

# **FLUOROMETRIA Y FOSFORIMETRIA**

- Fernando de J. Amézquita L.
- Diana Mendoza O.



Universidad de Guanajuato

# Luminiscencia

La mayoría de las sustancias que absorben luz ultravioleta o visible disipan el exceso de energía como calor, por medio de colisiones con los átomos o moléculas vecinas. Sin embargo, un número importante de sustancias pierde únicamente parte de este exceso de energía como calor y emite la energía remanente como radiación electromagnética de una longitud de onda mayor que la absorbida. Este proceso de emitir la radiación es llamado luminiscencia, clasificado como fluorescencia y fosforescencia.

Cuando una molécula tiene un estado electrónico excitado que es más estable que el usual, el exceso de energía vibracional será disipado por colisiones, mientras que la molécula permanece en el estado electrónico excitado; más tarde la molécula sigue cualquiera de los dos caminos siguientes; **uno**, regresa directamente al estado electrónico basal con la emisión de radiación (fluorescencia) o, menos comúnmente **dos**, puede desplazarse a un nivel triplete metaestable antes de emitir radiación (fosforescencia). El tiempo de vida típico para un estado electrónico excitado es de cerca de  $10^{-8}$  s, y los materiales que presentan fluorescencia, generalmente emiten el exceso de la radiación dentro de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  s, después de la absorción. El tiempo de vida de la fosforescencia es mucho más largo que la fluorescencia, generalmente se encuentra en un rango de  $10^{-4}$  a 20 s o más.

Aunque comparativamente pocas sustancias presentan fluorescencia o fosforescencia, un número de compuestos muy importante, de interés biológico farmacológico y orgánico lo presentan y siendo aplicable en ellas, la fluorometría y fosforimetría ofrecen ventajas analíticas únicas de alta sensibilidad y selectividad. La mayoría de sustancias que presentan fluorescencia o fosforescencia ofrecen ventajas analíticas únicas de alta sensibilidad y selectividad. La mayoría de sustancias que presentan florescencia o fosforescencia son moléculas orgánicas grandes, rígidas o multicíclicas. La rigidez es algunas veces el resultado de la formación de complejos con un ion metálico, y en tales casos la luminiscencia puede ser usada como un medio de análisis del metal.

# Teoría

Antes de que pueda ocurrir la luminiscencia, una sustancia debe absorber radiación de longitud de onda apropiada. Cuando un cuanto de luz de la longitud de onda apropiada choca sobre la molécula, será absorbido en un tiempo cercano a  $10^{-15}$  s, (el tiempo necesario para que una molécula vaya de un estado electrónico a otro). Una molécula excitada puede existir como tal durante  $10^{-7}$  ó  $10^{-8}$  s antes que elimine algo o todo el exceso de energía. Una de las tres cosas que a continuación se describe, le sucederá a la molécula excitada.

- Emitirá un fotón de la misma frecuencia que la absorbida (emisión resonante).
- Emitirá un fotón infrarrojo, perdiendo energía vibracional y cayendo a un nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado, o
- Sufrirá una pérdida en la disminución, de radiación, de energía vibracional por medio de colisiones, finalizando en el nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado.

Las primeras dos alternativas son extremadamente raras y en la práctica ocurre únicamente con gases a presiones muy bajas. Con sistemas típicos, por ejemplo gases a presión ordinaria, soluciones o sólidos; la relajación térmica de una molécula excitada vibracionalmente es más probable que ocurra antes de que la molécula tenga tiempo para emitir un fotón. Una vez que una molécula llega al nivel vibracional más bajo de un estado excitado tiene de nuevo tres formas posibles por medio de las cuales puede perder el exceso de energía remanente:

- Puede sufrir una pérdida en la disminución, de radiación, de energía electrónica por medio de colisiones u otras interacciones.
- Puede emitir un fotón de luz ultravioleta o visible (fluorescente); o
- Puede sufrir una transición a un estado triplete metaestable y algún tiempo después de esto regresar al estado basal, generalmente con emisión de un fotón de luz ultravioleta o visible (fosforescente ).

# Estados singulete y triplete para un enlace $\pi$

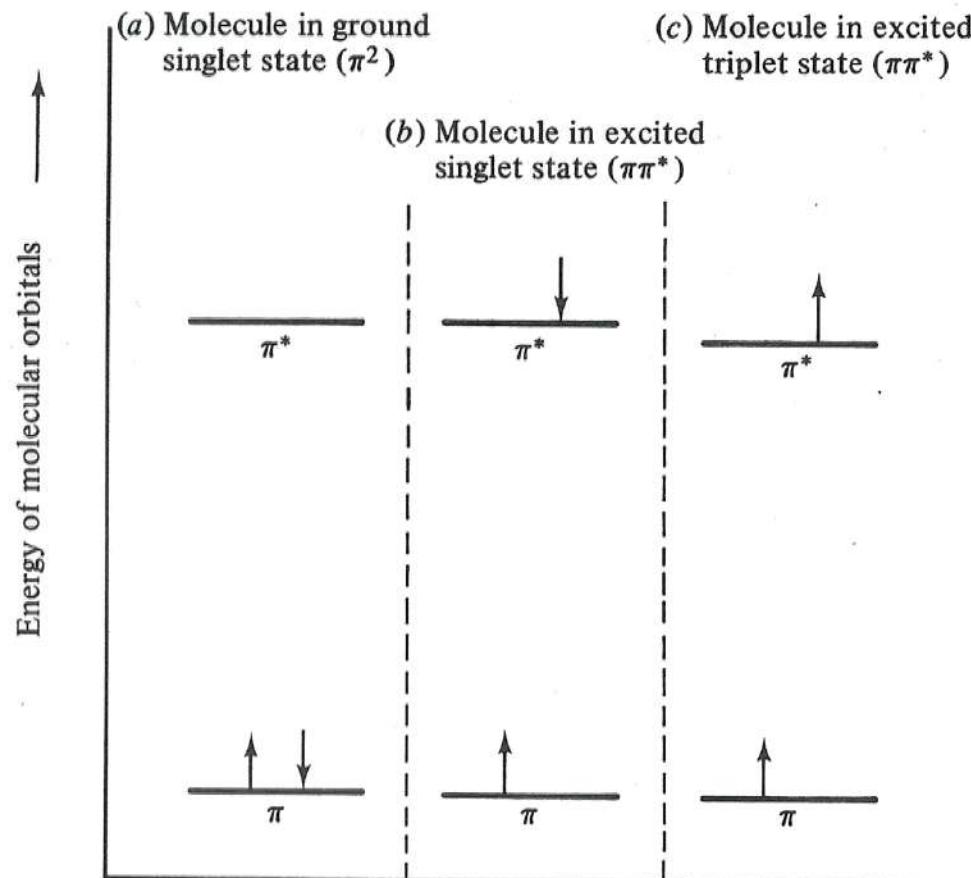


FIGURE 8-1 Examples of molecules with  $\pi$  electrons in various spin configurations.

# Resumen del proceso de luminiscencia

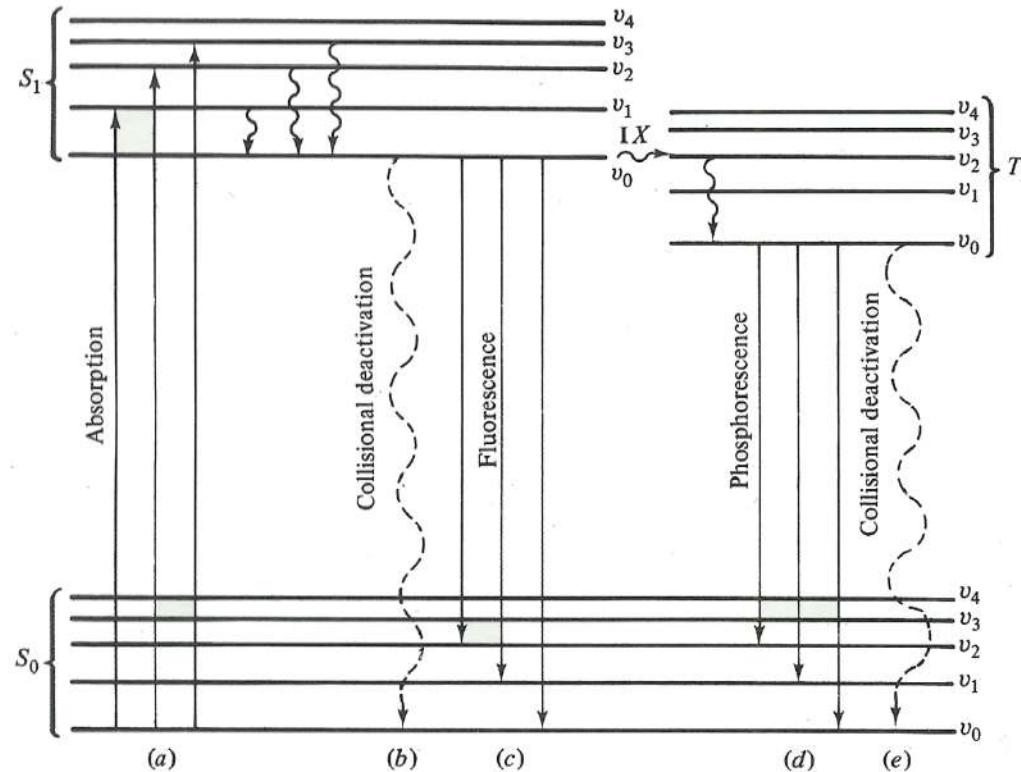


FIGURE 8-2 Schematic energy-level diagram illustrating the energy changes involved in absorption, fluorescence, and phosphorescence. (Straight arrows represent radiation photons; wavy arrows represent radiationless collisional deactivate;  $v$  = vibrational levels,  $S_0$  = singlet ground state,  $S_1$  = singlet first excited state,  $T_1$  = triplet first excited state.)

- Para la mayoría de las moléculas, los espacios de energía vibracional son similares en los estados basal y electrónico excitados, de tal manera que el espectro de emisión fluorescente es generalmente la imagen especular aproximada del espectro de absorción, con el espectro fluorescente desplazado a longitud de onda más larga.

# Espectros de absorción y fluorescencia del antraceno

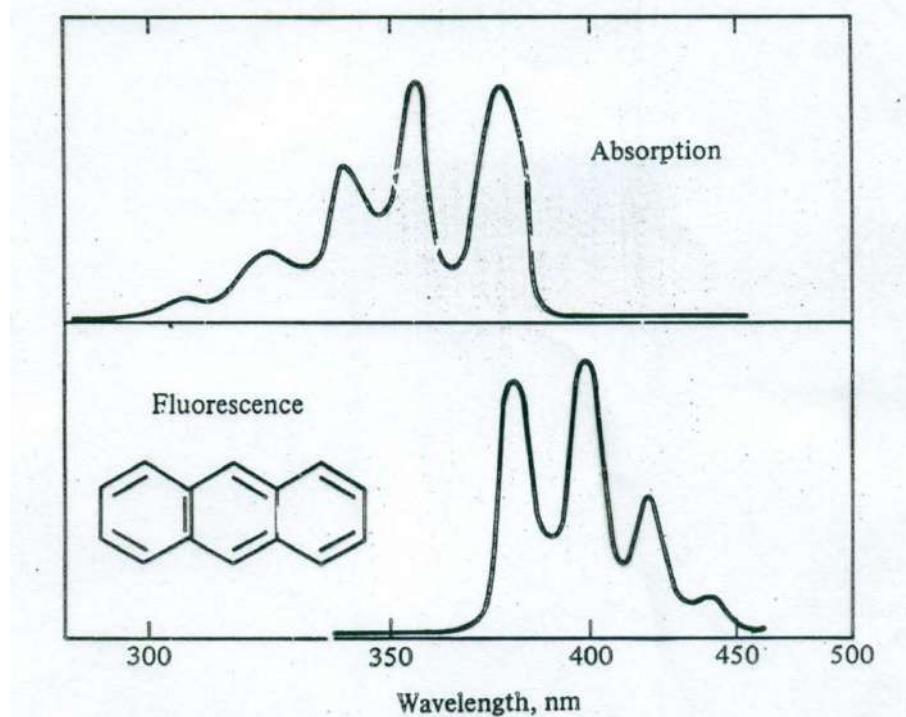


FIGURE 8-3 Absorption and fluorescence spectra of anthracene, showing approximate mirror symmetry. (From D. H. Whiffen, "Spectroscopy," p. 164, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1966, by permission.)

# Comparación de los espectros absorción y fluorescencia de antraceno y quinina.

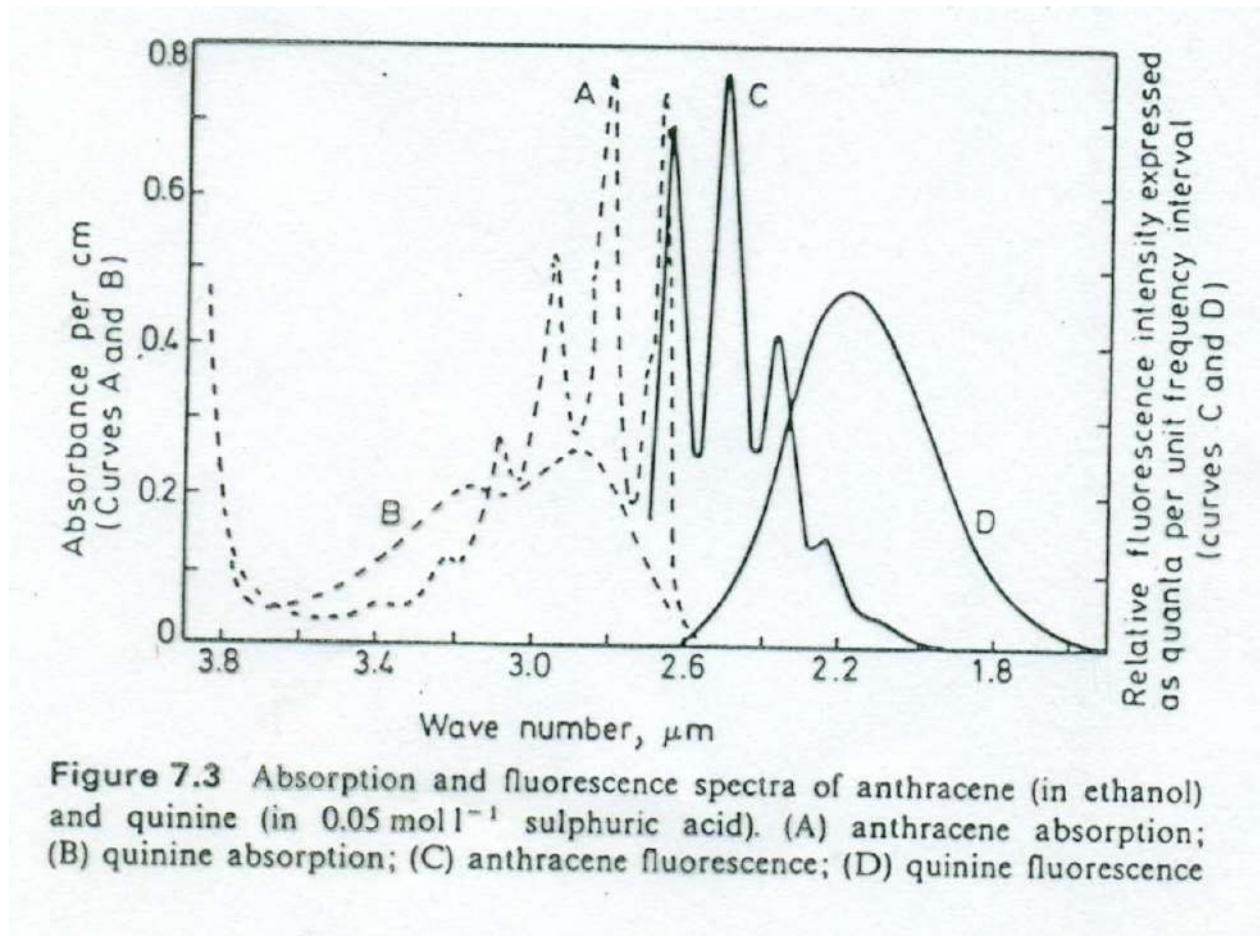


Figure 7.3 Absorption and fluorescence spectra of anthracene (in ethanol) and quinine (in  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  sulphuric acid). (A) anthracene absorption; (B) quinine absorption; (C) anthracene fluorescence; (D) quinine fluorescence

- Es importante seleccionar las condiciones ambientales adecuadas para observar o acentuar la fosforescencia, que casi nunca es observada a temperatura ambiente (siendo el biacetilo una excepción), ya que el tiempo de vida muy largo del estado triplete favorece generalmente la pérdida de energía colisional. Por otra parte, si la molécula es colocada en un medio rígido, de tal manera que el proceso colisional se minimice, se observará la emisión fosforescente, la técnica más común de inmovilizar el sistema es congelar las moléculas fosforescentes en cristales especiales, uno de los más populares es el EPA, una mezcla de éter etílico, isopentano y alcohol etílico en una razón de 5:5:2 la cual es enfriada a temperatura de nitrógeno líquido (+77 K)

# Eficiencia Cuántica

$$\Phi = \frac{\text{number of quanta emitted}}{\text{number of quanta absorbed}} = \text{quantum yield}$$

The higher the value of  $\Phi$ , the greater the fluorescence of a compound. A non-fluorescent molecule is one whose quantum efficiency is zero or so close to zero that the fluorescence is not measurable. All energy absorbed by such a molecule is rapidly lost by collisional deactivation. Some typical quantum yields of various substances are given in Table 7.1.

Table 7.1 Quantum yields of various substances

Compound	Solvent	$\Phi$
Fluorescein	Water, pH 7	0.65
	0.1 M NaOH	0.92
Rhodamine B	Ethanol	0.97
	Water, ;pH 7	0.26
Riboflavin	Ethanol	0.30
	Alcohol	0.12
Anthracene	Ethanol	0.22
	Water	0.23
Naphthalene	Ethanol	0.10
	Ethanol	
Phenol		
Chlorophyll a		
Chlorophyll b		

# Cálculo de la eficiencia cuántica

The value of  $\Phi$  can be determined by measuring the fluorescence of a dilute solution ( $F_2$ ) of a substance whose quantum efficiency is known,  $\Phi_1$ , such as quinine sulphate. The fluorescence and absorbance of a solution of the substance whose  $\Phi$  is to be determined is then measured and the quantum efficiency is calculated as follows:

$$\frac{F_2}{F_1} = \frac{\Phi_2}{\Phi_1} \cdot \frac{\text{absorbance of 2}}{\text{absorbance of 1}}$$

Use  $\Phi_1 = 0.55$  for quinine in  $0.05 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ .

The fluorescence lifetime of most organic molecules is in the nanosecond region. The fluorescence lifetime,  $\tau$ , refers to the mean lifetime of the excited state; the probability of finding a given molecule that has been excited still in the excited state after time  $t$  is  $e^{-t/\tau}$ . The general equation relating the fluorescence intensity,  $I$ , and the lifetime,  $\tau$ , is,

$$I = I_0 e^{-t/\tau}$$

where  $I$  = fluorescence intensity at time  $t$ ,  $I_0$  = maximum fluorescence

# Periodo de vida del estado excitado

Table 7.2 Average lifetime of the excited state ( $\tau$ ) of some compounds

Compound	$\tau$ /s
DPNH	$5 \times 10^{-10}$
Fluorescein anion	$5.1 \times 10^{-9}$
Quinine	$4 \times 10^{-8}$
Chlorophyll	$3 \times 10^{-8}$
Anthracene	$2.5 \times 10^{-7}$
Naphthalene	$3.3 \times 10^{-5}$

Relation between fluorescence intensity and concentration

# Factores de estructura molecular en luminiscencia

El primer requerimiento para fluorescencia o fosforescencia es una estructura molecular que absorba radiación ultravioleta o visible. En general, entre más grande sea la absorbencia de una molécula más intensa es su luminiscencia. Estos requerimientos eliminan virtualmente los compuestos alifáticos y cíclicos saturados. Las moléculas que contienen dobles enlaces conjugados, especialmente aquellas con un alto grado de estabilidad de resonancia, son particularmente útiles para estudio. Los hidrocarburos aromáticos, particularmente rígidos, planos, con estructuras multicíclicas son ideales. Los anillos aromáticos que contienen heteroátomos generalmente presentan mejor fosforescencia que fluorescencia.

- Los sustituyentes generalmente tienen un efecto marcado sobre la luminiscencia de las moléculas. Estos efectos están correlacionados generalmente con sus efectos sobre el espectro de absorción. Aunque no se pueden dar reglas rígidas, pueden utilizarse algunas generalidades:
- 1. Los grupos donadores de electrones generalmente mejoran la fluorescencia debido a que tienden a incrementar la probabilidad de la transición, entre el estado singulete excitado más bajo y el estado basal. Son especialmente útiles los grupos  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{OH}$ .
- 2. Grupos sustituyentes que tienen únicamente una pequeña interacción con sistemas de electrones  $\pi$ , tales como  $-\text{SO}_3\text{H}$ , - y los grupos alquilo tienden a tener un efecto pequeño sobre la luminiscencia.
- 3. La introducción de un átomo de número atómico grande en un sistema electrónico  $\pi$  generalmente mejora la fosforescencia y disminuye la fluorescencia.
- 4. Los grupos desactivadores del núcleo, tales como un grupo  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{N}=\text{N}-$  y halogenuros, disminuye o incluso destruye la fluorescencia.

# Fluorescencia de derivados monosustituidos del benceno

Table 7.9 Fluorescence of monosubstituted benzenes

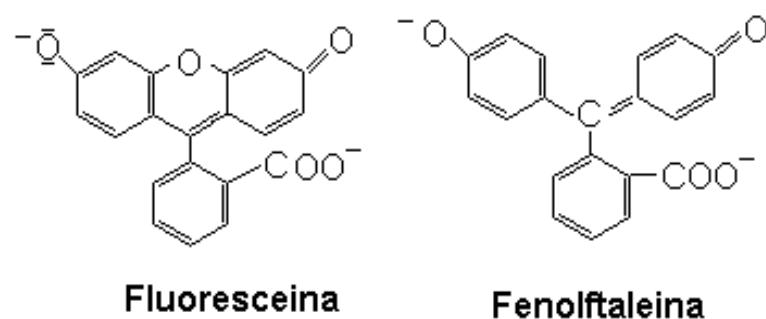
Compound	Substituent	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Relative intensity
<i>Ortho-para directing</i>				
Benzene	H	269	291	1
Aniline	NH <sub>2</sub>	290	345	46
Dimethylaniline	NMe <sub>2</sub>	297	363	114
Fluorobenzene	F	269	285	13
Chlorobenzene	Cl	281	294	0.02
Bromobenzene	Br	—	None	0
Iodobenzene	F	—	None	0
Phenol	OH	279	302	112
<i>Meta-directing</i>				
Benzoic acid	CO <sub>2</sub> H	—	—	0
Nitrobenzene	NO <sub>2</sub>	—	—	0
Benzaldehyde	CHO	—	—	0
Benzonitrile	CN	287	294	45

# Efectos de la conjugación en la longitud de onda

Table 7.8 Effect of conjugation on fluorescence

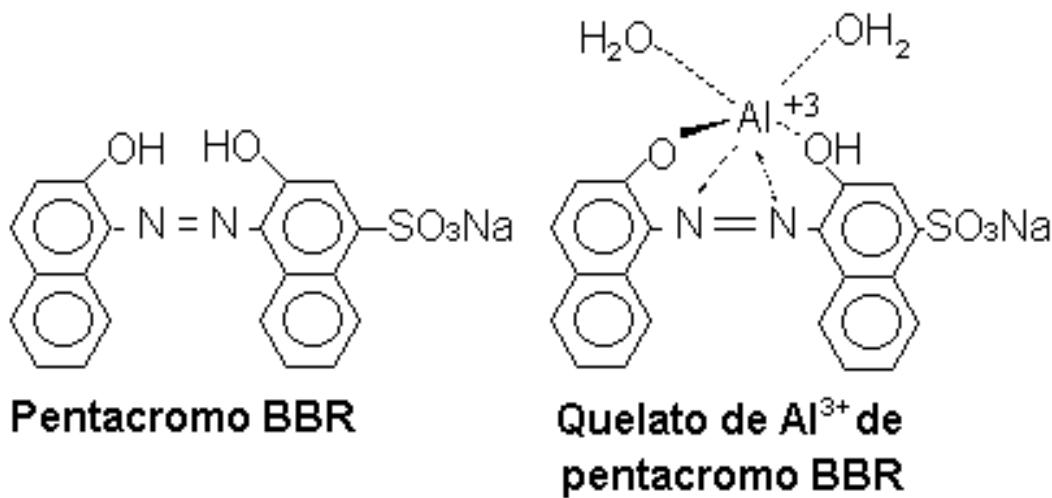
<i>Compound</i>	<i>Excitation maximum/nm</i>	<i>Fluorescence maximum/nm</i>
Benzene	204	278
Naphthalene	286	321
Anthracene	375	400
Naphthacene	390	480
Pentacene	580	640

El hecho de que las estructuras planas rígidas promuevan la fluorescencia puede ser ilustrado por la comparación de la estructura de la fluoresceína y con la fenolftaleína.



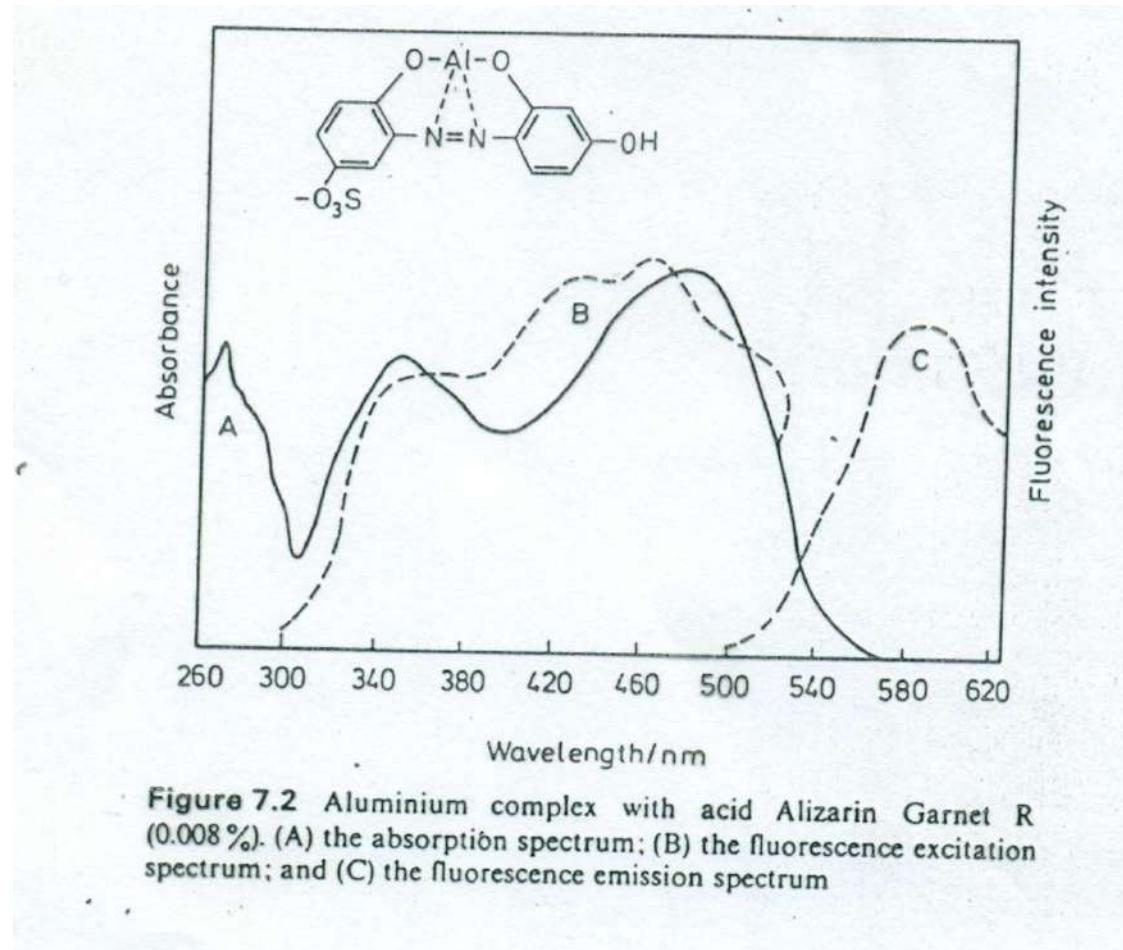
La fluoresceína presenta fluorescencia muy intensa en solución, pero la fenolftaleína no, a pesar de la similitud estructural. El efecto principal de aumentar la rigidez molecular es para disminuir las vibraciones, esto minimiza el cruce de intersistema a un estado triplete y la degradación colisional por calor.

En general, la formación de quelatos con iones metálicos también promueve la fluorescencia por la promoción de la rigidez y minimiza las vibraciones internas. Esto puede ser ilustrado comparando la estructura del pentacromo azul negro R (la sal de sodio del ácido 3sulfónico 2,2 dihidroxi-I, I-azonaftaleno, designado pentacromo BBR) con su aluminio-quelato.



El pentacromo BBR es un tinte que no fluoresce en la ausencia de aluminio, pero en la presencia de aluminio a pH 5 muestra fluorescencia roja. En ausencia de aluminio los grupos naftaleno del pentacromo BBR son libres para rotar alrededor del grupo azo, mientras que cuando el aluminio está quelatado la molécula se mantiene en una posición plana rígida. En una forma similar, un buen número de sustancias pueden ser usadas como indicadores fluorescentes en titulaciones quelométricas.

# Espectros de absorción y fluorescencia del complejo de aluminio con alizarina



**Figure 7.2** Aluminium complex with acid Alizarin Garnet R (0.008%). (A) the absorption spectrum; (B) the fluorescence excitation spectrum; and (C) the fluorescence emission spectrum

# Factores que afectan la luminiscencia

- El pH de la solución generalmente tiene un efecto marcado sobre la fluorescencia de los compuestos principalmente por alterar la carga y formas de resonancia del cromóforo. Por ejemplo en solución neutra o alcalina la anilina presenta una fluorescencia en la región visible, pero la fluorescencia visible desaparece si la anilina es acidificada. (La anilina muestra fluorescencia en la región ultravioleta sin importar el pH). En forma similar algunas sustancias son tan sensibles al pH que pueden ser utilizadas como indicadores en titulaciones ácido-base. La fluoresceína, que muestra un rango de transición desde pH 4 a 6, es uno de dichos ejemplos.
-

Finalmente, dos procesos, reacción química y extinción (*quenching*) de oxígeno pueden competir con la luminiscencia. La extinción de oxígeno es uno de tantos aspectos problemáticos de la fluorometría y fosforimetría y requiere que todas las soluciones sean deaireadas antes del análisis. En algunos casos, el oxígeno disminuye la intensidad de la fluorescencia de un compuesto orgánico por oxidación; generalmente, sin embargo, el oxígeno extingue los estados singuletes y tripletes excitados por la promoción del cruce de intersistema a través de colisiones con las especies excitadas y forma un complejo de transferencia de carga transitoria. El estado basal de una molécula de oxígeno es un estado triplete y su naturaleza paramagnética del aparentemente aumenta el acoplamiento spín-órbita con moléculas electrónicamente excitadas electronegativamente. Otros gases paramagnéticos, por ejemplo, el óxido nítrico, NO, se comporta igual pero el oxígeno es más común.

Un segundo proceso que algunas veces influye en la luminiscencia es una reacción química por una molécula en el estado excitado. Puesto que puede tener una distribución electrónica diferente del estado basal y puede por tanto reaccionar diferentemente.

# Relación entre Luminiscencia y concentración

Recordemos la ley de Beer:

$$I_t = I_0 e^{-abc}$$

$$T = \frac{I_t}{I_0} = e^{-abc}$$

Fracción de luz absorbida:

$$1 - (I_t/I_0) = 1 - e^{-abc}$$
$$I_0 - I_t = I_0 (1 - e^{-abc})$$

La intensidad de radiación fluorescente medida es  $I_f$ . está relacionada a la cantidad de luz absorbida.

$$I_f = K \phi_f (I_0 - I_t)$$

$K$  = depende del instrumento,  $\phi_f$  = eficiencia cuántica de la fluorescencia; y finalmente:

$$I_f = K \phi_f (I_0) (2.3 abc)$$

$$I_p = K \phi_p I_0 (2.3 abc)$$

# Otra forma de obtener la relación

$I_f$  es proporcional a la radiación que fué absorbida por las especies

$$I_f \propto (I_0 - I_t)$$

$$I_f = k (I_0 - I_t) \quad (1)$$

$I_f$  = intensidad de haz fluorescente,  $I_0$  = intensidad incidente,  $I_t$  = intensidad transmitida,  $K$  constante que es función de la eficiencia cuántica del proceso fluorescente y depende del instrumento.

Según Beer  $I_t = I_0 10^{-abc}$  (2)

Sustituyendo en (1)

$$I_f = K I_0 (1 - 10^{-abc}) \quad (3)$$

El término exponencial puede extenderse como una serie de Taylor dando:

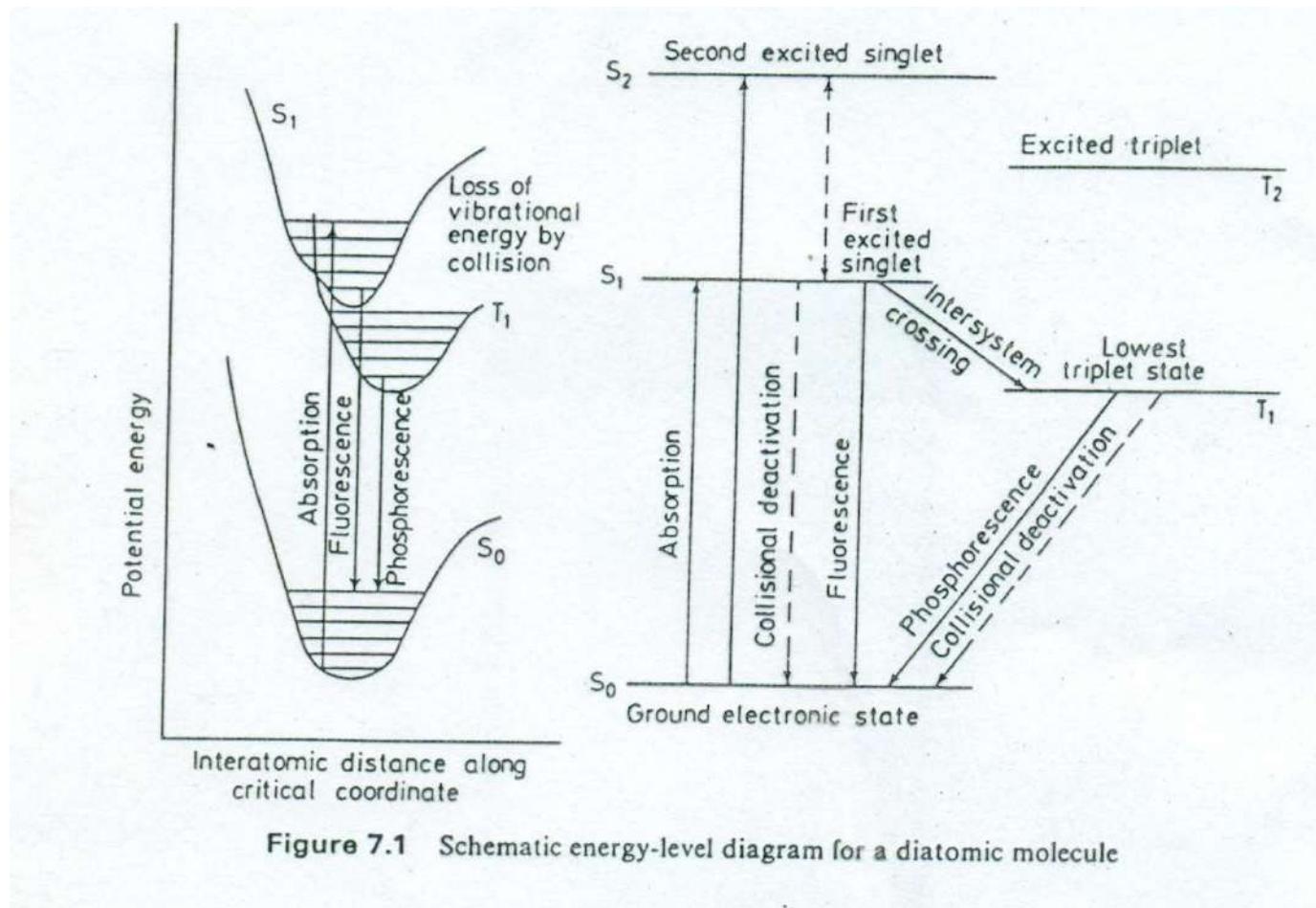
$$I_f = K I_0 \left[ 2.3abc - \frac{(2.3abc)^2}{2!} + \frac{(2.3abc)^3}{3!} + \dots \right]$$

Si  $abc < 0.05$  todos los términos son despreciables menos el primero, y la expresión queda:

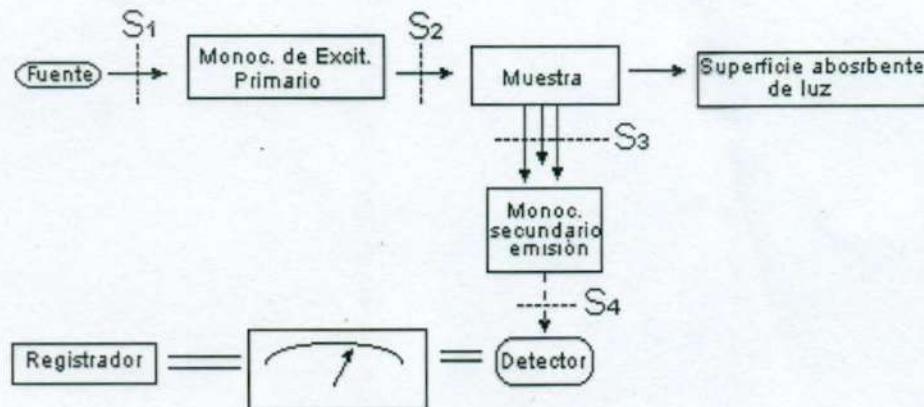
$$I_f = K' I_0 abc \quad (4)$$

Para que esto ocurra la concentración de las especies debe estar dada de tal manera que:  
 $abc < 0.05$  o preferiblemente  $< 0.01$ , en donde  $K' = 2.3K$

# Diagrama esquemático de los niveles de energía para una molécula diatómica

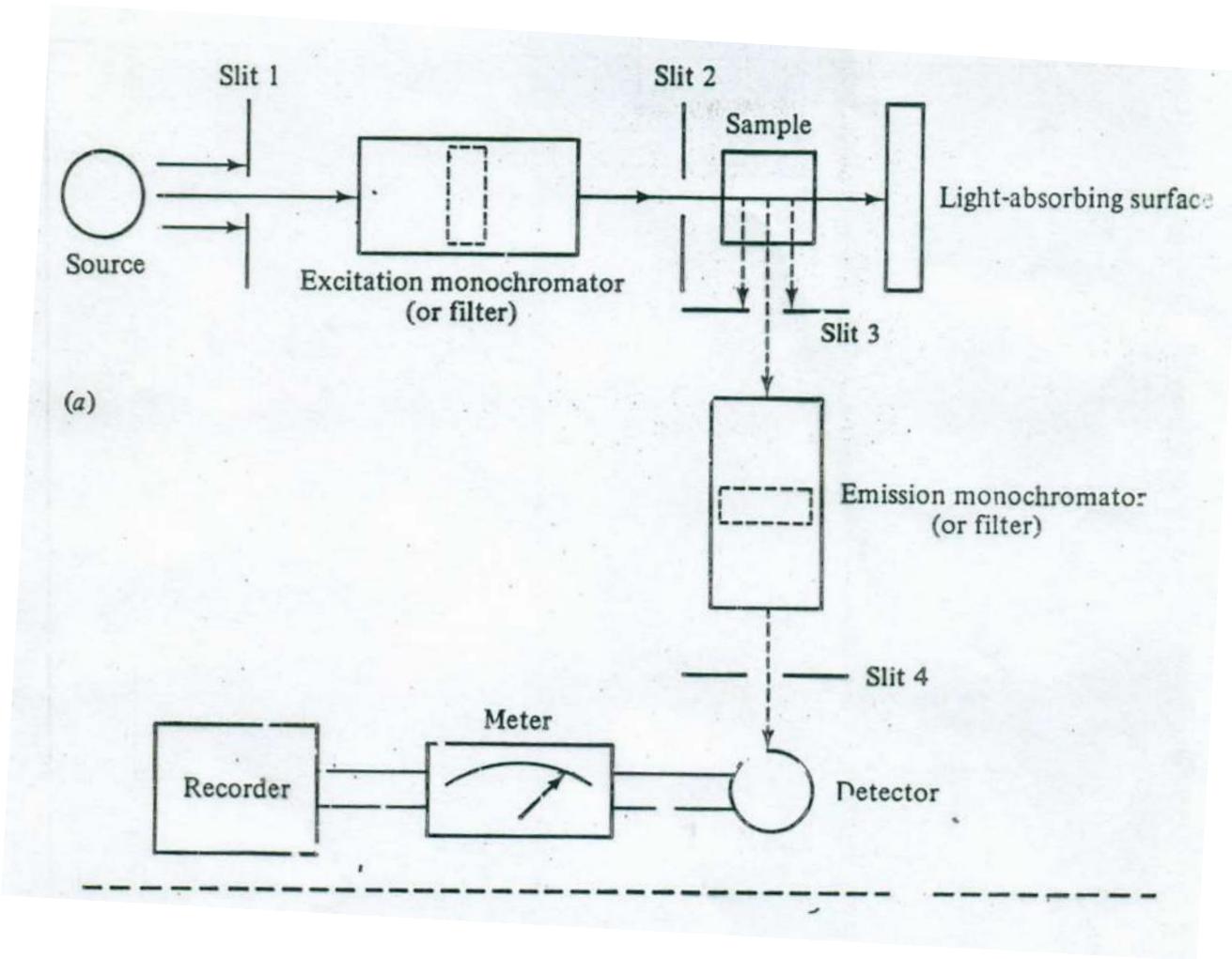


## DIAGRAMA DE BLOQUES DE UN FLUOROMETRO

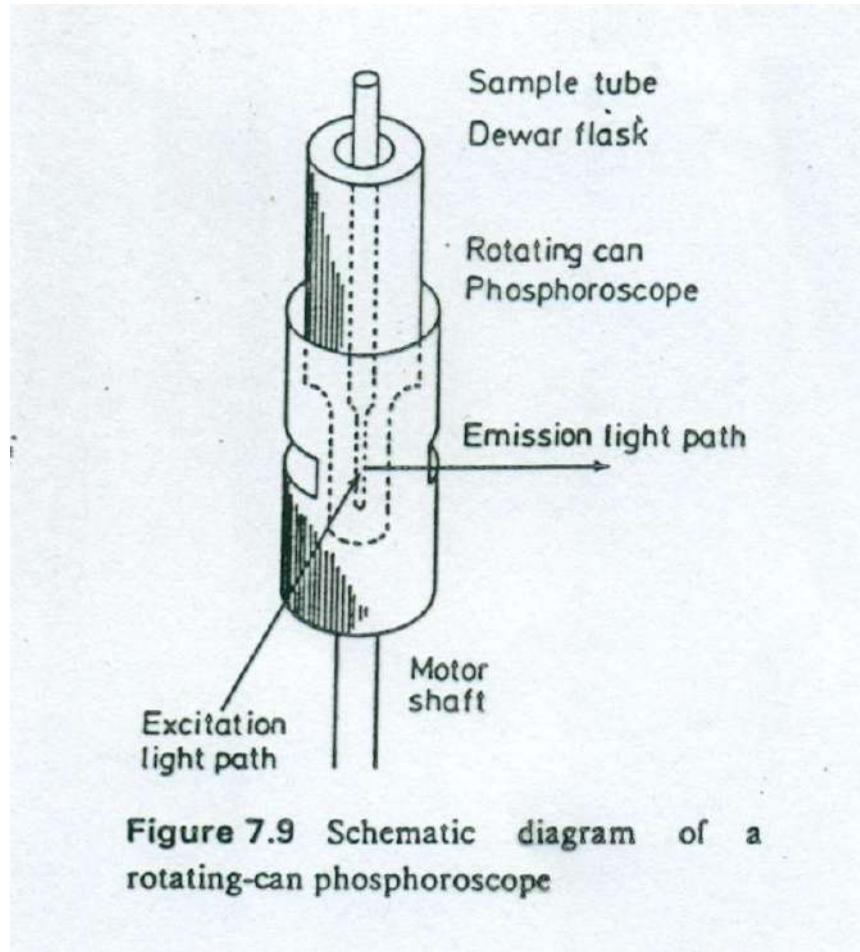


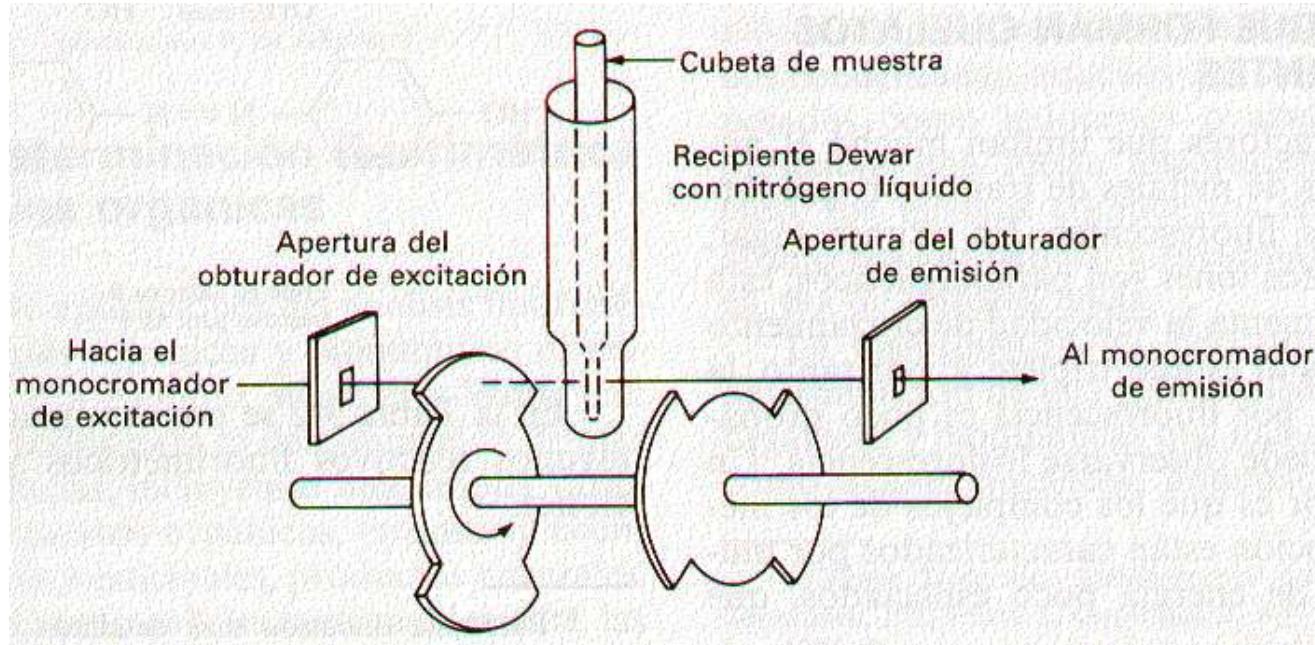
En la FIG 3, se muestra el diagrama de bloques de los componentes esenciales de un fluorómetro o espectrofluorómetro. En un fluorómetro se usan filtros (al filtro de excitación se lo llama filtro primario, y al filtro de emisión se lo llama filtro secundario); en un espectrofluorómetro se usan monocromadores ya sea prismas o redes de dispersión.

Puesto que la radiación fluorescente es emitida en todas direcciones por la muestra, es posible hacer algunas variaciones en el ángulo de detección con respecto al haz de excitación. Sin embargo, el arreglo en recto que se muestra en la FIG.3 es el que minimiza la detección del haz de



# Diagrama de un obturador rotatorio





# Diagrama a bloques de un fluorómetro

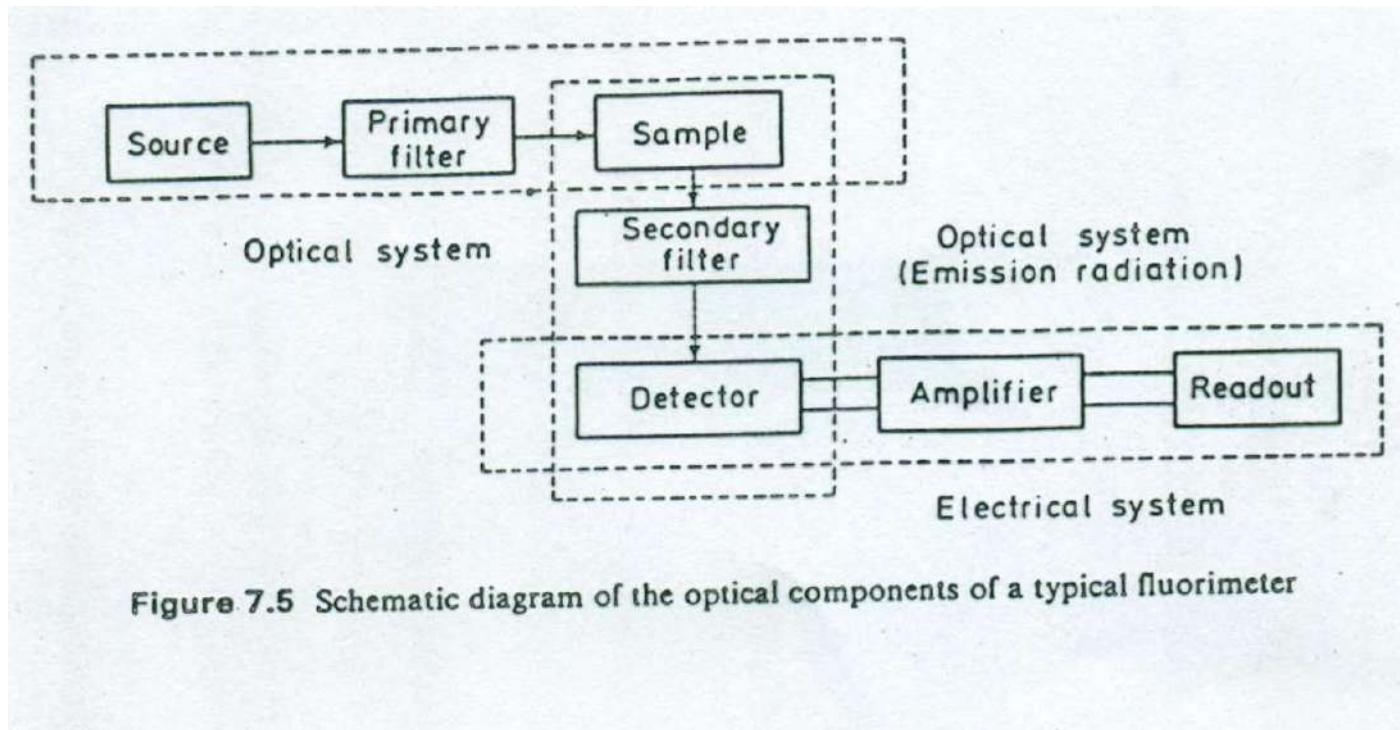


Figure 7.5 Schematic diagram of the optical components of a typical fluorimeter

# Adaptación para muestras opaca

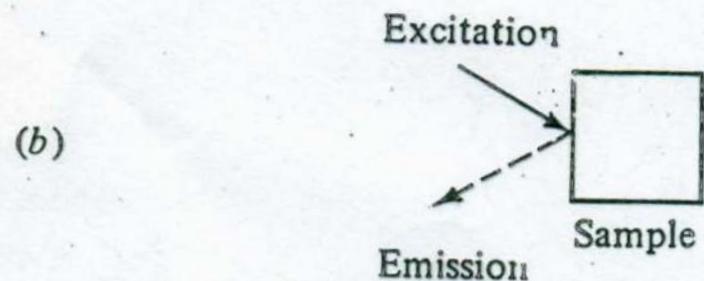


FIGURE 8-7 Block diagram of a typical fluorometer or spectrofluorometer. Detection at (a) right angles (used with most samples) and (b) at acute angles (for samples that are solid or very opaque).

# Diagrama esquemático de un espectrofósforímetro

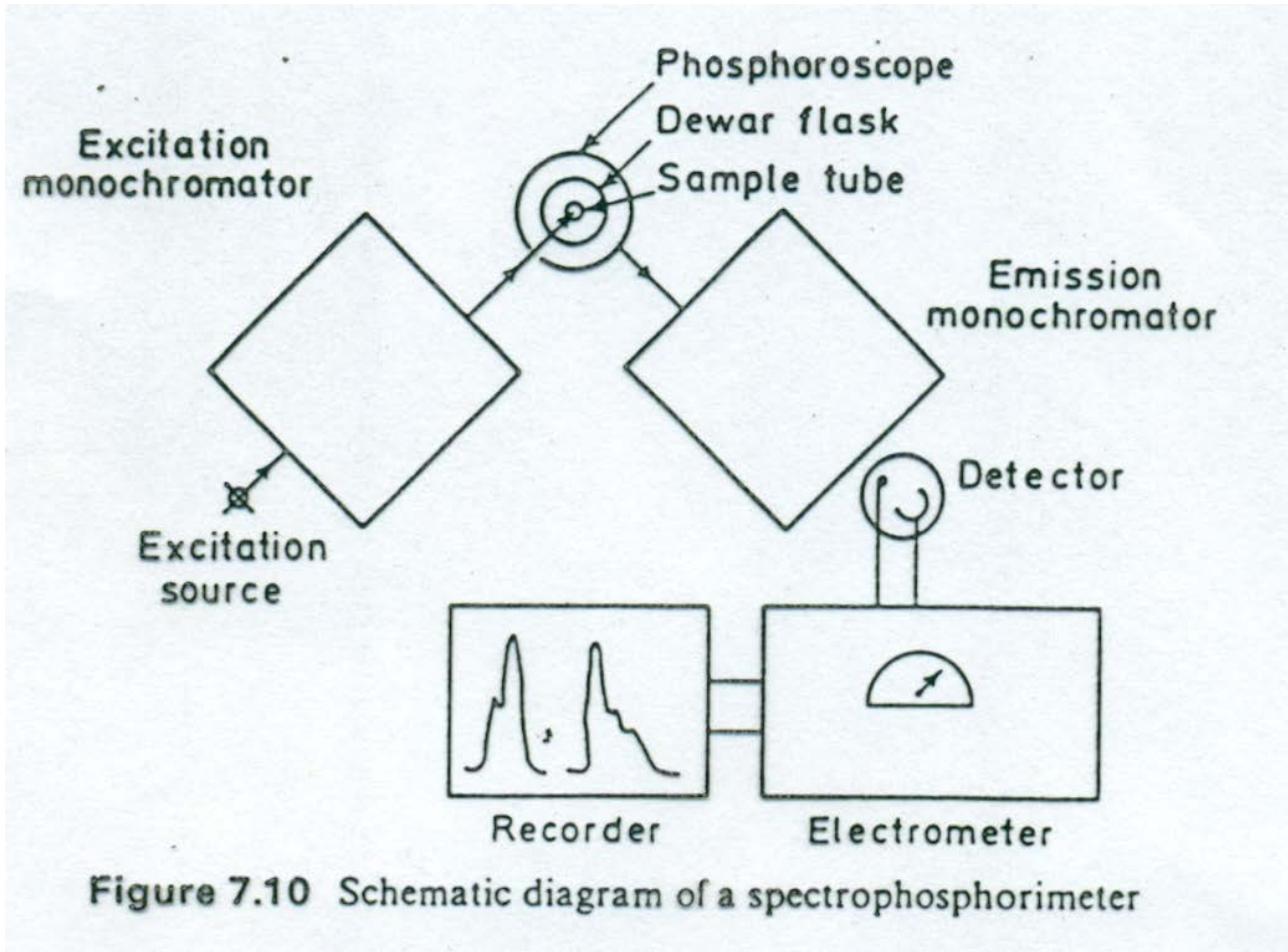


Figure 7.10 Schematic diagram of a spectrophosphorimeter

# Fuentes

La magnitud de la señal de salida, y por tanto la sensibilidad, es directamente proporcional a la potencia de la fuente  $I_o$ . Normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón o de mercurio.

La lámpara más corriente para los fluorómetros de filtro es la lámpara de arco de mercurio a baja presión equipada con una ventana de sílice fundida. Esta fuente produce líneas muy intensas a (254, 366, 405, 436, 546, 577, 691 y 773) nm. Las líneas individuales se pueden aislar con los filtros de interferencia o absorción adecuados. Ya que, en la mayoría de los compuestos que son fluorescentes la fluorescencia se puede inducir por diversas longitudes de onda, al menos una de las líneas del mercurio resulta normalmente adecuada.

Para los espectrofluorómetros en donde se requiere una fuente de radiación continua, normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón a elevada presión de (75 a 450) W. Estas lámparas requieren una potencia elevada capaz de producir de (15 a 20) V y corrientes continuas de (5 a 20) A. El espectro de una lámpara de xenón es continuo desde aproximadamente (300 a 1 300) nm. El espectro se aproxima al de un cuerpo negro. En algunos instrumentos, se obtienen destellos espaciados regularmente por descarga de un condensador a través de la lámpara; de esta manera se producen impulsos de gran intensidad. Además, entonces la salida de los fototubos es de corriente alterna, con lo que fácilmente se puede amplificar y procesar.

A principios de 1970, se utilizaron también diversos tipos de láseres como fuentes de excitación para medidas de fotoluminiscencia. Particular interés tiene un láser ajustable de colorante que utiliza un láser pulsado de nitrógeno como fuente primaria y que produce una radiación monocromática entre (360 y 650) nm. Este dispositivo elimina la necesidad de un monocromador de excitación.

# Filtros y monocromadores

- Tanto los filtros de interferencia como los de absorción han sido utilizados en los fluorómetros. La mayoría de los espectrofluorómetros están equipados con monocromadores de red.

# Detectores

- La señal de fluorescencia típica es de baja intensidad, por tanto, se necesitan factores de amplificación altos para estas medidas. Los tubos fotomultiplicadores han sido ampliamente utilizados como detectores en instrumentos de fluorescencia sensibles. Los detectores de diodos alineados también han sido propuestos para los espectrofluorómetros.

# Sensores de fibra óptica de fluorescencia

Diversos tipos de análisis por fluorescencia se pueden llevar al cabo en posiciones muy alejadas de la fuente y el detector, en este caso, la radiación de una fuente de láser viaja a través de una fibra óptica y excita la fluorescencia en disoluciones de la muestra. La radiación fluorescente vuelve entonces otra vez por la misma fibra óptica al detector para la medida. La aplicabilidad de este tipo de dispositivo se ha extendido a analitos no fluorescentes poniendo un material fluorescente indicador al final de la fibra óptica.

# Fosforímetros

Los instrumentos que se utilizan para estudios de fosforescencia son similares en diseño a los fluorómetros y a los espectrofluorómetros antes considerados, excepto en que requieren dos componentes adicionales. El primero es un dispositivo que alternativamente irradia la muestra y, después de un tiempo adecuado, mide la intensidad de fosforescencia. Se utilizan tanto dispositivos mecánicos como electrónicos y muchos instrumentos de fluorescencia comerciales tienen accesorios para medidas de fosforescencia.

Normalmente las medidas de fosforescencia se llevan a cabo a la temperatura del nitrógeno líquido, con el objeto de prevenir la degradación de la radiación de salida por desactivación colisional. normalmente forma parte del fosforímetro un recipiente *Dewar* con ventanas de cuarzo. A esta temperatura, el analito está en un cristal de disolvente sólido (el disolvente más usual es una mezcla de dietil eter, pentano y etanol -EPA-).

# Calibrado del instrumento

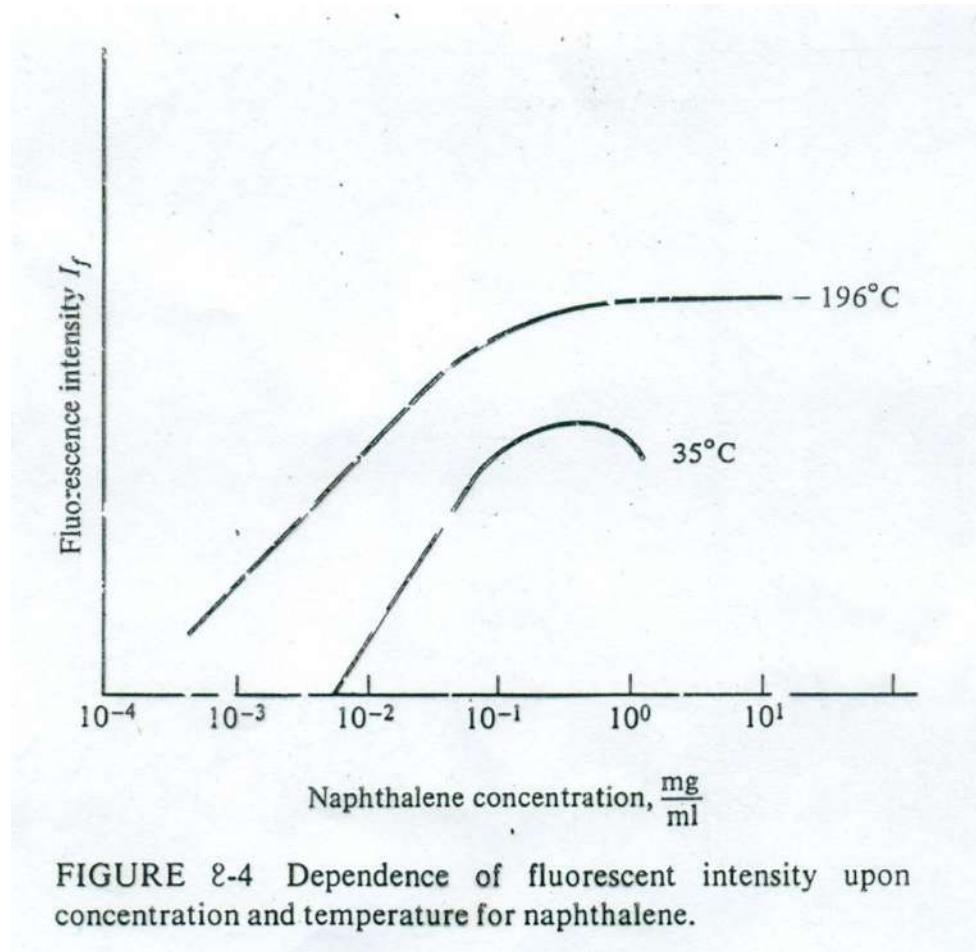
- Debido a las variaciones de la intensidad de la fuente, de la sensibilidad del fotomultiplicador y de otras variables instrumentales, es imposible obtener con un fluorómetro o un espectrofluorómetro dado exactamente las mismas lecturas para una disolución o un conjunto de disoluciones de un día a otro, por esta razón es una práctica común calibrar un instrumento y ajustarlo a un nivel de sensibilidad reproducible. La estandarización a menudo se lleva al cabo con una solución estándar de un fluoróforo estable. El reactivo más común para este cometido es una solución estándar de sulfato de quinina aproximadamente  $10^{-5} M$ . Esta disolución generalmente se excita con una radiación de 350 nm y emite radiación a 460 nm. Se han descrito otros compuestos para otras longitudes de onda.

La Perkin-Elmer Corporation ofrece un juego de seis estándares fluorescentes disueltos en una matriz de plástico, que forman unos bloques sólidos estables, que pueden ser utilizados indefinidamente sin un almacenamiento especial. Con estos patrones, el instrumento se calibra en la región de longitud de onda que se va a utilizar en el análisis.

## Aplicaciones y métodos fotoluminiscentes

Los métodos fluorescentes y fosforescentes son inherentemente aplicables a intervalos de concentración más bajos que las determinaciones espectrofotométricas y están entre las técnicas analíticas más sensibles asequibles a los científicos. El aumento de sensibilidad se alcanza por el hecho que el parámetro que relaciona la concentración en fluorometría y en fosforimetría  $F$  se puede medir independientemente de la potencia de la fuente  $I_o$ . Por otra parte, una medida espectrofotométrica requiere la evaluación de  $I_o$  y de  $I_t$ , ya que la absorbencia  $A$ , que es proporcional a la concentración, depende de la relación entre estas dos cantidades. La sensibilidad de un método fluorimétrico puede mejorarse aumentando  $I_o$  o por amplificación suplementaria de la señal de fluorescencia, mientras que en espectrofotometría, un aumento en  $I_o$  da lugar a un cambio proporcional en  $I_t$  y por consiguiente no afecta a la  $A$ . Por tanto, los métodos fluorimétricos tienen generalmente sensibilidades que son de uno a tres órdenes de magnitud superiores a los correspondientes espectrofotométricos. Por otro lado, la precisión y la exactitud de los métodos fotoluminiscentes es usualmente peor que la de los procedimientos espectrofotométricos en un factor entre, quizás dos y cinco. Generalmente, los métodos fosforescentes son menos precisos que sus correspondientes métodos fluorescentes.

# Curvas de calibración



# Curva de calibración

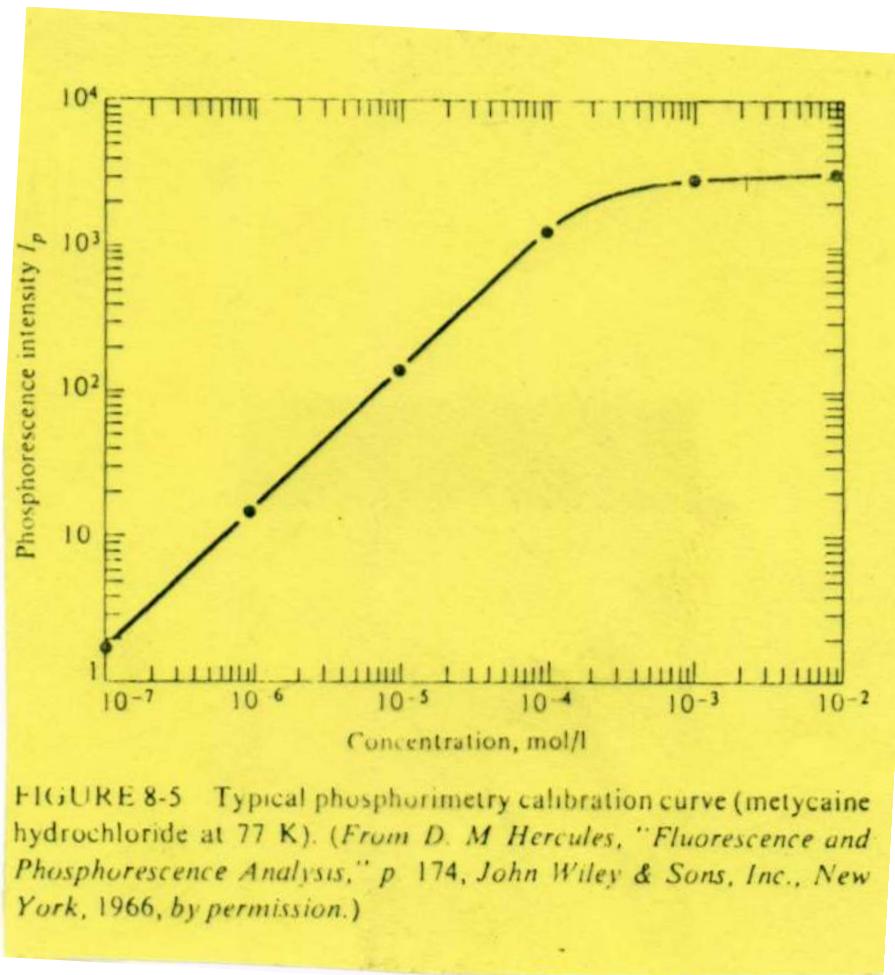


FIGURE 8-5 Typical phosphorimetry calibration curve (metycaine hydrochloride at 77 K). (From D. M. Hercules, "Fluorescence and Phosphorescence Analysis," p. 174, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1966, by permission.)

# Curva de calibración

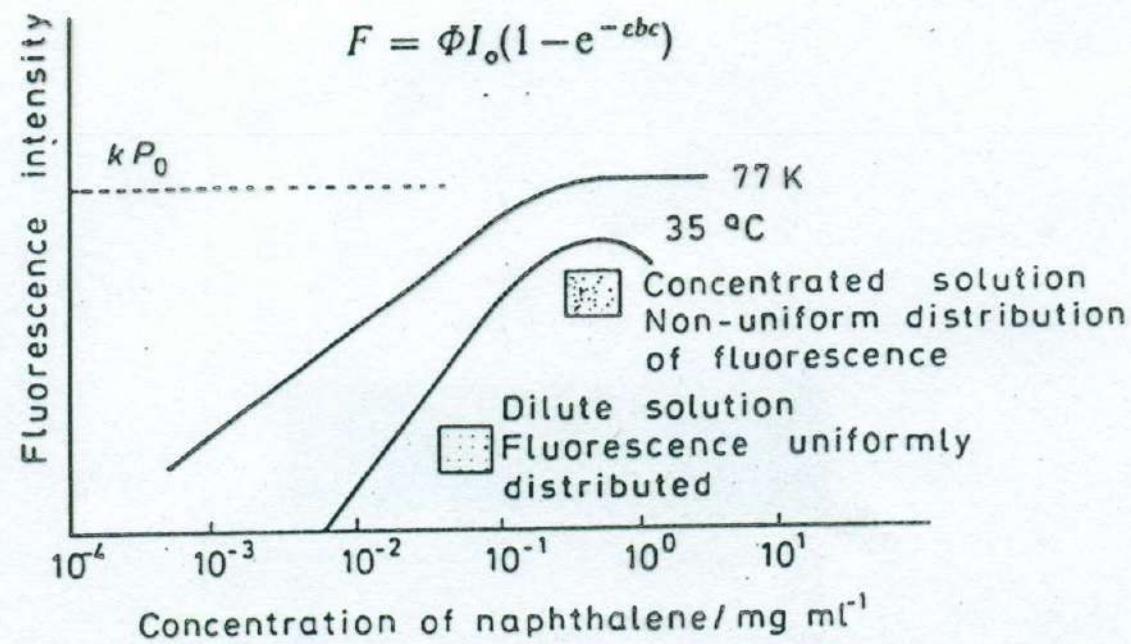
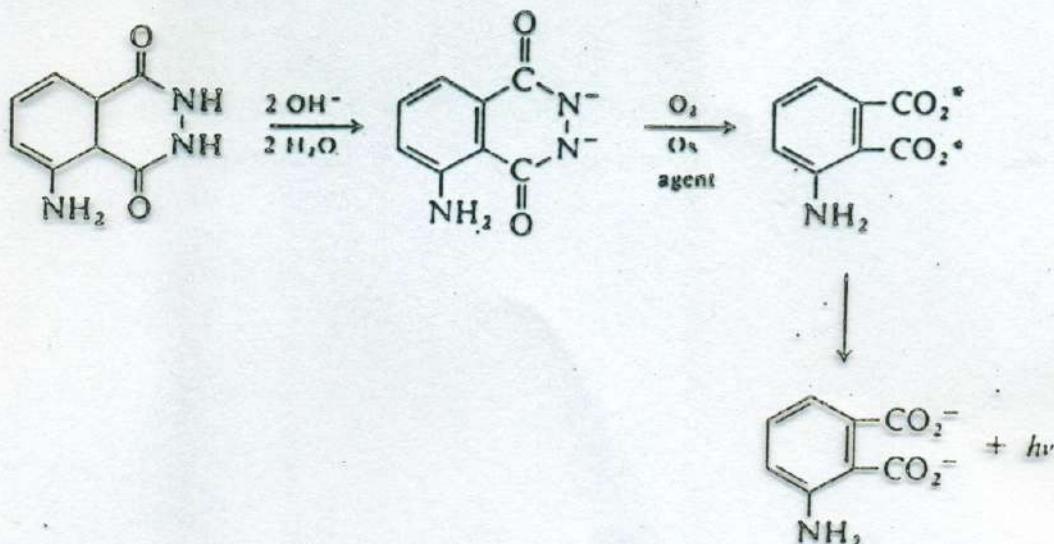


Figure 7.4 Dependence of fluorescence upon concentration of fluorophor and temperature

# Ejemplos de Luminiscencia

Luminol is measured by its intense luminescence, produced via the following reaction:

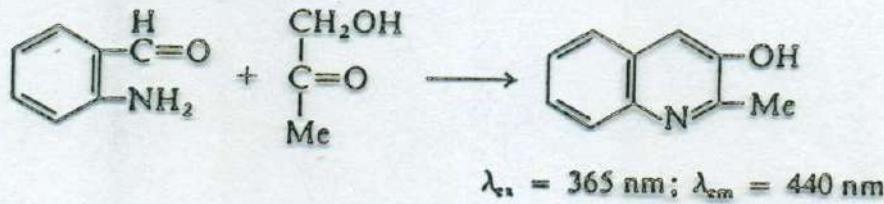


(Green luminescence)

The luminol reaction has been used for the determination of oxidising agents, such as peroxide, and for metal ions such as Cu or Co, which catalyse the reaction. As little as 2 p.p.b. Co or 30 p.p.b. Cu can be determined<sup>40</sup>.

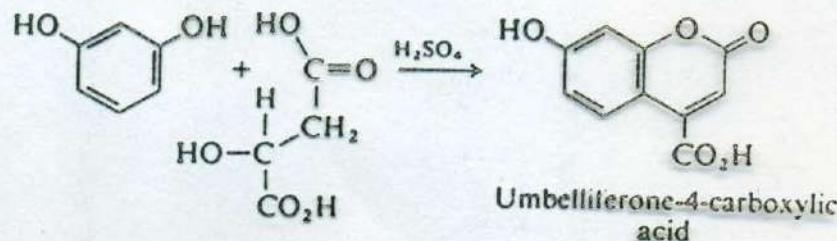
# Formación de compuestos fluorescentes

Acetol can be determined by a condensation with *o*-aminobenzaldehyde to produce the fluorophore 3-hydroxyquinaldine<sup>41</sup>:



# Formación de compuestos fluorescentes

Organic acids, like malic acid, can be assayed by a condensation with resorcinol to yield umbelliferone derivatives<sup>42</sup>.



Some of the organic acids assayable and the relative fluorescences are given in Table 7.14.

Table 7.14

Acid,	Colour of fluorescence	Relative fluorescence
Malic	Blue-Violet	22
Fumaric	Blue-Violet	24
Succinic	Yellow-Green	20
Isocitric	Light Blue	58
Citric	Sky Blue	89

(From Frohman and Orten<sup>42</sup>, by courtesy of the American Society of Biological Chemists)

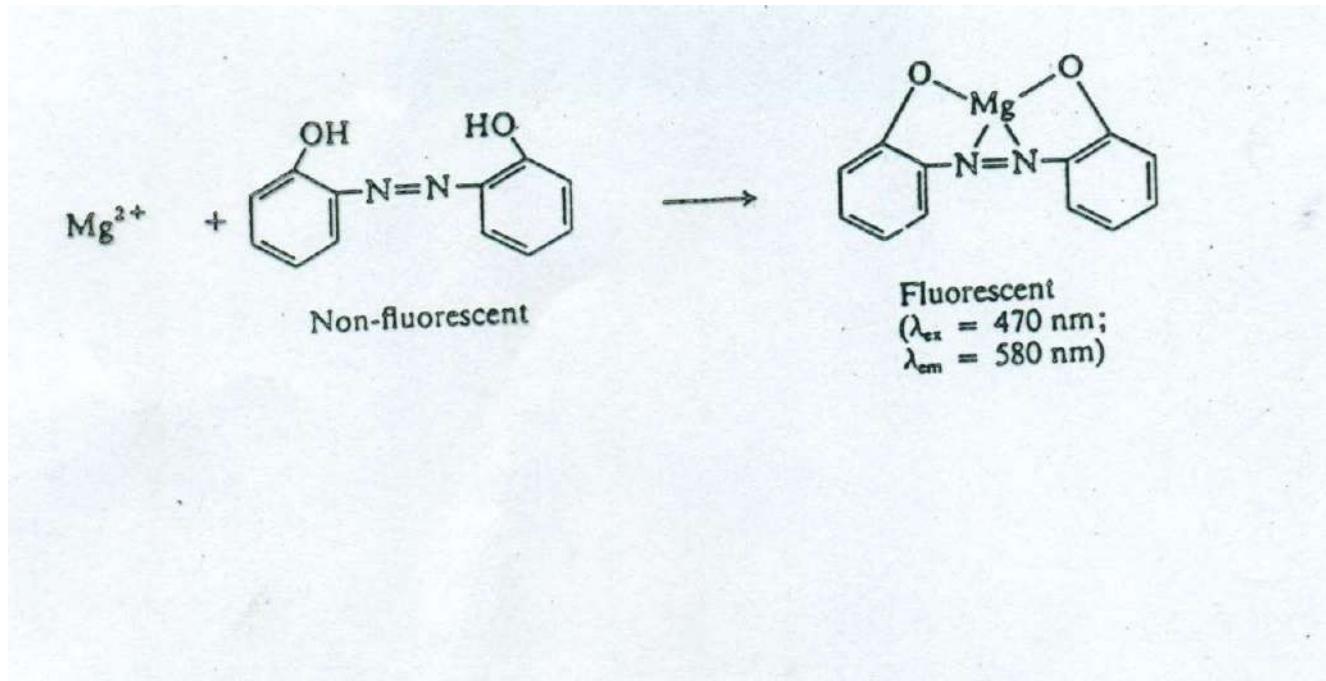
## Cationes que forman quelatos fluorescentes

Existen dos factores que limitan mucho el número de iones de metales de transición que forman quelatos fluorescentes. En primer lugar, muchos de estos iones son paramagnéticos; esta propiedad aumenta la velocidad de cruzamiento entre sistemas al estado triplete y, por tanto, la desactivación por fluorescencia es poco probable, si bien puede observarse fosforescencia.

Un segundo factor es que los complejos de los metales de transición están caracterizados por muchos niveles de energía poco espaciados, que exaltan la probabilidad de desactivación por conversión interna. Los iones de los metales que no son de transición son menos susceptibles a los procesos de desactivación anteriores y es para estos elementos, para los que se han desarrollado las principales aplicaciones inorgánicas de la fluorometría.

Hay que señalar que los cationes de los metales que no son de transición son generalmente incoloros y tienden a formar quelatos que también lo son. Por ello, la fluorometría a menudo complementa a la espectrofotometría.

# Formación de compuestos fluorescentes

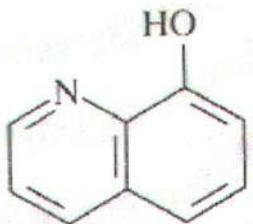


# Reactivos fluorimétricos

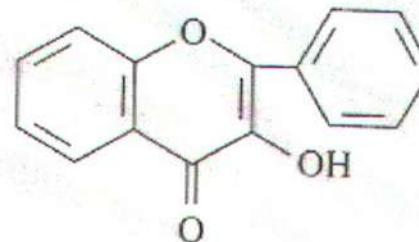
Table 7.13 Fluorescent methods for the assay of inorganics

<i>Ion</i>	<i>Reagent</i>	<i>Excitation/nm</i>	<i>Emission/nm</i>	<i>Sensitivity/p.p.m.</i>	<i>Ref.</i>
Al	Alizarin Garnet R	470	580	0.007	23
	SOAP	—	Green	0.0003	24
Au	Rhodamine B	550	575	0.01	25
B	Benzoin	370	480	0.040	26
Be	Morin	470	570	0.004	27
CN <sup>-</sup>	Quinone	440	500	0.10	28
Eu	Hexafluoro- $\beta$ -diketone	312	544	0.10	29
F <sup>-</sup>	Ternary complex with Zr + Calcein Blue	350	410	0.010	30
Ga	Rhodamine B	550	575	0.010	31
Li	Quinolin-8-nol	370	580	0.20	32
Mg	<i>N,N'</i> -Bis-salicylidene- ethylenediamine	355	440	0.0002	33
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Enzyme-glutamate dehydrogenase + NAD	320	410	0.010	34
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Enzyme-glycogen + phosphophase	320	410	0.01	35
Se	2,3-Diaminonaphthalene	365	525	0.0005	36, 37
Zn	Dibenzothiazolylmethane	365	415	0.05	38
Zr	Flavonol	400	465	0.10	39

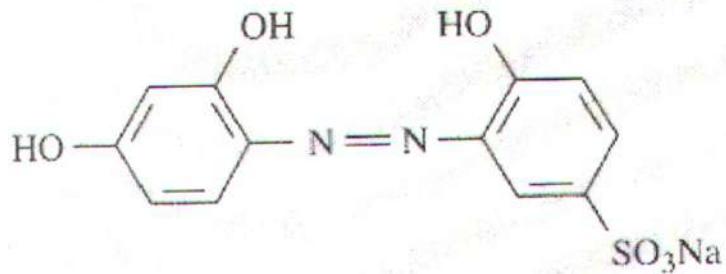
# Estructuras de algunos reactivos fluorimétricos



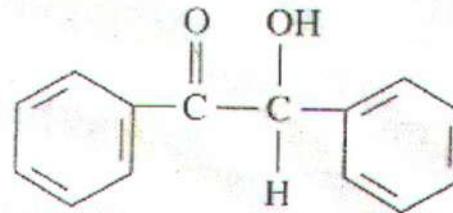
8-hidroxiquinoléina  
(reactivo para Al, Be y  
otros metales iónicos)



flavanol  
(reactivo para Zr y Sn)



rojo de alizarina R  
(reactivo para Al, F<sup>-</sup>)



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

# Determinación fluorimetrica de especies orgánicas

El número de aplicaciones del análisis fluorimétrico a especies orgánicas y bioquímicas es impresionante. Por ejemplo, Weissler y White han recogido métodos para la determinación de más de 200 sustancias, incluyendo una amplia variedad de compuestos orgánicos, enzima y coenzimas, agentes medicinales, productos naturales, esteroides y vitaminas. Incuestionablemente, las aplicaciones más importantes de la fluorometría están en el campo del análisis de productos alimentarios, farmacéuticos, muestras clínicas y productos naturales. La sensibilidad y la selectividad del método lo hace una herramienta particularmente valiosa en estos campos.

# Métodos fosforimétricos

- Los métodos fosforescentes y fluorescentes tienden a ser complementarios, ya que los compuestos que son fuertemente fluorescentes presentan una débil fosforescencia y viceversa. Por ejemplo, entre los hidrocarburos aromáticos con anillos condensados, aquellos que contienen átomos pesados como halógenos o azufre a menudo presentan una fuerte fosforescencia; por otro lado, los mismos compuestos en ausencia del átomo pesado tienden a presentar fluorescencia en vez de fosforescencia.

La fosforimetría ha sido utilizada para la determinación de una gran variedad de especies orgánicas y bioquímicas que incluyen sustancias como ácidos nucléicos, aminoácidos, pirina y pirimidina, enzimas, hidrocarburos del petróleo y pesticidas. Sin embargo, quizás debido a la necesidad de bajas temperaturas y a la generalmente pobre precisión de las medidas de fosforescencia, el método no ha tenido una utilización tan amplia como la fluorometría. Por otro lado, la gran selectividad potencial de los procedimientos de fosforescencia es atractiva.

Durante las últimas dos décadas, se ha dedicado un esfuerzo considerable al desarrollo de métodos fosforimétricos que puedan llevarse a cabo a temperatura ambiente. Los esfuerzos se han hecho en dos direcciones. La primera se basa en la gran fosforescencia que se observa en los compuestos adsorbidos en la superficie de sólidos, como puede ser un filtro de papel. En estas aplicaciones, se dispersa una disolución de analito sobre el sólido y se evapora el disolvente. Se mide entonces la fosforescencia de la superficie. Presumiblemente la matriz rígida minimiza la desactivación del estado triplete por conversiones externa e interna.

El segundo método a temperatura ambiente implica la solubilización del analito en micelas de detergente en presencia de iones de metales pesados. Aparentemente las micelas aumentan la proximidad entre los iones de metales pesados y la especie fosforescente, por tanto aumenta la fosforescencia.

# Panorama general de las aplicaciones de luminiscencia

- 
- **Sensibilidad**
- 
- **Selectividad**
- 
- **Algunas aplicaciones fluorométricas**
- 
- **Análisis orgánico**
- **Análisis inorgánico**
- **Análisis bioquímicos y médicos**
- **Análisis de compuestos farmacéuticos**
- Para un gran número de casos la fluorometría ha sido muy útil en la determinación de bajas concentraciones de drogas, por ejemplo la reserpina, el LSD que pueden ser determinados en cantidades de 0,05 pg, y en algunos casos se han detectado hasta 0,003 µg.
- **Análisis agrícola**
- Principalmente se ha aplicado esta técnica a los pesticidas organofosforados y otro tipo de carbamatos defoliantes.
- **Algunas aplicaciones fosforimétricas**
- Ejemplo. Tryptófano en la sangre, así como, una gran variedad de drogas en cantidades trazas en la sangre. Además también se determinan en la sangre algunos analgésicos, sulfa, aspirina, fenacetina y cafeína. Análisis de hidrocarburos cancerígenos y una variedad de antimetabolitos.
-

# Aplicaciones de la luminiscencia

## *Clinical pathology*

*Electrolytes:* Calcium, magnesium, inorganic sulphate, inorganic phosphate

*Steroids:* Corticosteroids, oestrogens, progesterone, androgens, testosterone, bile acids

*Lipids:* Lipoproteins, phospholipids, cholesterol, triglycerides

*Proteins:* Serum albumin, protein electrophoresis

*Amino acids and metabolites:* Tryptophan, serotonin, phenylalanine, tyrosine, catecholamines, 3-o-methylcatecholamines, homovanillic acid, DOPA, tyramine and 3-methoxytyramine, histidine and histamine, creatine, kynurenic acid, xanthurenic acid

*Immunology:* Fluorescent antibodies, fluorescent antigens, blood typing

*Enzymes:* Dehydrogenases, transaminases, phosphatases, proteases, lipases, creatine kinase, LDH-isoenzymes, peroxidases

*Drugs:* Barbiturates, salicylates, quinidine, LSD, tetracyclines

*Metabolites:* Blood glucose, porphyrins, carboxylic acids and ketones

*Other:* BUN, ammonia, hippuric acid, hematin iron

## *Inorganic*

*Metals:* Anions — Cyanide, fluoride, sulphate, silicate, iodide

Cations — Aluminium, arsenic, beryllium, boron, cadmium, cerium, calcium, gallium, iron, lithium, magnesium, rare earths, selenium, silicon, tin, tungsten, uranium, zinc, zirconium

## *Agricultural chemistry*

*Inorganic:* As noted above, especially selenium, magnesium, boron, fluorides, aluminium, tin

*Tracing techniques:* Insecticide and pesticide spray coverage studies, residue evaluations

*Natural products:* Gibberellic acid, chlorophylls, pigments

*Vitamins:* A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, D, and E

*Proteins:* Protein in milk

## *Public health*

*Pollution control:* Insecticide aerial drift studies, water pollution studies, spent sulphide liquor

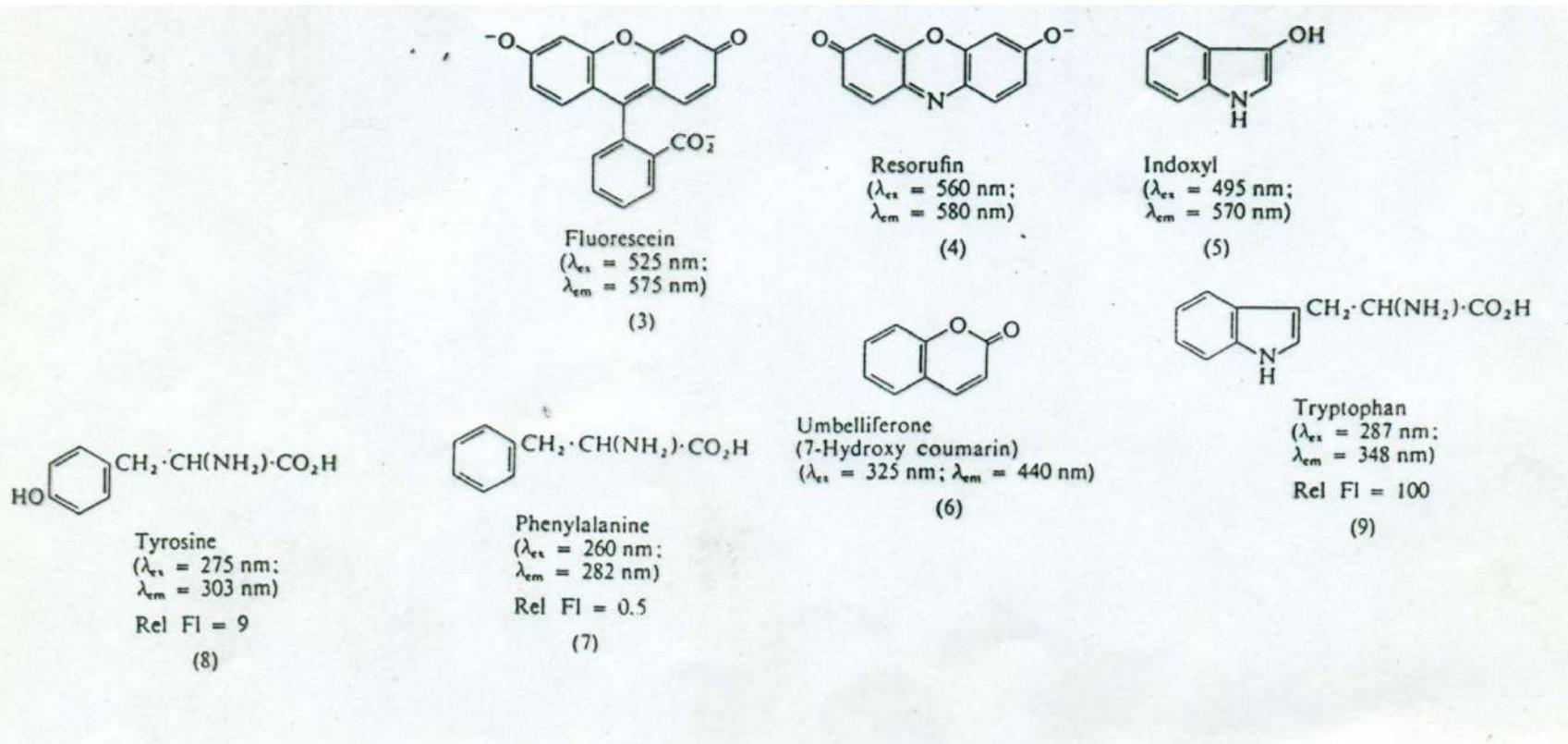
*Bacteriology:* Identification and counting of bacteria

*Metal poisoning:* Beryllium, boron, lead, uranium, cadmium

*Immunology:* Fluorescent antibody control

*Screening programmes:* P.K.U., histidemia

# Estructuras de moléculas que fluorescen



## PRUEBA PARA FENILCETONURIACOS

Los aminoácidos: **Fenilalanina, Tirosina y Triptofano** se analizan por Fluorescencia.

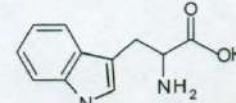
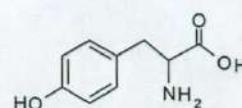
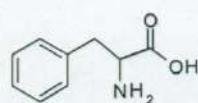
La **tirosina** y el **triptofano** poseen anillos aromáticos que absorben intensamente y por tanto tienen una fluorescencia natural intensa. La **Tirosina** es excitada a 275 y 280 nm y emite a 303 nm; El **triptofano** es excitado a 220 y 280 nm y emite a 438 nm [1]. En contraste la **fenilalanina** posee un anillo de benceno, que absorbe débilmente (260 nm) y no emite fluorescencia (282 nm) intensamente para ser analizada en cantidades traza (microgramos/L), por ello los métodos analíticos usuales, involucran un tratamiento con ninhidrina, Cu(II) y L-leucil-L-alanina [2], para dar un producto altamente fluorescente.

Las mediciones fluorométricas de **fenilalanina** son útiles en las pruebas para fenilcetonuria, un desordenador metabólico hereditario que causa retraso mental.

Los fenilcetonuriacos no pueden convertir eficientemente la **fenilalanina** a **tirosina**.

En una serie de pruebas, muestras de control para adultos dieron 1.5 mg de **fenilalanina** por 100 ml de suero sanguíneos.

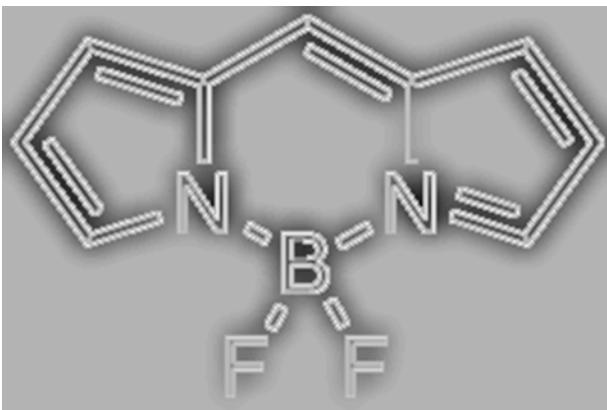
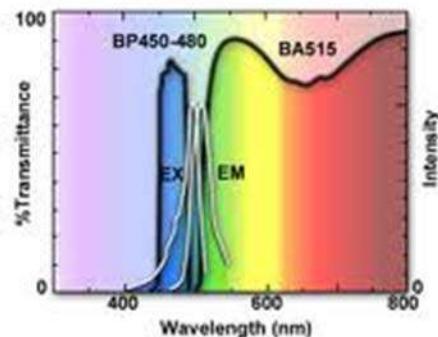
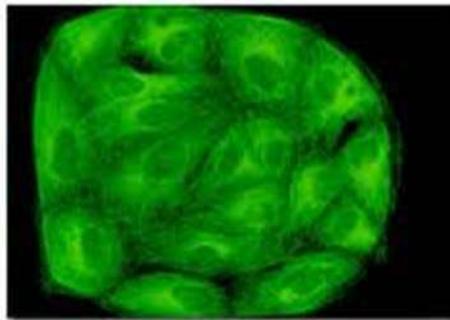
En contraste, los padres de niños fenilcetonuriacos dieron 1.9 mg por 100 ml, y los fenilcetonuriacos 30 mg por 100 ml de suero sanguíneo.





PERKIN-ELMER  
LS-2  
Filter  
Fluorimeter





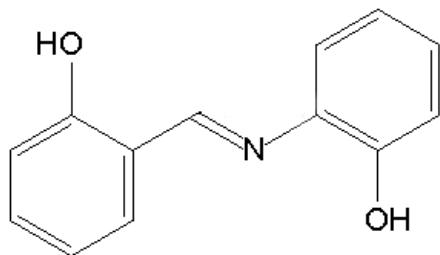
borodipirrometano

*Table 1.* Spectral properties of BODIPY lipid probes.\*

<b>Wavelength Range</b>	Fluorescence excitation maxima from 500 nm to ~650 nm. Emission maxima from 510 nm to ~665 nm.
<b>Spectral Bandwidth</b>	Narrow (Figure 1).
<b>Fluorescence Stokes Shift</b>	Small (Figure 1). Spectral overlap results in Förster transfer radius ( $R_o$ ) = 57 Å for BODIPY FL.
<b>Fluorescence Quantum Yield</b>	High. Typically 0.9 in fluid phase lipid bilayers.
<b>Molar Absorptivity</b>	High. $\epsilon_{\text{max}}$ typically $>80,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .
<b>Sensitivity to Environment</b>	Generally low. Fluorescence quantum yields of fatty acids are not diminished in water. Fluorescence is quenched by collisional interactions with aromatic amino acids.
<b>Concentration Dependence</b>	Long-wavelength excimer emission detectable at incorporation levels of about 1:10 mole:mole with respect to unlabeled phospholipid in lipid bilayers.

\* Data in this table are compiled, in part, from J Am Chem Soc 116, 7801 (1994) and Anal Biochem 198, 228 (1991).

Stokes fluorescence is the re-emission of longer wavelength photons (lower frequency or energy) by a molecule that has absorbed photons of shorter wavelengths (higher frequency or energy). Both absorption and radiation (emission) of energy are unique characteristics of a particular molecular structure. If a material has a direct bandgap in the range of visible light, the light shining on it is absorbed, causing electrons to become excited to a higher energy state. The electrons remain in the excited state for about  $10^{-8}$  seconds. This number varies over several orders of magnitude depending on the sample, and is known as the fluorescence lifetime of the sample. After losing a small amount of energy in some way (hence the longer wavelength), the electron returns to the ground state and energy is emitted.



Salicylidene-o-aminophenol (SOAP)

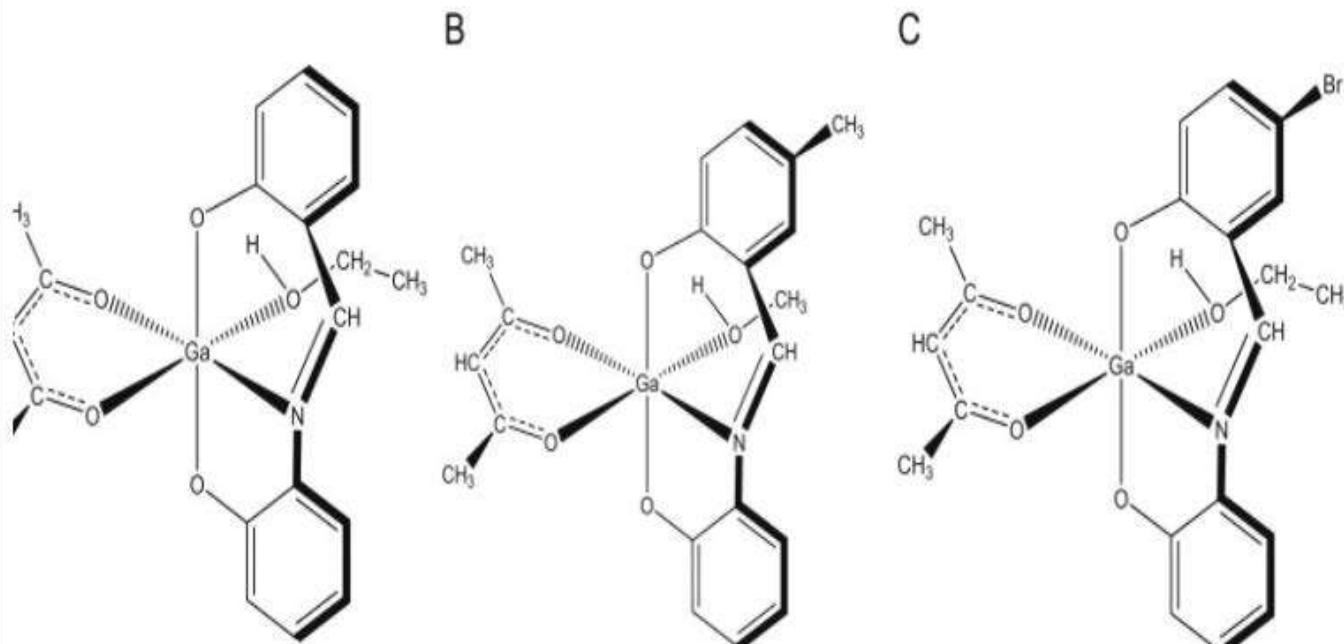


Fig. 2. Structure and bonding in  $\text{Ga}(\text{acac})(\text{saph})(\text{Alcohol})$  complexes: (A) unsubstituted  $\text{saph}^{2-}$ ; (B)  $\text{saph}^{2-}$  derivatized with the EDG- $\text{CH}_3$  ( $5\text{Mesaph}^{2-}$ ) and (C)  $\text{saph}$  derivatized with the EWG- $\text{Br}$  ( $5\text{Brsaph}^{2-}$ ).