



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE
FLUORESCENCIA POR MÉTODOS INDIRECTOS**

ANDREA GARCÍA SUÁREZ

Julio 2015, Oviedo



Alfonso Fernández González, técnico de los servicios científico técnicos, tutor del presente trabajo y Rosana Badía Laíño, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo y cotutora del mismo:

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado “Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos”

ha sido realizado por el alumno Andrea García Suárez bajo nuestra dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 13 de julio de 2015

Fdo: Alfonso Fernández González

Fdo. Rosana Badía Laíño

ÍNDICE

LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Luminiscencia	3
1.2. Fundamento de la luminiscencia a nivel electrónico: diagrama de Jablonski	3
1.3. Fluorescencia.....	5
1.4. Factores que afectan/influyen en la fluorescencia	6
1.4.1. Estructura molecular	6
1.4.2. Efecto de la temperatura	6
1.4.3. Efecto del disolvente	7
1.4.4. Efecto del pH	7
1.4.5. Efecto del oxígeno disuelto	7
1.4.6. Efecto de la concentración.....	7
1.5. Espectros de excitación y de emisión.....	8
1.6. Instrumentación.....	9
1.7. Rendimiento cuántico de fluorescencia.....	12
1.7.1. Métodos para determinar rendimientos cuánticos de fluorescencia.....	12
1.8. Patrones de rendimiento cuántico conocido	18
1.9. Muestras a analizar	19
1.9.1. Cumarinas.....	19
1.9.2. Nafcilina.....	20
2. OBJETIVO.....	21
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	22
3.1. Reactivos y disoluciones.....	22
3.2. Instrumentación.....	22
3.2. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de las cumarinas.....	22
3.2.1 Medida del patrón.....	23
3.2.2. Medida de las muestras	23
3.3. Determinación del rendimiento cuántico de la nafcilina.....	24
3.3.1. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método indirecto.....	24

3.3.2. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método de la variación de las rendijas.....	25
3.3.3. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método del <i>quenching</i>	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. Opción elegida para la realización de este trabajo	27
4.2. Elección de los patrones de rendimiento cuántico conocido	27
4.3. Determinación del rendimiento cuántico de las cumarinas	28
4.3.1. Determinación de la relación de la intensidad de fluorescencia frente a la absorción a λ máxima de la fluoresceína	28
4.3.2. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína a otras λ	29
4.3.3. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 153, $\lambda_{exc}=422$ nm.....	33
4.3.4. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 314, $\lambda_{exc}=436$ nm.....	34
4.3.5. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 334, $\lambda_{exc}=445$ nm.....	35
4.3.6. Comparación de los valores obtenidos y de los tabulados	36
4.4. Determinación del rendimiento cuántico de la nafcilina	36
4.4.1. Método Indirecto	36
4.4.2. Método de la variación de las rendijas	40
4.4.3. Método del <i>quenching</i>	44
4.4.4. Comparación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos en los tres métodos utilizados	48
5. CONCLUSIONES	49
6. BIBLIOGRAFÍA, PUBLICACIONES Y RECURSOS WEB	50
7. APÉNDICES.....	52
7.1. APÉNDICE: Espectros de absorción obtenidos durante la realización del trabajo	52
7.2. APÉNDICE: Espectros de emisión de fluorescencia obtenidos durante la realización del trabajo	56
7.3. APÉNDICE: Método del trapecio	64

LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo / abreviatura	Significado
Abs	Absorción / Absorbancia
r^2	Coefficiente de correlación
Cu	Cumarina
Ec.	Ecuación
n	Índice de refracción
I_F	Intensidad de fluorescencia
λ	Longitud de onda de radiación
Máx.	Máxima
nm	Nanómetro
b	Ordenada en el origen
m	Pendiente de la recta de calibrado
ϕ	Rendimiento cuántico de fluorescencia
UV	Radiación ultravioleta
VIS	Radiación visible
u.a.A	Unidades arbitrarias de absorción
u.a.F	Unidades arbitrarias de fluorescencia

RESUMEN

La fotoluminiscencia es la emisión de radiación por parte de algunos compuestos que previamente han sido expuestos a una fuente lumínica. Esta propiedad es especialmente interesante en algunas especies orgánicas, como es el caso de antibióticos o proteínas ya que permite estudiar, por ejemplo, la interacción entre ambos.

El rendimiento cuántico de fluorescencia cuantifica la fluorescencia de los compuestos, ya que se define como el número de fotones emitidos respecto al número de fotones absorbidos, y su determinación puede llevarse a cabo mediante métodos absolutos y métodos indirectos. Los primeros implican la medida de toda la radiación emitida por el compuesto en cuestión tras haber sido excitado; si bien, no es posible realizar tal medición en todos los equipos puesto que es necesario que los espectrofluorímetros dispongan de una *esfera integradora de radiación*. Por ello, la alternativa es determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia por métodos indirectos partiendo de sustancias de rendimiento cuántico conocido, mediante la medida de la absorción y de la intensidad de fluorescencia con los correspondientes equipos convencionales.

Además, la medida de la absorción y de la emisión de fluorescencia exige alcanzar un intervalo de concentraciones óptimo para poder registrar los respectivos espectros de manera adecuada para ambas magnitudes. Este aspecto es especialmente complejo en situaciones en que las diferencias entre el rendimiento cuántico del compuesto desconocido y el del patrón utilizado son muy grandes. Por ello, se proponen una serie de modificaciones en el método indirecto con el fin de subsanar esos problemas.

Palabras clave: fluorescencia, rendimiento cuántico, espectro de absorción, espectro de emisión, rendijas, *quenching*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Luminiscencia

Cuando una sustancia absorbe radiación VIS-UV suele perder ese exceso de energía adquirido en forma de calor, mediante colisiones con otros átomos o moléculas; si bien, hay una serie de compuestos en los que la pérdida de energía no solo tiene lugar en forma de calor sino también emitiendo radiación de λ más larga. Este fenómeno se conoce como fotoluminiscencia.

Según como sea la emisión de radiación, se distinguen distintos procesos luminiscentes: fluorescencia o fosforescencia. Aunque la diferencia entre ellos se da en relación con la multiplicidad de los orbitales, en la práctica se distinguen, en la mayoría de los casos, por el tiempo que transcurre entre la absorción y la emisión.

Los distintos procesos luminiscentes antes citados dan lugar a las correspondientes técnicas analíticas. En éstas se suele registrar el espectro de emisión que se genera cuando las moléculas de analito excitadas vuelven a su estado fundamental emitiendo radiación. A partir de dicho espectro se puede obtener valiosa información para realizar análisis cualitativos o cuantitativos.

A pesar de que existen relativamente pocas sustancias luminiscentes, este fenómeno es frecuente en especies de gran importancia biológica y farmacéutica o de interés orgánico y en los casos en los que son aplicables las técnicas luminiscentes, presentan muchas ventajas analíticas únicas en lo que se refiere a sensibilidad (a niveles de trazas) y selectividad.

El presente trabajo se centrará en la determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia, por ser ésta la técnica fotoluminiscente más común y ampliamente utilizada.

1.2. Fundamento de la luminiscencia a nivel electrónico: diagrama de Jablonski

Para explicar los fenómenos luminiscentes (especialmente la fluorescencia y fosforescencia) a nivel atómico-molecular se hace uso del diagrama de Jablonski (**Figura 1**):

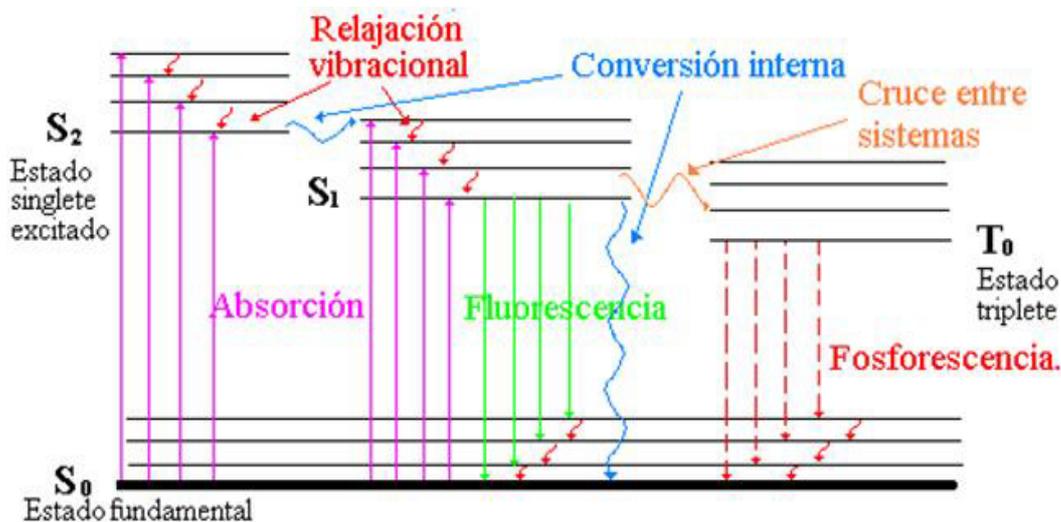


Figura 1: Diagrama de Jablonski

Para que pueda ocurrir cualquier fenómeno luminiscente es necesario que la especie en cuestión absorba, previamente, radiación de λ adecuada. Así, algunos electrones pasan de estados vibracionales y electrónicos fundamentales (S_0) a los correspondientes estados excitados (S_1 , S_2 ... según la cantidad de energía absorbida). El tiempo de absorción es del orden de 10^{-15} segundos¹ y es el tiempo necesario para que una molécula pase de un estado electrónico a otro. Es importante señalar que en la transición del estado fundamental al estado excitado el spin del electrón no cambia de manera que sigue "apareado" con el electrón no excitado. Esto se conoce como transición singlete-singlete (**Figura 2**). El tiempo de vida del electrón en el estado excitado es de 10^{-7} - 10^{-8} segundos¹ y, posteriormente, la molécula pierde el exceso de energía que la hizo pasar del estado fundamental al estado excitado emitiendo o no radiación.

En los procesos en los que la desactivación ocurre sin emisión de radiación (procesos no radiantes) la pérdida de energía electrónica tiene lugar mediante choques o interacciones en los que la energía se pierde en forma de calor. Puede ocurrir una desactivación por conversión interna en la que la molécula pasa de un estado excitado a otro estado excitado siendo este último de menor energía; o una desactivación por conversión externa en la que la molécula cede su energía al disolvente o a otros solutos, aunque estos procesos no están bien documentados; si bien, se sabe que ocurren y que suele ser muy eficaces ya que son relativamente pocos los compuestos que presentan algún tipo de luminiscencia.

También puede ocurrir un solapamiento entre dos niveles de energía relativamente próximos. Esto es lo que se conoce como cruce-intersistemas y tampoco hay emisión de radiación. Este proceso implica, además, un cambio en el spin electrónico y, por tanto, en la multiplicidad de la molécula, es decir, ocurre una transición singlete-triplete (**Figura 2**).

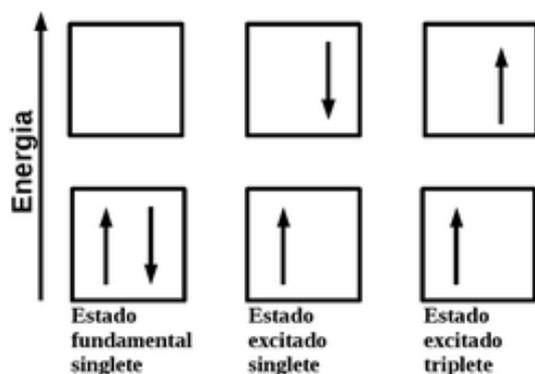


Figura 2: Diagrama de estado singlete fundamental, singlete excitado y triplete

En los procesos luminiscentes, la pérdida del exceso de energía emitiendo un fotón puede ocurrir desde el nivel vibracional más bajo del estado singlete excitado hacia cualquiera de los niveles vibracionales del estado fundamental dando lugar a la fluorescencia, o puede ocurrir desde el nivel vibracional más bajo del estado triplete hasta cualquiera de los niveles vibracionales del estado fundamental, originando la fosforescencia. Tal como se comentó en **1.1. Luminiscencia**, a nivel práctico, la diferencia entre ambos fenómenos luminiscentes radica en el tiempo de emisión de radiación: mientras que la emisión de fluorescencia es un proceso muy rápido que tiene lugar 10^{-11} - 10^{-9} segundos¹, la emisión en fosforescencia es notablemente más lenta (generalmente superior a los milisegundos)¹.

El camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por ello, si la desactivación por fluorescencia es más rápida que los procesos no radiantes, se observa tal emisión. Por otro lado, si la desactivación no radiante tiene una constante de velocidad más favorable, la fluorescencia desaparece o es menos intensa. Por ello, los tres procesos de desactivación electrónica se han descrito en orden de probabilidad decreciente, es decir: hay muchas moléculas que no son luminiscentes, las que sí lo son suelen presentar fluorescencia y son muy pocas las moléculas fosforescentes.

1.3. Fluorescencia

Para la mayoría de los compuestos fluorescentes, la radiación se produce por una transición $n \rightarrow \pi^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$, dependiendo cuál de ellas sea la menos energética.

Empíricamente, se observa que la fluorescencia se encuentra con más frecuencia en los compuestos en los que la transición de más baja energía es del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ que en aquellos compuestos en los que la transición de menor energía es del tipo $n \rightarrow \pi^*$; es decir, la emisión de fluorescencia es mayor para las transiciones $\pi^* \rightarrow \pi$

Los primeros fenómenos fluorescentes comenzó a observarlos el botánico Nicolás Monarde en 1565 en algunas plantas². A comienzo del s. XVIII, Clarke describió la fluorescencia en las fluoritas y, años más tarde, Brewster y Herschel² hicieron lo mismo con la clorofila y quinina respectivamente. Pero no fue hasta 1852 cuando Stokes, en sus estudios de óptica, enunció los principios de la fluorescencia en el artículo "On the Change of Refrangibility of Lights"³. Por tanto, el descubrimiento de la fluorescencia se le atribuye a Stokes, que también enunció que

la λ de la luz emitida por fluorescencia era mayor que la λ de la radiación incidente, lo que se conoce como *ley de Stokes*.

1.4. Factores que afectan/influyen en la fluorescencia

Hay una serie de factores que pueden influir, de manera muy notable, en la intensidad de fluorescencia de los compuestos, como es el caso de la estructura molecular, el entorno químico, el disolvente, el pH de la disolución o la temperatura, entre otros.

1.4.1. Estructura molecular

La primera condición para que una molécula pueda presentar fluorescencia es que absorba radiación UV o VIS. En general, cuanto más radiación absorba más intensa será su luminiscencia. Esta condición hace que los compuestos orgánicos cíclicos saturados y los alifáticos no sean luminiscentes (ya que no son capaces de absorber radiación de esa energía). Por otra parte, las moléculas con dobles enlaces conjugados, especialmente las que tienen gran energía de resonancia, sí suelen ser fluorescentes; concretamente, los hidrocarburos aromáticos, especialmente los de estructura multicíclica rígidos y planos son los compuestos ideales.

La rigidez molecular es un factor clave de la fluorescencia. Empíricamente se encuentra que la fluorescencia se ve particularmente favorecida en las moléculas que poseen estructuras rígidas. La importancia de la rigidez radica en que así se evitan otro tipo de mecanismos desactivantes. La falta de rigidez de una molécula probablemente provoca un aumento de la velocidad de conversión interna y el correspondiente aumento en la probabilidad de desactivación no radiante. En caso de que una molécula tenga una parte rígida y otra flexible, la parte de la molécula no rígida puede sufrir vibraciones de baja frecuencia respecto a sus otras partes y tales movimientos permiten explicar las pérdidas de energía que provocan una disminución (o pérdida total) de la emisión de fluorescencia.

La luminiscencia de las moléculas también está muy influenciada por los sustituyentes, especialmente, por los heteroátomos; Los átomos pesados tienden a favorecer el cruce intersistemas, potenciando la fosforescencia en detrimento de la fluorescencia.

1.4.2. Efecto de la temperatura

La fluorescencia disminuye, en la mayoría de las moléculas, al aumentar la temperatura ya que así aumenta la frecuencia de las colisiones y, con ello, la probabilidad de desactivación por fenómenos no radiantes.

1.4.3. Efecto del disolvente

La fluorescencia de una molécula se reduce en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con dichos átomos en su estructura.

Así mismo, un factor importante del disolvente es su viscosidad. Ésta juega un papel similar al de la temperatura. Cuanto menos viscoso sea el disolvente, mayor es la probabilidad de que haya colisiones entre las moléculas del soluto y, de este modo, se favorecen las desactivaciones no radiantes por conversión externa.

1.4.4. Efecto del pH

La fluorescencia de un compuesto con grupos ácidos o básicos depende, normalmente, del pH. Tanto la λ como la intensidad de emisión son, por lo general, diferentes para la forma ionizada y no-ionizada del compuesto.

Cuanto mayor es el número de formas resonantes mayor es la estabilidad del primer estado excitado y, como consecuencia, más probable será observar fluorescencia.

Los procedimientos analíticos basados en la medida de fluorescencia requieren habitualmente un control minucioso del pH, pudiendo llegar a utilizarse las moléculas fluorescentes como indicadores del punto final en valoraciones ácido-base.

1.4.5. Efecto del oxígeno disuelto

La presencia de oxígeno disuelto tiende a disminuir la intensidad de fluorescencia de una disolución. Aunque en algunas ocasiones este efecto pueda ser el resultado de una oxidación fotoquímica de las especies fluorescentes sin embargo, lo más habitual es que la amortiguación de la fluorescencia (*quenching*) tenga lugar como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, que favorece el cruce intersistemas y la conversión de las moléculas excitadas al estado triplete.

1.4.6. Efecto de la concentración

La intensidad de emisión de fluorescencia (I_F) es proporcional a la intensidad de la radiación del haz absorbido por el sistema:

$$I_F = K' \cdot (I_0 - I) \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo I_0 la intensidad de radiación del haz que incide sobre la disolución, I la intensidad después de atravesar una longitud b del medio, I_F la intensidad de fluorescencia y K' una constante que depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia. Con el objeto de relacionar I_F con la concentración c de la especie fluorescente se considera la ley de Beer como:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde ε es la absorptividad molar de las moléculas fluorescentes y $\varepsilon \cdot b \cdot c$ la absorbancia. Sustituyendo **Ecuación 2** en **Ecuación 1** se obtiene:

$$I_F = K' \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}) \quad \text{Ecuación 3}$$

El término exponencial puede desarrollarse como una serie de McLaurin de tal forma que para absorbancias suficientemente bajas **Ecuación 3** se puede reescribir como:

$$I_F = 2.3 \cdot K' \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c \cdot I_0 \quad \text{Ecuación 4}$$

Considerando que I_0 es constante, la expresión anterior puede simplificarse a:

$$I_F = K \cdot c \quad \text{Ecuación 5}$$

Así, la representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de la especie emisora debe ser lineal a bajas concentraciones.

Otros factores responsables de las desviaciones de la linealidad a elevadas concentraciones son la autoamortiguación y la autoabsorción. El primero es el resultado de colisiones entre las moléculas excitadas siendo dichas colisiones no radiantes (se cree que su mecanismo puede ser similar a la conversión externa). Por su parte, la autoabsorción tiene lugar cuando la λ de emisión se solapa con el pico de absorción. Esto implica una disminución de la fluorescencia porque la radiación emitida por unas moléculas es reabsorbida por otras moléculas que también son fluorescentes.

1.5. Espectros de excitación y de emisión

La representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a λ permite obtener los correspondientes espectros de excitación y de emisión.

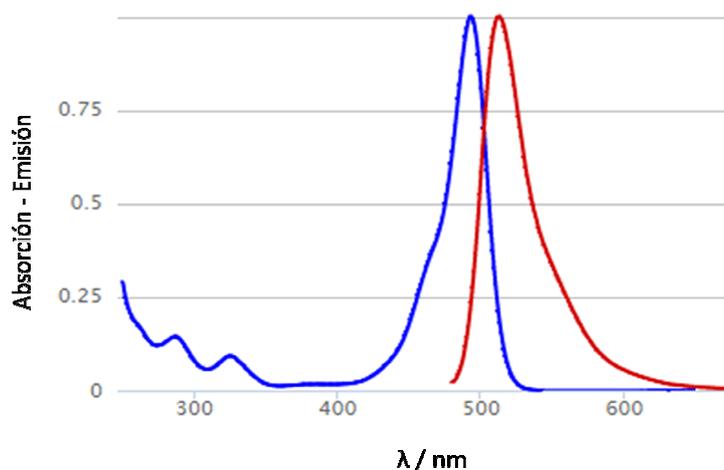


Figura 3: Espectro de excitación (azul) y de emisión (rojo) de la fluoresceína en NaOH 0.1M

Como se observa en **Figura 3**, la banda de emisión y excitación son simétricas. Además, de acuerdo al desplazamiento de Stokes previamente explicado, el máximo de emisión se encuentra a una λ mayor que el máximo de absorción.

Es importante señalar que, en la mayoría de las moléculas, la λ de emisión es independiente de la λ empleada para excitar a la molécula, si bien la intensidad de emisión decrece cuanto más lejana está la longitud de onda de excitación del valor óptimo, pudiendo llegar a ser prácticamente nula.

1.6. Instrumentación

Los instrumentos con los que se realizan las medidas, llamados espectrofluorímetros, constan de las siguientes partes⁴:

- Fuente de luz: Como fuente de excitación.
- Monocromador de excitación: Dado que la fuente suele proporcionar un espectro de emisión continua, el monocromador permite seleccionar la λ de excitación.
- Compartimento de muestra: donde se deposita la cubeta que contiene la muestra. Puede ser termostatzada o no según las medidas que se quieran realizar. El compartimento de muestra es diferente según el estado de la muestra (sólida o líquida) que se mida.
- Monocromador de emisión: Que en este caso sirve para determinar a qué longitud de onda se desea determinar la fluorescencia emitida.
- Detector: Encargado de "contar" el flujo de fotones emitido por la muestra a la λ seleccionada.

El equipo utilizado en la realización de este trabajo es un espectrofluorímetro *Edinburgh Instruments* modelo FLSP 920 con las siguientes características⁵:



Figura 4: Aspecto que presenta el espectrofluorímetro modelo FLSP 920

A continuación se describen, brevemente, las distintas partes que forman el espectrofluorímetro empleado y sus principales características:

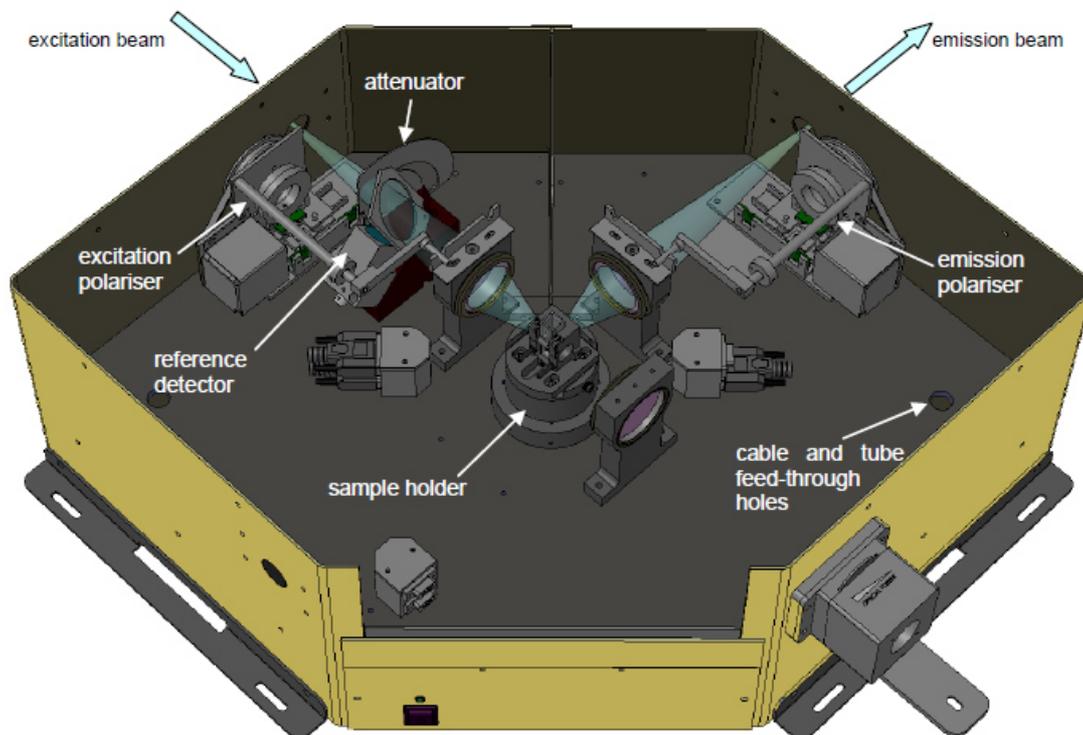


Figura 5: Vista superior de los distintos componentes del espectrofluorímetro FLSP 920

Fuente de radiación:

El equipo utilizado consta de una lámpara de arco de Xenon que tiene una potencia de 450W. Su rango espectral óptimo va desde 250-1000 nm. La lámpara produce luz "blanca" y sirve para realizar medidas tanto pulsadas como en continuo.

Monocromadores:

Este espectrofluorímetro consta de monocromadores simétricos del tipo Czerny-Turner. Estos monocromadores tienen dos cámaras: una cámara superior recubierta con pintura absorbente y equipada con deflectores que minimizan la luz dispersada por las superficies brillantes, y una cámara inferior que contiene los componentes mecánicos y eléctricos.

El monocromador de excitación tiene una única rejilla y dos puertos de entrada para dos lámparas, y un puerto de salida hacia el compartimento de muestra del espectrofluorímetro. Por su parte, el monocromador de emisión también tiene una única rejilla que está conectada al compartimento de muestra y dos salidas para poder ser conectado a dos detectores diferentes.

Compartimento de muestra:

Es una caja hexagonal que se subdivide en dos: la cámara de muestra propiamente dicha, situada en la parte superior, y una sección inferior que contiene la electrónica de control. En este espectrofluorímetro constituye la parte central.

Además, el compartimento de muestra consta de un atenuador. Esto es una hendidura horizontal de anchura variable que permite disminuir la cantidad de luz que llega a la muestra

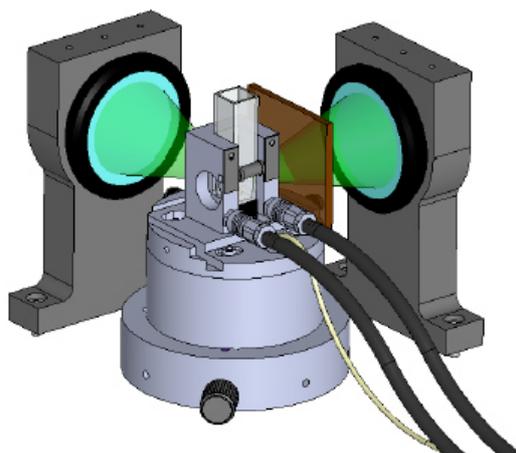


Figura 6: Compartimento de muestra para muestra líquidas con una cubeta rectangular.

Para la medida de muestras en disolución se utilizan cubetas rectangulares de 1 cm de paso óptico que están hechas de vidrio o de sílice. A diferencia de las cubetas para las medidas de absorción que tienen dos caras paralelas esmeriladas para facilitar su manejo, las cubetas utilizadas en fluorescencia tienen todas sus caras transparentes. Esto es debido a que las medidas de fluorescencia se realizan en un ángulo de 90° entre la fuente de radiación y el detector.

El hecho de que el monocromador de excitación y el monocromador de emisión tengan una disposición de 90° respecto al compartimento de muestra es debido a la λ de mayor emisión se selecciona con el monocromador de emisión. Si todos los componentes se encontrasen en línea recta llegaría al detector la radiación no absorbida por la muestra por lo que el espectro obtenido no sería el verdaderamente correspondiente a la muestra.

Detector:

El detector que incorpora este equipo es un detector fotomultiplicador de alta ganancia (PMT) y es adecuado tanto para medidas en estado estacionario (modo recuento de fotones) como para aplicaciones de tiempo resuelto; si bien, la máxima sensibilidad del detector fotomultiplicador se alcanza cuando éste opera en el modo de recuento de fotones.

Este detector fotomultiplicador consta de una ventana lateral con un rango espectral de 200-870 nm.

1.7. Rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto del número total de moléculas excitadas; o de otra forma, es la relación entre los fotones emitidos como fluorescencia respecto de los fotones absorbidos.

$$\phi = \frac{\text{fotones emitidos}}{\text{fotones absorbidos}} \quad \text{Ecuación 6}$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia se representa mediante la letra griega ϕ . Para moléculas altamente fluorescentes la eficacia cuántica se aproxima a la unidad, mientras que las especies que no presentan fluorescencia apreciable tienen una eficacia próxima a cero.

Para un compuesto dado, ϕ también se puede calcular a partir de las constantes de velocidad relativas de los procesos por los que el estado singlete excitado se desactiva. Estas relaciones se pueden expresar por la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ci} + k_{ce} + k_{cis}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde k_f es la constante de fluorescencia, k_{ci} la constante de conversión interna, k_{ce} la constante de la conversión externa y k_{cis} la constante del cruce intersistemas. Por tanto, el rendimiento cuántico de fluorescencia es una estimación de la probabilidad de emisión de fluorescencia de una molécula respecto de otros mecanismos no radiativos.

Actualmente la fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada como herramienta en investigación, análisis, control y diagnóstico en muchos campos de la física, química o medicina y el rendimiento cuántico de fluorescencia es el parámetro que permite evaluar y comparar cuantitativamente la fluorescencia de los diferentes compuestos, de ahí la importancia de su determinación.

1.7.1. Métodos para determinar rendimientos cuánticos de fluorescencia

Existen dos metodologías para la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia^{6,7,8,9}: el método absoluto y el método relativo o indirecto.

Mientras que el primero de ellos permite determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia tanto para especies en disolución como para compuestos en fase sólida, el segundo solo es aplicable para especies en disolución. El método absoluto carece de popularidad debido, principalmente al uso de metodologías e instrumentos con requerimientos tecnológicos altos lo que implica grandes inversiones económicas⁹. Por su parte, los métodos relativos son más accesibles, ya que requieren inversiones instrumentales bajas y se basan en el empleo de sustancias patrón con rendimientos cuánticos ampliamente estudiados y conocidos que se usan como referencia.

1.7.1.1. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia por el método absoluto

La determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia por el método absoluto tiene como objetivo determinar los valores del numerador y denominador de **Ecuación 6**.

La emisión de fluorescencia por parte de una especie no es un proceso polarizado, es decir, no se produce en un único sentido sino que la radiación se emite en todas direcciones. Por ello, medir la totalidad de fotones emitidos en fluorescencia implica la utilización de una *esfera de integración* que es un dispositivo diseñado para recoger la emisión de luz de la muestra desde todos los ángulos.

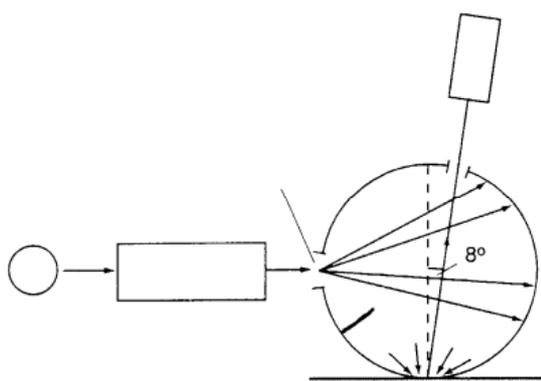


Figura 7: Esquema de una esfera integradora

La esfera integradora está formada por un material fluoropolimérico¹⁰ (Spectralon®) que se caracteriza por tener una alta reflectancia (reflectancia $\sim 95\%$). Esta propiedad hace que toda la luz que entra en la esfera tenga solo dos posibles caminos: la absorción por parte de la muestra o la recolección óptica por el detector del espectrofluorímetro. El número de fotones absorbidos por la muestra (por unidad de tiempo) se determina como la diferencia entre el número de fotones que emite la fuente de iluminación (lámpara) y el número de fotones que llega al detector (ya que los que no llegan es que han sido absorbidos por la muestra). Por su parte, los fotones emitidos son recolectados por la esfera integradora que los focaliza todos en una zona cercana al detector para su cuantificación.

En caso de aplicar esta metodología es necesario realizar una corrección espectral de los valores obtenidos con un blanco de reactivos (habitualmente se utiliza el disolvente).



Figura 8: Aspecto exterior que presenta una esfera integradora de radiación¹⁰ situada fuera de un espectrofluorímetro

1.7.1.2. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia por el método indirecto

La determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia por el método indirecto se basa en hacer una comparación de la emisión de fluorescencia de la muestra con materiales patrón cuyo rendimiento cuántico de fluorescencia es perfectamente conocido. Es la metodología más empleada en la actualidad por su sencillez y escasos requisitos tecnológicos.

El fundamento del método indirecto para determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia se basa en comparar la intensidad de luz emitida, medida como la integral del espectro de emisión, respecto a la absorbancia en el máximo de excitación para la muestra desconocida y para el patrón. Dicha relación es proporcional a la relación de los rendimientos cuánticos de ambos compuestos. Dado que el rendimiento cuántico del patrón es un parámetro conocido, a partir de él resulta sencillo conocer el rendimiento cuántico de la muestra analizada.

En el caso de un espectrofluorímetro sin esfera integradora, tan sólo una pequeña fracción de la luz emitida por la muestra alcanza el detector. Sin embargo, la luz que llega es proporcional a la luz emitida y, dado que el método utiliza la relación de intensidades entre el patrón y la muestra, suponiendo la constante de proporcionalidad similar en ambos casos, puede emplearse el espectro de emisión como estimación de la emisión de fluorescencia. Por su parte, la fracción de luz de excitación que absorbe la muestra se determina fácilmente a partir de la medida de la absorción a la λ de excitación con un espectrofotómetro.

Cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia por el Método Indirecto:

Tal como se comentó, el método indirecto para la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia se basa en que la fracción de luz emitida por la muestra y el patrón debe ser, cuantitativamente, la misma cuando ambos se han medido en las mismas condiciones de $\lambda_{\text{excitación}}$ y de apertura de las rendijas de los monocromadores de excitación y de emisión. Así, **Ecuación 6** puede reescribirse como:

$$\phi = \frac{[\alpha \cdot n^{\circ} \text{ fotones detectados}]}{[\beta \cdot \text{fracción de luz absorbida}]} \quad \text{Ecuación 8}$$

Siendo en **Ecuación 8** α y β constantes relacionadas con la fracción de luz emitida y la intensidad de la fuente de excitación a $\lambda_{\text{excitación}}$ respectivamente.

En **Ecuación 8** el número de fotones detectados es el área integrada bajo el espectro de emisión de fluorescencia y la fracción de luz absorbida se obtiene a partir de la medida de la absorbancia a la λ de excitación.

Por lo tanto, para una muestra (x) se puede escribir **Ecuación 8** como:

$$\phi_x = \frac{[\alpha \cdot I_{F_x}]}{[\beta \cdot A_x]} \quad \text{Ecuación 9}$$

Siendo I_{F_x} el área integrada bajo la curva del espectro de emisión de fluorescencia y A_x la fracción de luz absorbida por la muestra.

Para el caso de los patrones de referencia (s), aunque el rendimiento cuántico de fluorescencia sea conocido, se puede escribir una expresión similar:

$$\phi_s = \frac{[\alpha \cdot I_{F_s}]}{[\beta \cdot A_s]} \quad \text{Ecuación 10}$$

La comparación de las medidas de la muestra y del patrón se puede utilizar para estimar el rendimiento cuántico de fluorescencia dividiendo **Ecuación 9** entre **Ecuación 10**:

$$\frac{\phi_x}{\phi_s} = \frac{[I_{F_x}/A_x]}{[I_{F_s}/A_s]} \quad \text{Ecuación 11}$$

Así, las constantes α y β desaparecen. Por tanto, el rendimiento cuántico de fluorescencia para la muestra se calcula como:

$$\phi_x = \phi_s \cdot [I_{F_x}/I_{F_s}] \cdot [A_s/A_x] \quad \text{Ecuación 12}$$

Siendo todos los términos de esa ecuación conocidos (o determinables) a excepción de ϕ_x .

En **Ecuación 12** se asume que las medidas de las disoluciones x y s se realizan en idénticas condiciones de $\lambda_{\text{excitación}}$ y de apertura de las rendijas. Si para realizar dichas medidas se utilizan distintos disolventes, entonces, es necesario introducir en **Ecuación 12** un factor de corrección para indicar el efecto del índice de refracción en la cantidad de fluorescencia recogida por el detector del espectrofluorímetro. Por tanto, la ecuación general para la estimación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia por el método indirecto es:

$$\phi_x = \phi_s \cdot \left[\frac{I_{F_x}}{I_{F_s}} \right] \cdot \left[\frac{A_s}{A_x} \right] \cdot \left[\frac{n_x}{n_s} \right]^2 \quad \text{Ecuación 13}$$

Siendo n_x el índice de refracción de la disolución problema y n_s el del patrón. La corrección para las diferencias de índice de refracción de la muestra y del patrón puede llegar a ser bastante significativa en algunos casos.

Tal como se observa en **Ecuación 13**, el rendimiento cuántico de fluorescencia de una especie no depende de la concentración en que ésta se encuentre, pero sí es función (indirectamente) de la λ de excitación con la que se registre el espectro de emisión de fluorescencia. Por tanto, el rendimiento cuántico máximo de una especie es aquel que se determina a la λ máxima de excitación del compuesto en cuestión.

Desarrollo experimental del método indirecto

Para llevar a cabo la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de una especie por el método indirecto es necesario conocer los términos de **Ecuación 13**. El rendimiento cuántico del patrón y los índices de refracción de los disolventes son valores ya tabulados, por lo que solo hay que averiguar las absorbancias y las intensidades de emisión de fluorescencia del patrón y de la muestra. El requisito es que dichas medidas se realicen en las mismas condiciones de λ de excitación y de apertura de las rendijas de excitación y de emisión.

El procedimiento experimental que debe seguirse se resume a continuación:

- 1) Preparar una serie de disoluciones del patrón y de la muestra en un rango de concentraciones que no sature el detector del fluorímetro pero que tenga una absorbancia lo más cercana posible al intervalo de mínimo error.
- 2) Registrar el espectro de absorción de las disoluciones del patrón (si bien, de todo el espectro solamente interesa la absorción del patrón a su λ de excitación máxima y a λ máxima de excitación de la muestra).
- 3) Registrar el espectro de emisión de fluorescencia de las disoluciones del patrón excitando a λ máxima del propio patrón y a λ máxima de la muestra. Realizar las correspondientes integraciones del área bajo la curva del espectro de emisión de fluorescencia en cada caso.
- 4) Registrar el espectro de absorción de las disoluciones de la muestra (si bien, de todo el espectro solamente interesa la absorción de la muestra a su λ máxima de excitación).
- 5) Registrar el espectro de emisión de fluorescencia de las disoluciones de la muestra excitando a la λ máxima de la muestra. Realizar las correspondientes integraciones del área bajo la curva del espectro de emisión de fluorescencia en cada caso.

Es importante señalar que, a pesar de que el rendimiento cuántico de fluorescencia es independiente de la concentración de la especie, este factor es clave en el procedimiento experimental. Para determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia es necesario hacer medidas de absorción y de intensidad de fluorescencia. El problema que surge es que las medidas de fluorescencia son mucho más sensibles que las medidas de absorción. Esto se traduce en que, mientras que para realizar medidas adecuadas de absorción es necesario un determinado rango de concentración, la medida de esas mismas disoluciones en el espectrofluorímetro puede no ser correcta ya que las disoluciones pueden estar muy concentradas y provocar efectos de autoamortiguación o autoabsorción, como se indica en **1.4.6. Efecto de la concentración**. Al contrario, si el rango de concentraciones de las disoluciones es el óptimo para hacer las medidas de fluorescencia puede ocurrir que en las medidas de absorción apenas se detecte absorbancia por parte del compuesto puesto que

podría estarse midiendo por debajo del límite de detección. Por ello, un aspecto fundamental en el procedimiento experimental es encontrar un rango de concentraciones adecuado para poder realizar las medidas de absorción y de fluorescencia de manera correcta para ambas magnitudes.

Una vez obtenido los datos de absorbancia y de área bajo la curva del espectro de emisión de fluorescencia del patrón y de la muestra, la representación gráfica del área frente a la absorbancia debe dar como resultados sendas rectas cuya relación de pendientes se utiliza en el cálculo del rendimiento cuántico del analito.

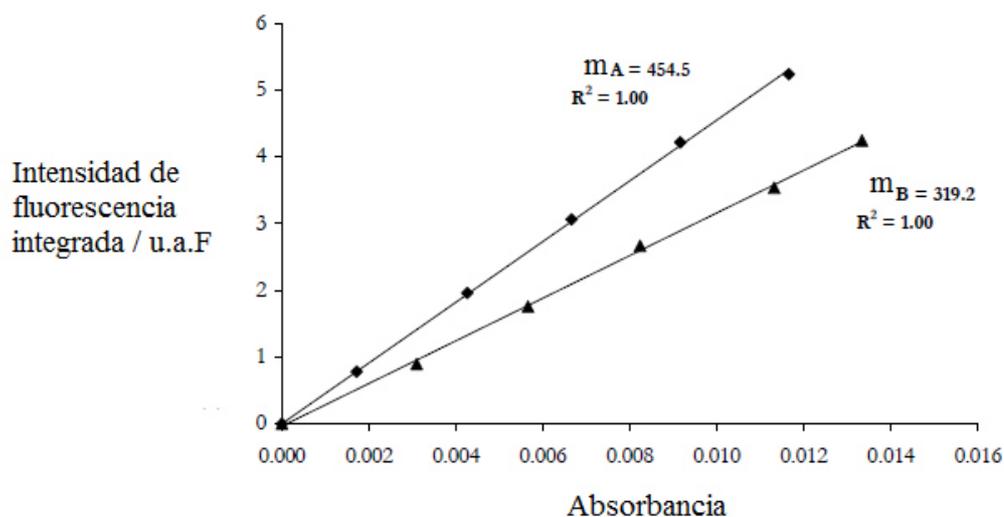


Figura 9: Representación gráfica hipotética de la intensidad de fluorescencia integrada frente a la absorbancia. Se observan sendas rectas para el patrón (A) y para la muestra (B)

El cálculo del rendimiento cuántico a partir de las pendientes del calibrado del patrón y de la muestra hace que **Ecuación 13** se convierta en:

$$\phi_x = \phi_s \cdot \left(\frac{m_x}{m_s}\right) \cdot \left(\frac{n_x}{n_s}\right)^2 \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde m_x y m_s son las pendientes de la representación del área de la emisión de fluorescencia frente a la absorbancia para la muestra y el patrón respectivamente.

1.8. Patrones de rendimiento cuántico conocido

Los patrones de rendimiento cuántico de los que se dispone son: quinina, fluoresceína, eosina, rodamina B y rodamina 6-G.

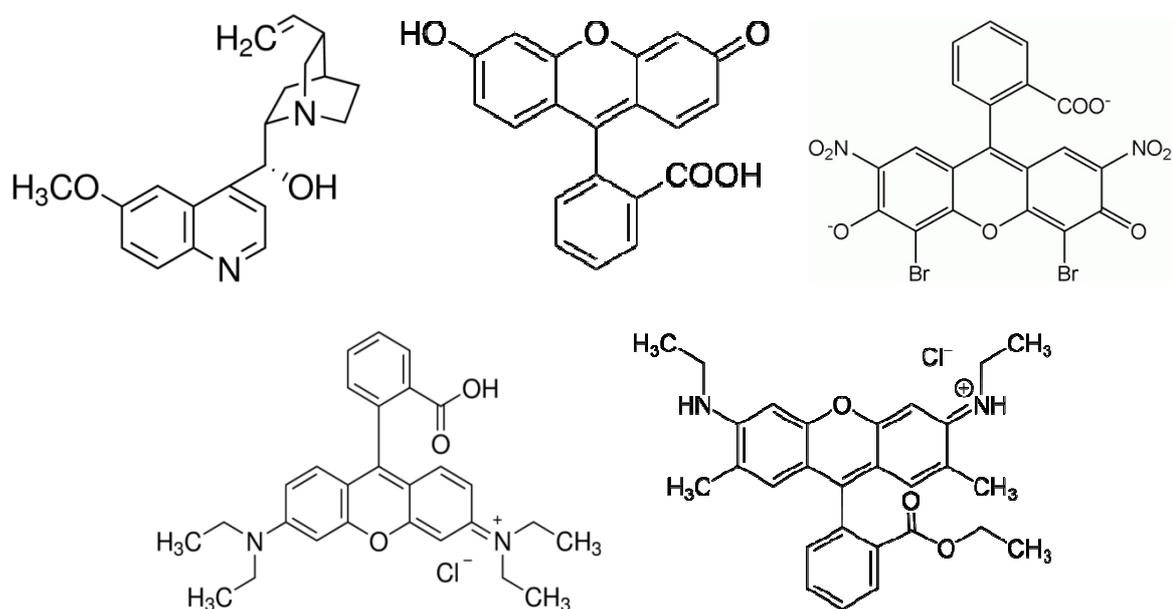


Figura 10: Estructura de los patrones de rendimiento cuántico disponibles para la realización del trabajo. [Fila superior]: quinina (izquierda), fluoresceína (centro), eosina (derecha). [Fila inferior]: rodamina B (izquierda) y rodamina 6-G (derecha)

La quinina es un alcaloide natural con importantes propiedades analgésicas, antipiréticas y antipalúdicas. Se utilizó como fármaco contra la malaria; si bien, actualmente hay otros tratamientos más efectivos para esta enfermedad. La quinina es el principal componente de una conocida bebida, la tónica, y es la responsable de su sabor amargo.

La fluoresceína es un colorante orgánico especialmente usado para detectar la presencia de cuerpos extraños en los ojos. Esta especie fue sintetizada por primera vez por Adolf von Bayer en 1905.

La eosina es un colorante ácido. Esta característica la hace especialmente útil como tinte celular (puesto que las células están cargadas negativamente); concretamente, tiñe los citoplasmas de color rojo-anaranjado y los eritrocitos con color rojo intenso. También se utiliza como tinte de la gasolina.

Las rodaminas se usan como colorantes y sus principales aplicaciones son en citometría de flujo y en ensayos ELISA.

El hecho de que la mayoría de los patrones se utilicen como colorantes es debido a los intensos colores que presentan. Se trata de sustancias muy fluorescentes y, por tanto, con altos rendimientos cuánticos de fluorescencia.

Los principales datos en lo que respecta a la fluorescencia se resumen a continuación.

Tabla 1: Patrones de rendimiento cuántico conocido disponibles junto con los disolventes en que se encuentran, sus λ de excitación y emisión máximas y el rendimiento cuántico de fluorescencia

Compuesto	Disolvente	λ máx. excitación / nm	λ máx. emisión / nm	ϕ
Quinina ¹¹	H ₂ SO ₄ 0.1M	345	450	0.55
Fluoresceína ¹²	NaOH 0.1M	489	514	0.92
Eosina ¹²	NaOH 0.1M	511	534	0.23
Rodamina 6-G ¹³	Etanol	529	554	0.95
Rodamina B ¹⁴	Etanol	555	580	0.70

1.9. Muestras a analizar

Se analizan cuatro muestras diferentes: tres cumarinas y la nafcilina.

1.9.1. Cumarinas

Las cumarinas son compuestos heterocíclicos oxigenados de la familia de las benzo(a)piranonas. Se han descrito más de mil especies naturales¹⁵ pertenecientes a esta familia puesto que se encuentran ampliamente distribuidas en los vegetales como constituyentes de muchas plantas y aceites esenciales.

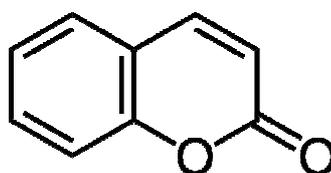


Figura 11: Estructura general de las cumarinas

A pesar de que algunas de ellas son tóxicas para los mamíferos (como es el caso de las aflatoxinas), las cumarinas más simples son menos tóxicas y presentan un amplio rango de acción farmacológica; así mismo, muchos derivados de la cumarina presentan importantes propiedades anticoagulantes.

Las cumarinas cuyo rendimiento cuántico se pretende determinar son: cumarina 153, cumarina 314 y cumarina 334.

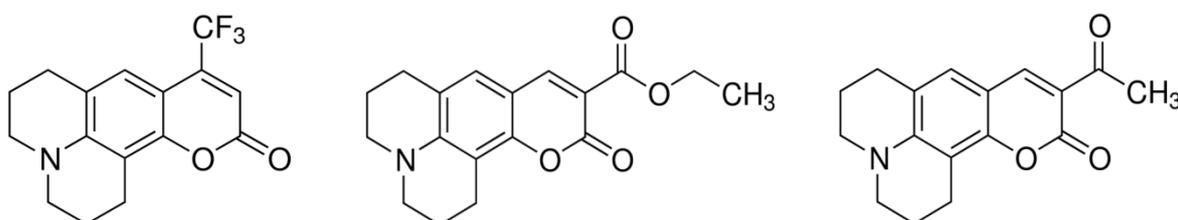


Figura 12: Estructura de las cumarinas utilizadas en la realización de este trabajo: cumarina 153 (izquierda), cumarina 314 (centro) y cumarina 334 (derecha)

En la siguiente tabla se recogen los datos más importantes (a nivel luminiscente) de estos tres compuestos.

Tabla 2: Datos más relevantes de las cumarinas analizadas para la realización de este trabajo: λ máxima de excitación, λ de emisión y rendimiento cuántico de fluorescencia

Compuesto	λ máx. excitación / nm	λ máx. emisión / nm	ϕ
Cumarina 153 ^{16,17}	422	532	0.54
Cumarina 314 ¹⁸	436	476	0.68
Cumarina 334 ¹⁸	445	475	0.60

1.9.2. Nafcilina

La nafcilina (6-(2-etoxi-1-naftamido) penicilina) es un antibiótico perteneciente a la familia de las β -lactamas. Es especialmente usado en el tratamiento de las bacterias estafilococos ya que es resistente a la mayoría de las β -lactamasas, enzimas que degradan a la mayoría de las β -lactamas confiriendo inmunidad al microorganismo.

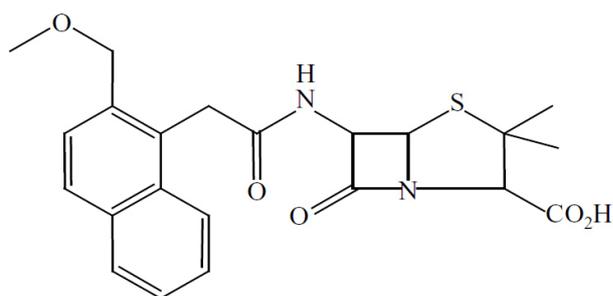


Figura 13: Estructura de la nafcilina

Muchos antibióticos β -lactámicos no exhiben propiedades fluorescentes, pero la nafcilina, tal como puede observarse en su estructura (**Figura 13**) tiene un grupo naftaleno en la sexta posición que actúa como luminóforo.

Este compuesto tiene como λ máxima excitación 324 nm¹⁹ y λ emisión 365 nm¹⁹. No se ha encontrado información bibliográfica sobre su rendimiento cuántico de fluorescencia.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia de una serie de sustancias: tres anticoagulantes (cumarinas) y un antibiótico (nafcilina).

Dado que la instrumentación disponible en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo (donde se desarrolla el procedimiento experimental) condiciona la metodología seguida puesto que el espectrofluorímetro disponible carece de *esfera integradora*, se determinará el rendimiento cuántico de fluorescencia por métodos indirectos, que requieren el conocimiento del rendimiento cuántico de un patrón. En primer lugar se determina el rendimiento cuántico de fluorescencia de tres analitos (cumarinas) cuyo valor está tabulado, con el fin de verificar la validez del método de análisis para, finalmente, aplicar este procedimiento en la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de una muestra (nafcilina).

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y disoluciones

Los patrones de rendimiento cuántico conocidos utilizados son: fluoresceína ($C_{20}H_{12}O_5$) y sulfato de quinina dihidrato ($C_{20}H_{24}N_4O_6 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$). Se utiliza NaOH en lentes y H_2SO_4 al 98 %. Los reactivos usados son de VWR Prolabo.

Se prepara NaOH 0.1M como disolvente para la fluoresceína y H_2SO_4 0.1M como disolvente para la quinina. Todas las disoluciones de quinina se preparan a partir de la dilución de un patrón $10^{-4}M$. Las disoluciones de fluoresceína se preparan cada día de que se utilicen²⁰ por dilución de un patrón $10^{-4}M$. Todas las disoluciones se preparan empleando agua destilada.

Las muestras cuyo rendimiento cuántico se pretende determinar son cumarinas 153, cumarina 314, cumarina 334 y nafcilina. Todas ellas son de Sigma-Aldrich.

Todas las disoluciones de cada cumarina se preparan a partir de la dilución de sendos patrones de concentración $10^{-3}M$ utilizando como disolvente etanol. Así mismo, para la nafcilina se prepara una disolución patrón de concentración $10^{-3}M$ en H_2SO_4 0.1M y a partir de ésta se hacen las correspondientes diluciones.

El compuesto que se utilizará como *quencher* (tal como se explica posteriormente) es KI de VWR Prolabo. Se prepara una disolución patrón de este compuesto de concentración $10^{-3}M$ de KI utilizando como disolvente H_2SO_4 0.1M

3.2. Instrumentación

Todas las medidas de fluorescencia que se realizan durante el desarrollo de este estudio se llevan a cabo con el espectrofluorímetro modelo FLSP 920 con lámpara de Xe y detector PMT instalado en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Las correspondientes medidas de absorción se efectúan con el espectrofotómetro modelo QL Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific situado en la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

3.2. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de las cumarinas

Mediante la aplicación del método indirecto, se determina el rendimiento cuántico de fluorescencia de tres cumarinas diferentes: Cumarina 153, Cumarina 314 y Cumarina 334, utilizando como patrón de rendimiento cuántico conocido la fluoresceína.

Para ello, es necesario registrar los espectros de emisión de fluorescencia del patrón a su λ máxima de excitación y a λ máxima de excitación de cada una de las cumarinas; así como los espectros de emisión de cada cumarina a sus respectivas λ máximas de excitación. También

hay que realizar los espectros de absorción del patrón y de las muestras con el fin de conocer la absorbancia a las mismas λ que las estudiadas para la fluorescencia.

3.2.1 Medida del patrón

Se hace un calibrado del patrón con disoluciones de fluoresceína en concentración $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-6}$, $4 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$ y $6 \cdot 10^{-6}$ M diluyendo el patrón madre de fluoresceína de concentración 10^{-4} M con NaOH 0.1M. De cada una de las disoluciones del calibrado se registran los espectros de emisión de fluorescencia de la fluoresceína a la λ máxima de excitación de la propia fluoresceína (489 nm) así como a la λ máxima de excitación de cada cumarina (422, 436 y 445 nm), entre los intervalos que figuran en **Tabla 3**. La apertura de las rendijas de excitación y de emisión es de 1 nm en ambas para todos los casos.

Tabla 3: Se indican las λ de excitación y los intervalos entre los que se registran los espectros de emisión de fluorescencia de las disoluciones del calibrado de fluoresceína.

Compuesto	$\lambda_{\text{excitación}} / \text{nm}$	Espectro emisión fluoresceína / nm
Fluoresceína ($\lambda_{\text{máx. fluoresceína}}$)	489	495 - 650
Fluoresceína ($\lambda_{\text{máx. Cumarina 153}}$)	422	425 - 650
Fluoresceína ($\lambda_{\text{máx. Cumarina 314}}$)	436	440 - 650
Fluoresceína ($\lambda_{\text{máx. Cumarina 334}}$)	445	450 - 650

También se registran los espectros de absorbancia de la fluoresceína de las disoluciones preparadas anteriormente en el calibrado en un intervalo entre 400-600 nm.

Es importante señalar que la medida de las disoluciones de fluoresceína debe realizarse el mismo día en que se prepare la disolución patrón madre ya que la fluoresceína es un compuesto que se degrada fácilmente expuesta a la luz y a temperatura ambiente²⁰.

3.2.2. Medida de las muestras

Se hace un calibrado de cada cumarina en concentraciones de $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-6}$, $4 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $6 \cdot 10^{-6}$ M diluyendo las correspondientes disoluciones patrón cada cumarina 10^{-3} M en etanol. A partir de las disoluciones del calibrado se registran los respectivos espectros de emisión de fluorescencia de cada cumarina excitando a $\lambda_{\text{máxima}}$ de cada cumarina y utilizando una apertura de las rendijas de excitación y de emisión de 1 nm para ambos monocromadores en todos los casos. El intervalo en el que se registra cada espectro de emisión es el que figura en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Se indican las λ máximas de excitación y los intervalos entre los que se registran los espectros de emisión de fluorescencia de las disoluciones del calibrado de cada cumarina.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx. excitación}} / \text{nm}$	Espectro _{emisión} / nm
Cumarina 153	422	425 - 650
Cumarina 314	436	440 - 650
Cumarina 334	445	450 - 650

Con las disoluciones del calibrado previamente preparadas, se registran los correspondientes espectros de absorbancia de cada cumarina en un intervalo comprendido entre 350-500 nm.

3.3. Determinación del rendimiento cuántico de la nafcilina

Se determina el rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el Método Indirecto utilizando como patrón de rendimiento cuántico conocido la quinina.

3.3.1. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método indirecto

Medida del patrón:

Se hace un calibrado del patrón con disoluciones de quinina en concentración $1 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$ y $1 \cdot 10^{-6}$ M diluyendo el patrón de quinina 10^{-4} M con H_2SO_4 0.1M. De cada una de las disoluciones del calibrado se registran los espectros de emisión de fluorescencia de la quinina a λ máxima de excitación de la propia quinina (345 nm) y a λ máxima de la nafcilina (324 nm) y en un intervalo de 350-600 nm para quinina a $\lambda_{345\text{nm}}$ y entre 330-600 nm para quinina $\lambda_{324\text{nm}}$. La apertura de las rendijas de excitación y de emisión es de 5 nm para ambos monocromadores en todos los casos.

También se registran los correspondientes espectros de absorción con las disoluciones de quinina preparadas anteriormente para el calibrado, entre 270-500nm.

Medida de la muestra:

Se hace un calibrado de la nafcilina en concentraciones de $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$ M diluyendo el patrón de nafcilina 10^{-3} M con H_2SO_4 0.1M. A partir de las disoluciones de nafcilina del calibrado se registran los respectivos espectros de emisión de la nafcilina excitando a $\lambda_{\text{máxima}}$ de la nafcilina (324 nm) y en un intervalo de 330-600nm. La apertura de las rendijas de excitación y emisión es de 5,5 nm respectivamente.

Con las disoluciones de nafcilina previamente preparadas para el calibrado, se registran los correspondientes espectros de absorción entre 320-350 nm.

3.3.2. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método de la variación de las rendijas

Medida del patrón:

Se hace un calibrado del patrón con disoluciones de quinina de concentración $1 \cdot 10^{-6}$; $5 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-5}$; $1,5 \cdot 10^{-5}$; $2 \cdot 10^{-5}$; $3 \cdot 10^{-5}$ M diluyendo el patrón de quinina 10^{-4} M con H_2SO_4 0.1M. De cada una de las disoluciones del calibrado se registran los espectros de emisión de fluorescencia de la quinina a λ máxima de la propia quinina (345 nm) y a λ máxima de la nafcilina (324 nm) y en un intervalo de 350-600 para quinina a λ_{345nm} y entre 330-600 nm para quinina λ_{324nm} . La apertura de las rendijas de excitación y de emisión es de 5,1 nm respectivamente.

También se registran los correspondientes espectros de absorción con las disoluciones de quinina preparadas anteriormente para el calibrado, en un intervalo entre 200-400nm.

Para realizar el ajuste de las rendijas en las medidas de quinina respecto de las rendijas utilizadas en las medidas de la nafcilina se prepara una disolución de quinina $1 \cdot 10^{-6}$ M (en H_2SO_4 0.1M) a partir de la disolución patrón madre de quinina de concentración 10^{-4} M. Manteniendo la rendija de excitación fija en 5, se registran espectros de emisión de fluorescencia variando las rendijas de emisión en: 1, 3, 4, 5, 6 y 7.

Medida de la muestra:

Se hace un calibrado de la nafcilina en concentraciones de $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$ M diluyendo el patrón de nafcilina 10^{-3} M con H_2SO_4 0.1M. A partir de las disoluciones de nafcilina del calibrado se registran los respectivos espectros de emisión de la nafcilina excitando a $\lambda_{m\acute{a}xima}$ de la nafcilina (324 nm) y en un intervalo de 330-600nm. La apertura de las rendijas de excitación y emisión es de 5 nm para ambos monocromadores.

Con las disoluciones de nafcilina previamente preparadas para el calibrado, se registran los correspondientes espectros de absorción entre 320-350 nm.

Para la aplicación del método son válidas las medidas tomadas en el experimento descrito en **3.3.1. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método indirecto** (medida de la muestra), ya que se requieren las mismas condiciones. Se utilizan, por tanto, los mismos datos sin volver a preparar ni medir de nuevo las disoluciones.

3.3.3. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método del *quenching*

Medida del patrón:

Se hace un calibrado del patrón con disoluciones de quinina en concentración $5 \cdot 10^{-7}$, $7.5 \cdot 10^{-7}$, $10 \cdot 10^{-7}$, $12.5 \cdot 10^{-7}$ y $15 \cdot 10^{-7}$ M diluyendo el patrón de quinina 10^{-4} M con H_2SO_4 0.1 M y añadiendo como *quencher* KI en concentración $5 \cdot 10^{-4}$; $7.5 \cdot 10^{-4}$; $10 \cdot 10^{-4}$; $12.5 \cdot 10^{-4}$; $15 \cdot 10^{-4}$ M respectivamente. Se registran los espectros de emisión a la λ máxima de excitación de la quinina (345 nm) y a λ máxima de excitación de la nafcilina (324 nm) y en un intervalo de 350-600 para quinina a λ_{345nm} y entre 330-600 nm para quinina λ_{324nm} . La apertura de las rendijas de excitación y de emisión es de 5,5 nm respectivamente.

También se registran los espectros de absorción de las disoluciones de quinina con KI preparadas para el calibrado, en un intervalo de 200-400 nm.

Medida de la muestra:

Se hace un calibrado de la nafcilina en concentraciones de $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$ M diluyendo el patrón de nafcilina 10^{-3} M con H_2SO_4 0.1M. A partir de las disoluciones de nafcilina del calibrado se registran los respectivos espectros de emisión de la nafcilina excitando a $\lambda_{m\acute{a}xima}$ de la nafcilina (324 nm) y en un intervalo de 330-600nm. La apertura de las rendijas de excitación y emisión es de 5,5 nm.

Con las disoluciones de nafcilina previamente preparadas para el calibrado, se registran los correspondientes espectros de absorción entre 320-350 nm.

Para la aplicación del método son válidas las medidas tomadas en el experimento descrito en **3.3.1. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método indirecto** (medida de la muestra), ya que se requieren las mismas condiciones. Se utilizan, por tanto, los mismos datos sin volver a preparar ni medir de nuevo las disoluciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Opción elegida para la realización de este trabajo

Dado que la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia por el método absoluto implica la medida de todos los fotones emitidos y absorbidos por la muestra y para ello es necesario que el espectrofluorímetro disponga de esfera integradora de radiación (tal como se explica en **1.7.1.1. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia por el método absoluto**), la opción "elegida" para la realización de este trabajo es la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia por métodos indirectos puesto que el equipo con que se realizan las medidas de fluorescencia carece de esfera integradora, lo que hace inviable poder desarrollar el experimento con la primera opción propuesta.

4.2. Elección de los patrones de rendimiento cuántico conocido

Los patrones de rendimiento cuántico conocido de los que se dispone son:

Tabla 5: Patrones de rendimiento cuántico conocido disponibles para la realización del presente estudio junto con los disolventes en que se encuentran y sus λ de excitación y emisión máximas.

Compuesto	Disolvente	$\lambda_{\text{máx. excitación}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{máx. emisión}} / \text{nm}$	ϕ
Quinina	H ₂ SO ₄ 0.1M	345	450	0.55
Fluoresceína	NaOH 0.1M	489	514	0.92
Eosina	NaOH 0.1M	511	534	0.23
Rodamina 6-G	Etanol	529	554	0.95
Rodamina B	Etanol	555	580	0.97

A su vez, los analitos cuyo rendimiento cuántico se pretende determinar son:

Tabla 6: Analitos utilizados en este trabajo de los que se pretende conocer su rendimiento cuántico de fluorescencia

Compuesto	Disolvente	$\lambda_{\text{máx. excitación}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{máx. emisión}} / \text{nm}$
Cumarina 153	Etanol	422	532
Cumarina 314	Etanol	436	476
Cumarina 334	Etanol	445	475
Nafcilina	H ₂ SO ₄	324	365

El rendimiento cuántico se determinará por el método indirecto, lo que hace necesario escoger para cada uno de los analitos un patrón de rendimiento cuántico conocido. El criterio seguido se basa en utilizar, en cada caso, el patrón cuya λ máxima de excitación sea lo más próxima a la λ máxima de excitación del analito. Por tanto, para la realización de este estudio, los patrones de rendimiento cuántico conocido que se utilizan son la fluoresceína y la quinina. La fluoresceína se utiliza en el caso de la determinación del rendimiento cuántico de las cumarinas ya que la λ de excitación de este grupo de compuestos oscila entre 422 y 445 nm y la λ de excitación de la fluoresceína es 489 nm. Para el caso de la nafcilina, se utiliza la quinina ya que la λ de este compuesto es de 345 nm y la de la muestra es de 324 nm.

El hecho de utilizar como criterio para la elección del patrón de rendimiento cuántico conocido la "cercanía" entre las λ de excitación máximas del patrón y de la muestra es con el fin de minimizar el error cometido en la medida del patrón a λ máxima de excitación de la muestra.

4.3. Determinación del rendimiento cuántico de las cumarinas

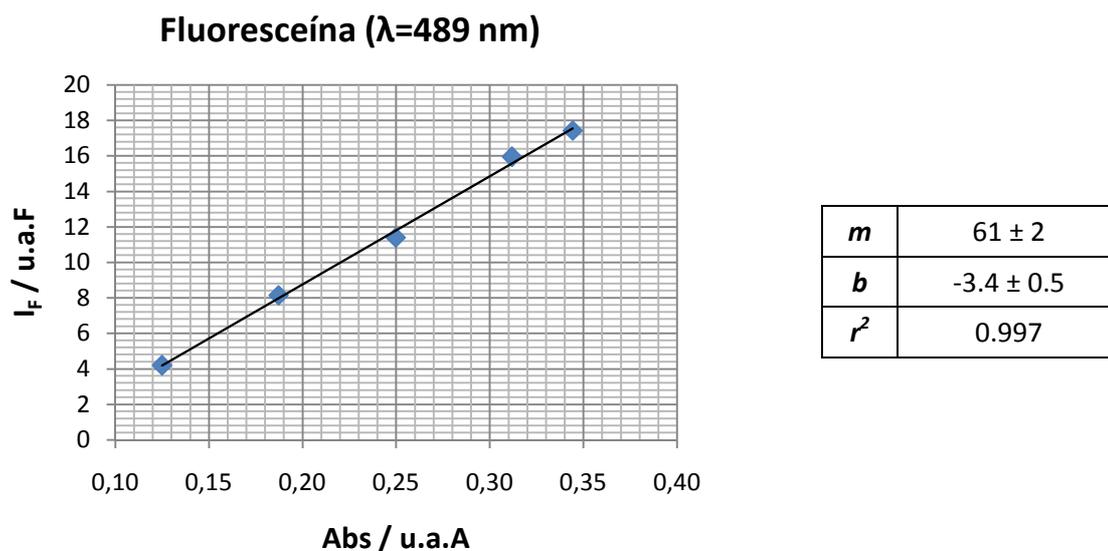
Una vez seleccionada la fluoresceína como patrón, el cálculo del rendimiento cuántico consta de dos etapas. En la primera de ellas se determina por el mismo método indirecto el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína a la λ máxima de cada cumarina, para lo que se hacen medidas de este compuesto a diferentes λ pero con la misma apertura de las rendijas. Conocido este último valor se realiza una nueva comparación entre el rendimiento cuántico de fluorescencia del patrón y de la muestra, los cuales sí han sido medidos en las mismas condiciones de λ y de apertura de rendijas de excitación y de emisión.

4.3.1. Determinación de la relación de la intensidad de fluorescencia frente a la absorción a λ máxima de la fluoresceína

A continuación se presentan los datos correspondientes a las medidas de fluorescencia (concretamente del área bajo la curva del espectro de emisión) y de absorbancia de las disoluciones de fluoresceína medidas a 489 nm que es la λ máxima de excitación de este compuesto. A esa λ , el rendimiento cuántico de este fluoróforo es de 0.92.

Tabla 7: Concentración de fluoresceína, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 489 nm y con una apertura de las rendijas de 1,1 nm.

Concentración / M	Abs ($\lambda=489$) / u.a.A	I_f ($\lambda=489$) / u.a.F
$1 \cdot 10^{-6}$	0.125	4.1971
$2 \cdot 10^{-6}$	0.187	8.1413
$3 \cdot 10^{-6}$	0.250	11.4000
$4 \cdot 10^{-6}$	0.312	15.9459
$5 \cdot 10^{-6}$	0.344	17.4337
$6 \cdot 10^{-6}$	0.349	19.7706



Gráfica 1: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la fluoresceína, excitando a 489 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 1,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta obtenida de **Gráfica 1** es:

$$I_F = 61 \cdot Abs + 3.4 \quad \text{Ecuación 15}$$

4.3.2. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína a otras λ

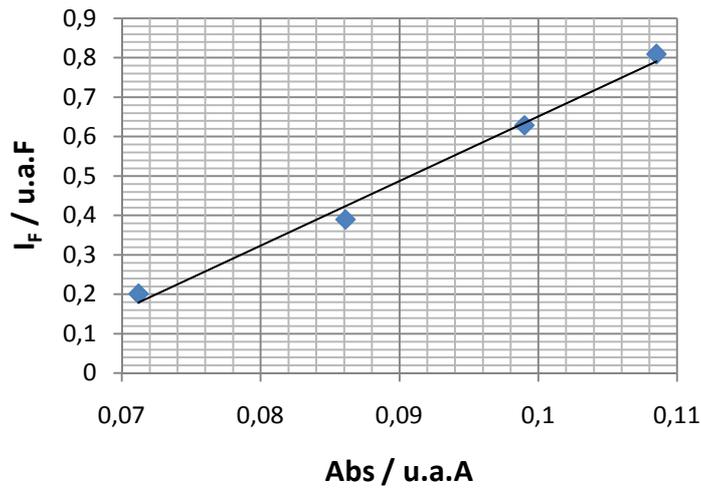
Conocido el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína en su máximo de excitación $\phi_{489}=0.92$, se procede a calcular el rendimiento cuántico de fluorescencia de este compuesto a otras λ distintas, correspondientes a las λ máximas de excitación de cada cumarina

Fluoresceína a la λ de excitación máxima de la cumarina 153, 422 nm:

Tabla 8: Concentración de fluoresceína, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 422 nm y con una apertura de las rendijas de 1,1 nm.

Concentración / M	Abs ($\lambda=422$) / u.a.A	I_F / ($\lambda=422$) / u.a.F
$1 \cdot 10^{-6}$	0.0712	0.2009
$2 \cdot 10^{-6}$	0.0861	0.3898
$3 \cdot 10^{-6}$	0.0990	0.6288
$4 \cdot 10^{-6}$	0.1085	0.8090
$5 \cdot 10^{-6}$	0.0869	0.9834
$6 \cdot 10^{-6}$	0.1133	1.1722

Fluoresceína ($\lambda=422$ nm)



<i>m</i>	16 ± 1
<i>b</i>	-1.0 ± 0.1
<i>r</i>²	0.997

Gráfica 2: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la fluoresceína, excitando a 422 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 1,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 2** es:

$$I_F = 16 \cdot Abs - 1.0 \quad \text{Ecuación 16}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína en su máximo de excitación (489 nm) es de 0.92, con las pendientes de las rectas de **Ecuación 15** y **Ecuación 16**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína a 422 nm es:

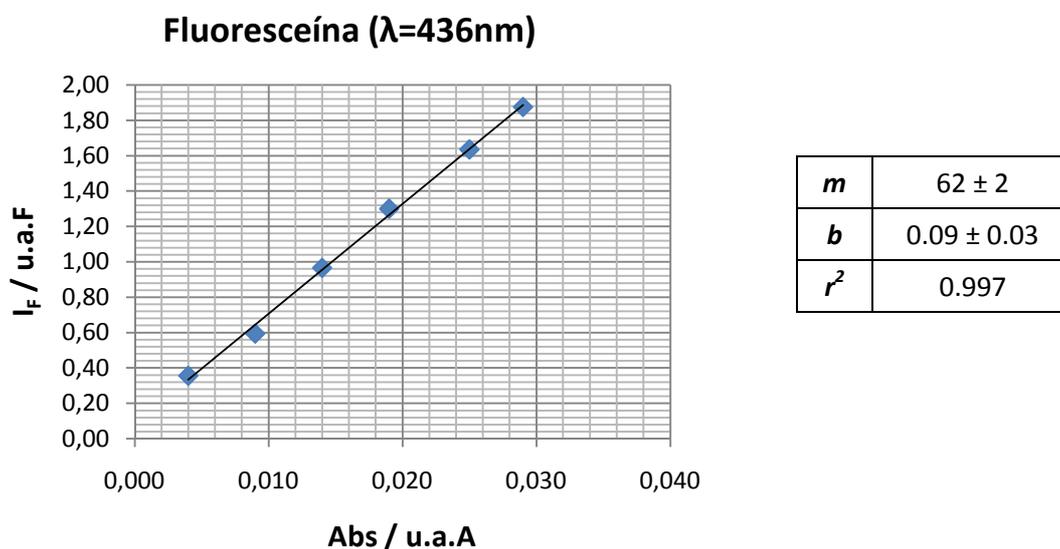
$$\phi_{422nm}^{fluor} (99\%): 0.25 \pm 0.07$$

$$\phi_{422nm}^{fluor} (95\%): 0.25 \pm 0.04$$

Fluoresceína a la λ de excitación máxima de la cumarina 314, 436 nm:

Tabla 9: Concentración de fluoresceína, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 436 nm y con una apertura de las rendijas de 1,1 nm.

Concentración / M	Abs ($\lambda=436$) / u.a.A	$I_f / (\lambda=436) / \text{u.a.F}$
$1 \cdot 10^{-6}$	0.004	0.3559
$2 \cdot 10^{-6}$	0.009	0.5935
$3 \cdot 10^{-6}$	0.014	0.9654
$4 \cdot 10^{-6}$	0.019	1.2999
$5 \cdot 10^{-6}$	0.025	1.6349
$6 \cdot 10^{-6}$	0.029	1.8748



Gráfica 3: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la fluoresceína, excitando a 436 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 1,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 3** es:

$$I_F = 62 \cdot \text{Abs} + 0.03 \quad \text{Ecuación 17}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína en su máximo de excitación (489 nm) es de 0.92, con las pendientes de **Ecuación 15** y **Ecuación 17**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína a 436 nm es:

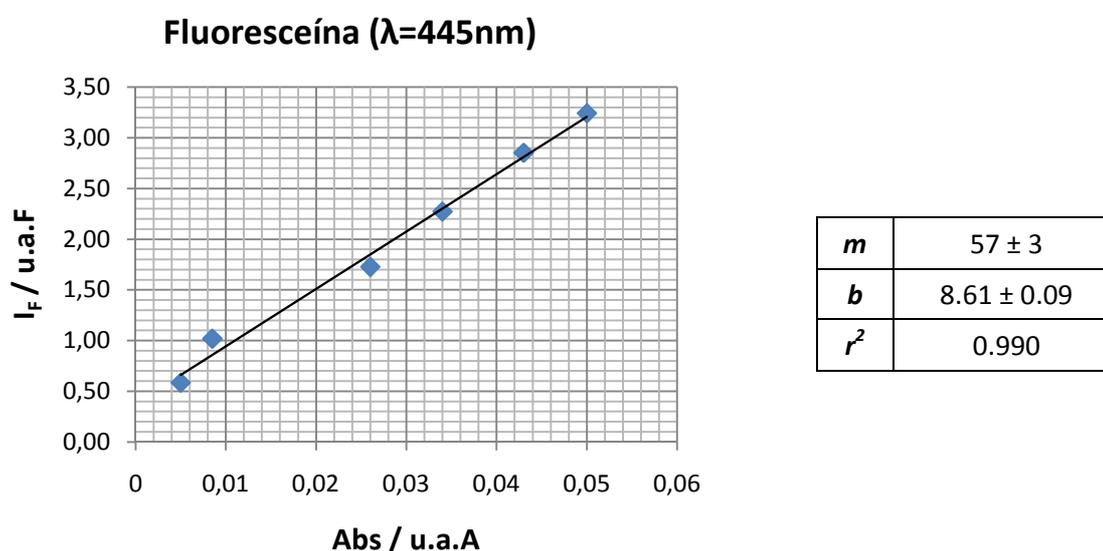
$$\phi_{436\text{nm}}^{\text{fluor}} (99\%): 0.93 \pm 0.10$$

$$\phi_{436\text{nm}}^{\text{fluor}} (95\%): 0.93 \pm 0.07$$

Fluoresceína a la λ de excitación máxima de la cumarina 334, 445 nm:

Tabla 10: Concentración de fluoresceína, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 445 nm y con una apertura de las rendijas de 1,1 nm.

Concentración / M	Abs ($\lambda=445$) / u.a.A	I_F ($\lambda=445$) / u.a.F
$1 \cdot 10^{-6}$	0.005	0.5852
$2 \cdot 10^{-6}$	0.009	1.0182
$3 \cdot 10^{-6}$	0.026	1.7262
$4 \cdot 10^{-6}$	0.034	2.2718
$5 \cdot 10^{-6}$	0.043	2.8505
$6 \cdot 10^{-6}$	0.050	3.2403



Gráfica 4: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorción de la fluoresceína, excitando a 445 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 1,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 4** es:

$$I_F = 57 \cdot \text{Abs} + 8.61 \quad \text{Ecuación 18}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína en su máximo de excitación (489 nm) es de 0.92, con las pendientes de **Ecuación 15** y **Ecuación 18**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína a 445 nm es:

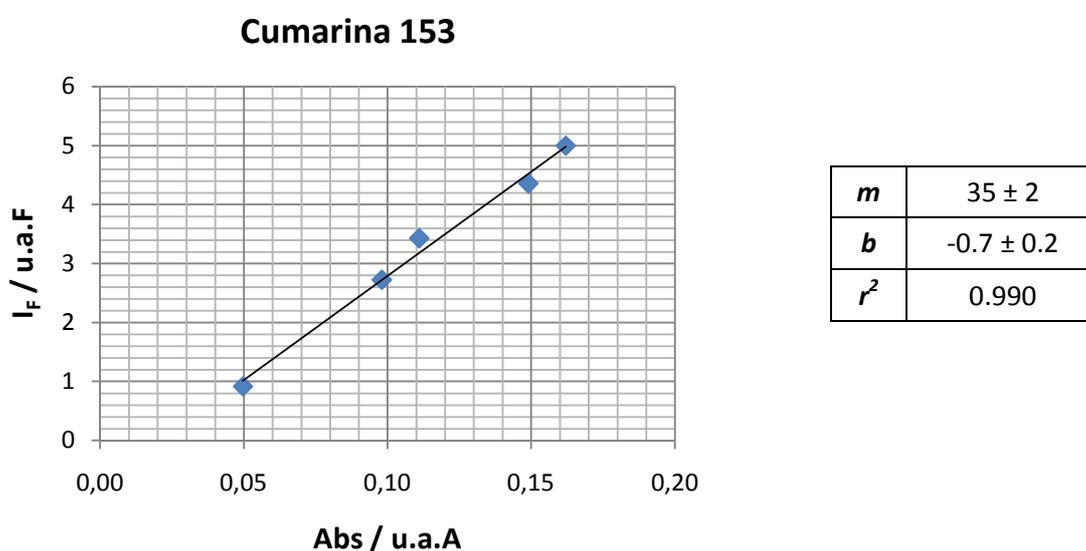
$$\phi_{445\text{nm}}^{\text{fluor}} (99\%): 0.85 \pm 0.16$$

$$\phi_{445\text{nm}}^{\text{fluor}} (95\%): 0.85 \pm 0.10$$

4.3.3. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 153, $\lambda_{exc}=422\text{ nm}$

Tabla 11: Concentración de cumarina 153, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 422 nm y con una apertura de las rendijas de 1,1 nm.

Concentración / M	Abs ($\lambda=422$) / u.a.A	$I_F / (\lambda=422) / \text{u.a.F}$
$1 \cdot 10^{-6}$	0.0497	0.9193
$2 \cdot 10^{-6}$	0.0838	1.8473
$3 \cdot 10^{-6}$	0.0980	2.7246
$4 \cdot 10^{-6}$	0.1110	3.4296
$5 \cdot 10^{-6}$	0.1490	4.3570
$6 \cdot 10^{-6}$	0.1620	4.9965



Gráfica 5: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la cumarina 153, excitando a 422 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 1,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 4** es:

$$I_F = 35 \cdot Abs - 0.7 \quad \text{Ecuación 19}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína en el máximo de excitación la cumarina 153 (422 nm) es de 0.25, con las pendientes de **Ecuación 16** y **Ecuación 19**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 153 es:

$$\phi_{422nm}^{Cu153} (99\%): 0.53 \pm 0.17$$

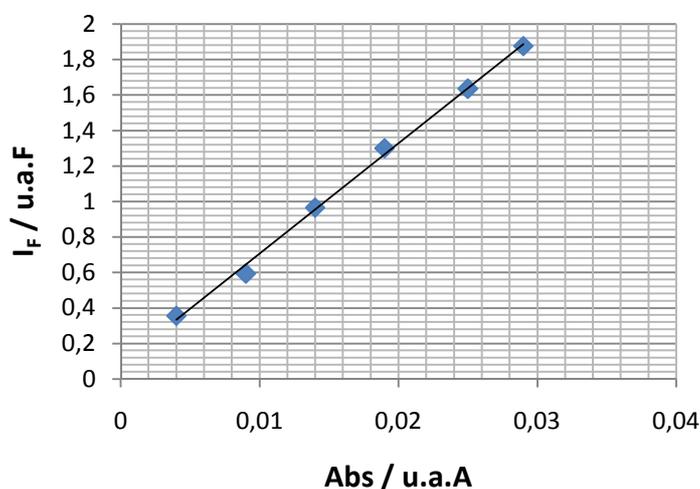
$$\phi_{422nm}^{Cu153} (95\%): 0.53 \pm 0.10$$

4.3.4. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 314, $\lambda_{exc}=436\text{nm}$

Tabla 12: Concentración de cumarina 314, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 436 nm y con una apertura de las rendijas de 1,1 nm.

Concentración / M	Abs ($\lambda=436$) / u.a.A	$I_f / (\lambda=436) / \text{u.a.F}$
$1 \cdot 10^{-6}$	0.004	0.3559
$2 \cdot 10^{-6}$	0.009	0.5935
$3 \cdot 10^{-6}$	0.014	0.9654
$4 \cdot 10^{-6}$	0.019	1.2999
$5 \cdot 10^{-6}$	0.025	1.6349
$6 \cdot 10^{-6}$	0.029	1.8748

Cumarina 314



Gráfica 6: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la cumarina 314, excitando a 436 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 1,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 6** es:

$$I_f = 62 \cdot Abs + 0,09 \quad \text{Ecuación 20}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína en el máximo de excitación la cumarina 314 (436 nm) es de 0.93, con las pendientes de **Ecuación 17** y **Ecuación 20**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 314 es:

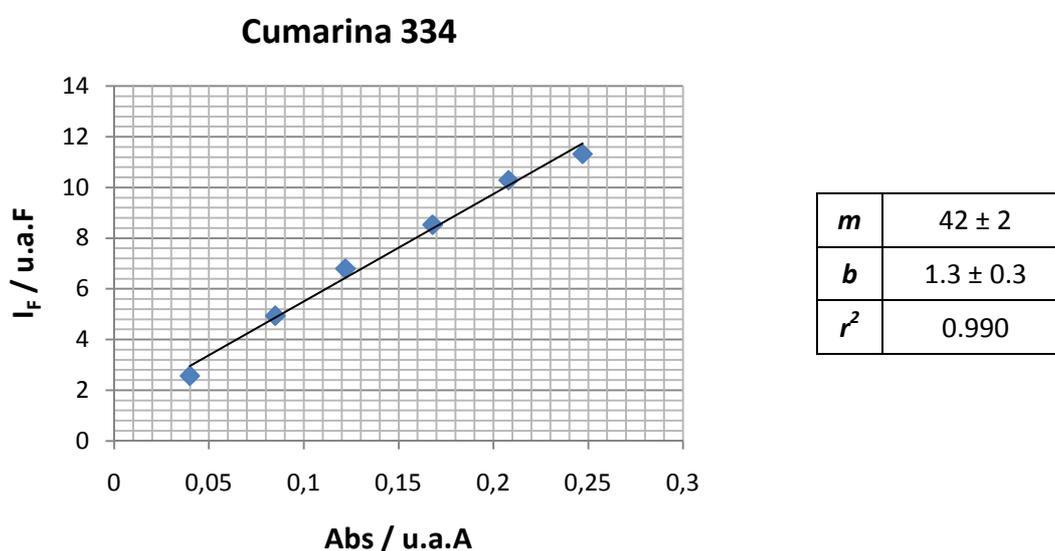
$$\phi_{436\text{nm}}^{Cu314} (99\%): 0.67 \pm 0.12$$

$$\phi_{436\text{nm}}^{Cu314} (95\%): 0.67 \pm 0.07$$

4.3.5. Rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 334, $\lambda_{exc}=445\text{nm}$

Tabla 13: Concentración de cumarina 334, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 445 nm y con una apertura de las rendijas de 1,1 nm.

Concentración / M	Abs ($\lambda=445$) / u.a.A	$I_F / (\lambda=445) / \text{u.a.F}$
$1 \cdot 10^{-6}$	0.040	2.5721
$2 \cdot 10^{-6}$	0.085	4.9401
$3 \cdot 10^{-6}$	0.122	6.7941
$4 \cdot 10^{-6}$	0.168	8.5285
$5 \cdot 10^{-6}$	0.208	10.2869
$6 \cdot 10^{-6}$	0.247	11.3143



Gráfica 7: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la cumarina 334, excitando a 445 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 1,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 7** es:

$$I_F = 42 \cdot Abs + 1.3 \quad \text{Ecuación 21}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fluoresceína en el máximo de excitación la cumarina 334 (445 nm) es de 0.85, con las pendientes de **Ecuación 18** y **Ecuación 21**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la cumarina 334 es:

$$\phi_{445\text{nm}}^{\text{Cu334}} (99\%): 0.64 \pm 0.14$$

$$\phi_{445\text{nm}}^{\text{Cu334}} (95\%): 0.64 \pm 0.10$$

4.3.6. Comparación de los valores obtenidos y de los tabulados

Dado que se conoce el valor real del rendimiento cuántico de las cumarinas estudiadas, se hace una comparación entre el valor obtenido y el valor encontrado en la bibliografía para validar la calidad del método utilizado en el análisis.

Tabla 14: Comparación entre el valor real, el valor experimental y de la diferencia entre ambos (calculada como % de error absoluto) de las cumarinas estudiadas.

Compuesto	ϕ real	ϕ experimental	% error
Cumarina 153	0.54	0.53	1.00
Cumarina 314	0.68	0.67	1.78
Cumarina 334	0.60	0.64	6.95

Como % de error cometido en el cálculo del rendimiento cuántico de la cumarinas es, en todos los casos, inferior al 7%, se confirma la validez del método indirecto para conocer el rendimiento cuántico de fluorescencia de los compuestos.

4.4. Determinación del rendimiento cuántico de la nafcilina

4.4.1. Método Indirecto

Se procede a determinar el rendimiento cuántico de la nafcilina de manera análoga a como se determina el rendimiento cuántico de las cumarinas.

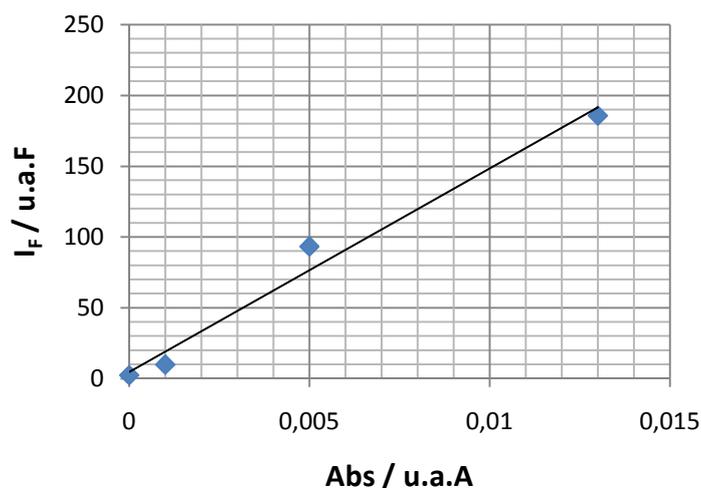
Al igual que en los casos anteriores, lo primero que se hace es registrar los correspondientes espectros de emisión de intensidad de fluorescencia del patrón (quinina) a su λ máxima de excitación (345 nm) y a la λ máxima de excitación de la nafcilina (324 nm) para conocer el rendimiento cuántico de la quinina a la λ de la nafcilina, ya que el valor está tabulado para $\lambda_{Exc} = 345$ nm que es la máxima.

Los datos obtenidos para la quinina excitando a 345 nm son:

Tabla 15: Concentración de la quinina, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 345 nm y con una apertura de las rendijas de 5,5 nm.

[Quinina] / M	Abs ($\lambda=345$) / u.a.A	I_f ($\lambda=345$) / u.a.F
$1.0 \cdot 10^{-8}$	0.000	2.4853
$5.0 \cdot 10^{-8}$	0.001	9.9552
$1.0 \cdot 10^{-7}$	0.003	19.7194
$5.0 \cdot 10^{-7}$	0.005	93.3801
$1.0 \cdot 10^{-6}$	0.013	185.697

Quinina ($\lambda=345$; R 5,5)



m	14379 ± 5210
b	5 ± 36
r^2	0.982

Gráfica 8: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la quinina, excitando a 345 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,5 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 8** es:

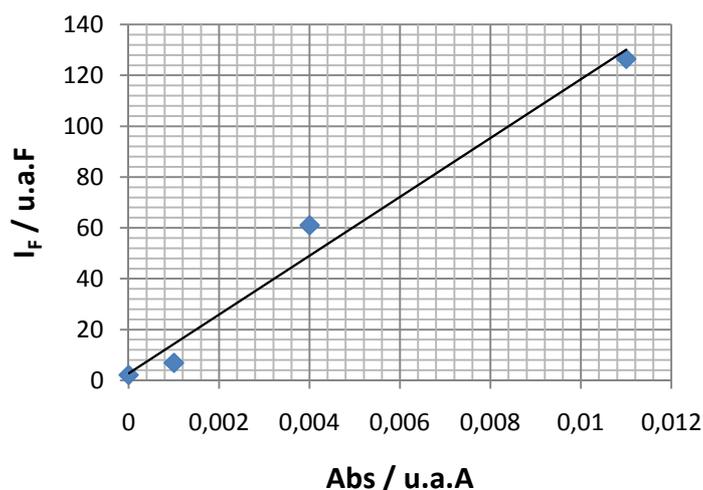
$$I_F = 14379 \cdot Abs + 5 \quad \text{Ecuación 22}$$

A continuación se presentan los datos obtenidos para las medidas de quinina a 324 nm:

Tabla 16: Concentración de la quinina, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad fluorescencia excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de 5,5 nm.

[Quinina] / M	Abs ($\lambda=324$) / u.a.A	I _F ($\lambda=324$) / u.a.F
$1.0 \cdot 10^{-8}$	0.000	2.0749
$5.0 \cdot 10^{-8}$	0.001	6.819
$1.0 \cdot 10^{-7}$	0.003	13.6535
$5.0 \cdot 10^{-7}$	0.004	60.9767
$1.0 \cdot 10^{-6}$	0.011	126.4491

Quinina ($\lambda=324$ nm; R 5,5)



m	11572 ± 4486
b	3 ± 26
r^2	0.979

Gráfica 9: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la quinina, excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,5 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 9** es:

$$I_F = 11572 \cdot Abs + 3 \quad \text{Ecuación 23}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la quinina en el máximo de excitación la quinina (345 nm) es de 0.55, con las pendientes de **Ecuación 22** y **Ecuación 23** y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de la quinina a 324 nm (que es el λ de excitación máxima de la nafcilina), con una apertura de las rendijas de excitación y de emisión de 5,5 es:

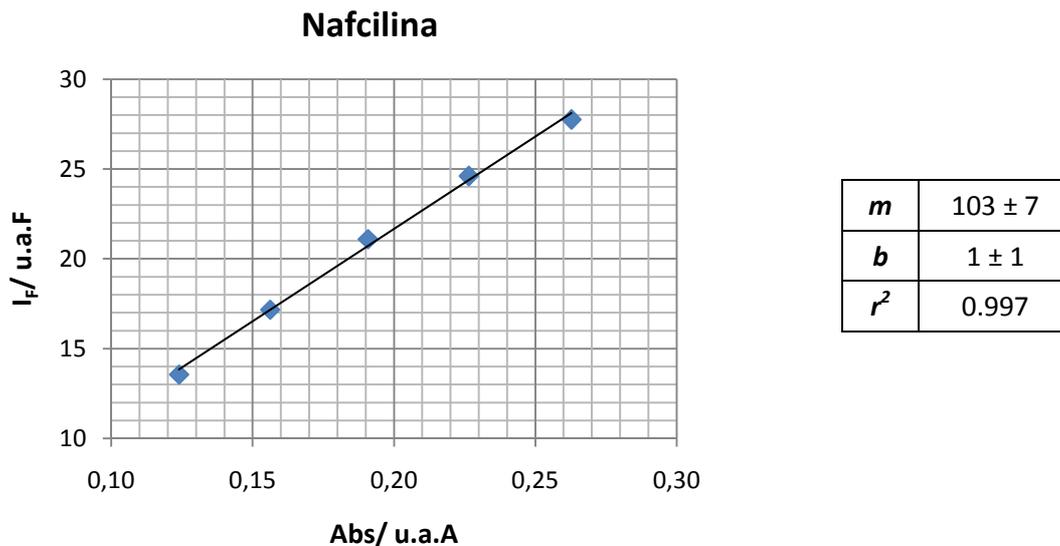
$$\phi_{324nm}^{quin} (99\%): 0.43 \pm 0.24$$

$$\phi_{324nm}^{quin} (95\%): 0.43 \pm 0.14$$

Conocido el rendimiento cuántico del patrón a λ máxima del analito, se procede a calcular el rendimiento cuántico de la muestra (nafcilina) que es el objetivo del presente trabajo. Para ello, se registran los correspondientes espectros de absorción y de intensidad de fluorescencia.

Tabla 17: Concentración de nafcilina, absorbancia y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 324nm y con una apertura de las rendijas de 5,5 nm.

[Nafcilina] / M	Abs / u.a.A	I_F / u.a.F
$3.0 \cdot 10^{-5}$	0.12400	13.5608
$4.0 \cdot 10^{-5}$	0.15622	17.1718
$5.0 \cdot 10^{-5}$	0.19087	21.0995
$6.0 \cdot 10^{-5}$	0.22648	24.6040
$7.0 \cdot 10^{-5}$	0.26275	27.7532



Gráfica 10: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la nafcilina, excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,5 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 10** es:

$$I_F = 103 \cdot Abs + 1 \quad \text{Ecuación 24}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la quinina en el máximo de excitación de la nafcilina (324nm) es de 0.43, con las pendientes de **Ecuación 23** y **Ecuación 24** en las que tanto el patrón como la muestra han sido medidos en las mismas condiciones de λ de excitación y de apertura de las rendijas; aplicando **Ecuación 14** se obtiene que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina es:

$$\phi_{324nm}^{nafci} (99\%): 0.0038 \pm 0.0015$$

$$\phi_{324nm}^{nafci} (95\%): 0.0038 \pm 0.0009$$

Del resultado obtenido se deduce que la muestra tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia muy inferior al del patrón utilizado. Además, en la determinación de este valor, las rectas obtenidas en **Gráfica 8** y **Gráfica 9** no presentan buenos coeficientes de correlación entre las variables (dichos coeficientes son inferiores a 0.99). Esto es debido a la dificultad de encontrar un intervalo de concentraciones para la quinina que no sature al fluorímetro cuando se utilizan rendijas de 5 nm en ambos monocromadores, pero que a su vez tengan una absorbancia determinable. Esta situación se plantea porque la quinina tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia muy superior al de la nafcilina. Mientras que el rango de concentraciones para la muestra es el adecuado tanto para las medidas de fluorescencia como para las medidas de absorción, no ocurre lo mismo para el caso del patrón. La medida de la intensidad de fluorescencia del patrón en las mismas condiciones que la muestra

(concretamente con la misma apertura de rendijas) sí proporciona unos resultados aceptables con las concentraciones de quinina estudiadas; si bien, las medidas de absorción son muy bajas. Por otra parte, la medida adecuada de la absorción de las disoluciones de quinina requeriría el uso de disoluciones más concentradas y esto, a su vez, provocaría que las medidas de fluorescencia de esas mismas disoluciones saturasen el detector del espectrofluorímetro (utilizando la misma apertura de rendijas que para las medidas de las disoluciones de la muestra). Por ello, se deciden buscar alternativas o modificaciones del método indirecto para la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de especies que tengan un rendimiento cuántico de fluorescencia muy inferior al del patrón utilizado.

4.4.2. Método de la variación de las rendijas

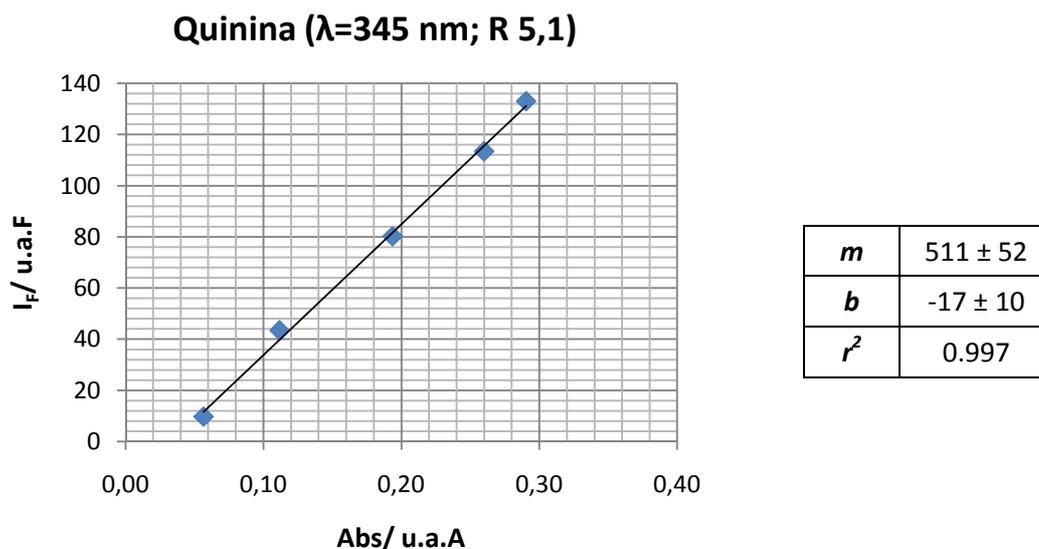
La primera alternativa propuesta se denomina "método de la variación de las rendijas". El objetivo de esta metodología es determinar el rendimiento cuántico sin necesidad de tener que emplear las mismas condiciones experimentales para el patrón y la muestra, refiriéndose esto, fundamentalmente, al tamaño de las rendijas. Para ello, manteniendo fija y común la apertura de la rendija del monocromador de excitación, se establece una relación entre la apertura de la rendija del monocromador de emisión y la intensidad de fluorescencia del patrón. Dicha relación servirá para conocer el factor por el que se debe multiplicar la intensidad de fluorescencia del patrón para que sea equivalente a la que se obtendría midiendo con las mismas rendijas con las que se mide la muestra.

Tras conocer dicho factor se calcula el rendimiento cuántico de fluorescencia del patrón a λ de excitación de la muestra y, finalmente, se calcula el rendimiento cuántico de la muestra conocido el rendimiento cuántico del patrón a λ de excitación del analito.

Los datos obtenidos para las medidas de quinina excitando a 345 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y de emisión de 5,1 nm respectivamente son:

Tabla 18: Concentración de la quinina, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 345nm y con una apertura de las rendijas de 5,1 nm.

[Quinina] / M	Abs ($\lambda=345$) / u.a.A	I _F ($\lambda=345$) / u.a.F
$1.0 \cdot 10^{-6}$	0.05663	9.7060
$5.0 \cdot 10^{-6}$	0.11168	43.4398
$1.0 \cdot 10^{-5}$	0.19373	80.2259
$1.5 \cdot 10^{-5}$	0.26008	113.4429
$2.0 \cdot 10^{-5}$	0.29051	133.0101



Gráfica 11: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la quinina, excitando a 345 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 11** es:

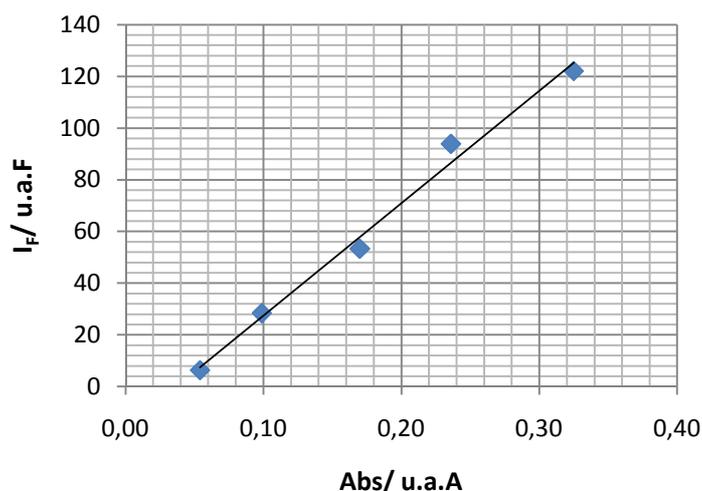
$$I_F = 511 \cdot Abs - 17 \quad \text{Ecuación 25}$$

A continuación se presentan los datos de las medidas de quinina excitando a 324 nm (λ máxima de excitación de la nafcilina) y con una apertura de las rendijas de 5,1 nm.

Tabla 19: Concentración de quinina, absorción máxima y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de 5,1 nm.

[Quinina] / M	Abs ($\lambda=324$) / u.a.A	I_F ($\lambda=324$) / u.a.F
$1.0 \cdot 10^{-6}$	0.05411	6.3098
$5.0 \cdot 10^{-6}$	0.09888	28.3562
$1.0 \cdot 10^{-5}$	0.16988	53.2919
$2.0 \cdot 10^{-5}$	0.23594	93.8925
$3.0 \cdot 10^{-5}$	0.32494	122.0231

Quinina ($\lambda=324$ nm; R 5,1)



m	435 ± 25
b	-16 ± 5
r^2	0.990

Gráfica 12: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la quinina, excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 12** es:

$$I_F = 435 \cdot Abs - 16 \quad \text{Ecuación 26}$$

Conocido el rendimiento cuántico de fluorescencia de la quinina (0.55) en el máximo de excitación la quinina (345 nm), con las pendientes de **Ecuación 25** y **Ecuación 26**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de la quinina a 324 nm (que es la λ de excitación máxima de la nafcilina) con una apertura de las rendijas de excitación y de emisión de 5,1 respectivamente, es:

$$\phi_{324nm}^{quin}(99\%) = 0.47 \pm 0.10$$

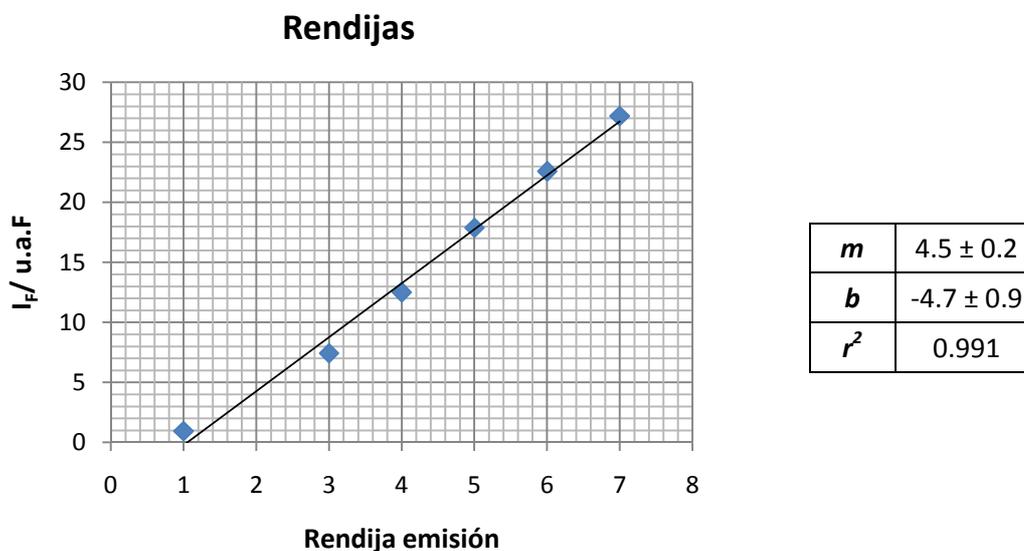
$$\phi_{324nm}^{quin}(95\%) = 0.47 \pm 0.06$$

A continuación, se realiza un estudio de la intensidad de fluorescencia de una disolución de concentración 10^{-6} M de quinina según cuál sea la apertura de la rendija de emisión.

Tabla 20: Intensidad de fluorescencia de quinina 10^{-6} M con la apertura de la rendija de emisión manteniendo la rendija de excitación fija en 5.

Rendija emisión	$I_F / u.a.F$
1	0.94049719
3	7.42888080
4	12.4976738
5	17.8823297
6	22.5712616
7	27.1866093

La representación gráfica de la apertura de las rendijas frente al área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia proporciona el siguiente resultado:



Gráfica 13: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la apertura de la rendija de emisión manteniendo fija la rendija de excitación en 1.

La ecuación de la recta de **Gráfica 13** es:

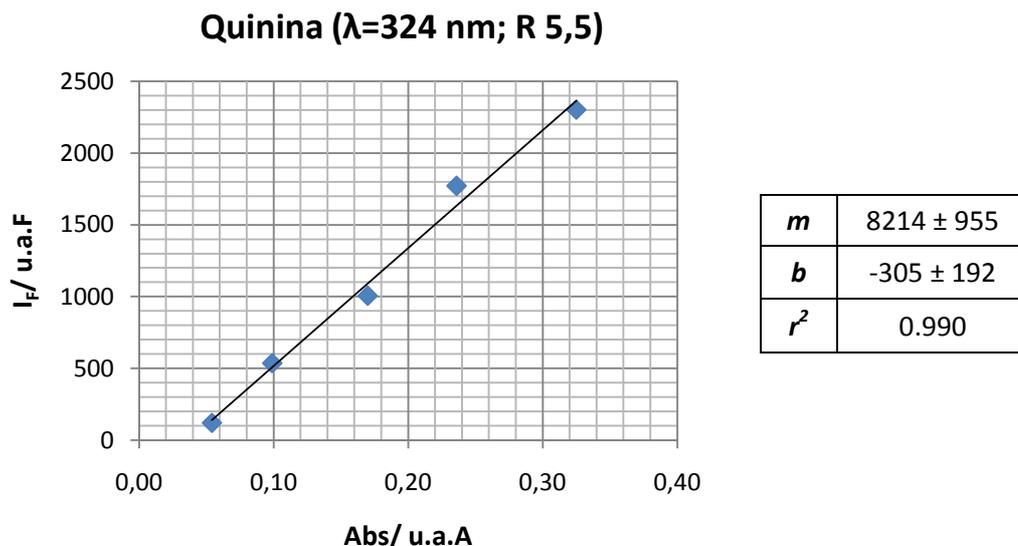
$$I_F = 4.5 \cdot \text{Rend}_{\text{emisión}} - 4.7 \quad \text{Ecuación 27}$$

Al sustituir en **Ecuación 27** la rendija de emisión con un valor de 5 (en el que se encuentra medida la nafcilina), se obtiene un resultado de 18.88. Éste es el factor por el que deben multiplicarse los valores de la intensidad de fluorescencia de la quinina excitando a 324 nm para que sean equivalentes a si las medidas se hubiesen realizado con una apertura de las rendijas de 5,5 que son las condiciones en las que se mide la muestra.

Por tanto, al multiplicar los datos de la intensidad de fluorescencia de la quinina excitada a 324 nm (**Tabla 19**) por el "factor de corrección" de 18.88 para que los valores de dicha intensidad de fluorescencia sea equivalente a si hubiese sido medida con una apertura de la rendija de emisión de 5 se presenta a continuación.

Tabla 21: Concentración de quinina, absorción y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia (multiplicada por el factor 18.88) excitando a 324nm

[Quinina] / M	Abs / u.a.A	I _F (corregida) / u.a.F
$1.0 \cdot 10^{-6}$	0.05411	119.060717
$5.0 \cdot 10^{-6}$	0.09888	535.058187
$1.0 \cdot 10^{-5}$	0.16988	1005.57426
$2.0 \cdot 10^{-5}$	0.23594	1771.67407
$3.0 \cdot 10^{-5}$	0.32494	2302.47527



Gráfica 14: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia (corregida) frente a la absorbancia de la quinina, excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión (apertura teórica) de 5,5 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 14** es:

$$I_F = 8214 \cdot Abs - 305 \quad \text{Ecuación 28}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la quinina en el máximo de excitación la nafcilina (324 nm) es de 0.47, con las pendientes de **Ecuación 24** y **Ecuación 28**, y aplicando **Ecuación 14**, se obtiene que el rendimiento cuántico de la nafcilina, determinado por el Método de las Rendijas es:

$$\phi_{324nm}^{nafc} (99\%): 0.0059 \pm 0.0013$$

$$\phi_{324nm}^{nafc} (95\%): 0.0059 \pm 0.0008$$

4.4.3. Método del quenching

La segunda alternativa propuesta se denomina "método del quenching" y se basa en disminuir la intensidad de fluorescencia del patrón utilizado por adición de una especie que disminuya su fluorescencia (*quenching*). En este caso, se selecciona KI como reactivo ya que su poder desactivante de la fluorescencia está ampliamente descrito²¹. En el caso de los haluros de potasio la efectividad del *quencher* es mayor cuanto más pesado sea el anión de la sal: así, se consigue mucho mayor *quenching* utilizando KI que KF, gracias al efecto del átomo pesado que indica que la disminución de la fluorescencia se ve favorecida cuando hay átomos grandes.

Al disminuir la intensidad de fluorescencia del patrón se consigue que la diferencia entre el rendimiento cuántico del patrón y de la muestra sea mucho menor de tal forma que se soluciona el problema de encontrar un rango de concentraciones adecuado para poder medir en las mismas condiciones (de apertura de rendijas) tanto el patrón como la muestra.

La metodología tras la interacción con el *quencher* es muy similar al método indirecto: se determina el rendimiento cuántico del patrón desactivado a partir del patrón sin *quencher*. Conocido el rendimiento cuántico del patrón desactivado a la λ máxima del patrón se calcula el rendimiento cuántico del patrón desactivado a λ máxima de la muestra y, a partir de éste, se calcula el rendimiento cuántico de la muestra. Es muy importante señalar que en el método del *quenching* de la fluorescencia todas las medidas (tanto del patrón como de la muestra) se realizan en las mismas condiciones de λ y de apertura de rendijas.

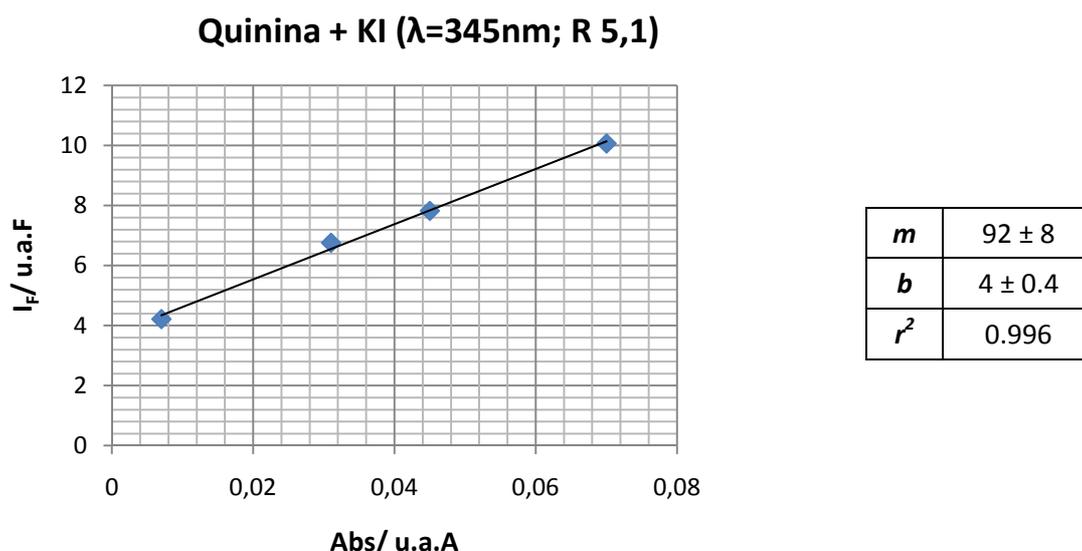
Para el cálculo del rendimiento cuántico del complejo se toma como patrón la quinina medida a 345 nm y con una apertura de las rendijas de 5,1 (ver **Tabla 18** y **Gráfica 11**).

A continuación se presentan los datos de absorción e intensidad de fluorescencia del complejo excitando a 345 nm.

Es importante aclarar que, en todos los casos, la concentración de quencher utilizada es tres órdenes de magnitud superior a la concentración de quinina utilizada en cada caso.

Tabla 22: Concentración de la especie formada por quinina y KI, absorción y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 345 nm y con una apertura de las rendijas de 5,1.

[Quinina + KI] / M	Abs / u.a.A	I_F / u.a.F
$5.0 \cdot 10^{-7}$	0.007	4.2189
$7.5 \cdot 10^{-7}$	0.015	5.6108
$10.0 \cdot 10^{-7}$	0.031	6.7587
$12.5 \cdot 10^{-7}$	0.045	7.8226
$15.0 \cdot 10^{-7}$	0.070	10.0653



Gráfica 15: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la quinina desactivada por KI, excitando a 345 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 15** es:

$$I_F = 92 \cdot Abs + 4 \quad \text{Ecuación 29}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de la quinina en su máximo de excitación (345 nm) es 0.55, con las pendientes de **Ecuación 25** y **Ecuación 29**, y utilizando **Ecuación 14**, se obtiene un rendimiento cuántico para el complejo a 345 nm de:

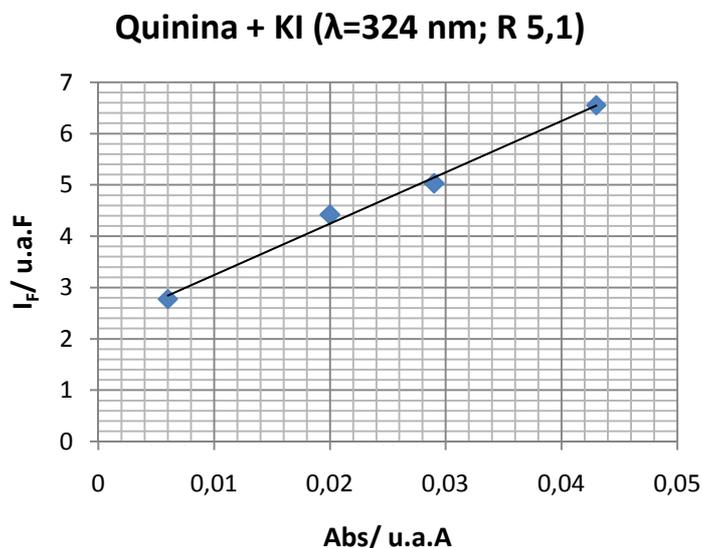
$$\phi_{345nm}^{quin desact} (99\%): 0.10 \pm 0.02$$

$$\phi_{345nm}^{quin desact} (95\%): 0.10 \pm 0.01$$

Conocido el rendimiento cuántico del complejo a 345 nm se procede a calcular el rendimiento cuántico del mismo pero a 324 nm.

Tabla 23: Concentración de la especie formada por quinina + KI, absorbancia y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de 5,1.

[Quinina + KI] / M	Abs / u.a.A	I _F / u.a.F
5.0·10 ⁻⁷	0.006	2.7764
7.5·10 ⁻⁷	0.008	3.7617
10.0·10 ⁻⁷	0.020	4.4209
12.5·10 ⁻⁷	0.029	5.0307
15.0·10 ⁻⁷	0.043	6.5504



Gráfica 16: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la quinina desactivada por KI, excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,1 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 16** es:

$$I_F = 100 \cdot Abs + 2 \quad \text{Ecuación 30}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de la quinina desactivada por KI en el máximo de excitación de la quinina (345 nm) es 0.10, con las pendientes de **Ecuación 29** y **Ecuación 30**, y utilizando **Ecuación 14**, se obtiene un rendimiento cuántico para el complejo a 324 nm de:

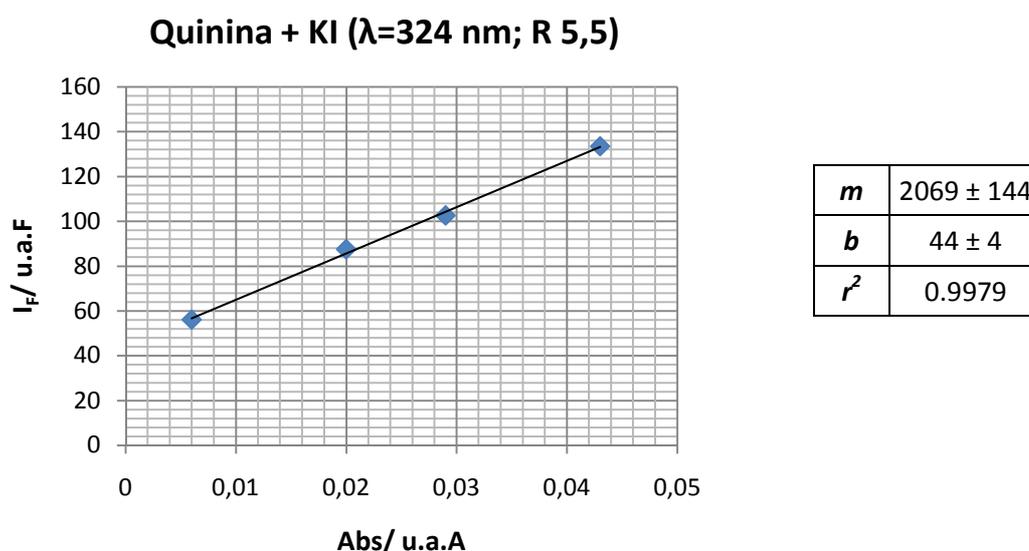
$$\phi_{324 \text{ nm}}^{\text{quin desact}} (99\%): 0.11 \pm 0.03$$

$$\phi_{324 \text{ nm}}^{\text{quin desact}} (95\%): 0.11 \pm 0.02$$

Finalmente, las medidas del complejo excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de 5,5 permiten calcular el rendimiento cuántico de la nafcilina.

Tabla 24: Concentración de la especie formada por quinina+KI, absorbancia y área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de 5,5.

[Quinina + KI] / M	Abs / u.a.A	I _F / u.a.F
5.0·10 ⁻⁷	0.006	56.0586
7.5·10 ⁻⁷	0.008	78.5431
10.0·10 ⁻⁷	0.020	87.4980
12.5·10 ⁻⁷	0.029	102.6024
15.0·10 ⁻⁷	0.043	133.5013



Gráfica 17: Área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia frente a la absorbancia de la quinina desactivada por KI, excitando a 324 nm y con una apertura de las rendijas de excitación y emisión de 5,5 nm respectivamente.

La ecuación de la recta de **Gráfica 17** es:

$$I_F = 2069 \cdot Abs + 44 \quad \text{Ecuación 31}$$

Sabiendo que el rendimiento cuántico de la quinina desactivada por KI en el máximo de excitación de la nafcilina (324 nm) es 0.11, con las pendientes de **Ecuación 24** y **Ecuación 31** y utilizando **Ecuación 14**, se obtiene un rendimiento cuántico para la nafcilina, determinado por el método del *quenching*, de:

$$\Phi_{324nm}^{nafci} (99\%): 0.0054 \pm 0.0009$$

$$\Phi_{324nm}^{nafci} (95\%): 0.0054 \pm 0.0005$$

4.4.4. Comparación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos en los tres métodos utilizados

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por los tres métodos utilizados.

Tabla 25: Comparación del valor obtenido en el rendimiento cuántico de fluorescencia de la nafcilina por el método indirecto, por el método de la variación de las rendijas y por el método del *quenching* y sus correspondientes errores a 99% y 95% de confianza

	Φ nafcilina	Error (99% confianza)	Error (95% confianza)
Método Indirecto	0.0038	0.0020	0.0009
Método de la variación de las rendijas	0.0059	0.0010	0.0008
Método del <i>Quenching</i>	0.0054	0.0009	0.0005

Como puede verse en **Tabla 25**, el método que genera el mayor error es el método indirecto aplicado tal y como está descrito en la bibliografía sin ninguna modificación. Sin embargo, las modificaciones del método propuestas en este trabajo logran disminuir el error a la mitad, o incluso a menos de la mitad en el caso del método del *quenching*.

5. CONCLUSIONES

Mediante la determinación del rendimiento cuántico de tres cumarinas se comprueba que el método elegido (método indirecto) funciona correctamente y proporciona buenos resultados con errores inferiores al 10% para los compuestos en los que el rendimiento cuántico de fluorescencia del patrón y de la muestra es del mismo orden de magnitud, como ocurre con las cumarinas con la fluoresceína.

Para el caso de la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de especies poco fluorescentes (y que, por ende, tienen un rendimiento cuántico de fluorescencia muy inferior al del patrón utilizado) el método indirecto resulta bastante ineficaz y tedioso. Por ello se proponen dos modificaciones: realizar las medidas del patrón y de la muestra utilizando diferente apertura de las rendijas de emisión y estableciendo, posteriormente, una relación entre las rendijas de emisión y la intensidad de fluorescencia del patrón y de la muestra; o disminuir la intensidad de fluorescencia del patrón mediante la adición de un *quencher*.

El método de las rendijas aumenta la tarea experimental de la determinación del rendimiento cuántico, puesto que requiere la calibración de la intensidad de fluorescencia frente al tamaño de las rendijas además de las medidas de absorción y fluorescencia del patrón y la muestra empleadas en el método. Sin embargo, esta técnica permite reducir el error experimental a la mitad.

Por su parte, el método del *quenching*, también resulta más laborioso que el método indirecto original, pero presenta dos ventajas fundamentales con respecto al método de las rendijas: el error es aún menor que el obtenido por dicho método y resulta más fácil regular la intensidad de fluorescencia que debe tener el patrón, dado que se consigue con la simple adición de un reactivo.

Por tanto, como conclusión final, se puede establecer que para especies que tienen un rendimiento cuántico similar al del patrón utilizado se puede aplicar el método indirecto, mientras que para el caso de compuestos poco fluorescentes en los que el rendimiento cuántico de la muestra difiere sensiblemente del rendimiento cuántico del patrón, resulta mucho más adecuado aplicar el método del *quenching*.

6. BIBLIOGRAFÍA, PUBLICACIONES Y RECURSOS WEB

Bibliografía:

D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman *"Principios de Análisis Instrumental"* 5ª ed. Editorial McWraw-Hill, 1992

E. D. Olsen *"Métodos ópticos de análisis"* Editorial Reverté, 1990

J. D. Ingle, S. R. Crouch *"Spectrochemical Analysis"* Editorial Prentice Hall, 1988

Publicaciones:

¹ J. R. Lacowicz *"Principles of Fluorescence Spectroscopy"* Springer, **1999**, 3-5

² A. Fernández-Gutiérrez *"De Monardes y Sweet a la bioanalítica"* Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas Naturales" **2011**

³ G.G. Stokes *"On the change of the refrangibility of light"*, Philosophical Transactions, **1852**, Vol. 142, 463-562

⁴ M. M. Santamaría-Solves *"Calibración de un espectrofluorímetro multi-funcional para la medida de la evaluación (visual) de colores fluorescentes"* Trabajo Fin de Máster en Optometría Avanzada y Ciencias de la Visión, **2010**

⁵ Edinburgh Photonics Instrument *"FLSP 920 Series User Guide"*, **2012**

⁶ A. Parker, W. T. Trees *"Correction of fluorescence spectral measurement of fluorescence quantum efficiency"*, **1960**, Vol. 85, 587-600

⁷ J. Yvon *"A guide to recording fluorescence quantum yields"* Horiba

⁸ Nanoco Technologies *"Protocol for fluorescence quantum yield determination"*, **2008**

⁹ D. M. Alzate, R. Rodríguez, C. A. Sierra *"Rendimiento cuántico de fluorescencia en sistemas fenilvinildieno"* Revista colombiana de Química, **2010**, Vol. 39, 309-319

¹⁰ Horiba *"Manual F-3029 Integrating Sphere"* Quanta-φ review, **2010**

¹¹ W. H. Melhuish *"New Directions in Molecular Luminescence"* Journal of Science and technology, **1955**, Vol. 37, 142

¹² G. Weber, F. W. J. Teale *"Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions"* Transactions of the Faraday Society, **1957**, Vol 53, 646-655

¹³ M. Grabolle, M. Spieles *"Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties"*, Analytical Chemistry, **2009**, Vol. 81, 6285-6294

- ¹⁴ B. Reija-Outero "*Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*" Tesis doctoral Universidad de Santiago de Compostela, **2007**
- ¹⁵ S. Martín-Aragón Álvarez "*Cumarinas en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad*" Tesis Doctoral Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, **1994**
- ¹⁶ K. Rurack, M. Spieles "*Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600–1000 nm*" Analytical Chemistry, **2011** Vol. 83, 1232-1242
- ¹⁷ K. Dobežk, J. Karolczak, J. Kubický "*Temperature effects on excitation and deactivation processes of coumarin 102. A comparison with coumarin 153*" Dyes and Pigments, **2014**, Vol. 100, 222-231
- ¹⁸ G. A. Reynolds, K. H. Drexhage "*New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers*" Optics Communications, **1975**, Vol. 13, 222-225
- ¹⁹ A. Fernández-González, R. Badía, M.E. Díaz-García "*Sensitive flow-injection system for nafcillin determination based on non-protected room temperature phosphorescence*" Analytica Chimica Acta, **2003**, Vol. 498, 69-77
- ²⁰ S. A. Smith, W. A. Pretorius "*The conservative behavior of fluoresceine*", Water SA, **2002**, Vol. 28, 403-406
- ²¹ M. A. Pacheco, L. Bruzzone "*Estudio del mecanismo del quenching de seroalbúmina bovina por imazetapir y clorimurón-etil. Evaluación de efectos de filtro interno*" Universidad Nacional de la Plata

Recursos web:

http://www.uned.es/cristamine/mineral/prop_fis/luminiscencia2.htm#Tipos de luminiscencia (Junio, **2015**)

<http://www.monografias.com/trabajos67/electronica-organica/electronica-organica> (Mayo, **2015**)

<http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/fluorescencia> (Mayo, **2015**)

http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/cifus/numerico/notasweb4.pdf (Junio, **2015**)

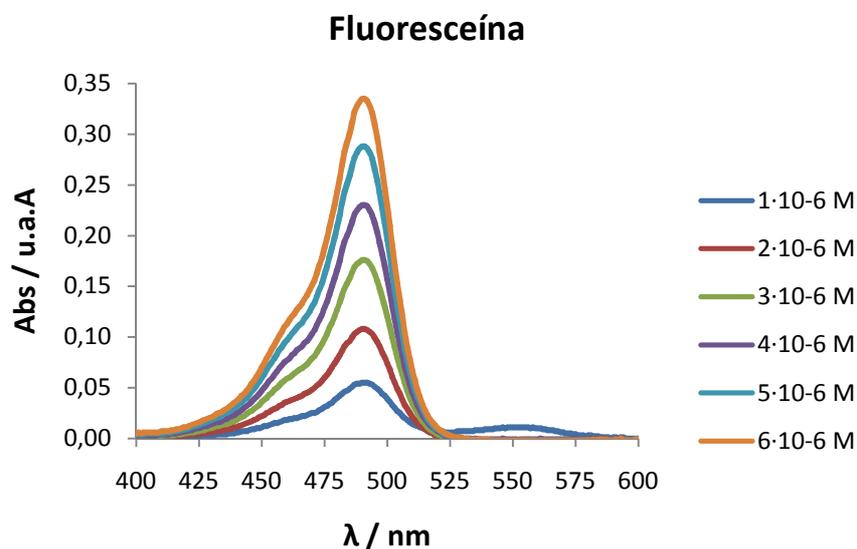
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003845.htm> (Mayo, **2015**)

<http://hematoxilina-eosina-uc.blogspot.com.es> (Julio, **2015**)

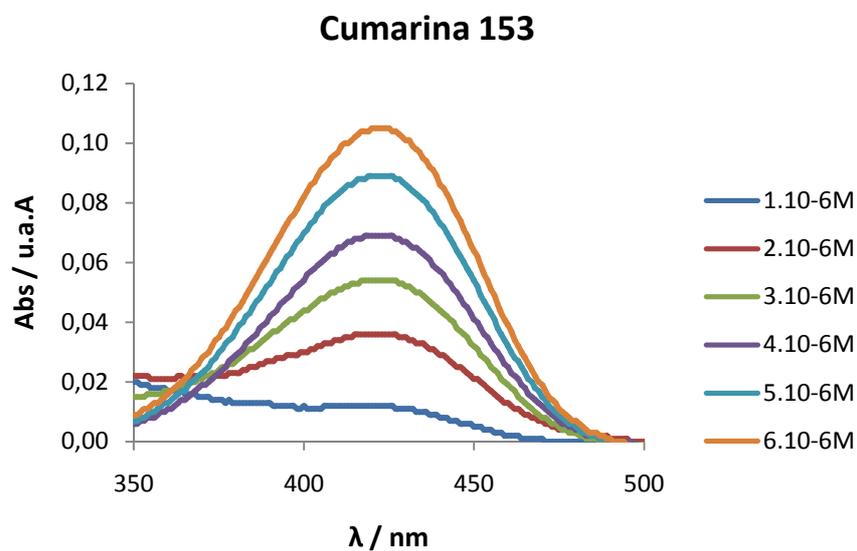
http://www.materlab.com/documentacion/microbiologia/tinciones/KIT_AURAMINA-RODAMINA.pdf (Julio, **2015**)

7. APÉNDICES

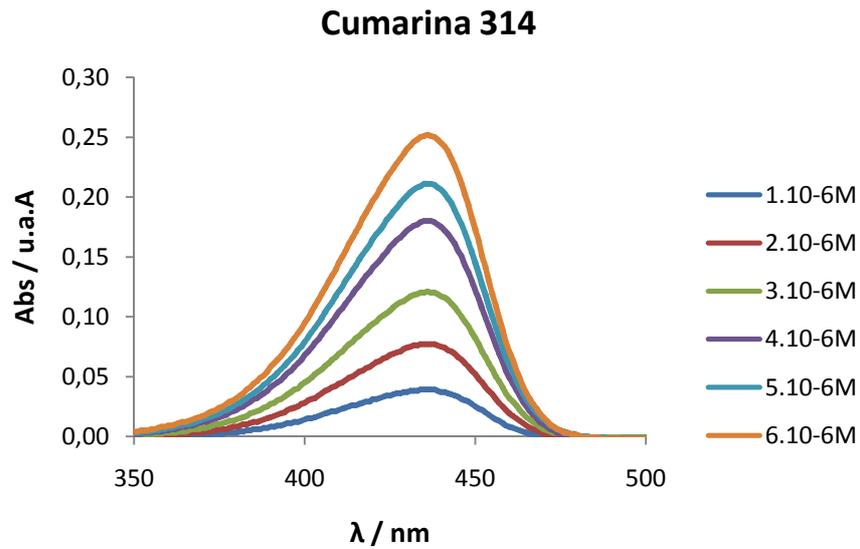
7.1. APÉNDICE: Espectros de absorción obtenidos durante la realización del trabajo



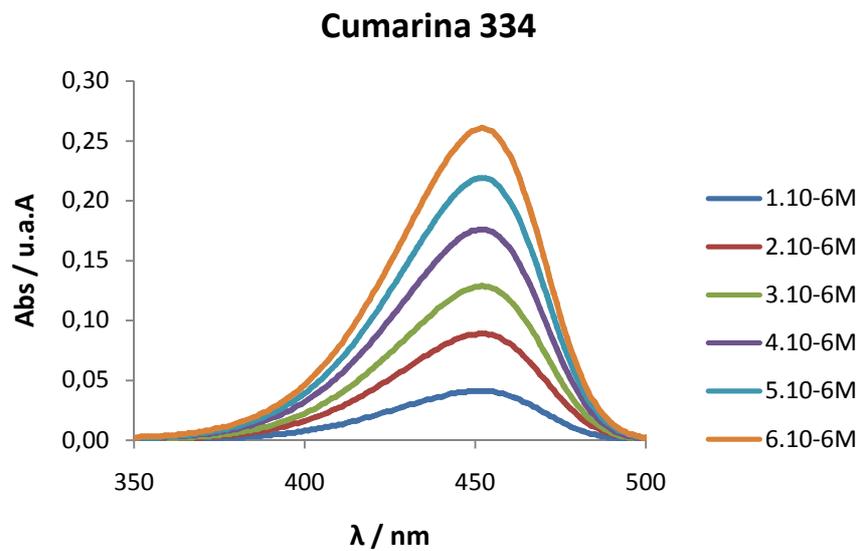
Gráfica 18: Superposición de los espectros de absorción de la fluoresceína a las diferentes concentraciones estudiadas.



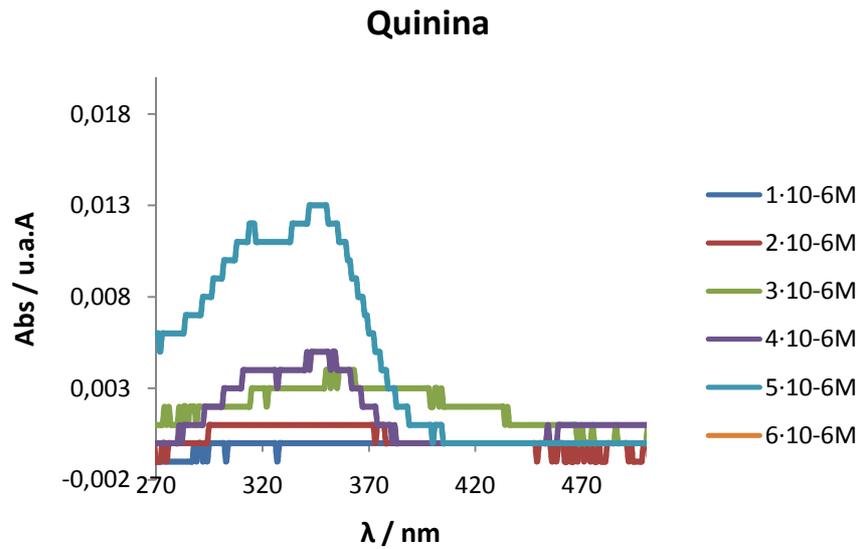
Gráfica 19: Superposición de los espectros de absorción de la cumarina 153 a las diferentes concentraciones estudiadas.



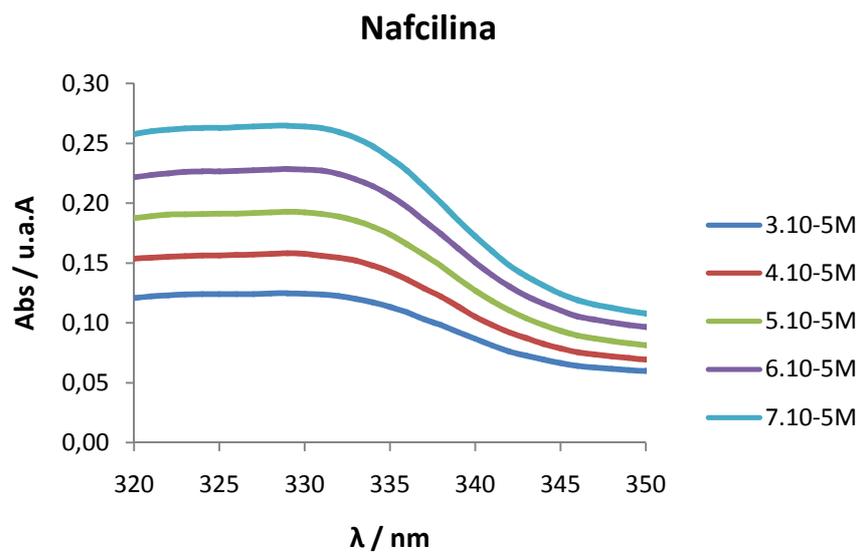
Gráfica 20: Superposición de los espectros de absorción de la cumarina 314 a las diferentes concentraciones estudiadas



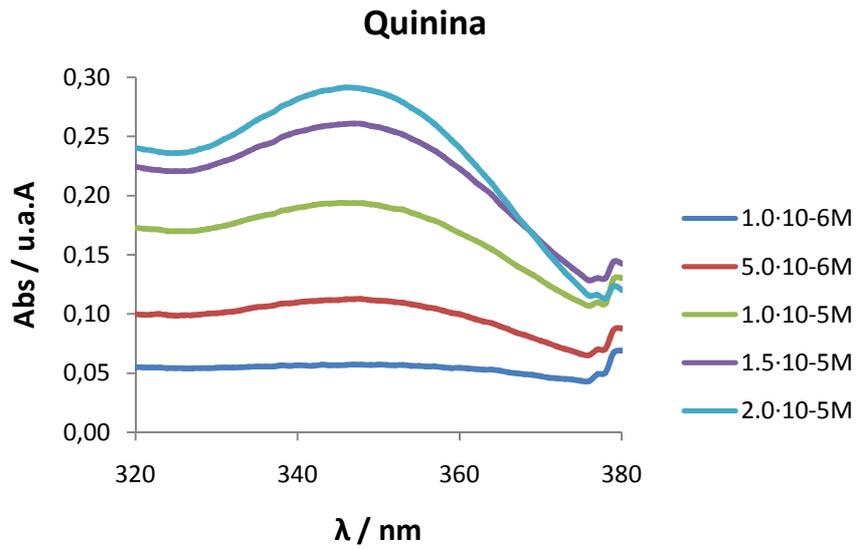
Gráfica 21: Superposición de los espectros de absorción de la cumarina 334 a las diferentes concentraciones estudiadas.



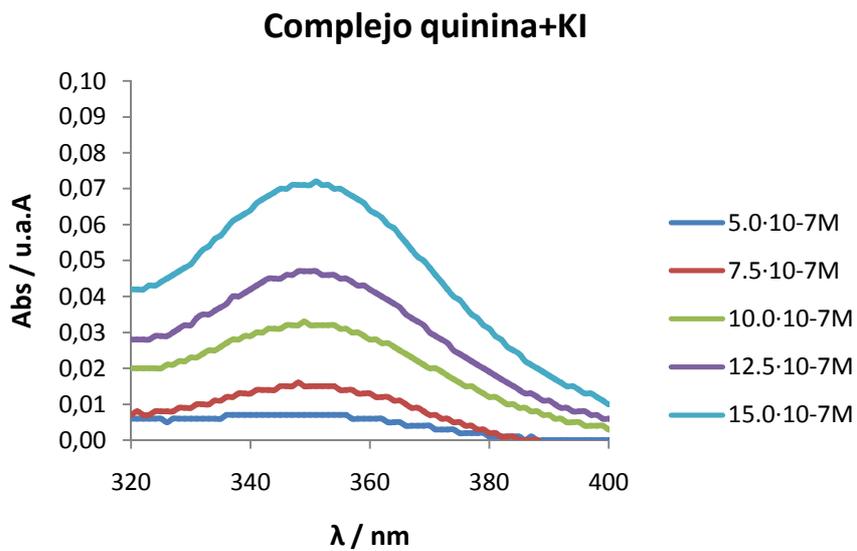
Gráfica 22: Superposición de los espectros de absorción de la quinina a las diferentes concentraciones estudiadas para el Método Indirecto



Gráfica 23: Superposición de los espectros de absorción de la nafcilina a las diferentes concentraciones estudiadas

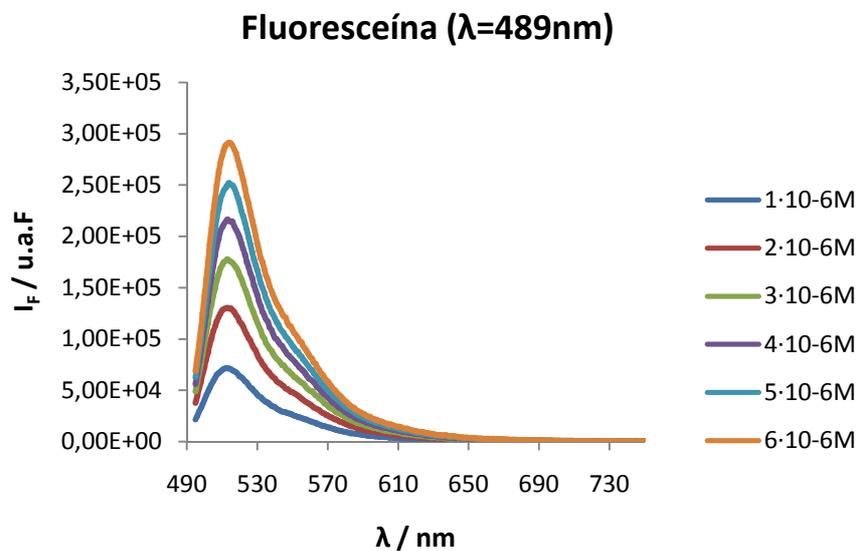


Gráfica 24: Superposición de los espectros de absorción de la quinina a las diferentes concentraciones estudiadas para el método de la variación de las rendijas

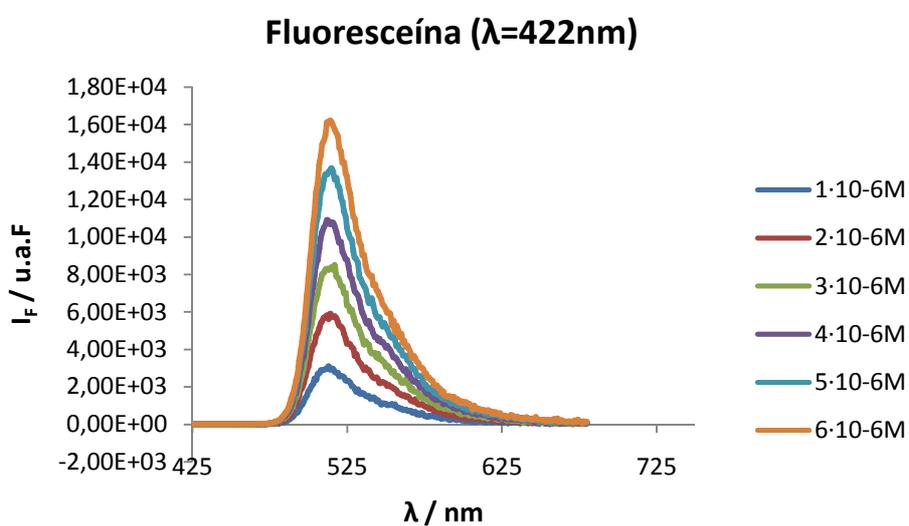


Gráfica 25: Superposición de los espectros de absorción de la especie formada por la quinina y KI (quencher) a las diferentes concentraciones estudiadas

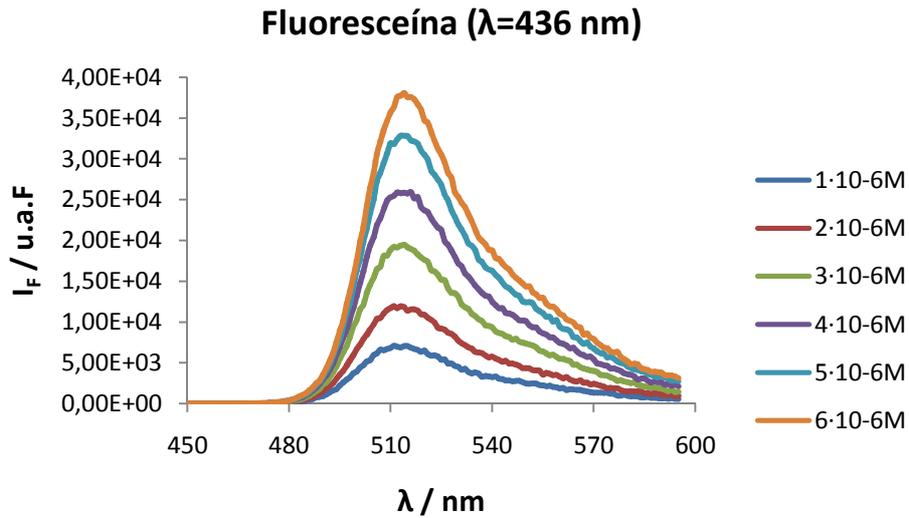
7.2. APÉNDICE: Espectros de emisión de fluorescencia obtenidos durante la realización del trabajo



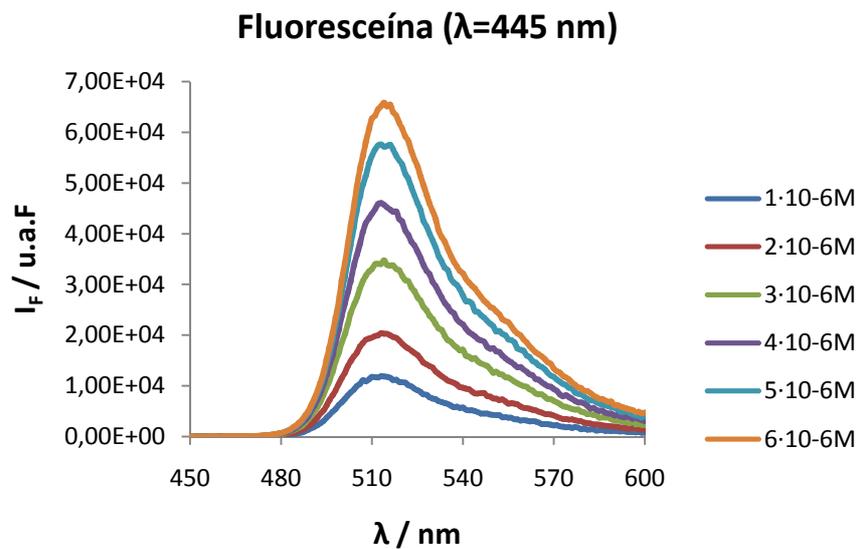
Gráfica 26: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la fluoresceína a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 489 nm y con una apertura de las rendijas 1,1 nm.



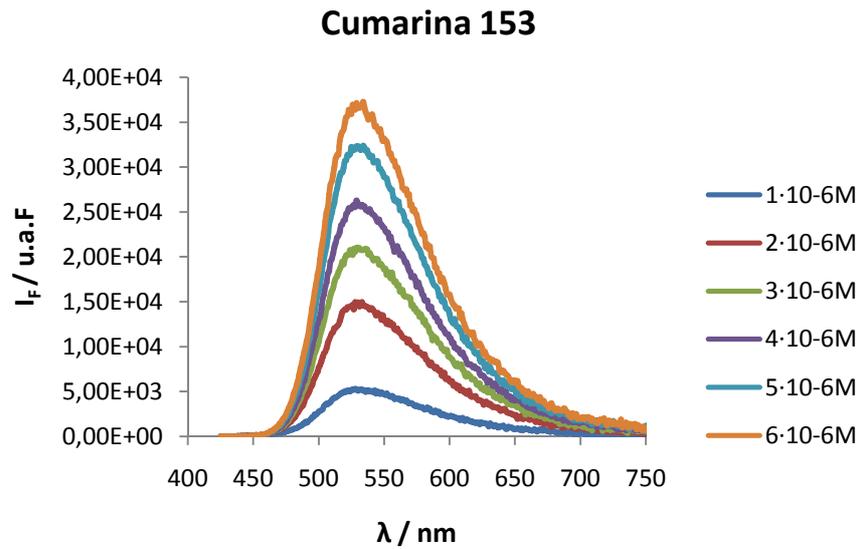
Gráfica 27: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la fluoresceína a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 422 nm y con una apertura de las rendijas 1,1 nm.



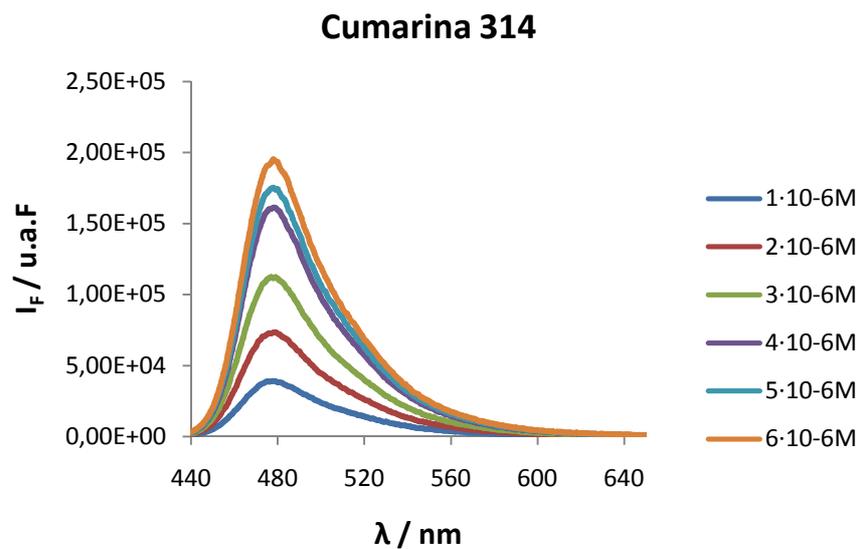
Gráfica 28: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la fluoresceína a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 436 nm y con una apertura de las rendijas 1,1 nm.



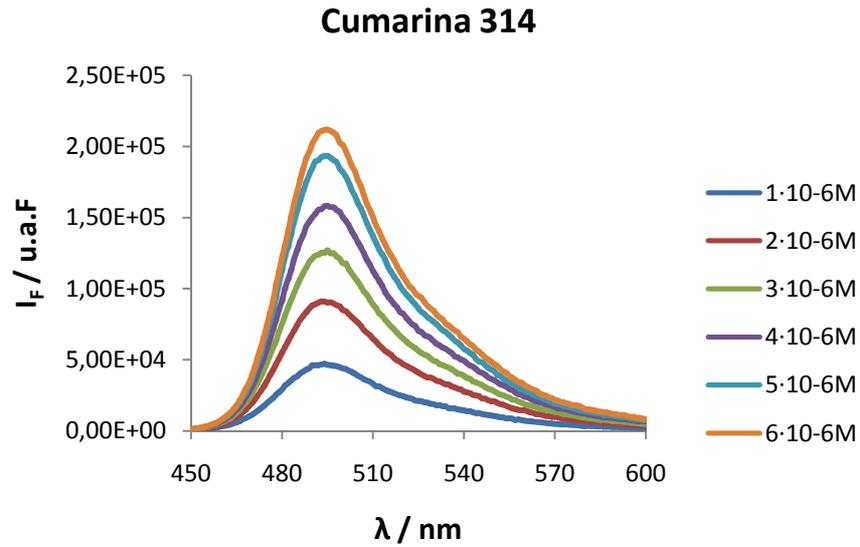
Gráfica 29: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la fluoresceína a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 445 nm y con una apertura de las rendijas 1,1 nm.



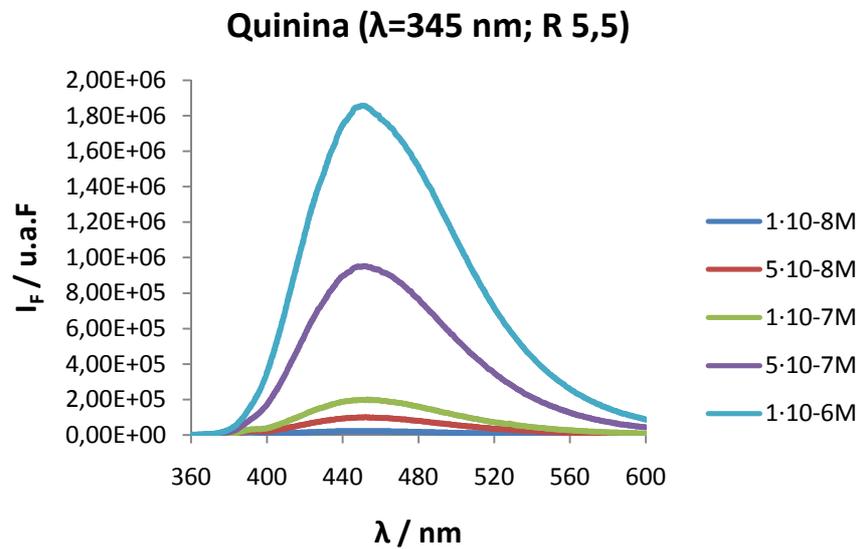
Gráfica 30: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de cumarina 314 a las distintas concentraciones estudiadas medidos a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 422 nm y con una apertura de las rendijas 1,1 nm.



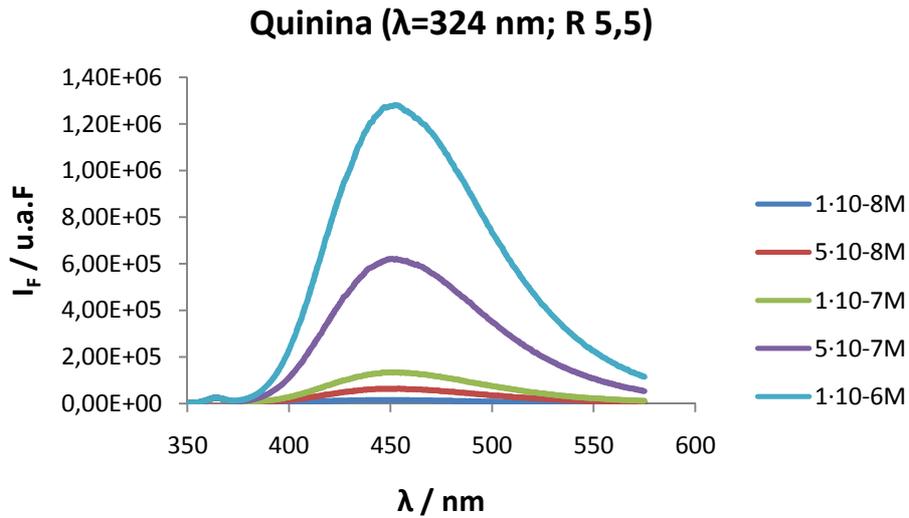
Gráfica 31: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de cumarina 314 a las distintas concentraciones estudiadas medidos a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 436 nm y con una apertura de las rendijas 1,1 nm.



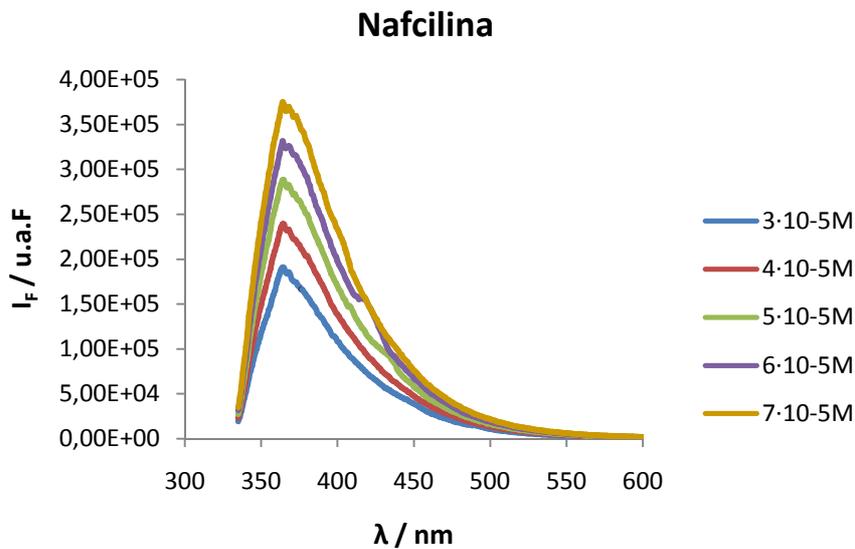
Gráfica 32: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la cumarina 334 a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 445 nm y con una apertura de las rendijas 1,1 nm.



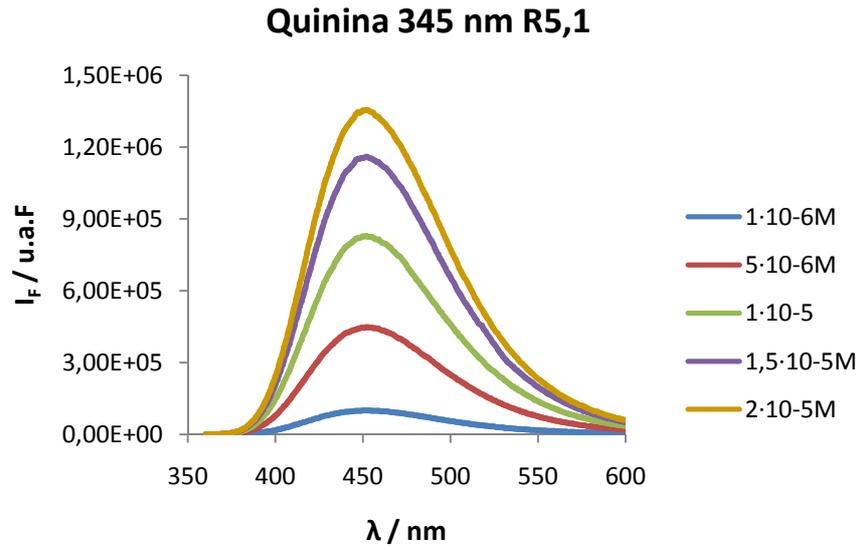
Gráfica 33: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la quinina a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 345nm y con una apertura de las rendijas 5,5nm.



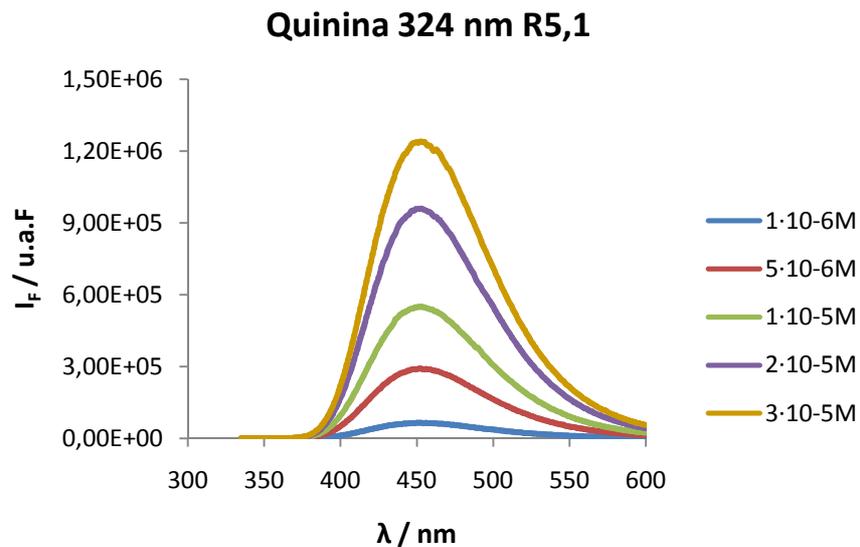
Gráfica 34: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la quinina a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 324nm y con una apertura de las rendijas 5,5 nm.



Gráfica 35: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la nafcilina a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 324nm y con una apertura de las rendijas 5,5 nm.

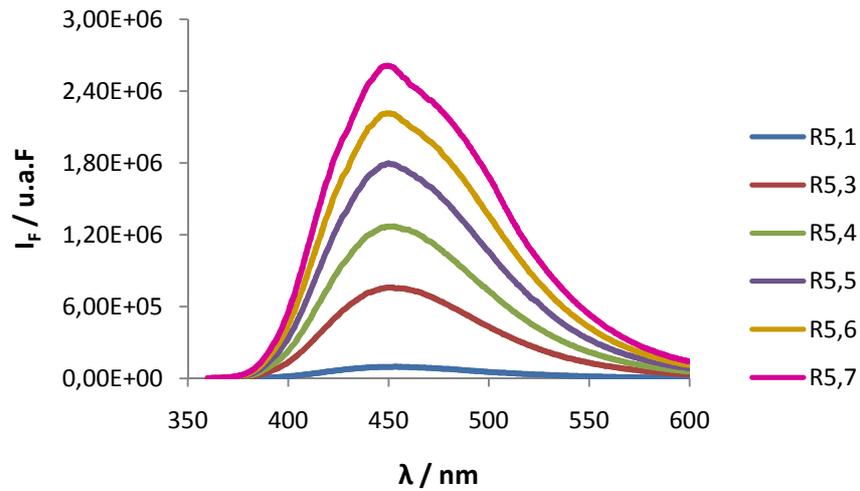


Gráfica 36: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la quinina a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 345 nm y con una apertura de las rendijas de 5,1 nm a las distintas concentraciones estudiadas.



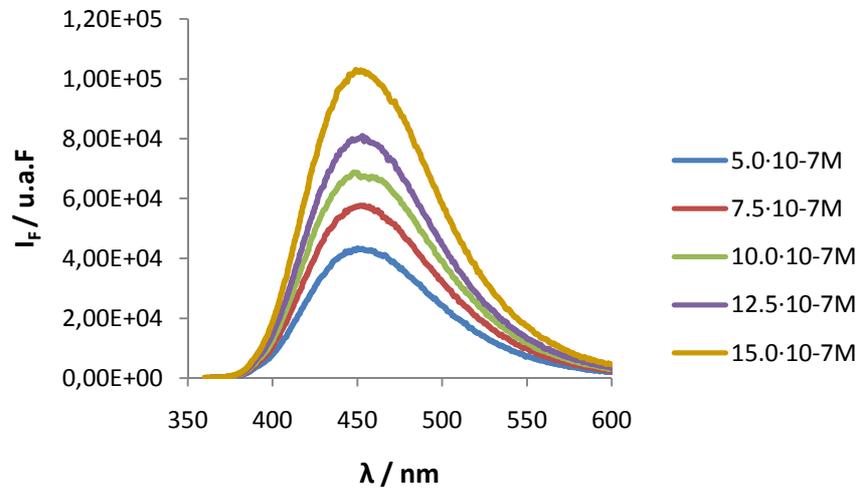
Gráfica 37: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de la quinina a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 324 nm y con una apertura de las rendijas 5,1 nm.

Quinina 345 nm (estudio rendijas)



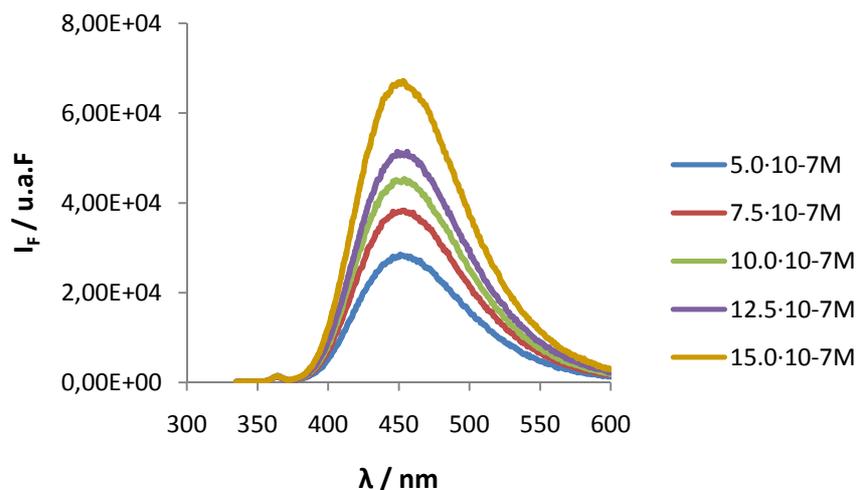
Gráfica 38: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de una disolución de quinina $1 \cdot 10^{-6} M$, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 345 nm manteniendo fija la apertura de la rendija de excitación en 5 nm y variando la apertura de la rendija de emisión según se indica.

Complejo quinina+KI 345nm R5,1



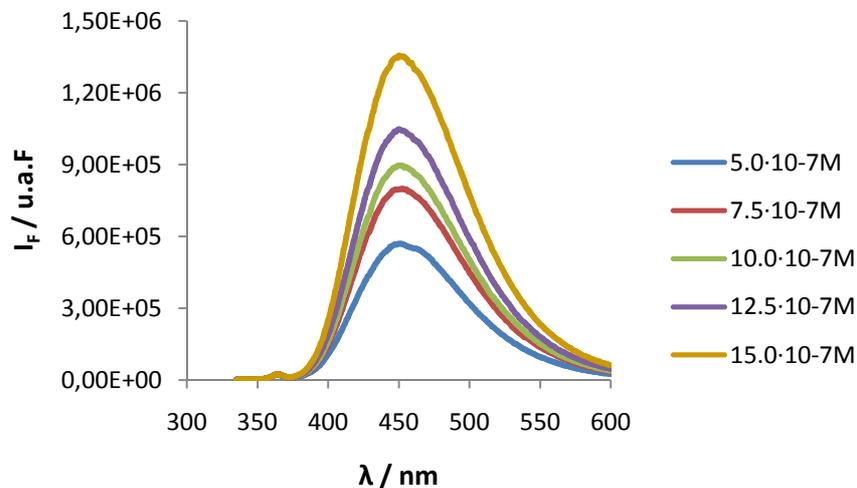
Gráfica 39: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia del complejo formado por la quinina y KI (quencher) a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 345 nm y con una apertura de las rendijas de 5,1 nm.

Complejo quinina+KI a 324 nm R5,1



Gráfica 40: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia del complejo formado por la quinina y KI (quencher) a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ 324 nm y con una apertura de las rendijas 5,1 nm.

Complejo quinina+KI a 324 nm R5,5



Gráfica 41: Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia del complejo formado por la quinina y el KI (quencher) a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a $\lambda_{excitación}$ de 324 nm y con una apertura de las rendijas 5,5 nm.

7.3. APÉNDICE: Método del trapecio

Para calcular el rendimiento cuántico de fluorescencia se compara un compuesto patrón frente a la correspondiente muestra. Para ello es necesario realizar una representación gráfica de la absorción frente al área bajo la curva del espectro de emisión de fluorescencia a una λ determinada en cada caso.

Para conocer el área bajo la curva del espectro de emisión de fluorescencia es necesario plantear una integral o utilizar algún método de integración aproximado que permita conocer dicho valor. En este caso, se aplica el método del trapecio.

Siguiendo el método del trapecio se puede calcular el valor aproximado de una función f en un intervalo $[a,b]$ al sustituir dicha función por un polinomio lineal con nodos en los extremos del intervalo, se obtiene:

$$f = \int_a^b \frac{(x-a) \cdot f(b) + (b-x) \cdot f(a)}{b-a} = (b-a) \cdot \frac{f(b)+f(a)}{2} \quad \text{Ecuación 32}$$

Este método proporciona una buena aproximación al valor real de la integración siempre y cuando el intervalo $b-a$ sea pequeño.

Gráficamente, el método del trapecio puede explicarse tal como se indica en **Figura 14**. En dicho esquema la función a integrar f se representa por la curva azul mientras que la función aproximada (que es una función lineal) se representa por la recta roja.

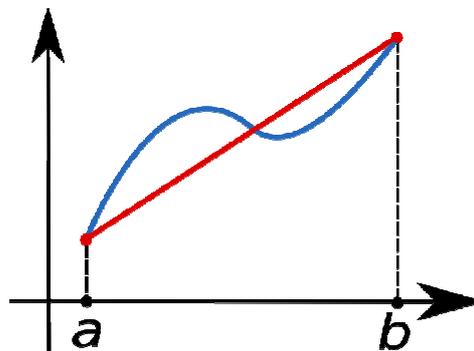


Figura 14: Explicación gráfica de la integración mediante el método del trapecio

Oviedo, Julio de 2015