

PRACTICA 3: ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Objetivos. La práctica se divide en dos partes. En la primera, se registran los espectros de absorción, fluorescencia y excitación de un conjunto de colorantes orgánicos. La intensidad de la emisión fluorescente se correlacionará con la estructura molecular de los colorantes. En la segunda, se estudia el fenómeno de la desactivación bimolecular (*quenching*) de la emisión fluorescente del mononucleótido de flavina por los iones I⁻.

Conceptos relacionados:

Espectroscopia electrónica, estados excitados (singlete, triplete), procesos fotofísicos, cinética fotoquímica.

Revisión: 2023-2024

PARTE I.- Efecto de la Estructura Molecular en la Capacidad Fluorescente de los Colorantes

1. Introducción

El objetivo de esta parte de la práctica es obtener el espectro de fluorescencia de una serie de colorantes de la misma familia y relacionar la intensidad de fluorescencia con la estructura molecular.

La probabilidad (constante de velocidad) de los procesos de desactivación de estados electrónicos excitados viene controlada por una serie de aspectos relacionados con la estructura molecular. Así, la constante de velocidad fluorescente viene gobernada fundamentalmente por el momento dipolar de transición entre los estados S_0 y S_1 , y por tanto está relacionada directamente con la probabilidad de absorción. El cruce intersistema, que supone un cambio de multiplicidad, depende en gran medida de la interacción espín-órbita, la cual está favorecida por la presencia de átomos pesados. El proceso de conversión interna, transición no radiativa entre estados electrónicos de la misma multiplicidad, es inducido por los términos de acoplamiento electrónico despreciados en la aproximación de Born-Oppenheimer. Este proceso va seguido de la relajación vibracional hasta el nivel vibracional más bajo del estado electrónico.

En esta parte de la práctica se evalúa la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína y de una serie de sus derivados halogenados así como de la

fenolftaleína. En el laboratorio se registran los espectros de absorción, fluorescencia y excitación (en este orden) de todos ellos. Se analizarán las diferencias observadas entre los espectros de absorción y excitación, considerando factores instrumentales. Se discutirá la capacidad fluorescente de los colorantes en base a los procesos de conversión interna (rigidez / flexibilidad de las moléculas) y de cruce intersistema (átomos pesados).

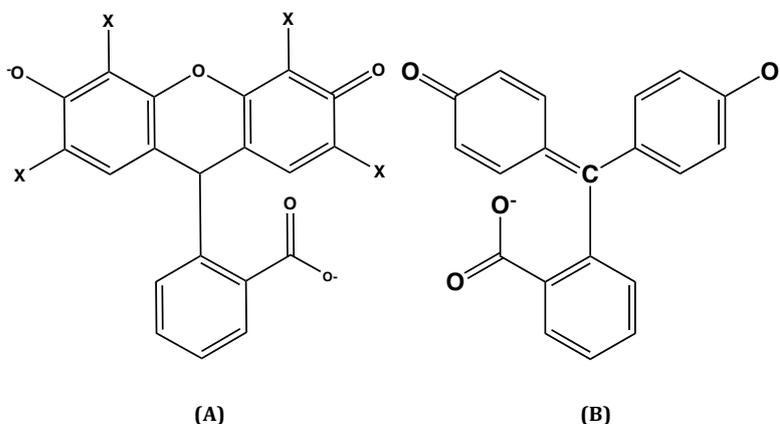


Figura 1: Estructuras moleculares de: (A) Fluoresceína (X=H), Eosina (X=Br) y Eritrosina (X=I). (B) Fenolftaleína.

2. Experimental

2.1 Disoluciones (comunes):

En caso de no estar preparadas las disoluciones de los colorantes, prepare 1L de una disolución $2 \times 10^{-5} \text{M}$ de los siguientes compuestos utilizando como disolvente NaOH 0.01M (pH = 12), disolución que hay que preparar:

- Fluoresceína (7 mg/L a pH=12) Mr = 332.32 $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$.
- Eosina amarillenta (14 mg/L a pH=12) Mr = 691.86 $\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$.
- Eritrosina B (18 mg/L a pH=12) Mr = 879.92 $\text{C}_{20}\text{H}_6\text{I}_4\text{Na}_2\text{O}_5$.
- Fenolftaleína (20 mg/L a pH=12) Mr = 318.33 (6×10^{-5}). Atención: Para realizar los espectros (absorción y emisión) de la fenolftaleína, introducir en la cubeta 2/3 de la disolución incolora (madre) y terminar de rellenar con el disolvente (NaOH 0.01 M) observando el intenso color violeta. Medir el espectro inmediatamente. (Recordar la práctica del Lab. Q-F-I: *Decoloración de la fenolftaleína*).

Disolución para diluir los colorantes:

- 500mL disolución de NaOH 0.01 M

NOTA: Es necesario diluir en un factor 1/100 estas disoluciones para registrar los espectros de emisión. Para ello pipetee 1 mL de cada disolución y añórelo a 100 mL en un matraz utilizando la disolución de NaOH 0.01 M como disolvente. Los espectros de absorción se registran a partir de las disoluciones madre (sin diluir).

2.2 Procedimiento Experimental

1. Registre los espectros de absorción de todas las moléculas entre 250 y 700 nm utilizando las disoluciones madre correspondientes.
2. Registre los espectros de fluorescencia hasta 700 nm utilizando como longitud de onda de excitación un valor entre 10 y 15 nm menor que la del máximo de absorción más desplazado hacia el rojo obtenido en el apartado anterior utilizando las disoluciones diluidas correspondientes.
3. Registre el espectro de excitación entre 250 y 700 nm utilizando como longitud de onda de emisión aquella del máximo de fluorescencia obtenida en el apartado anterior utilizando las disoluciones diluidas correspondientes.
4. Superponga los espectros de excitación y fluorescencia para cada sustancia. Superponga los espectros de fluorescencia para las tres primeras sustancias.
5. Repita el espectro de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de un máximo de menor longitud de onda que el utilizado en el apartado (2) para validar el cumplimiento de la regla de *Kasha*.

NOTA: En sistemas cuya emisión sea muy pequeña o incluso nula, la fluorescencia de la muestra puede estar afectada por la fluorescencia de posibles impurezas (provenientes de la muestra, del disolvente, y/o de una muestra anterior). También es posible que aparezca señal Raman del disolvente; recuerde que la posición de una señal Raman depende de la longitud de onda de excitación.

3. Resultados

3.1 Espectros de absorción

Prepare una tabla con los parámetros de los espectros de absorción de los colorantes indicando para cada uno: picos, longitud de onda máxima de absorción, absorbancia y descripción de la excitación que representan. Ordene los picos por energías ($S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$, ...). Compare los distintos colorantes.

3.2 Espectros de fluorescencia

Prepare una tabla con los parámetros de los espectros de fluorescencia de los colorantes indicando: picos, longitud de onda de excitación, longitud de onda máxima de fluorescencia, intensidad fluorescente y descripción -indicando si son señales de fluorescencia o señales Raman. Compare y analice los espectros de los distintos colorantes. ¿Cómo se puede distinguir una emisión fluorescente de una señal Raman?

3.3 Regla de Kasha

Explique si se cumple o no la regla de Kasha en los colorantes estudiados.

3.4 Espectros de excitación

1. Prepare una tabla con los parámetros de los espectros de excitación de los colorantes indicando: picos, longitud de onda de emisión, longitud de onda máxima de excitación e intensidad.
2. Compare los espectros de excitación y de absorción de los diferentes colorantes (forma y posición de los máximos, especialmente).
3. Identifique las transiciones electrónicas que se observan en los espectros de excitación y de absorción de los diferentes colorantes.

3.5 Capacidad fluorescente y estructura molecular de los colorantes

1. Comente por qué la banda de fluorescencia está situada a mayores longitudes de onda que la banda de absorción. ¿Ocurre igual en cualquier sistema?
2. Correlacione la capacidad fluorescente de los colorantes con su estructura molecular y discuta las diferencias.

3.6 Desplazamiento Stokes

Mida el desplazamiento Stokes, en cm^{-1} , entre las señales de absorción y fluorescencia.

PARTE II. Transferencia de Energía de Moléculas Excitadas de Riboflavina. Ecuación de Stern-Volmer

Objetivo

Este experimento trata de demostrar la transferencia de energía de una molécula excitada coloreada (riboflavina) a otra no excitada y no coloreada (KI).

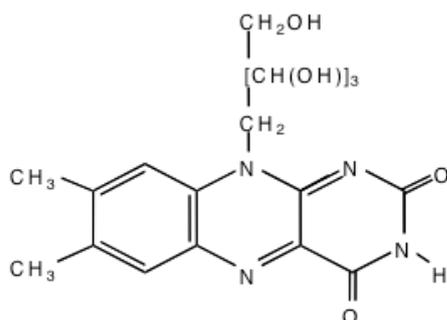
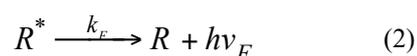


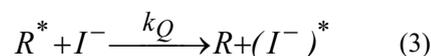
Figura 2: Molécula de mononucleótido de flavina

1. Introducción y Fundamentos Teóricos

Cuando el mononucleótido de flavina, que representamos por R , absorbe un fotón y se convierte en una molécula excitada, R^* , reacción (1), un camino favorable para la vuelta al estado fundamental es la emisión de un fotón o fluorescencia, reacción (2).



En presencia del ion I^- , el mononucleótido de flavina puede volver al estado fundamental por transferencia de energía al I^- , reacción (3), no emitiendo un fotón.



En una disolución con riboflavina y I^- la intensidad de fluorescencia, que representamos por I_F , puede considerarse de esta manera: Si la molécula de riboflavina excitada no choca con los iones I^- , la mayoría de las moléculas emiten un fotón. Si colisionan con algún I^- , se desactivarán por emisión no fotónica. La competencia entre estos dos procesos, fluorescencia y desactivación bimolecular (“*quenching*”), será dependiente de:

1. Del tiempo de vida media del estado excitado (τ). A mayor duración de la molécula de riboflavina en el estado excitado más se favorecerá la reacción (3) antes que la (2).

- Del número de colisiones efectuadas. Ello vendrá relacionado con las concentraciones de riboflavina y Γ^- .
- De la eficacia (k_Q) de Γ^- como amortiguador. (No todas las colisiones son efectivas dando transferencia de energía).

La relación entre la fluorescencia no amortiguada (I_F^0) y la fluorescencia amortiguada (I_F) está relacionada con estas variables mediante la ecuación de Stern-Volmer, ecuación (4),

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

donde $[Q]$ es la concentración de desactivador, en este caso el anión Γ^- .

2. Procedimiento Experimental

1. Prepare las siguientes disoluciones (compartidas):

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

2. Prepare a continuación cada una de las disoluciones indicadas en la tabla en matraces aforados de 25 mL. Cada disolución tendrá la misma concentración de riboflavina en presencia de concentraciones variables de KI.

3. Mida la fluorescencia de cada una de las disoluciones utilizando la longitud de onda del máximo de absorción -15 nm (450 nm) como longitud de onda de excitación, así como el área de la banda de emisión.

Tabla 1. Intensidad máxima y área de la banda de emisión de disoluciones de riboflavina y Γ^- .

Disolución	v/mL (R)	v/mL (KI)	$I_{max,F}$	Área 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. Resultados

3.1 Desactivación bimolecular (*quenching*) de riboflavina excitada a yoduro no excitado.

1. Represente el cociente $\frac{I_F^0}{I_F}$, teniendo en cuenta la lectura de fluorescencia para cada disolución, frente a la concentración de KI.
2. Realice la misma representación pero con la relación de áreas de la banda de emisión.
3. Estime el tiempo de vida medio de fluorescencia del mononucleótido de flavina y la constante de velocidad fluorescente.

4. Cuestiones

4.1 Cuestiones previas

1. Indique que se representa en los espectros de absorción, fluorescencia y excitación y si son de absorción o emisión.
2. ¿Qué es el desplazamiento Stokes?
3. Enuncie la regla de de Kasha. ¿La cumplen todas las moléculas?
4. Antes de comenzar la práctica, lea atentamente el artículo citado en la referencia [8].
5. Deduzca la ecuación (4).
6. Estime un valor para la constante de desactivación bimolecular, k_Q , suponiendo que la reacción (3) está controlada por difusión.

4.2 Cuestiones post-laboratorio

1. ¿Cómo se puede distinguir la señal Rayleigh de una señal Raman?
2. ¿Cuáles son los factores que influyen en la intensidad de una transición electrónica?
3. Explica el concepto del factor de Frank-Condon y cómo se manifiesta en el espectro de fluorescencia de una molécula.
4. ¿Cómo varía la intensidad de fluorescencia en los distintos colorantes y a qué se debe?
5. ¿Por qué los espectros de fluorescencia son utilizados para caracterizar los estados fundamentales de los diferentes colorantes, mientras que los espectros de absorbancia se utilizan para caracterizar sus estados excitados? Relacione esta pregunta con el desplazamiento de Stokes.
6. ¿Por qué es más preciso utilizar el área bajo un espectro de fluorescencia para estimar el tiempo de vida medio de fluorescencia del mononucleótido de flavina? Relacione su respuesta con el momento dipolar de transición.

Material y aparatos

Material por pareja:

- 4 matraces aforados de 100 mL.
- 5 vasos de precipitados de 50 mL.
- 4 pipetas de 1 mL
- 1 Pipeta graduada de 2 mL.
- 1 Pipeta graduada de 5 mL.
- 6 Matraces aforados de 25 mL.

Material por mesa:

- 1 Matraz aforado de 200 mL.
- 1 Matraz aforado de 500 mL.
- 2 Vasos de precipitados de 100 mL.

Aparatos:

- Espectrofluorímetro.
- Espectrofotómetro de absorción.

Reactivos:

- Colorantes: Fluoresceína, eritrosina B, eosina amarillenta, fenolftaleína.
- Riboflavina monofostato.
- KI.
- NaOH.

Referencias

- [1] J. Bertrán y J. Núñez. *Química Física*. Ariel Ciencia, 2004.
- [2] Ira N. Levine. *Fisicoquímica*. McGraw-Hill, Madrid, 2004.
- [3] M. Díaz Peña and A. Roig. *Química Física*, volumen 2. Alhambra Universidad, 1972.
- [4] A. Requena and J. Zúñiga. *Espectroscopía*. 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.