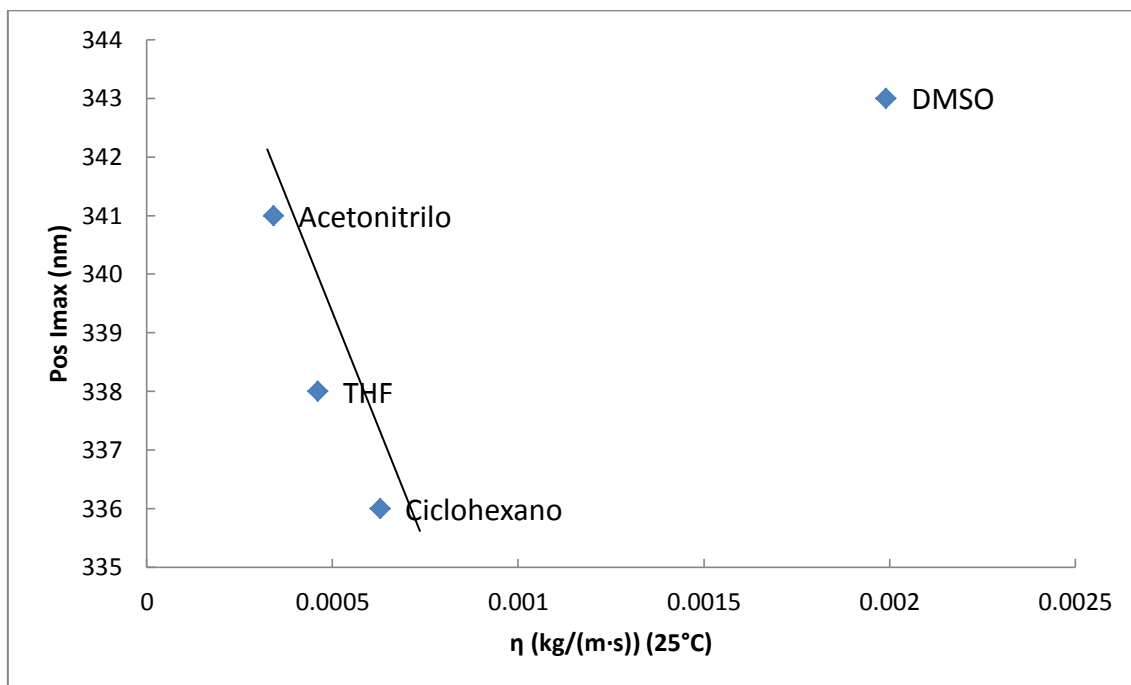


Figura 4.4.1. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de la viscosidad del disolvente.

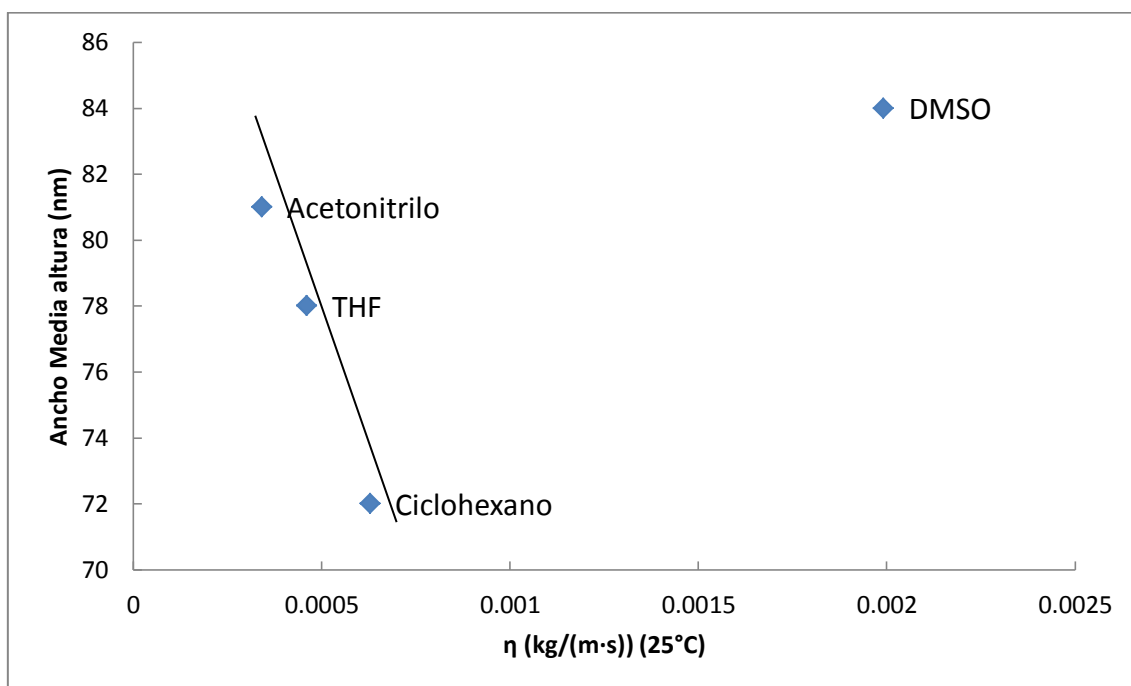


Figura 4.4.1. b) Variación del ancho a media altura en función de la viscosidad del disolvente.

4.4.2. Efecto del índice de refracción

En las siguientes figuras se observa el comportamiento del espectro en función del índice de refracción del disolvente. A la vista de los resultados se puede establecer que existe una influencia sobre los espectros parecida a la observada en la viscosidad, es decir, una tendencia de estrechamiento, y desplazamiento hacia el ultravioleta que aumenta con el aumento del índice de refracción (excepto en el caso del DMSO).

El índice de refracción forma parte, junto con la constante dieléctrica, de la ecuación que define la polarizabilidad del disolvente. Por los resultados obtenidos parece que su efecto es contrario al que produce la constante dieléctrica, pero siendo sus efectos sobre los espectros menos significativos que los de ésta.

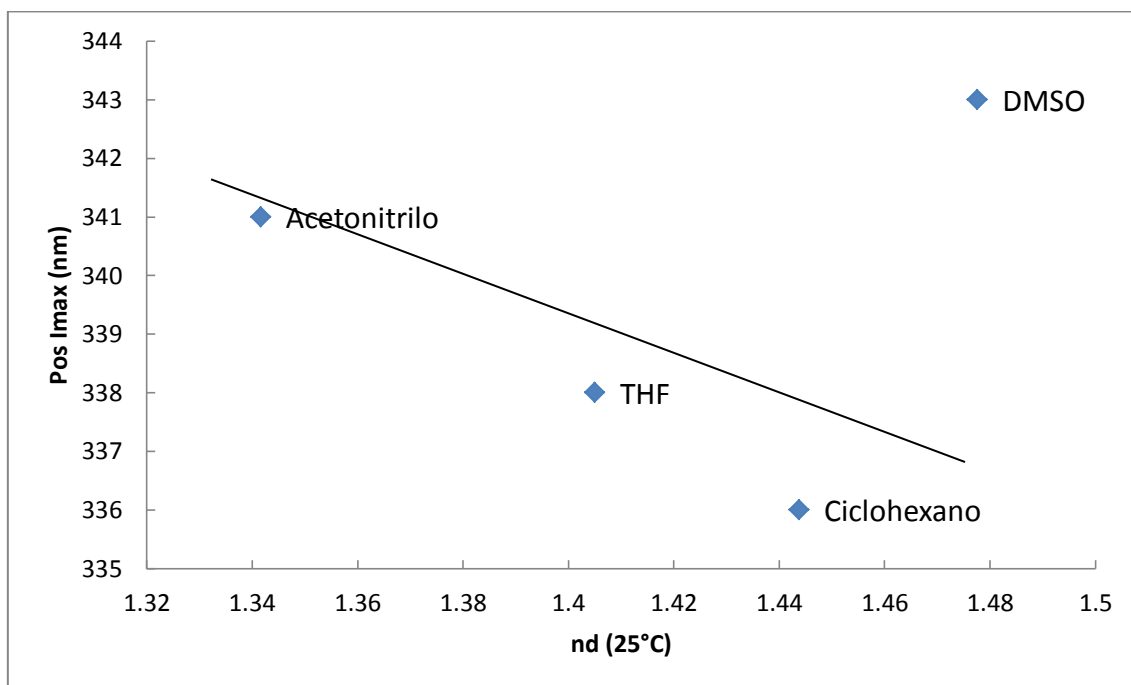


Figura 4.4.2. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función del índice de refracción del disolvente.

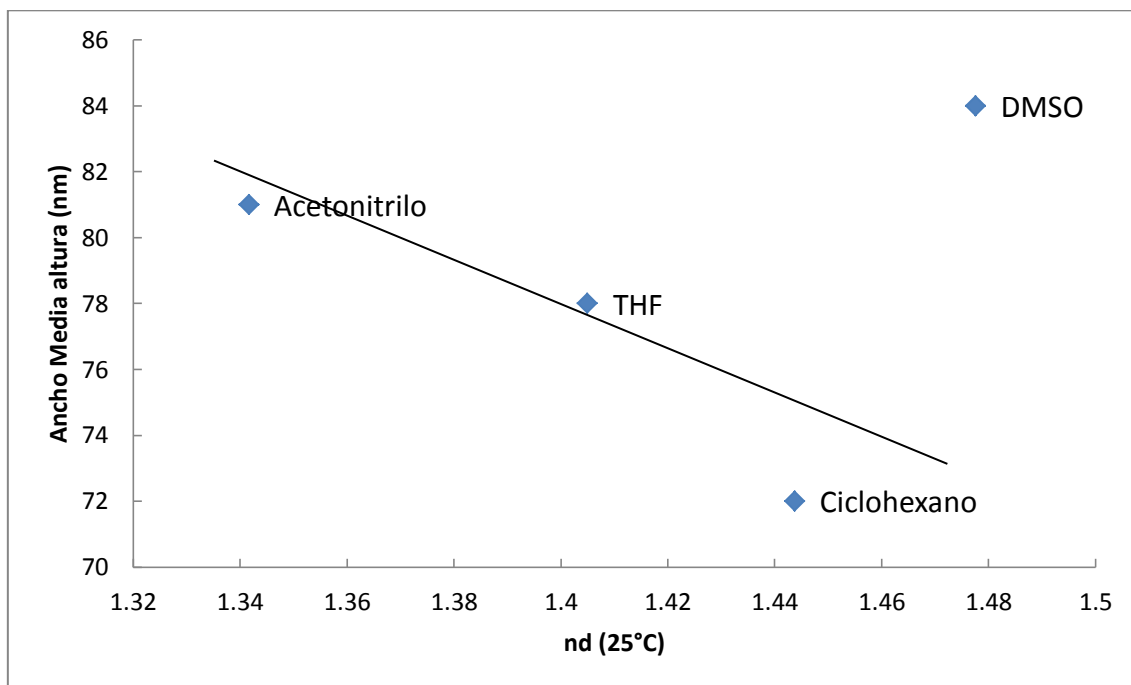


Figura 4.4.2. b) Variación del ancho a media altura en función del índice de refracción del disolvente.

4.4.3. Efecto de la constante dieléctrica

Este efecto se puede observar en la gráfica 4.4.3.a) donde el indicador se aleja del violeta debido al efecto antes explicado (apartado 4.4.1.).

El ancho a media altura también tiene una tendencia creciente con el aumento de la constante dieléctrica, lo que implica un ensanchamiento del espectro, debida a la heterogeneidad de la distribución de distintos entornos moleculares.

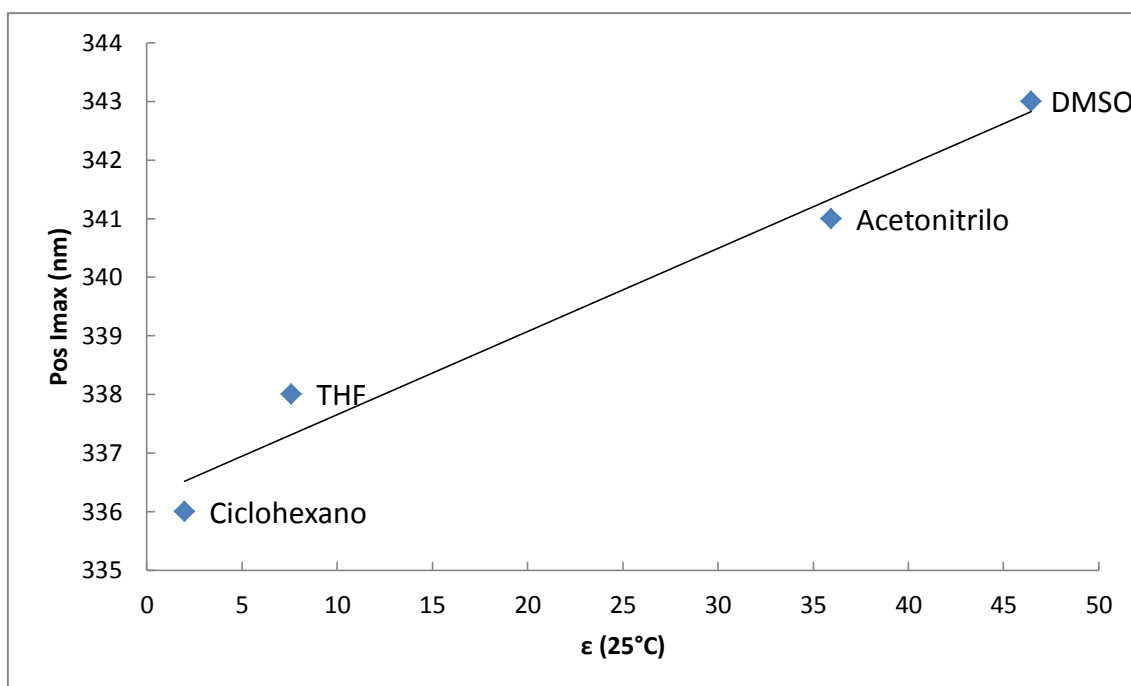


Figura 4.4.3. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de la constante dieléctrica del disolvente.

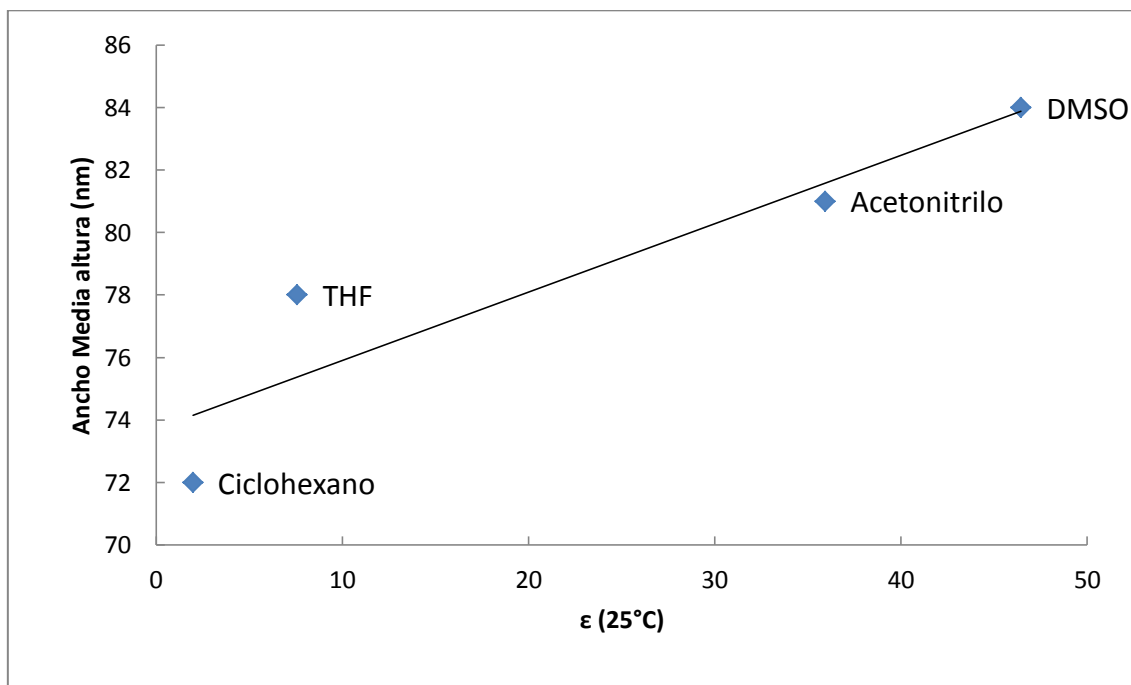


Figura 4.4.3. b) Variación del ancho a media altura en función de la constante dieléctrica del disolvente.

4.4.4. Efecto del momento dipolar

Como se explicó en el apartado de fundamentos, el momento dipolar está relacionado con la constante dieléctrica a la hora de establecer la polaridad del disolvente. Por esto se observa las mismas tendencias que en la constante dieléctrica, con la misma explicación para su comportamiento explicada anteriormente. Es decir, ensanchamiento y desplazamiento del espectro hacia el infrarrojo con el aumento del momento dipolar.

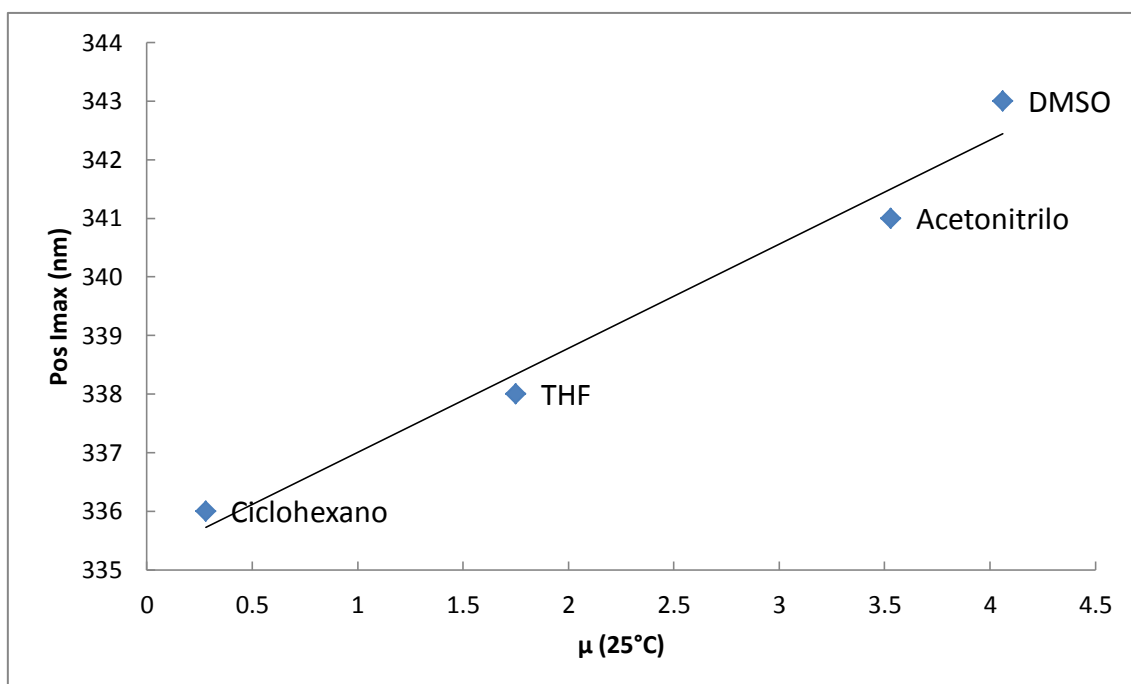


Figura 4.4.4. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función momento dipolar del disolvente.

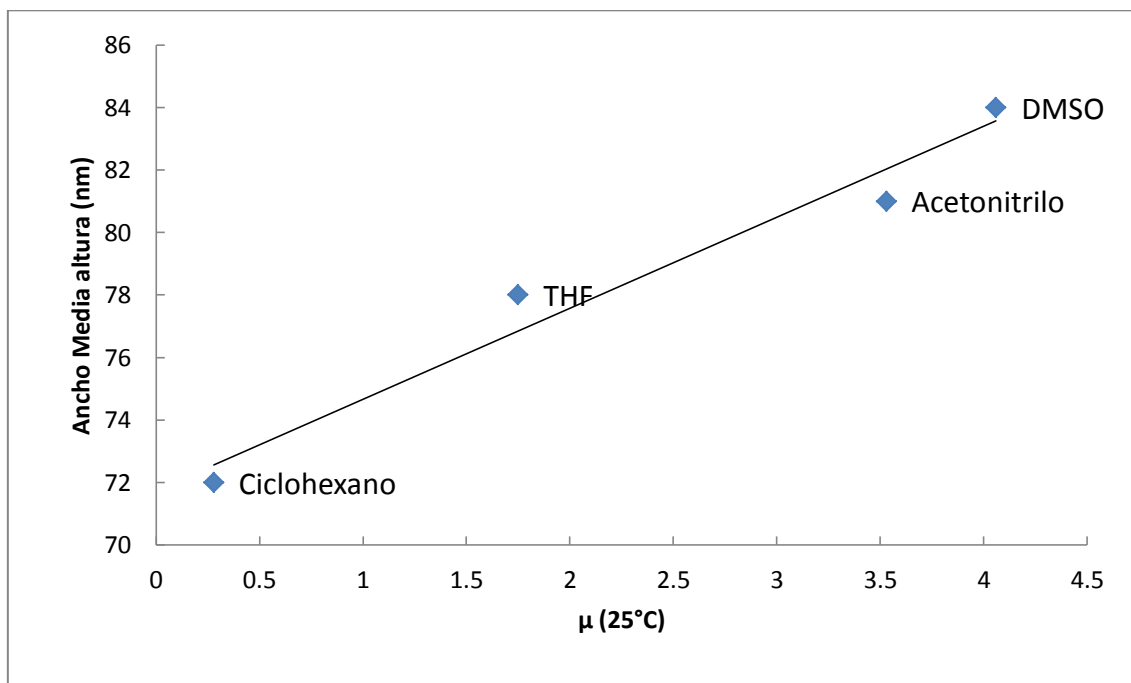


Figura 4.4.4. b) Variación del ancho a media altura en función del momento dipolar del disolvente.

4.4.5. Efecto del parámetro de Dimroth, Z

El parámetro de Dimroth (Z) es, como se explicó en el apartado de fundamentos, una medida de polaridad, basada en espectros de un fluoróforo en distintos disolventes. Con este valor, se debería poder expresar mejor las correlaciones de los efectos asociados al acoplamiento sonda-disolvente que con la constante dieléctrica y el momento dipolar.

A la vista de los resultados no se puede destacar un mejor entendimiento de las tendencias, ya que se obtienen resultados muy similares al compararlos con los dos anteriores. Es decir, ensanchamiento y desplazamiento del espectro hacia el infrarrojo con el aumento del valor de Z.

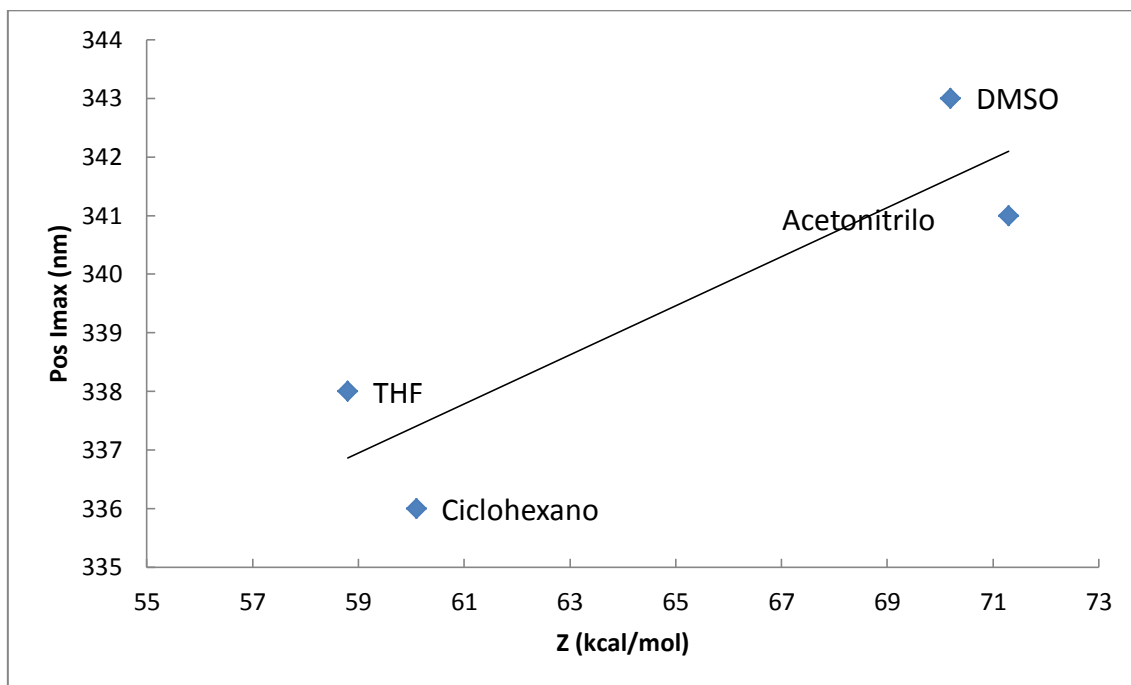


Figura 4.4.5. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de Z del disolvente.

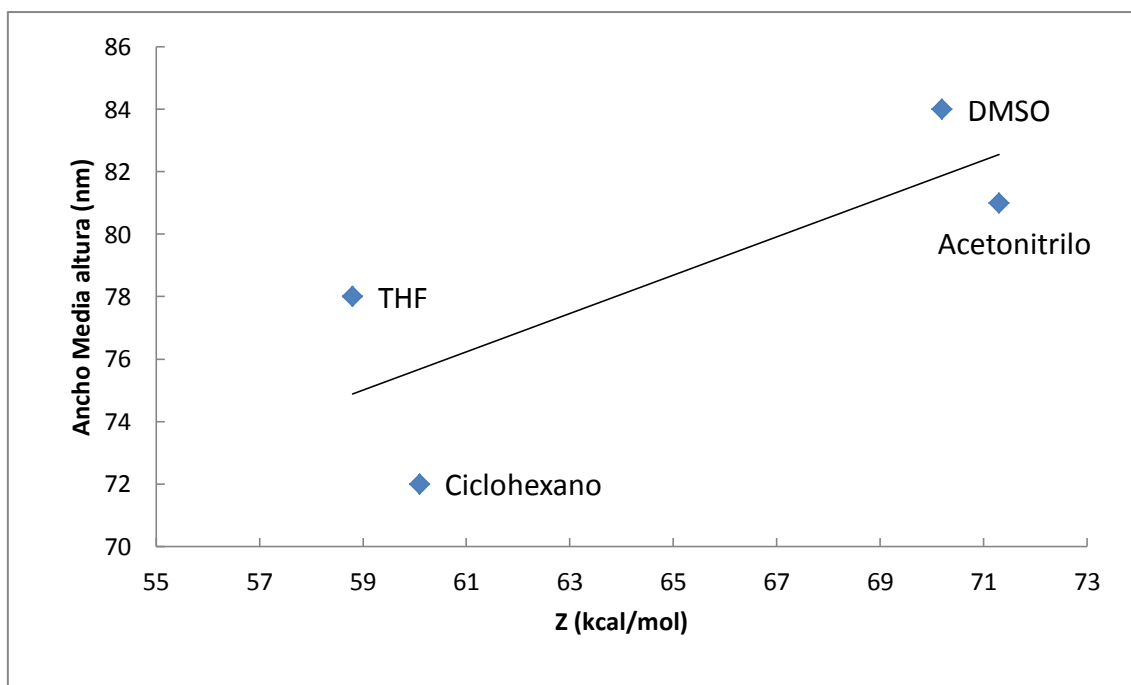


Figura 4.4.5. b) Variación del ancho a media altura en función de Z del disolvente.

4.4.6. Efecto del parámetro de Kosower, E_t

El parámetro de Kosower (E_t) representa la energía de transición de la banda de transferencia de carga intramolecular de las moléculas de un cromóforo concreto en distintos disolventes (como se explica en el capítulo de fundamentos).

Este valor genera unas correlaciones mucho más lineales y limpias en el apartado de fluorescencia. En este caso dado la menor cantidad de datos esto no tan es apreciable, pero se podría esperar una mejor definición de la variación del espectro de absorción por parte de este parámetro. Siendo el comportamiento el mismo que para las propiedades anteriores, podemos concluir que con el aumento de la polaridad se produce un desplazamiento de la banda hacia el infrarrojo y un ensanchamiento de la banda.

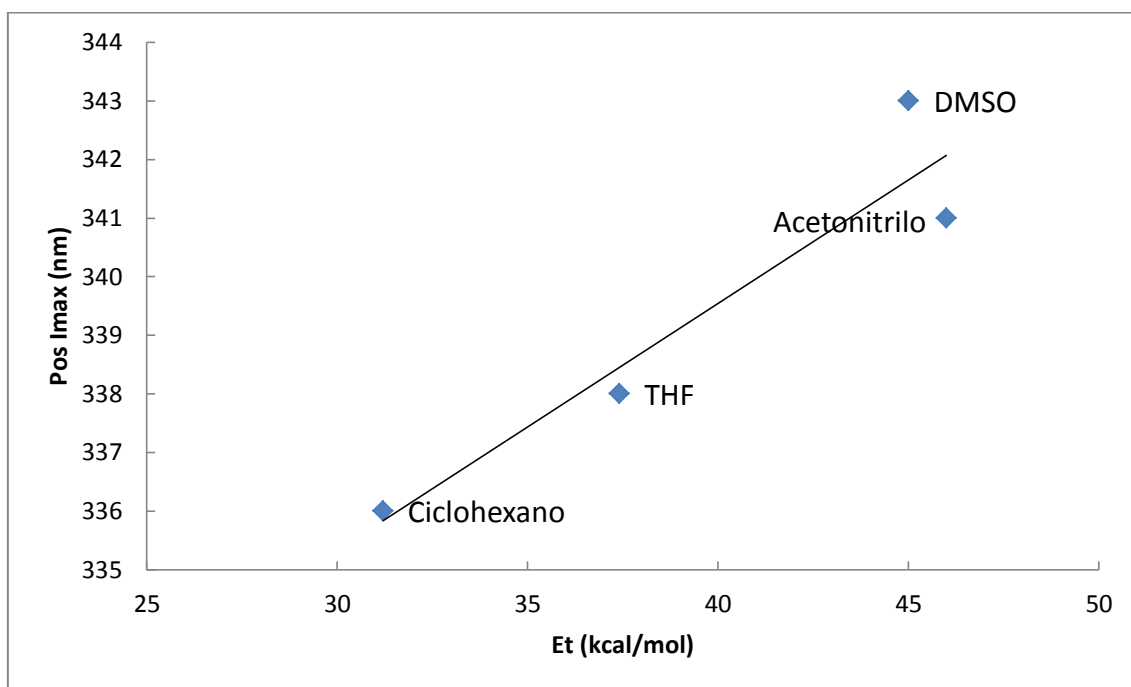


Figura 4.4.6. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de E_t del disolvente.

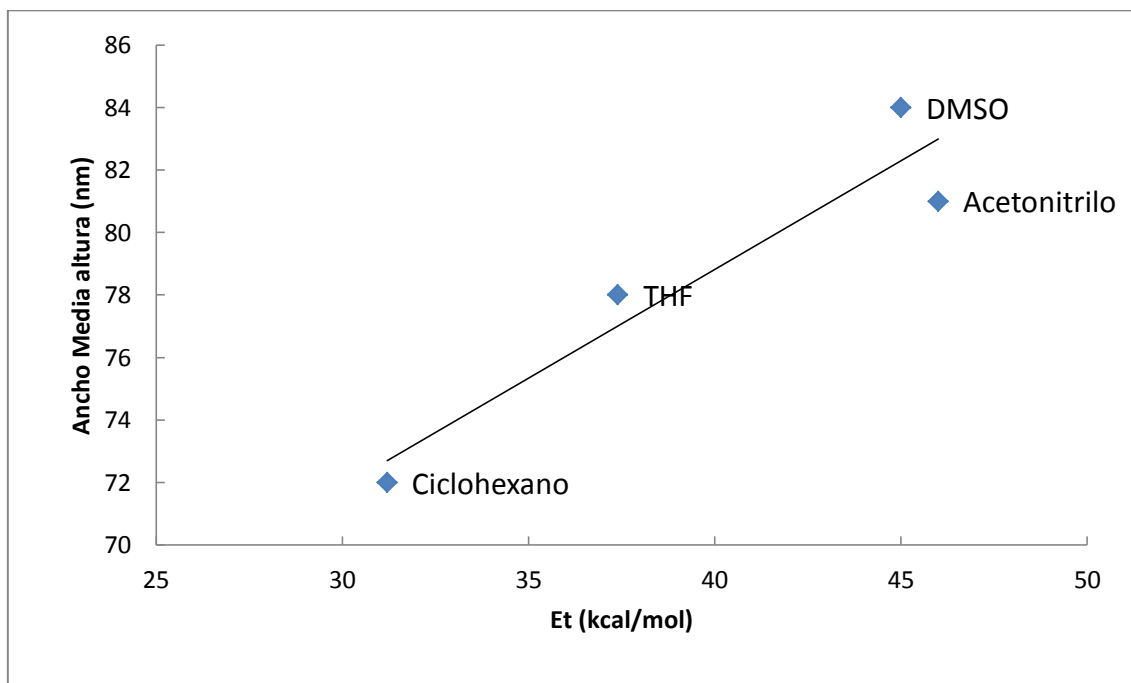


Figura 4.4.6. b) Variación del ancho a media altura en función de Et del disolvente.

4.4.7. Efecto del término dispersivo de la solubilidad

El término dispersivo mide la contribución de las fuerzas dispersivas de van der Waals, que representa la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas entre las moléculas del disolvente distintas de las interacciones electrostáticas y covalentes.

Por la definición de este término se asocia inmediatamente esta contribución con la viscosidad anteriormente estudiada. Es por esto por lo que se debería observar una tendencia similar a la observada en el apartado 4.4.1. , donde para un aumento del término dispersivo existe una tendencia de desplazamiento de la banda del espectro hacia longitudes de onda menores. En cambio no obtenemos ese resultado, y obtenemos unos valores que no tienen tendencia. Esta dispersión en los resultados podría ser atribuida a las pequeñas variaciones espectrales observadas en los espectros de absorción.

Lo mismo ocurre con el ancho a media altura, los valores parecen no tener un comportamiento correlativo.

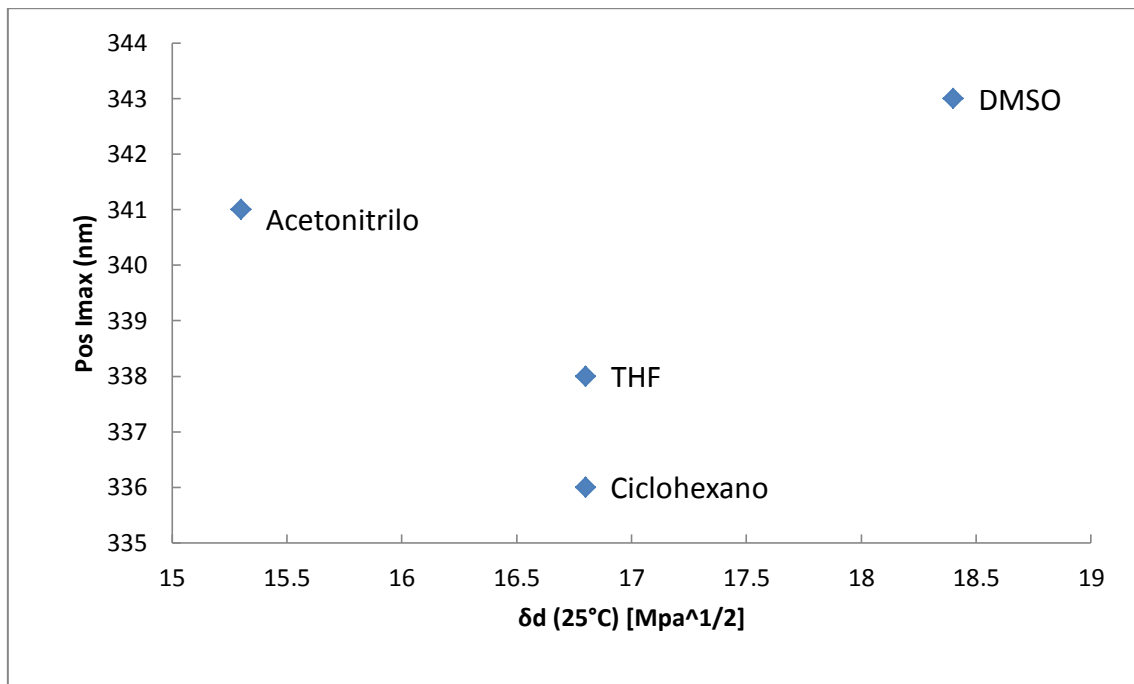


Figura 4.4.7. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de δ_d del disolvente.

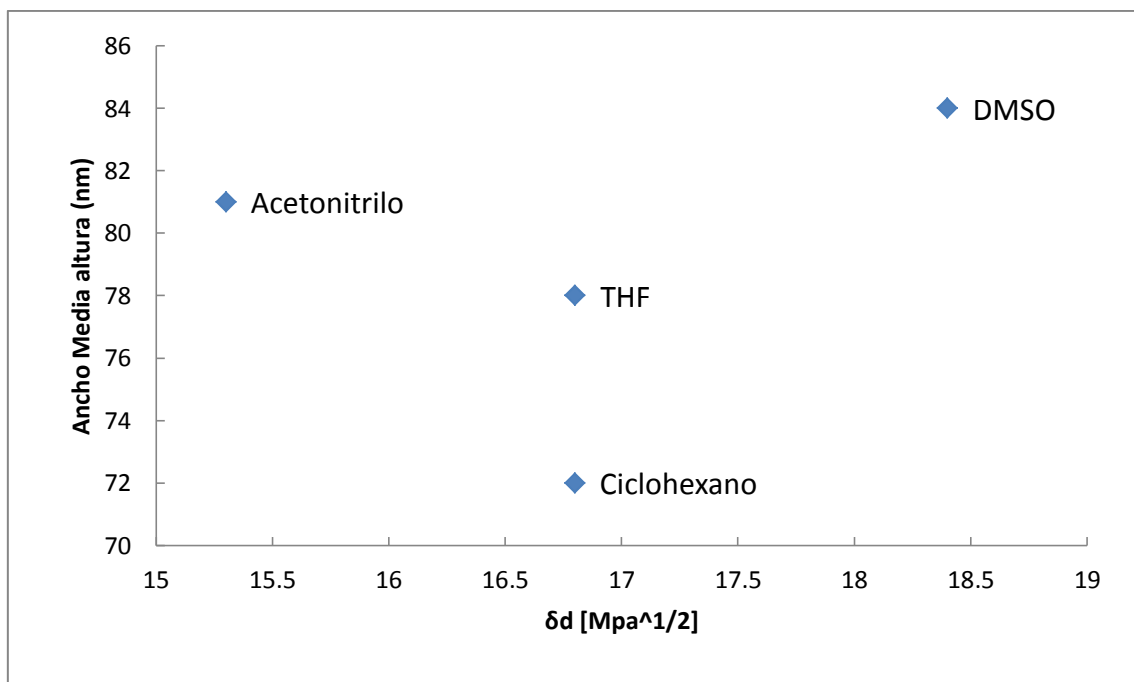


Figura 4.4.7. b) Variación del ancho a media altura en función de δ_d del disolvente.

4.4.8. Efecto del término polar de la solubilidad

Como era de esperar, el término polar de la solubilidad presenta un comportamiento idéntico al de las anteriores medidas de la polaridad. Es decir, ensanchamiento y desplazamiento del espectro hacia el infrarrojo con el aumento del término polar, siguiendo una tendencia lineal en ambos casos.

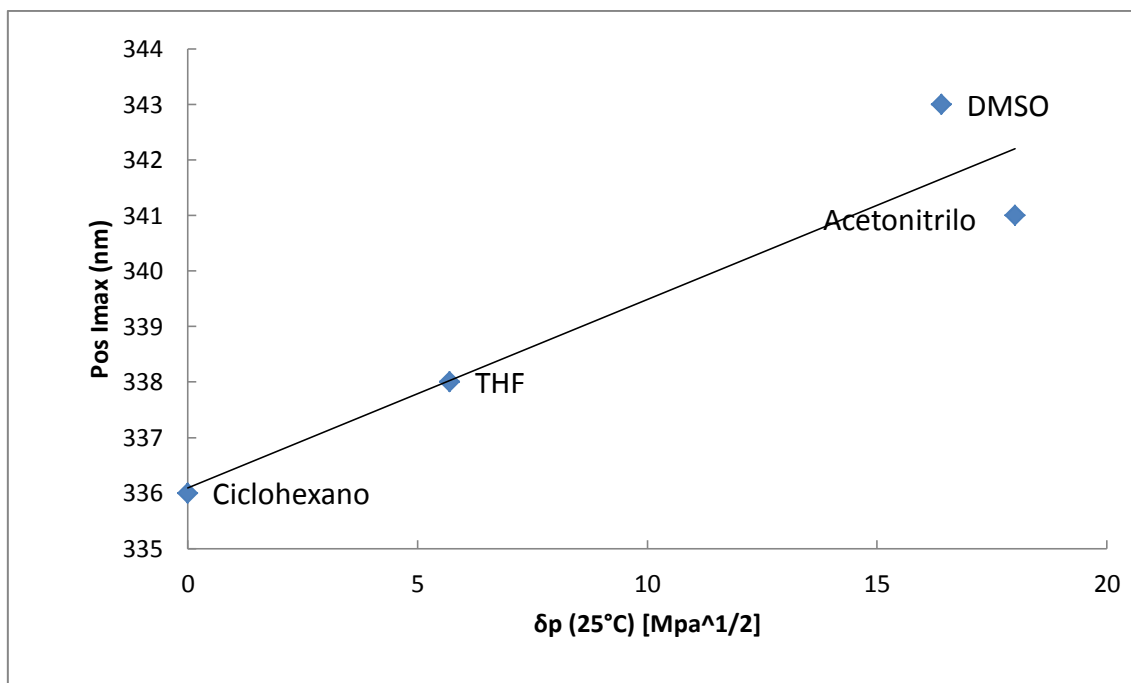


Figura 4.4.8. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de δ_p del disolvente.

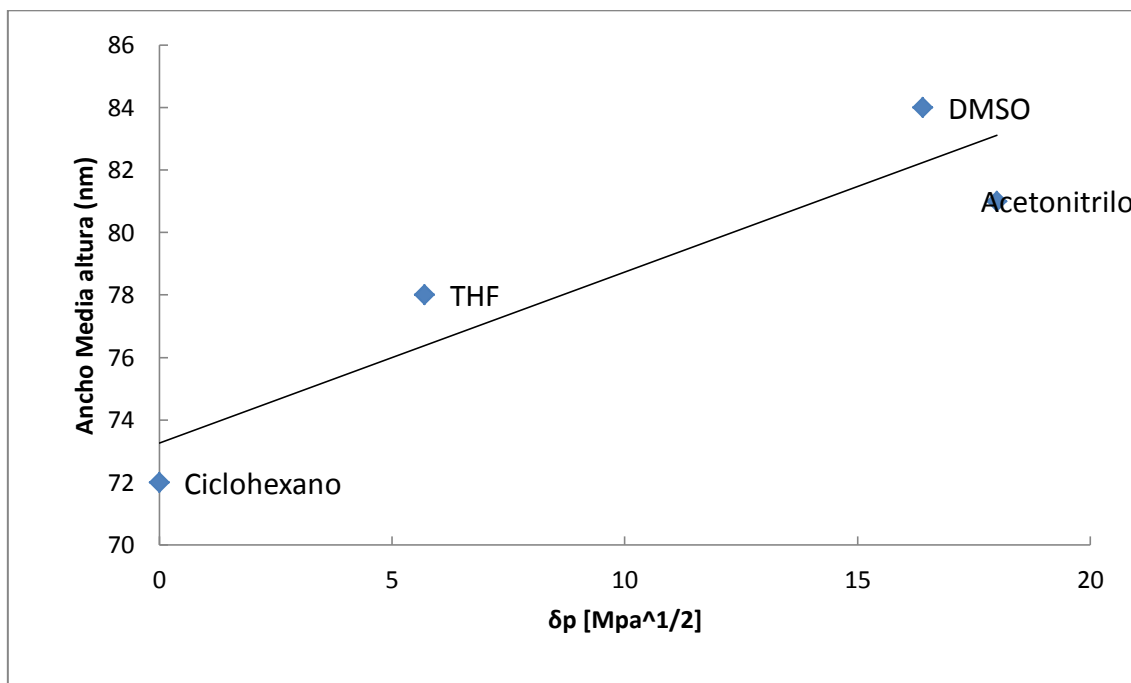


Figura 4.4.8. b) Variación del ancho a media altura en función de δp del disolvente.

4.4.9. Efecto del término de la solubilidad debido a la asociación por enlaces de hidrógeno

El término de debido a la asociación entre enlaces nos da una idea de la facilidad de formar enlaces de hidrogeno sonda-disolvente. A la vista de los resultados se observa una tendencia parecida a la observada en los parámetros polares, es decir este tipo de enlace genera un comportamiento similar al debido la polaridad del disolvente. Es decir, ensanchamiento y desplazamiento del espectro hacia el infrarrojo con el aumento del término polar, siguiendo una tendencia lineal en ambos casos.

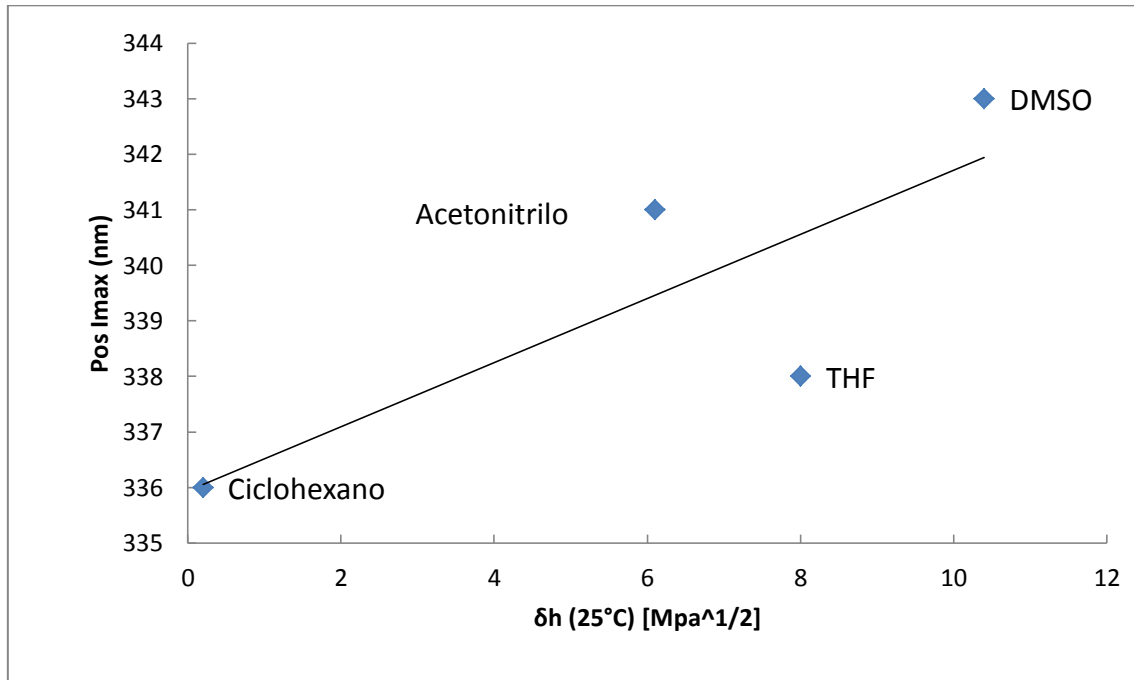


Figura 4.4.9. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función de δ_h del disolvente.

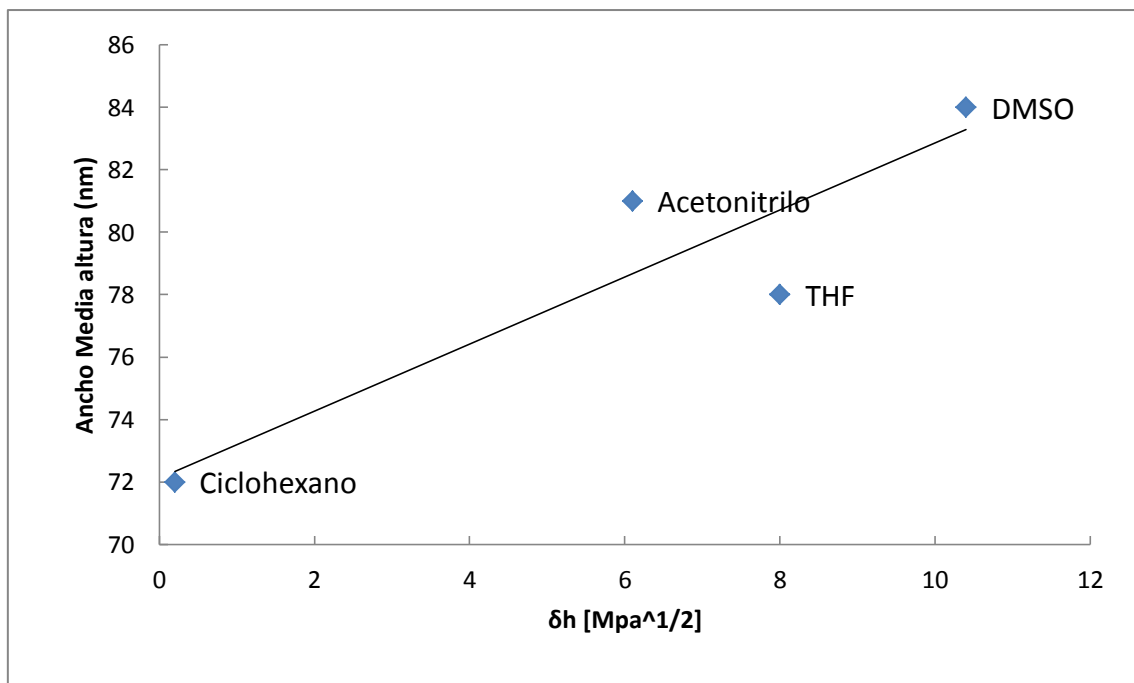


Figura 4.4.9. b) Variación del ancho a media altura en función de δ_h del disolvente.

4.4.10. Efecto del parámetro de solubilidad

El parámetro de solubilidad no es más que raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de los valores anteriores, como se vio en el apartado de fundamentos.

La comparación con los distintos valores que conforman este parámetro establecerá cuál de las componentes es la más predominante.

A la vista de los resultados, y determinado que las siguientes figuras son muy parecidas a las obtenidas en el apartado 4.4.8. se puede concluir que la componente polar de la solubilidad es la que tiene más efecto sobre el espectro de absorción de la sonda fluorescente. Aquí se obtiene una tendencia lineal muy clara.

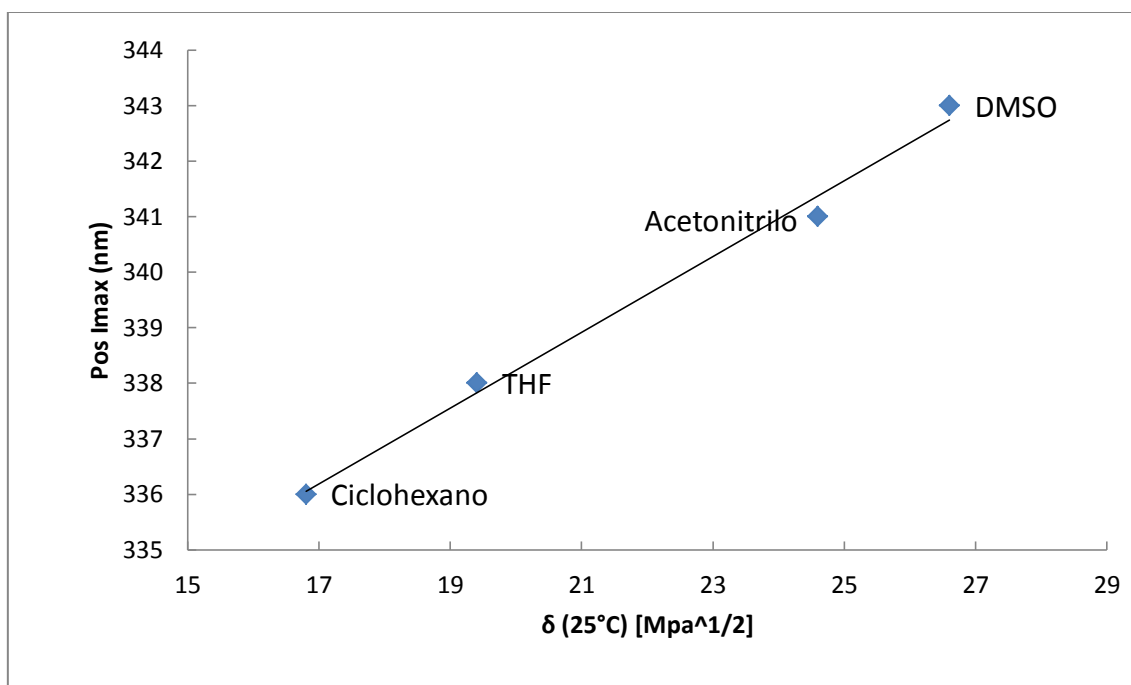


Figura 4.4.10. a) Variación del desplazamiento del punto de intensidad máxima en función del parámetro de solubilidad del disolvente.

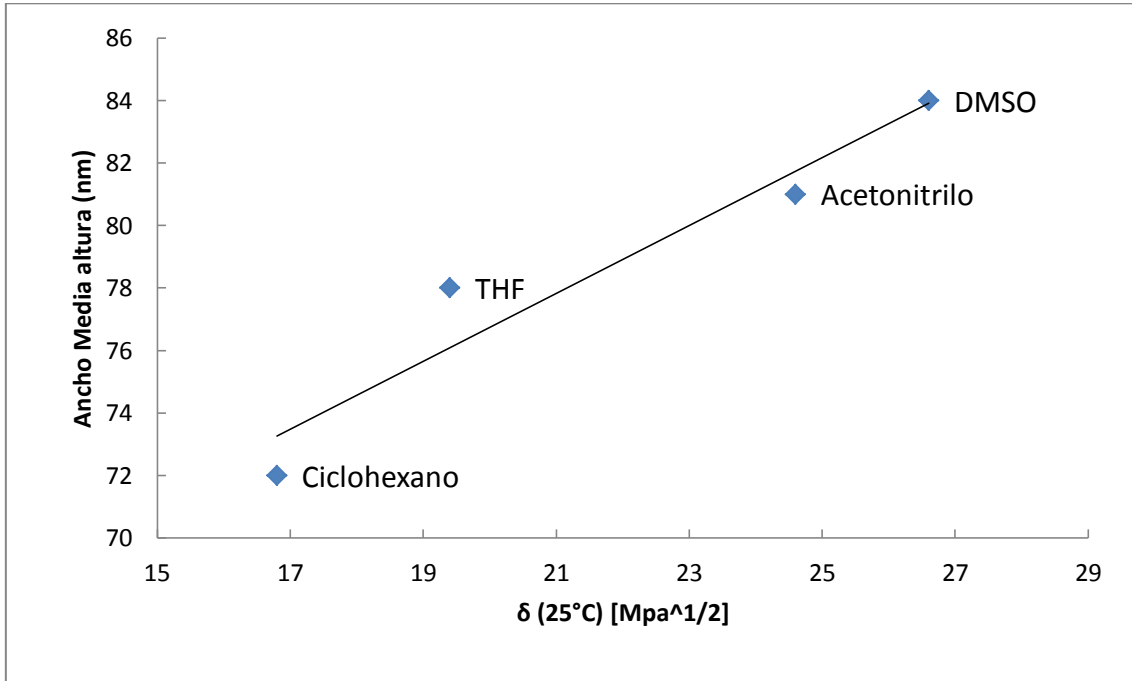


Figura 4.4.10. b) Variación del ancho a media altura en función del parámetro de solubilidad del disolvente.



5. CONCLUSIONES

En este proyecto se ha estudiado el comportamiento fotofísico de la Dansilcadaverina. El trabajo se ha centrado en el análisis de los espectros de emisión y de excitación de fluorescencia así como los de absorción UV-Vis, para distintos disolventes.

De los espectros de emisión de fluorescencia se analizó:

- La integral bajo la curva espectral
- El ancho a media altura
- La longitud de onda de emisión máxima
- La longitud de onda promedio (λ promedio)

De los espectros de absorción UV-Vis se analizó:

- El ancho a media altura
- La longitud de onda de máxima absorción

A continuación se resumen las conclusiones que se sacaron del estudio de este comportamiento en relación a cada parámetro de los disolventes.

- i. **Efecto de la viscosidad.** El aumento de la viscosidad produce un desplazamiento del espectro hacia el violeta, y un estrechamiento de la banda de emisión entorno al máximo. Esto debe implicar un acoplamiento dipolar menos efectivo y por tanto menor desestabilización del estado excitado lo que debería dar lugar a la desexcitación radiativa desde un nivel de mayor energía.
- ii. **Efecto del índice de refracción.** El aumento del índice de refracción produce un desplazamiento del espectro hacia el violeta, y un estrechamiento de la banda de emisión entorno al máximo.



- iii. **Efecto de la constante dieléctrica.** El aumento de la constante dieléctrica produce un desplazamiento del espectro hacia el rojo, y un ensanchamiento de la banda de emisión entorno al máximo. Este efecto es tanto mayor cuanto mayor sea la constante dieléctrica del disolvente puesto que el acoplamiento dipolar debería ser mucho más efectivo.
- iv. **Efecto del momento dipolar.** El aumento del momento dipolar produce un desplazamiento del espectro hacia el rojo, y un ensanchamiento de la banda de emisión entorno al máximo. Análogamente este efecto se puede explicar a partir de un acoplamiento dipolar de la sonda con el disolvente más efectivo.
- v. **Efecto del parámetro de Dimroth, Z.** El aumento del parámetro de Dimroth produce un desplazamiento del espectro hacia el rojo, y un ensanchamiento de la banda de emisión entorno al máximo.
- vi. **Efecto del parámetro de Kosower, E_t .** El aumento de la constante dieléctrica produce un desplazamiento del espectro hacia el rojo, y un ensanchamiento de la banda de emisión entorno al máximo.
- vii. **Efecto del término dispersivo del parámetro de solubilidad (δ_d)** El aumento del término dispersivo produce un desplazamiento del espectro hacia el violeta, y un estrechamiento de la banda de emisión entorno al máximo.
- viii. **Efecto del término polar del parámetro de solubilidad δ_p .** El aumento del término polar produce un desplazamiento del espectro hacia el rojo, y un ensanchamiento de la banda de emisión entorno al máximo.
- ix. **Efecto del término debido a la asociación por enlaces de hidrógeno del parámetro de solubilidad (δ_h).** El aumento del término debido a la asociación entre enlaces de hidrógeno produce un desplazamiento del espectro hacia el rojo, y un ensanchamiento de la banda de emisión entorno al máximo.
- x. **Efecto del término total del parámetro de solubilidad.** La solubilidad total, tiene el comportamiento del término polar, por ser éste el más influyente.



Todos los efectos anteriores se explican por la relajación del disolvente, o por la microheterogeneidad (producida por las fuerzas de van der Waals) de los distintos entornos moleculares.

En los espectros de absorción UV-Vis, las conclusiones son similares, si bien los desplazamientos espectrales observados son mucho menores que en los espectros de emisión de fluorescencia.



Anexo A.

Programa de análisis de datos.

A.1 Entrada de datos.

Los datos de entrada del programa deben ser una matriz “data” en cuya primera columna sean las longitudes de onda, y el resto los distintos espectros a analizar. El módulo de carga de datos de MatLab es bastante potente, y permite la importación de datos desde un ASCII o incluso desde el portapapeles. También identifica los nombres dados a los espectros y permite su utilización en la presentación de los datos.

No existe límite al número de espectros que puede procesar el programa, salvo por supuesto lo que sea cómodo de mostrar por pantalla.

A.2. Acondicionamiento de los datos.

El programa nos pide unos valores de longitud de onda máximo y mínimo antes de realizar el análisis. Esto eliminará los datos por debajo de ese mínimo y por encima de ese máximo. También restará a los datos la línea que une los dos puntos antes mencionados.

A.3. Valores calculados.

Los valores que nos interesan que el programa calculará son:

- La integral bajo la curva.
- El ancho a media altura.
- El máximo valor de intensidad.
- La longitud de onda donde se alcanza el máximo.
- Y el valor de la longitud de onda promedio.



A.4. Presentación de los datos.

Para terminar el programa muestra por pantalla los datos pedidos en una tabla. Estos datos pueden ser copiados para su posterior utilización. También se muestra una gráfica de los espectros utilizados en el análisis después de su acondicionamiento, cuya utilidad reside en el poder comprobar el buen funcionamiento del programa y la elección de los valores máximos y mínimos de lambda. El programa también genera un fichero de datos de Excel, para que el usuario pueda disponer de los datos procesados para un uso posterior.

A.5. Código del programa. V1.1

```
clearvars
colheaders=0
uiimport

f = warndlg('Seleccione la variable, y presione "OK".', 'Selección de Variable "data"');
drawnow
waitfor(f);

eleccion =0;
data1=data;

while eleccion==0

    % Construct a questdlg with two options
    choice = questdlg('¿Quieres añadir mas datos a la matriz?, tenga en cuenta que deben
    tener el mismo numero de datos.', ...
    'Añadir mas datos a la matriz', ...
    'Si','No','No');

    % Handle response

    switch choice
    case 'Si'
        eleccion = 0;
```



```
uiimport
f = warndlg('Seleccione la variable, y presione "OK".', 'Selección de Variable
"data");
drawnow
waitfor(f);

data(:,1) = [];
data1=[data1 data]

case 'No'
eleccion = 1;
end
end
```

% se deja seleccionada la matriz data(tiene que llamarse asi, si no no funciona)

```
%%
%GENERAMOS LA MATRIZ M ELIMINANDO LOS VALORES A IZQUIEDA DE I1 Y A
DERECHA
%DE I2, Y RESTANDO LA LINEA QUE LOS UNE A LOS VALORES.
```

```
N=sortrows(data1);
N2=N;
```

```
% Inicio variables
tamano=zeros(1,2);
tamano=size(N);
j=tamano(1); %%%% 301
k=tamano(2); %%%% 7
```

```
%---->M=data ; %De momento M=data inicial, hay que modificar para que reste a cada
valor lo que corresponde
%---->lambdaini=data(:,1);
```

```
x1=input('Ingrese el valor de LambdaMIN=');
x2=input('Ingrese el valor de LambdaMAX=');
```



%% Eliminamos las filas con $\lambda < x_1$ y con $\lambda > x_2$

```
ancho= x2-x1;  
medio1=(x1+x2)/2;  
medio=floor(medio1);
```

```
for m=1:j  
    if N(m,1)==medio  
        posmedio=m;  
    end  
end
```

```
for m=j:-1:posmedio  
    if N(m,1)>x2  
        N2(m,:)=[];  
    end  
end
```

```
for m=posmedio:-1:1  
  
    if N(m,1)<x1  
        N2(m,:)=[];  
  
    end  
end
```

%% Restamos la recta, que une (x_1, y_1) con (x_2, y_2) para cada una de las columnas

```
lambda=N2(:,1);  
tamano=zeros(1,2);  
tamano=size(N2);  
j=tamano(1);  
k=tamano(2);  
arestar=zeros(j,k);  
y1=N2(1,:);  
y2=N2(j,:);
```

```
for n=2:k;  
  
    for m=1:j;
```



```
arestar(m,n)=y1(n)+((y2(n)-y1(n))/(x2-x1))*(lambda(m)-x1);

end
end

N3=N2-arestar;

%% Aqui ya tenemos la matriz lista para operar.
M=N3;

%%

% Inicio variables
tamano=zeros(1,2);
tamano=size(M);
a=tamano(1); %%%% 301
b=tamano(2); %%%% 7

max=zeros(1,b);
poslmax=zeros(1,b);

                                %pide valores de lambda para hacer
                                %la recta y luego restar a los
                                %valores

%%
%CALCULO DEL MAXIMO Y LA RESTA PARA LUEGO CALCULAR BASE A MEDIA ALTURA

Resta=zeros(size(M));
lambda=M(:,1);

for m=2:b %paso por columnas

for n=1:a %paso por filas

%-----%
                                %encuentra el maximo
if M(n,m)>max(m);
max(m)=M(n,m);
poslmax(m)=M(n,1);
```



```
end
%-----%

mitad=max(m)/2;
altura(m)=max(m)-mitad;
Resta(n,m)=abs(M(n,m)-mitad);
end
end

% BASE A MEDIA ALTURA
Minimo1=10000000000.*ones(b,1);
Minimo2=10000000000.*ones(b,1);
lmitad=zeros(b,1);

for m=2:b %paso por columnas

for n=1:a %paso por filas

%izquierda del maximo
if lambda(n)<poslmax(m)
    if Resta(n,m)<Minimo1(m);

        Minimo1(m)=Resta(n,m);
        lmitad1(m)=M(n,1);
        end
    end

%derecha del maximo
if lambda(n)>poslmax(m)
    if Resta(n,m)<Minimo2(m);

        Minimo2(m)=Resta(n,m);
        lmitad2(m)=M(n,1);
        end
    end
end
end
```



```
end
Base(m)=lmitad2(m)-lmitad1(m);
end
%%

%INTEGRAL
int=zeros(b,1);
for m=2:b %paso por columnas

for n=1:a-1 %paso por filas

    y=(M(n,m)+M(n+1,m))/2;

    int(m)=int(m)+y;

end
end
%%
% LAMBDA PROMEDIO
lambdaprom=zeros(b,1);

for m=2:b %paso por columnas

for n=1:a %paso por filas

    lambdaprom(m)=lambdaprom(m)+(M(n,1)*(M(n,m)));

end
end
lambdaprom=lambdaprom./int;

%%

datosX=N3(:, 1);
N3(:,1)=[];

Resultados={'Valores Maximos','Posicion ValMax','Base Media
Altura','Integral','Lambdapromedio'};
Tablaresultados(:,1)=max(:,2:end);
```



```
Tablaresultados(:,2)=poslmax(:,2:end);  
Tablaresultados(:,3)=Base(:,2:end) ;  
Tablaresultados(:,4)=int(2:end,:);  
Tablaresultados(:,5)=lambdaprom(2:end,:);  
  
f=figure('Name','Tabla de resultados','Position',[100 100 700 600]);  
f=uitable('RowName',colheaders(2:end),'Position',[1 1 700  
600],'ColumnName',Resultados,'Data',Tablaresultados);
```

```
g=figure('Name','Grafica de los datos procesados','Position',[100 100 800 600]);
```

```
g=plot(datosX,N3);  
ylabel('Intensidad');  
xlabel('\lambda');
```

```
xlswrite('DatosProcesados',M)
```

```
%fin = warndlg('Pulse para finalizar', 'FINALIZAR');  
%drawnow  
%waitfor(fin);
```




7. Referencias

- [1] Fco. Javier González Benito. **Modificación superficial de fibras de vidrio. Microestructura, propiedades y degradación.** (1999)
- [2] Sigma-Aldrich <http://www.sigmaaldrich.com/>
- [3] J.R. Lacowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Plenum Press. (1983)
- [4] N.J. Turro, **Modern molecular Photochemistry.** University Science Books. (1991)
- [5] J.F. Rabek, **Mechanisms of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers.** (1987)
- [6] Dania Olmos Díaz. **Materiales Compuestos Epoxi-Sílice: Estudio de Interfase** (2003)
- [7] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M.T. Gandolfi. **Handbook of Photochemistry.** Taylor & Francis Group. (2006)
- [8] J. Brandrup. **Handbook of Polymers** (1998)
- [9] J.A.Riddick. **Organic Solvents: Physical properties and methods of purification.**
- [10] Tsien RY, Waggoner A. "**Fluorophores for confocal microscopy**". In Pawley JB. Handbook of biological confocal microscopy. (1995).
- [11] J.B. Birks, **Photophysics of aromatic molecules,** W-I. (1970)
- [12] K. Ficht, K. Fisher, H. Hoff, C.D. Eisenbach, **Makromol. Chem., Rapid Commun.**
- [13] K.A. Al-Hassan, J. Photochem. **Photobiol. A: Chem.** (1994)
- [14] M.Homocianu, A. Airinei, D Ortansa. **Solvent Effects on the Electronic Absorption and Fluorescence Spectra.** (2011)
- [15] I. Baraldi, G. Brancolini, F. Momicchioli, G. Ponterini, D. Vanossi. Chemical Physics 288 (2003) 309–325. **Solvent influence on absorption and fluorescence spectra of merocyanine dyes: a theoretical and experimental study.**
- [16] **Cure Process and Reaction-Induced Phase Separation in a diepoxy-diamine/PMMA Blend. Nanoscale monitorization by Steady State Fluorescence and FTIR (Near and Medium range)**", D. Olmos and J. González-Benito, Colloid and Polymer Science, 2006, 284: 654-667.
- [17] **Fluorescence response from anthracene labeled polystyrene to study its thermal transitions,** S.G. Turrión, D. Olmos, N. Ekizoglou, J. González-Benito, Polymer, 2005, 46, 4023-4031.