

ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA

Existen numerosas técnicas espectroscópicas que permiten estudiar los estados excitados de las moléculas orgánicas. En particular, los espectros de absorción y emisión de una molécula proveen información fundamental sobre la estructura, estado energético y dinámica de los estado excitados [Lakowicz, 1983]. En este Capítulo se detallan los métodos espectroscópicos empleados para el estudio de los estados excitados de las pterinas en solución acuosa. También se explica que información se obtiene con cada técnica y cómo se analiza la misma.

Espectros de Absorción.

Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de la absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda (o frecuencia) de la luz incidente. Un espectro de absorción muestra que longitudes de onda son absorbidas por la molécula en estudio al pasar de niveles de menor a mayor energía. Las bandas observadas en el espectro dan información sobre las diferencias energéticas entre los estados energéticos de una molécula. Un espectro de absorción UV-visible no proporciona una clara identificación de un compuesto. Sin embargo, es muy útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, debido a que es muy sensible a ellos. Por ejemplo, formas ácido-base diferentes de una misma sustancia pueden claramente ser identificadas por las diferencias en sus espectros de absorción.

Para obtener un espectro de absorción se requiere de un equipo que posea una fuente de luz estable, con capacidad de variar la longitud de onda en forma

continua en la región UV-visible del espectro electromagnético. Debe poseer también un detector capaz de responder linealmente con la intensidad de la radiación transmitida a través de la muestra. La muestra puede encontrarse en fase gaseosa, líquida o sólida, pero usualmente se encuentra en soluciones diluidas, contenidas en celdas de vidrio o cuarzo. La celda debe ser transparente a la radiación, por ello el uso de celdas de cuarzo es esencial para longitudes de onda menores que 300 nm. Si la muestra se encuentra en solución, debe realizarse una corrección por el solvente, debido a que el mismo puede presentar absorción UV-visible.

Los espectros de absorción se obtuvieron con espectrofotómetros *Cary 3* y *Cary 5 (Varian)*. Estos equipos permiten obtener espectros entre 190 y 900 nm. Son espectrofotómetros de barrido de doble haz y simple haz, respectivamente, provistos con programas adecuados para registrar y almacenar espectros. Estos programas también promedian señales que permiten suavizar los espectros cuando la relación señal / ruido es desfavorable. Los espectros se realizaron utilizando agua como blanco. Se utilizaron celdas de cuarzo, y, según la absorbancia de la muestra, se eligieron celdas de diferentes caminos ópticos: 0.1, 0.2 cm o 1 cm.

Además de brindar información sobre los estados excitados de las pterinas, los espectros de absorción en este trabajo fueron una herramienta fundamental para fijar condiciones experimentales y para detectar y controlar cambios químicos como consecuencia de la irradiación o reacciones térmicas. Los cambios espectrales observados pueden ser indicativos de cambios químicos, y los espectros de absorción de las moléculas que aquí se estudian son muy sensibles a alteraciones en su estructura química.

Como metodología adecuada para evaluar cambios químicos, los espectros de absorción se tomaron en cada experimento de irradiación continua (método que se describe en el *Capítulo 8*) y se analizaron los *espectros diferencia* [Thomas, 2001]. Los espectros diferencia se obtienen al restar a todos los espectros de absorción absolutos obtenidos a distintos tiempos de irradiación el espectro de absorción de la solución antes de ser irradiada. Con este análisis pueden observarse los puntos isobésticos y analizar su constancia en el tiempo. Si está ocurriendo un proceso único los puntos isobésticos se mantienen en el tiempo.

También se utilizaron espectros de absorción normalizados y espectros diferencia normalizados. Los espectros normalizados se obtienen al dividir las absorbancias a cada longitud de onda por un número arbitrario conveniente. En este trabajo siempre se eligió el valor máximo de absorción.

Por otro lado, como se mencionó en el Capítulo anterior, en ciertos experimentos se emplearon medidas de absorbancia para determinar la concentración de derivados pterínicos en solución. Asimismo, los espectros de absorción se usaron para controlar la estabilidad de las soluciones almacenadas. En muchos experimentos se recurrió a las medidas de absorbancia para fijar la concentración y / o absorbancia de una solución a determinada longitud de onda. En todos estos casos se tomaron espectros de absorción antes de cada experimento.

Espectros de emisión.

Un espectro de emisión es un registro de intensidad de la emisión como función de la longitud de onda de la luz emitida. Los espectros de emisión son muy variables y dependen de la estructura química de la molécula y del solvente en que la misma está disuelta [Lakowicz, 1983]. Los espectros de emisión se observan cuando una molécula excitada pierde el exceso de energía radiativamente. Puede observarse las diferencias de energías que existen entre los estados involucrados en la transición. Tanto los espectros de absorción como los de emisión dan información relacionada con los niveles de energía de las moléculas, pero hay consideraciones prácticas a tener en cuenta para elegir una u otra técnica.

Como se explicó en el *Capítulo 1*, hay dos formas de emitir la radiación: *fluorescencia* y *fosforescencia*. Ambas pueden distinguirse experimentalmente observando el tiempo de vida del estado excitado. La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de interrumpir la irradiación (10^{-9} - 10^{-6} seg.), mientras que la fosforescencia se prolonga durante un período más largo que el observado para la fluorescencia.

Se observa característicamente que la radiación de fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la correspondiente a la radiación incidente. Esta pérdida de energía, fenómeno conocido como corrimiento de Stokes, se debe a disipación de energía vibracional, a redistribución de electrones en moléculas del solvente, re-orientación de las moléculas de solvente e interacciones entre la molécula absorbente y las moléculas del solvente [Lakowicz, 1983].

Como ya se mencionó en el *Capítulo 1*, ocasionalmente la molécula excitada puede, por reordenamiento electrónico, sufrir cambios que le permiten alcanzar un estado triplete. Las propiedades de una molécula en el estado triplete excitado difieren considerablemente de las propiedades de la misma en estado singlete. Por otra parte una transición triplete-singlete resulta muy poco probable, sin embargo, usualmente ocurre por un proceso denominado “*cruzamiento intersistemas*”. A pesar de que estas transiciones ($T_1 \rightarrow S_0$) son menos probables, ocurren y la emisión resultante es la fosforescencia. Sin embargo, el tiempo para que la población de moléculas en estado T_1 se desexcite y regrese al estado basal S_0 es mayor que desde un singlete excitado.

Para obtener un espectro de emisión se necesita un equipo con una fuente de luz UV-visible. La longitud de onda de excitación se selecciona haciendo pasar el haz de luz por un monocromador de excitación. La muestra, que se coloca en celdas de vidrio o cuarzo, recibe la radiación de excitación en una cara de la misma, y emite por fluorescencia. La radiación emitida se observa perpendicularmente a la radiación de excitación, en un segundo monocromador de emisión que la dispersa y cada longitud de onda transmitida es detectada por un detector.

Para obtener los espectros de emisión se utilizó un equipo *Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments)*. Este equipo puede realizar tanto medidas de estado estacionario (espectros de emisión, espectros de excitación) como medidas resueltas en el tiempo (determinación de tiempos de vida de estados excitados). Para realizar ambos tipos de experimentos cuenta con dos lámparas diferentes: una pulsada y otra estacionaria. Para realizar los espectros de emisión utiliza la lámpara estacionaria de alta presión de xenon (419 Kw).

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron en soluciones acuosas. Se empleó una celda de cuarzo de 1 cm longitud de camino óptico. La temperatura de las muestras (24.0 ± 0.2 °C) se reguló con la ayuda de un dispositivo de circulación de agua conectado a un termostato. Se registraron los espectros de emisión corregidos (el equipo corrige automáticamente la respuesta del fototubo y del monocromador de emisión) entre 360 y 650 nm, excitando con luz de longitud de onda correspondiente a la banda de menor energía de la pterinas (350 nm). Sin embargo, algunos experimentos se realizaron excitando las muestras con otras longitudes de onda, con el objetivo de estudiar la influencia de la longitud de onda de excitación sobre los espectros de emisión.

Todas las medidas realizadas en el equipo *Single Photon Counting* utilizado en el presente trabajo se realizaron en el *Instituto Engler Bunte de la Universidad de Karlsruhe*, en el marco de un convenio de colaboración entre dicho Instituto y el grupo de Cinética y Fotoquímica del *Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas*, INIFTA (SECyT-BMFB).

También se realizaron medidas de emisión empleando el espectrofotómetro Cary 3, que cuenta con un accesorio especial para este fin. Este equipo no permite realizar espectros de emisión porque no posee un dispositivo capaz de cuantificar la luz emitida por la muestra a distintas longitudes de onda. Sin embargo, puede cuantificar la emisión total entre 200 y 700 nm. La longitud de onda de excitación, por su parte, puede seleccionarse. Esta técnica es muy útil para realizar experimentos rápidos que permiten evaluar y comparar la emisión de diferentes soluciones. Estas medidas se emplearon en experimentos preliminares que permitieron luego diseñar los estudios sistemáticos con la técnica *Single Photon Counting*.

En todos los experimentos realizados en el Cary 3 se utilizaron celdas para fluorescencia de 1 cm x 1 cm y de 1 cm x 0.4 cm. La luz de excitación utilizada fue de 340 nm, el ancho de rendija 0.4 cm.

Espectros de excitación

Los espectros de excitación registran la intensidad de la emisión a una frecuencia dada como función de la longitud de onda de la luz de excitación. La excitación se realiza con luz de longitud de onda variable e intensidad fija.

El espectro de excitación se puede presentar representando el rendimiento cuántico de emisión relativo a cada longitud de onda de excitación. Generalmente, la mayoría de las moléculas fluorescentes tiene rendimientos cuánticos y espectros de emisión independientes de la longitud de onda de excitación. En consecuencia, el espectro de excitación de una molécula fluorescente se superpone a su espectro de absorción [Lakowicz, 1983].

El equipo empleado en la determinación de los espectros de excitación de las pterinas en solución acuosa fue el mismo que el utilizado para obtener los espectros de emisión. La presencia de los dos monocromadores permite el registro de los dos diferentes tipos de espectros. Como se detalló en la sección anterior el espectro de emisión de una muestra se registra manteniendo el monocromador de excitación en una longitud de onda fija. Por el contrario, para obtener el espectro de excitación debe mantenerse el monocromador de emisión a una longitud de onda fija a la cual emite la muestra, que generalmente coincide, o está muy próxima, con el máximo de emisión. El movimiento del monocromador de excitación permite seleccionar la longitud de onda de la radiación absorbida por la muestra. Así se puede medir la intensidad de emisión a una longitud de onda dada como función de la longitud de onda de excitación.

La intensidad de la luz incidente varía con la longitud de onda debido a que la lámpara no provee una misma intensidad de luz en todo su espectro de emisión. Entonces los espectros de excitación resultan distorsionados por dicho motivo. Por lo tanto, se debe realizar una corrección de la señal de intensidad de la emisión de la muestra transformándola en una señal proporcional al número de fotones incidentes. Para ello se usan referencias, a modo de contadores de fotones, como rodamina B, fluoresceína o bisulfato de quinina, según el rango de longitudes de onda necesario. El máximo de emisión y el rendimiento cuántico de

emisión de estas referencias es independiente de la longitud de onda de la luz incidente, en determinados rangos del espectro, por lo que proveen una emisión, a longitud de onda constante, proporcional al flujo de fotones de la luz incidente.

Los espectros de excitación de los derivados pterínicos estudiados se tomaron empleando rodamina B en etilenglicol (3 g/l) como referencia. Este compuesto es adecuado para ser utilizado como referencia en el rango comprendido entre 220 y 600 nm [Lakowicz, 1983]. El espectro de emisión de la rodamina B. Los espectros se obtuvieron excitando con luz entre 230 y 440 nm, y se registró la emisión a 450 nm, longitud de onda cercana al máximo de emisión de las pterinas en solución acuosa.

Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

En fotoquímica existen dos leyes fundamentales. La primera ley fue formulada por Grotthuss y Draper y dice que *sólo la luz absorbida por una molécula puede producir cambio fotoquímico en la misma*. Se enfatiza luz absorbida, es decir, que la luz que simplemente pasa por el sistema no produce cambio alguno. La evolución de la teoría cuántica llevó a Stark y Einstein a complementar esta ley, originando la segunda ley de la fotoquímica: *si una especie absorbe radiación, por cada cuanto de energía absorbido se excita una molécula*. Esto indica que un solo fotón es responsable del cambio fotoquímico en una molécula. Sobre la base de estas dos leyes fundamentales se puede definir el término rendimiento cuántico.

Los rendimientos cuánticos dan cuenta de la eficiencia de un proceso en términos de la cantidad de energía lumínica absorbida. Se puede expresar el rendimiento cuántico de un proceso fotofísico, como la fluorescencia (Φ_F), en términos del número de moléculas fluorescentes respecto de los fotones de luz absorbidos:

$$\Phi_F = \frac{\text{Nro moléculas fluorescentes por unidad de tiempo y por unidad de volumen}}{\text{Nro de cuantos absorbidos por unidad de tiempo y por unidad de volumen}}$$

Como el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida (I_A) y el número de fotones emitidos por fluorescencia es proporcional a la intensidad de radiación fluorescente (I_F), se puede escribir:

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A}$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ_F , de especies moleculares (d) puede ser determinado experimentalmente por comparación de la intensidad de fluorescencia, I_F , medida como el área debajo del espectro de fluorescencia corregido (I_d) y la intensidad de fluorescencia, medida de la misma forma, de una solución de una referencia de rendimiento cuántico conocido (I_{st}). Como la cantidad de fotones absorbidos por la muestra y la referencia puede ser distinta, debe realizarse una corrección teniendo en cuenta las absorbancias de ambas sustancias a la longitud de onda de excitación (A_d y A_{st} , respectivamente). Utilizando el mismo equipo, en idénticas condiciones (longitud de onda de excitación, celda, abertura de las rendijas, temperatura, etc.), el rendimiento cuántico de fluorescencia se determina con la ecuación:

$$\Phi_d = [(A_{st} \cdot I_d \cdot n_d^2) / (A_d \cdot I_{st} \cdot n_{st}^2)] \Phi_{st}$$

donde n es el índice de refracción del solvente. En todos los experimentos realizados para este trabajo de tesis se utilizó el mismo solvente (agua) por lo cual el factor n_d^2/n_{st}^2 puede ser eliminado. Esta ecuación es válida sólo para soluciones diluidas, con absorbancia no mayor a 0.10. De lo contrario, A debe reemplazarse por $1-10^{-A}$.

Se utilizó el mismo equipo *Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments)* que se describió anteriormente, con la lámpara estacionaria. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia fueron determinados a partir de los espectros de fluorescencia corregidos obtenidos por excitación a 350 nm, usando como referencia *bisulfato de quinina* (Riedel-

deHaen) en solución acuosa de H_2SO_4 0.5 M ($\Phi_F = 0.546$) [Eaton, 1989; Meech y Phillips, 1993]. El espectro de fluorescencia de la referencia se muestra en la Figura 5.1. Para evitar efectos de filtro interno la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación se fijo en un valor menor a 0.10.

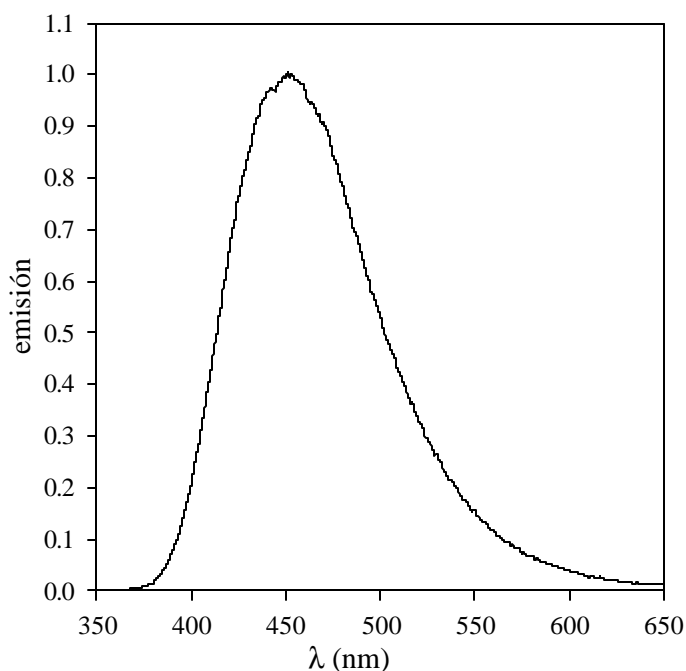


Figura 5.1: espectro de emisión normalizado de sulfato de quinina en solución acuosa de H_2SO_4 0.5 M.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia a longitudes de onda diferentes (Φ_f^λ) se calcularon a partir de los espectros de excitación y de los rendimientos cuánticos fluorescencia a 350 nm (Φ_f^{350}), utilizando la siguiente ecuación:

$$\Phi_F^\lambda = \Phi_F^{350} \cdot (I_{(\lambda)} / I_{(350)}) \cdot [(1 - 10^{-A(350)}) / (1 - 10^{-A(\lambda)})]$$

Aquí $I_{(\lambda)}$ y $I_{(350)}$ son las intensidades de la emisión medidas a 450 nm excitando a 350 nm y a λ , respectivamente, obtenidos de los espectros de excitación; $A_{(\lambda)}$ y $A_{(350)}$ las absorbancias de la solución a 350 nm y λ , respectivamente.

Estudio resuelto en el tiempo de la fluorescencia.

El tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) de una sustancia representa el tiempo promedio en que una población de moléculas excitadas disminuye a 1/e de su valor inicial [Lakowicz, 1983]. Además, como se explicará más adelante, la determinación del tiempo de vida de fluorescencia proporciona valiosa información en procesos de *quenching*. Por ejemplo, permite obtener información sobre la frecuencia de colisión con las moléculas *quenchers*, la fracción de energía transferida y la extensión de reacción en el estado estacionario.

Para realizar las medidas de este parámetro se necesitan equipos electrónicos y detectores de muy alta velocidad, porque sus valores son del orden de los nanosegundos. La técnica consiste en excitar la muestra con un pulso de luz muy corto de longitud de onda apropiada y registrar el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo. El pulso de luz provoca la población del estado singlete excitado. Si consideramos solamente un proceso radiativo la velocidad con que decrece el número de moléculas en el estado excitado puede describirse con la siguiente ecuación:

$$\frac{d(N^*)}{dt} = -k_F N^*$$

donde k_F es el coeficiente de velocidad de emisión espontánea y N^* el número de moléculas en el estado excitado. Al resolver esta ecuación, se obtiene:

$$N^*_t = N^*_o e^{(-k_F t)}$$

donde N_t^* y N_o^* son el número de moléculas en estado excitado a un tiempo t y 0 , respectivamente. Por ello se espera que la intensidad de fluorescencia, que es proporcional al número de moléculas en el estado excitado, tenga un decaimiento exponencial.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el tiempo de vida de fluorescencia se define como el tiempo requerido que para la intensidad de fluorescencia alcance $1/e$ de su valor inicial. Es decir:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F}$$

Para las medidas de tiempos de vida de fluorescencia se utilizó el equipo *Single Photon Counting*, descrito anteriormente en este mismo Capítulo. Para los estudios resueltos en el tiempo este equipo utiliza una lámpara pulsada de nitrógeno (pureza > 99.9995), a 1.2 bar, y alimentada con una tensión de 6.3 kV y una frecuencia de repetición de 40 kHz. En estas condiciones emite, por cada pulso, una intensidad del orden de 10^{10} fotones. El rango del equipo es 500 ps – 500 μ s, pero para las medidas del presente trabajo se utilizó una resolución de 0 - 100 ns. Los decaimientos se monitorearon a 450 nm y la luz de excitación fue 350 nm. Los tiempos de vida se obtuvieron del decaimiento monoexponencial observado luego de la deconvolución de la señal de la lámpara, mediante el uso de software provisto por Edinburgh Analytical Instruments.