

PRÀCTICA 3: ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

Objectius. La pràctica es divideix en dues parts. En la primera, s'enregistraran els espectres d'absorció, de fluorescència i d'excitació d'un conjunt de colorants orgànics. La intensitat de l'emissió fluorescent es relacionarà amb l'estructura molecular dels colorants. En la segona part s'estudiarà el procés de desactivació bimolecular (*quenching*) de l'emissió fluorescent de la molècula de riboflavina pels ions iodur, I⁻.

Conceptes relacionats:

Espectroscòpia electrònica, estats excitats (singlet, triplet), processos fotofísics, cinètica fotoquímica.

Actualització: 2023-2024

PART I. Efecte de l'estructura molecular en la capacitat fluorescent dels colorants

1. Introducció

L'objectiu d'aquesta pràctica és obtenir l'espectre de fluorescència d'una sèrie de colorants de la mateixa família i relacionar la intensitat de fluorescència amb l'estructura molecular.

La probabilitat (constant de velocitat) dels processos de desactivació d'estats electrònics excitats és controlada per una sèrie d'aspectes relacionats amb l'estructura molecular. Així, la constant de velocitat fluorescent és governada fonamentalment pel moment dipolar de transició entre els estats, i per tant està relacionada directament amb la probabilitat d'absorció. L'encreuament intersistema, que suposa un canvi de multiplicitat, depèn en gran manera de la interacció spin-òrbita, la qual és afavorida per la presència d'àtoms pesats. El procés de conversió interna, transició no radiativa entre estats electrònics de la mateixa multiplicitat, és induït pels termes d'acoblament electrònic menyspreats en l'aproximació de Born-Oppenheimer. Aquest procés va seguit de la relaxació vibracional fins al nivell vibracional més baix de l'estat electrònic.

En aquesta part de la pràctica s'avalua la intensitat de fluorescència de la fluoresceïna i d'una sèrie dels seus derivats halogenats així com de la fenolftaleïna. En el laboratori es registren els espectres d'absorció, fluorescència i excitació (en aquest ordre) de tots. S'analitzaran les diferències observades entre els espectres d'absorció i excitació, considerant factors instrumentals. Es discutirà la capacitat fluorescent dels colorants sobre la base dels processos de conversió interna (rigidesa / flexibilitat de les molècules) i d'encreuament intersistema (àtoms pesants).

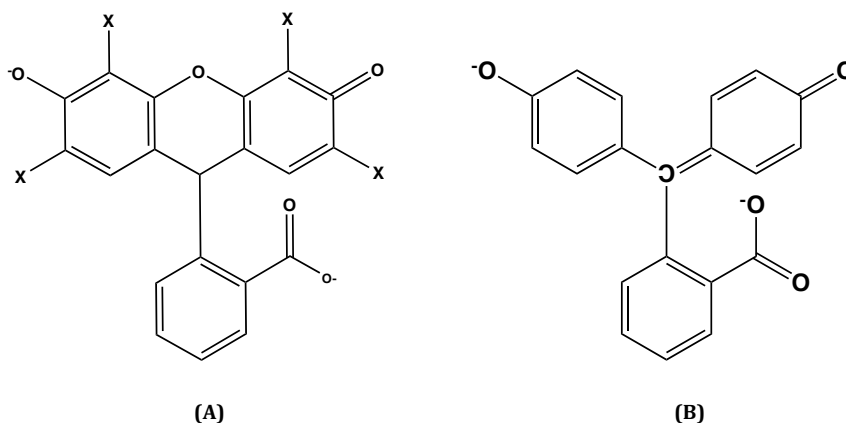


Figura 1: Estructures moleculars de: (A) Fluoresceïna (X=H), Eosina (X=Br) i Eritrosina (X=I). (B) Fenolftaleïna.

2. Experimental

2.1. Dissolucions (comuns):

En cas de no estar preparades les dissolucions dels colorants, prepareu 1 L d'una dissolució M dels següents **compostos** utilitzant com a dissolvent NaOH 0.01M (pH = 12) que cal preparar:

- Fluoresceïna (7 mg/L a pH=12) Mr = 332.32 $C_{20}H_{12}O_5$.
- Eosina groguenca (14 mg/L a pH=12) Mr = 691.86 $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$.
- Eritrosina B (18 mg/L a pH=12) Mr = 879.92 $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$.
- Fenolftaleïna (20 mg/L dissolució hidroalcohòlica. Aquesta dissolució és incolora.) Mr = 318.33 (6×10^{-5}). Atenció: Per a realitzar els espectres (d'absorció i d'emissió) de fenolftaleïna, cal introduir en la cubeta 2/3 de la dissolució incolora i acabar de reomplir amb dissolvent 0.01M de NaOH (comptagotes), observant l'intens color violeta. Mesureu l'espectre immediatament. (Recordeu la pràctica de LabQF-I, *Decoloració de la fenolftaleïna en medi bàsic*).

Dissolució per a diluir els colorants:

- 500 mL dissolució de NaOH 0.01 M

NOTA: Cal diluir en un factor 1/100 la dissolució de Fluoresceïna i 1/50 les dissolucions d'Eosina i Eritrosina B per a registrar els espectres d'emissió. Per a això, pipetegeu 1 ml de la dissolució de Fluoresceïna, 2 ml per a les dissolucions d'Eosina i Eritrosina B, i enrase'ls a 100 ml amb NaOH 0.01 M per a obtenir les respectives dilucions dels colorants. Els espectres d'absorció es registren a partir de les dissolucions mare (sense diluir).

2.2. Procediment experimental

1. Registreu els espectres d'absorció de totes les molècules entre 250 i 700 nm utilitzant les dissolucions mare corresponents.
2. Registreu els espectres de fluorescència fins a 700 nm utilitzant com a longitud d'ona d'excitació un valor entre 10 i 15 nm menor que la del màxim d'absorció més desplaçat cap al vermell obtingut en l'apartat anterior, utilitzant les dissolucions diluïdes corresponents.
3. Registreu l'espectre d'excitació entre 250 i 700 nm utilitzant com a longitud d'ona d'emissió aquella del màxim de fluorescència obtinguda en l'apartat anterior, utilitzant les dissolucions diluïdes corresponents.
4. Superposeu els espectres d'excitació i de fluorescència per a cada substància. Superposeu els espectres de fluorescència per a les tres primeres substàncies.
5. Repetiu l'espectre de fluorescència de la fluoresceïna utilitzant una longitud d'ona d'excitació d'un màxim de menor longitud d'ona que l'utilitzat en l'apartat (2) per a validar el compliment de la regla de *Kasha*.

NOTA: En sistemes amb una emissió molt xicoteta o fins i tot nul·la, la fluorescència de la mostra pot estar afectada per la fluorescència de possibles impureses (provinents de la mostra, del dissolvent, i/o d'una mostra anterior). També és possible que aparega senyal Raman del dissolvent; recordeu que la posició d'una senyal Raman depèn de la longitud d'ona d'excitació.

3. Resultats

3.1 Espectres d'absorció

Prepareu una taula amb els paràmetres dels espectres d'absorció dels colorants indicant per a cadascun: pics, longitud d'ona màxima d'absorció, absorbància i descripció de l'excitació que representen. Ordeneu els pics per energies ($S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$, ...). Compareu els diferents colorants.

3.2 Espectres de fluorescència

Prepareu una taula amb els paràmetres dels espectres de fluorescència dels colorants indicant: pics, longitud d'ona d'excitació, longitud d'ona màxima de fluorescència, intensitat fluorescent i descripció -indicant si són senyals de fluorescència o senyals Raman. Compareu i analitzeu els espectres dels diferents colorants. Com es pot distingir una emissió fluorescent d'una senyal Raman?

3.3 Regla de Kasha

Expliqueu si es compleix o no la regla de Kasha en els colorants estudiats.

3.4 Espectres d'excitació

1. Prepare una taula amb els paràmetres dels espectres d'excitació dels colorants indicant: pics, longitud d'ona d'emissió, longitud d'ona màxima d'excitació i intensitat.
2. Compare els espectres d'excitació i d'absorció dels diferents colorants (forma i posició dels màxims, especialment).
3. Identifique les transicions electròniques que s'observen en els espectres d'excitació i d'absorció dels diferents colorants.

3.5 Capacitat fluorescent i estructura molecular dels colorants

1. Comente per què la banda de fluorescència està situada a majors longituds d'ona que la banda d'absorció. Ocorre igual en qualsevol sistema?
4. Correlacione la capacitat fluorescent dels colorants amb la seua estructura molecular i discuteix les diferències.

3.6 Desplaçament Stokes

Mesure el desplaçament Stokes, en cm^{-1} , entre les senyals d'absorció i fluorescència.

PART II. Transferència d'energia de molècules excitades de riboflavina. Equació de Stern-Volmer

Objectiu

Aquest experiment tracta de demostrar la transferència d'energia d'una molècula excitada (riboflavina) a una altra no excitada (KI).

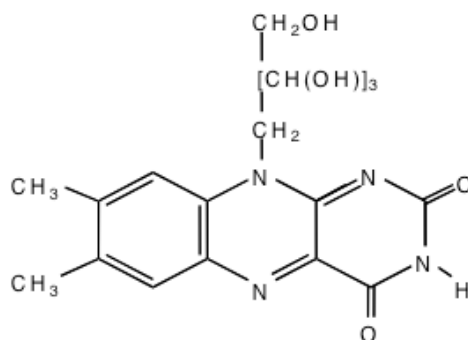
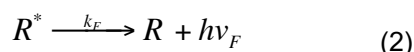


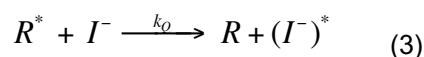
Figura 2: Molècula de Riboflavina

1. Introducció i Fonaments Teòrics

Quan la riboflavina, que representarem per R , absorbeix un fotó de llum i es converteix en molècula excitada, R^* (reacció 1), un camí favorable per a la tornada a l'estat fonamental és l'emissió d'un fotó o fluorescència (reacció 2).



En presència de l'ió I^- , la riboflavina pot tornar a l'estat fonamental per transferència d'energia al I^- , reacció (3), no emetent un fotó (*quenching*).



En una dissolució amb riboflavina i I^- la intensitat de la fluorescència, que representem per I , es pot considerar d'aquesta manera: si la molècula de riboflavina excitada no col·lideix amb els ions I^- , la major part de les molècules emeten un fotó. Si col·lideixen amb algun I^- , es desactivaran per emissió no fotònica.

La competència entre tots dos processos, fluorescència d'emissió i *quenching* de fluorescència, serà dependent:

1. Del temps de vida mitjana de l'estat excitat (τ). A major durada de la molècula de riboflavina en l'estat excitat, més s'afavorirà la reacció (3) abans que la (2).
2. Del nombre de col·lisions efectuades. Això estarà relacionat amb les concentracions de riboflavina i I^- .

3. De l'eficàcia (k_Q) de I⁻ com a esmorteïdor. (No totes les col·lisions són efectives donant transferència d'energia).

El quocient entre la fluorescència no esmorteïda (I_F^0) i la fluorescència esmorteïda (I_F) està relacionada amb aquestes variables mitjançant l'equació de Stern-Volmer:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + k_Q \cdot \tau \cdot [Q] \quad (4)$$

on $[Q]$ és la concentració d'esmorteïdor, en aquest cas la de l'ió I⁻.

2. Procediment experimental

1. Prepare les següents dissolucions (compartides):

- 500 mL de mononucleòtid de flavina 6.5×10^{-5} M.
- 200 mL de KI 0.1 M

2. Prepare a continuació cadascuna de les dissolucions indicades en la taula en matrassos aforats de 25 mL. Cada dissolució tindrà la mateixa concentració de riboflavina en presència de concentracions variables de KI.

3. Mesure la fluorescència de cadascuna de les dissolucions utilitzant la longitud d'ona del màxim d'absorció -15 nm (450 nm) com a longitud d'ona d'excitació, així com l'àrea de la banda d'emissió.

Taula 1. Intensitat màxima i àrea de la banda d'emissió de dissolucions de riboflavina i I⁻.

Dissolució	v/mL (R)	v/mL (KI)	$I_{max,F}$	Àrea banda
1	2.0	0.0		
2	2.0	1.0		
3	2.0	2.0		
4	2.0	3.0		
5	2.0	4.0		
6	2.0	5.0		

3. Resultats

3.1 Desactivació bimolecular, quenching, de riboflavina excitada a iodur no excitat

1. Representeu el quocient $\frac{I_F^0}{I_F}$ tenint en compte la lectura de fluorescència per a cada dissolució, enfront de la concentració de KI.
2. Realitzeu la mateixa representació però amb la relació d'àrees de la banda d'emissió.
3. Estimeu el valor del temps de vida mitjana de fluorescència de la riboflavina i la constant de velocitat fluorescent.

4. Qüestions

4.1. Qüestions prèvies

1. Indiqueu que es representa en els espectres d'absorció, fluorescència i excitació i si són d'absorció o emissió.
2. Què és el desplaçament de Stokes?
3. Enuncie la regla de Kasha. La complixen totes les molècules?
4. Abans de començar la pràctica, llija atentament l'article citat en la referència [8].
5. Deduïscu l'equació (4).
6. Estimeu un valor per a la constant de desactivació bimolecular, k_Q , suposant que la reacció (3) està controlada per difusió.

4.2. Qüestions post-laboratori

1. Com es pot distingir la senyal Rayleigh d'una senyal Raman?
2. Quins són els factors que influïxen en la intensitat d'una transició electrònica?
3. Explica el concepte del factor de Frank-Condon i com es manifesta en l'espectre de fluorescència d'una molècula.
4. Com varia la intensitat de fluorescència en els diferents colorants i a què es deu?
5. Per què els espectres de fluorescència són utilitzats per a caracteritzar els estats fonamentals dels diferents colorants, mentre que els espectres d'absorbància s'utilitzen per a caracteritzar els seus estats excitats? Relacione esta pregunta amb el desplaçament de Stokes.
6. Per què és més precís utilitzar l'àrea sota un espectre de fluorescència per a estimar el temps de vida mitjana de fluorescència del mononucleòtid de flavina? Relacione la seua resposta amb el moment dipolar de transició.

Material i aparells

Material per parella:

- 4 Matrassos aforats de 100 ml.
- 5 Vasos de precipitats de 50 ml.
- 4 Pipetes d'1 ml
- 1 Pipeta de 2 ml.
- 1 Pipeta graduada de 5 ml.
- 6 Matrassos aforats de 25 ml.

Material per taula:

- 1 Matràs aforat de 200 ml.
- 1 Matràs aforat de 500 ml.
- 2 Vasos de precipitats de 100 ml.

Aparells:

- Espectrofluorímetre.
- Espectrofotòmetre d'absorció.

Reactius:

- Colorants: Fluoresceïna, eritrosina B, eosina groguenca, fenolftaleïna.
- Riboflavina monofostat.
- KI.
- NaOH.

Referències

- [1] J. Bertrán i J. Núñez. *Química Física*. Ariel Ciència, 2004.
- [2] Ira N. Levine. *Físicoquímica*. Madrid: McGraw-Hill, 2004.
- [3] M. Díaz Peña i A. Roig. *Química Física*, volum 2. Alahambra Universidad, 1972.
- [4] A. Requena i J. Zúñiga. *Espectroscopia*. Pearson Educación, 2003.
- [5] N.J. Turro. *Modern Molecular Photochemistry*. Benjamin Cummings, 1978.
- [6] N.J. Turro. *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, 1991.
- [7] B. Valeur. *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH, 2001.
- [8] R. J. Clarke and A. Oprysa *Journal of Chemical Education* **2004**, 81, 705.