

Estudio de las propiedades ópticas de recubrimientos Sol-Gel dopados con fluoresceína en función de la concentración y del pH

E.F. MONTERO¹, M. A. GARCÍA¹, M. A. VILLEGAS², J. LLOPIS¹

¹Depto. Física de Materiales, Fac. de Ciencias Físicas, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España

²Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas, CSIC. Madrid, España

Se investiga la variación con el pH de las propiedades ópticas (absorción y luminiscencia) de moléculas de fluoresceína incorporadas a recubrimientos porosos sol-gel en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,5 y 3,8 % en peso. Los espectros de absorción de los recubrimientos presentan bandas principales en 435 nm y 487 nm para pH ácido y básico, respectivamente. Al comparar con los espectros de las disoluciones, la posición de ambos máximos se desplaza hacia el rojo y aparecen en 438 nm y 492 nm. La dependencia de la absorción de la fluoresceína en recubrimientos y disoluciones se ajusta a la ley de Lambert-Beer. Al excitar los recubrimientos y las disoluciones con fotones de la región en que la absorción es importante, los espectros de fotoluminiscencia muestran una banda ancha principal en 520 nm, tanto para pH ácido como para básico. En este caso y contrariamente a lo observado en los espectros en disolución, la intensidad a 520 nm decrece con el pH al aumentar éste desde 2 a 12.

Palabras clave: fluoresceína, pH, recubrimientos sol-gel, absorción, fotoluminiscencia

Study of optical properties of fluorescein-doped sol-gel coatings as a function of concentration and pH

Optical properties (absorption and luminescence) of fluorescein molecules encapsulated in porous sol-gel coatings for concentrations ranging from 0.5 to 3.8 wt % are investigated as a function of pH. Absorption spectra of the coatings show main bands at 435 nm and 487 nm for acid and basic pH, respectively. Both peaks appear in the solutions of fluorescein redshifted at 438 nm and 492 nm. However, the dependence in intensity of both peaks as a function of pH is found essentially similar between coatings and solutions. In both cases, the absorption dependence on concentration can be fitted to the Lambert-Beer law. On the other way, photoluminescent spectra of coatings and solutions upon excitation in the peak absorption region, show a dominant broad band peaked at 520 nm for both acid and basic pH. The intensity of the 520 nm-coating band displays a decreasing behaviour with increasing pH from 2 to 12, in contrast with those found for the same peak when the corresponding solutions were analysed.

Key Words: fluorescein, pH, sol-gel films, absorption, photoluminescence

1. INTRODUCCIÓN

La fluoresceína es una molécula orgánica que en disolución líquida presenta importantes propiedades ópticas tanto de absorción como de luminiscencia, dando espectros característicos en la zona del visible, que se ven modificados con el pH [1,2,3]. Las propiedades de la fluoresceína han permitido que se utilice como marcador óptico en biología [4] y que actualmente se pretenda explotar como indicador óptico (absorción y luminiscencia) de pH [2,3,5]. En el desarrollo de sensores ópticos, la incorporación de moléculas orgánicas a una matriz porosa de tipo sol-gel [6-8] resulta ventajosa, ya que se evitan o disminuyen algunos de los inconvenientes de su uso en disolución, tales como procesos de contaminación y degradación de la molécula, procesos no radiativos, etc., además de ofrecer la posibilidad de ser reutilizados. Otras ventajas que presentan los recubrimientos sol-gel son la relativa facilidad de preparación, el bajo coste, la gran resistencia química, la buena adherencia mecánica, y la aptitud del sol para recubrir muchos tipos de superficies. Todo ello ha permitido el desarrollo de esta técnica en nuevos sistemas que presentan posibilidades prometedoras en aplicaciones de interés tecnológico [9,10].

En este trabajo se estudian y comparan las propiedades ópticas de la fluoresceína en recubrimientos sol-gel de sílice y en disoluciones, haciendo especial énfasis en estudiar las propiedades ópticas al variar la concentración de fluoresceína y el pH del medio en que se encuentra.

2. MÉTODO EXPERIMENTAL

En la preparación de los recubrimientos se utilizaron como precursores tetraetóxido de silicio (TEOS), ácido clorhídrico 3M y metanol en proporciones molares 1:4:8, respectivamente. La fluoresceína se añadió al sol disuelta en metanol para obtener recubrimientos con concentraciones de 0,51, 0,97, 1,88, 2,82 y 3,77 % en peso. En el cálculo de las concentraciones molares se utilizó una densidad media para los recubrimientos de 1,5 g/cm³. Como sustratos se utilizaron portas comerciales de vidrio sódico cálcico con espesores de 0,5 mm, que previamente se limpiaron cuidadosamente con etanol.

Los recubrimientos sol-gel sobre los portas, se prepararon por la técnica de inmersión-extracción, obteniéndose diferentes espesores al extraerlos a distintas velocidades (entre 5 y 25 cm/min). Los recubrimientos así obtenidos se dejaron secar al aire al menos una hora antes de introducirlos en una estufa donde permanecieron tres días a 60 °C. Posteriormente, se determinaron los espesores de los recubrimientos a partir de los espectros de reflexión [11].

Las disoluciones con fluoresceína se prepararon empleando metanol y disoluciones tampón comerciales de pH entre 2 y 12 (pHydrión Buffers, Micro Essential Laboratory) en proporciones de volumen 1:4, respectivamente. Las disoluciones de pH < 2 se prepararon con HCl y las de pH > 12 con NaOH. Para obtener los espectros de las disoluciones, se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor.

Los recubrimientos se hidrataron durante 1 h en agua destilada

para facilitar los posteriores procesos de protonación y desprotonación. Seguidamente, las muestras se mantuvieron durante 5 min sumergidas en disoluciones tampón de pH crecientes entre 0 y 13,5. A continuación se obtuvieron los espectros de absorción óptica y de luminiscencia de las muestras tal y como se ha descrito en trabajos anteriores [7,12].

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

Los espectros de absorción de los recubrimientos presentan dos bandas anchas con máximos principales en 435 y 487 nm, como se muestra en la Fig. 1a. La intensidad relativa de ambas bandas depende del pH de la disolución en la que previamente se sumergieron los recubrimientos. Así, para medios con pH ácidos la contribución al espectro de la banda de 435 nm es mayor que la de 487 nm, ocurriendo lo contrario para pH básicos. La Fig. 1b muestra los espectros de la fluoresceína en disolución metanol-tampón que, aunque similares en su forma, presentan variaciones en la intensidad relativa de los máximos y en la longitud de onda en la que aparecen, especialmente a pH 0,5 y 13,5. Así, a pH 0,5 el máximo de absorción en las disoluciones aparece a 438 nm en vez de a 435 nm. Por otro lado, a pH 13,5 la disolución muestra el máximo a 492 nm en vez de a 487 nm (Figs. 1 a y b). Este desplazamiento en la posición del máximo hacia el rojo, respecto del observado en el recubrimiento, es similar al encontrado por Shamansky [2], y posiblemente relacionado con un estado electrónico molecular más confinado, que se vería favorecido por la transición del estado sol al estado vítreo del recubrimiento, mucho más rígido. La forma lactónica de la fluoresceína en disolución presenta una mínima absorción [1,2] cerca de pH 3, que no resulta tan marcada en el recubrimiento, lo que sugiere que la red de sílice afecta la estructura y los niveles electrónicos de la fluoresceína encapsulada en los poros abiertos.

La Fig.2 muestra la variación con el pH de la intensidad de absorción para los dos máximos principales de la fluoresceína en el recubrimiento, donde se puede apreciar que cada máximo sigue un comportamiento distinto. La intensidad de la banda de 487 nm aumenta con el pH y su variación relativa es mayor que la observada para la banda de 435 nm, la cual disminuye en intensidad al aumentar el pH. Para la banda de 487 nm, se observa un comportamiento aproximadamente lineal de la absorción con el pH en el intervalo entre 4 y 10. Por otro lado, la variación de la banda de 435 nm se puede aproximar a dos segmentos lineales, comprendidos entre pH 0,1 y 7,0 y otro para pH entre 7,0 y 13,5. Este comportamiento difiere del que se obtiene en disolución, donde el máximo de 438 nm muestra una disminución en intensidad con el pH seguida de una recuperación parcial para $3 \leq \text{pH} \leq 5$, volviendo a disminuir para pH mayores. Los parámetros de los ajustes lineales se resumen en la Tabla I. Estos resultados permiten considerar a este dispositivo como un buen candidato para desarrollar un optodo sencillo de pH, similar al que se ha desarrollado con otras sustancias dopantes [6,7,14].

TABLA I. PARÁMETROS DE LOS AJUSTES LINEALES Y SUS COEFICIENTES DE CORRELACIÓN QUE APARECEN EN LAS FIGURAS QUE SE INDICAN.

Figura	pH	y = mx + b		r ²	Comentario
		m	b		
2	0,1-7,0	-5,246x10 ⁻³	0,10022	0,9634	Banda de 435 nm
2	7,0-13,5	-1,449x10 ⁻³	0,07535	0,9483	Banda de 435 nm
2	4,0-10,0	9,450x10 ⁻³	0,01614	0,9954	Banda de 487 nm
3	1,5-10,0	-8,299x10 ⁻²	1,1249	0,9960	Emis. recub.(520)-pH
4a	6,2	0,39065	0,04389	0,9970	Ley Beer disolución
4b	7,0	1,039x10 ⁻³	0,01139	0,9843	Ley Beer recubrim.
5a	---	---	---	0,7377	Emisión recub.(520)
5b	---	---	---	0,9937	Emisión disol.(520)

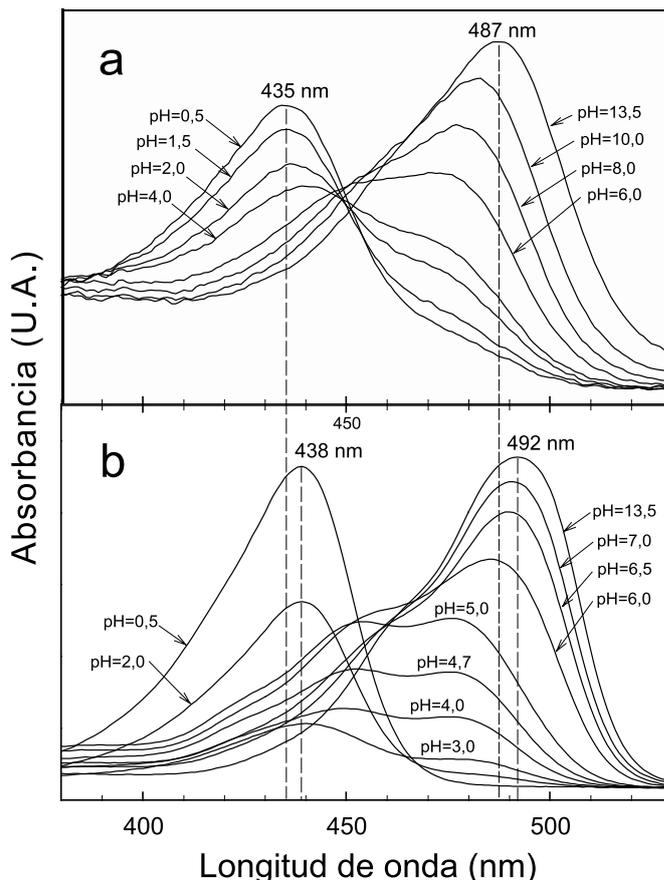


Fig 1. Espectros de absorción de la fluoresceína para distintos pH en (a) el recubrimiento con 0,97 % en peso y 245 nm de espesor; (b) disoluciones.

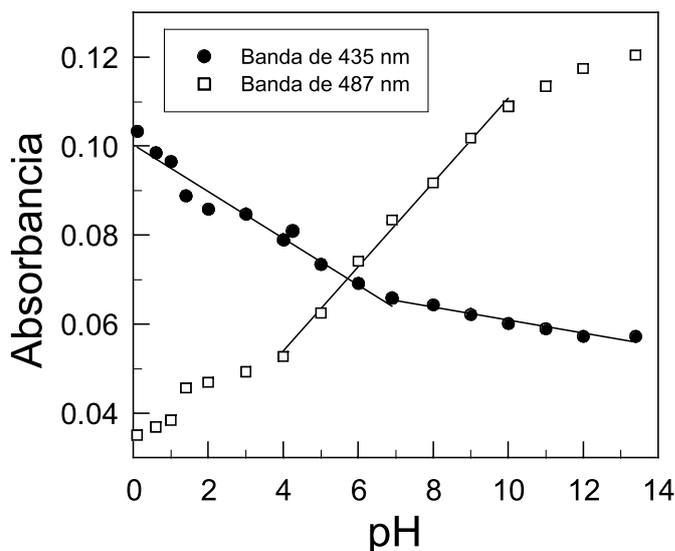


Fig 2. Evolución de la absorbancia con el pH de las bandas de 435 nm (ácida) y 487 nm (básica) de la fluoresceína (0,97 % en peso) en el recubrimiento de 245 nm de espesor.

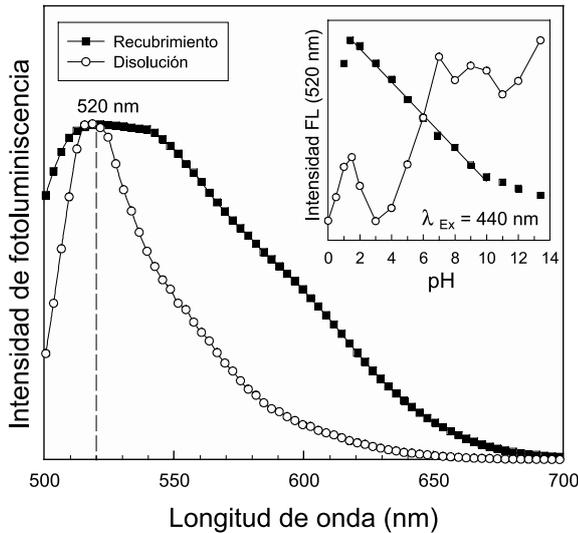


Fig 3. Espectros normalizados de luminiscencia de la fluoresceína en disolución y en recubrimiento para una excitación de 440 nm a pH 13,5. La figura insertada muestra la evolución normalizada de la emisión de 520 nm con el pH para disoluciones y recubrimientos (ajuste lineal entre pH 1,5 y 10,0).

Una característica del espectro de emisión de la fluoresceína en los recubrimientos a un pH de 13,5 y al excitar con fotones de 440 nm, es que presentan un perfil claramente más ancho que en disolución (Fig. 3). Esta diferencia se relaciona con el carácter compuesto del espectro de emisión de los recubrimientos que presenta dos bandas de emisión secundarias alrededor de 550 y 600 nm (Fig. 3). Estas emisiones de menor energía son probablemente la contribución de una fracción de mo-

léculas de fluoresceína que permanecen atrapadas en poros cerrados y que conservan el estado más protonado, correspondiente a la catálisis ácida del sol. Esta interpretación se basa en que en un medio ácido los espectros de luminiscencia de la fluoresceína presentan unas componentes secundarias similares a las mencionadas en 550 y 600 nm.

En el gráfico insertado en la Fig. 3, se muestra el comportamiento lineal monótono con el pH de la emisión de fluoresceína en el recubrimiento, lo que sugiere su aplicación como optodo luminiscente de pH. Además, en el recubrimiento el intervalo de pH en el que presenta la respuesta lineal (de 1,5 a 10) es mucho mayor que en disolución (de 4 a 7) lo que representa una mejora respecto al comportamiento de la disolución. Los parámetros del ajuste se recogen en la Tabla I.

Tanto en los recubrimientos como en las disoluciones (Figs. 4a y 4b), la intensidad del máximo de absorción aumenta proporcionalmente con la concentración de fluoresceína, lo que indica la validez de la ley de Lambert-Beer para este intervalo de concentraciones (Tabla I). No obstante, dado que la fluoresceína emite luz con una gran eficiencia cuántica a la vez que la absorbe, la medida de la intensidad del máximo de absorción se vería influida por la emisión luminiscente. Esto significaría que los valores medidos directamente del espectro de absorción serían en realidad algo menores y necesitarían una corrección. Sin embargo y afortunadamente, este efecto se comprueba que es pequeño y en cualquier caso la tendencia lineal de la luminiscencia con la concentración (Fig. 5a) influiría dando también una respuesta lineal. En la Fig. 5b se muestra la variación lineal de la intensidad de luminiscencia de las disoluciones con la concentración, aunque en este caso con una pendiente positiva. La variación de la absorción (emisión) dividida por el espesor utilizada en la Fig. 4b (5a) confirma que tanto la absorptividad molar (eficiencia cuántica) como la concentración se ven poco influidas por el espesor del recubrimiento. En la Tabla I se indican los valores de los ajustes mostrados en las Figs. 5a y 5b.

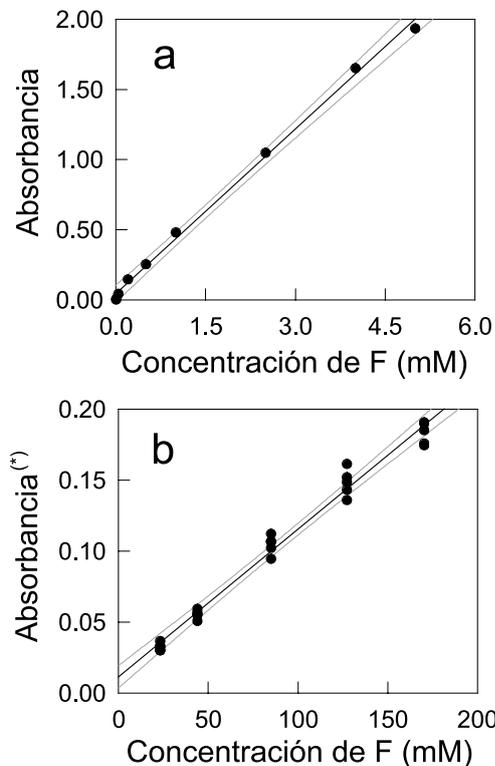


Fig 4. Evolución del máximo de absorbancia con la concentración de fluoresceína en (a) disoluciones de etanol (486 nm) y (b) recubrimientos a pH 7,0 (477 nm). Se muestran las rectas de mejor ajuste y los intervalos de confianza del 99 %. (*) Absorbancia / Espesor.

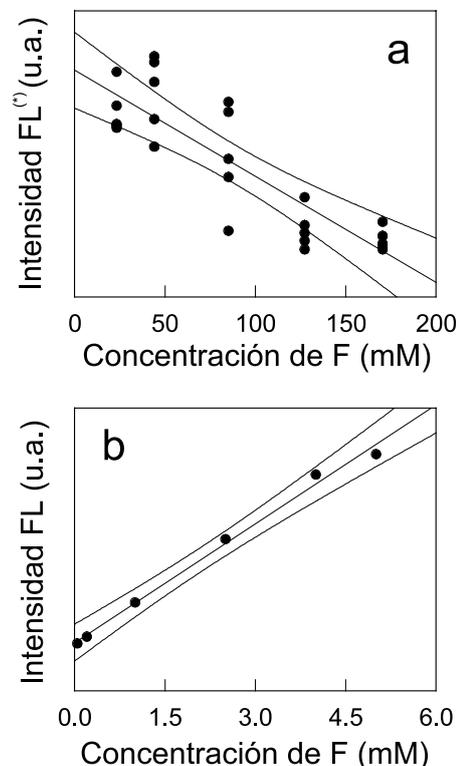


Fig 5. Intensidad de la luminiscencia a 520 nm en función de la concentración de fluoresceína al excitar con 440 nm en (a) recubrimientos a pH 7,0 y (b) disoluciones de etanol. Se muestran las rectas de mejor ajuste y los intervalos de confianza del 99 %. (*) Luminiscencia / Espesor.

4. CONCLUSIONES

Los resultados señalan que la incorporación de la fluoresceína en recubrimientos vítreos de tipo sol-gel, ofrece ventajas y buenas posibilidades de aplicación en sensores ópticos de pH (luminiscentes y de absorción) para un amplio intervalo de pH.

En los recubrimientos dopados con fluoresceína hay mayor linealidad en la variación de la intensidad de la absorción y la luminiscencia que en las disoluciones.

Al incorporar la fluoresceína a los recubrimientos sol-gel, ésta se mantiene sensible al pH del entorno y esto permite utilizar esos recubrimientos como optodos de pH.

Para las concentraciones estudiadas, la absorción de los recubrimientos sigue una ley lineal de tipo Lambert-Beer.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean dar su agradecimiento al proyecto de la DGI MAT2002-04503-C02-02. Uno de los autores desea agradecer especialmente la beca del CONICIT de Costa Rica para sufragar parcialmente sus estudios doctorales en España.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. M.R.S. Fuh, L.W. Burgess, T. Hirschfeld, G.D. Christian, F. Wang. "Single fibre optic fluorescence pH probe". *Analyst*, **112**, 1159-1163 (1987).
2. L.M. Shamansky, M. Yang, M. Olteanu, E.L. Chronister. "A spectroscopic study of the pH sensor response of fluorescein doped silica and aluminosilica sol-gel glasses". *Mat. Lett.*, **26**, 113-120 (1996).
3. M.D. Gulcev, G.L.G. Goring, M. Rakic, J.D. Brennan. "Reagentless pH-based biosensing using a fluorescently-labelled dextran co-entrapped with hydrolytic enzyme in sol-gel derived nanocomposite films". *Anal. Chim. Acta*, **457**, 47-59 (2002).
4. R.D. Lillie. "Conn's biological stains" 9th Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1977).
5. B.D. MacCraith, V. Ruddy, C. Poter, B. O'Kelly, J.F. McGilp. "Optical waveguide sensor using evanescent wave excitation of fluorescent dye in sol-gel glass". *Electron. Lett.* **27** [14] 1247-1248 (1991).
6. J. Lin, O. Liu. "An optical pH sensor with a linear response over a broad range". *Anal. Chim. Acta*, **408**, 49-55 (2000).
7. M.A. García, S.E. Paje, M.A. Villegas, J. Llopis. "Preparation and characterization of calcein-doped thin coatings". *Appl. Phys. A*, **74**, 83-88 (2002).
8. E. Bescher, J.D. Mackenzie. "Hybrid organic-inorganic sensors". *Mat. Sci. Eng. C*, **6**, 145-154 (1998).
9. C.J. Brinker, G.W. Scherer. "Sol-Gel Science. The Physics of Sol-Gel Processing". Academic Press, Capítulo 14, pp 839-873 (1990).
10. D.R. Uhlmann, G. Teowee. "Sol-gel science and technology: current state and future prospects". *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, **13**, 153-162 (1998).
11. M.A. García, S.E. Paje, J. Llopis, M.A. Villegas. "Influencia de las condiciones de preparación en la luminiscencia de recubrimientos de sílice pura". *Bol. Soc. Esp. Ceram. y V.*, **39**, [5] 641-646 (2000).
12. M.A. Villegas, L. Pascual, S.E. Paje, M.A. García, J. Llopis. "Eriochrome cyanine doped sol-gel coatings. Optical behavior against pH". *J. Europ. Ceram. Soc.* **20**, 1621-1628 (2000).
13. A. Lobnik, I. Oehme, I. Murkovic, O.S. Wolfbeis. "pH optical sensors based on sol-gels: Chemical doping versus covalent immobilization". *Anal. Chim. Acta*, **367**, 159-165 (1998).
14. D.A. Nivens, Y. Zhang, S.M. Angel. "A fiber-optic pH sensor prepared using a base-catalized organo-silica sol-gel". *Anal. Chim. Acta*, **376**, 235-245 (1998).

Recibido: 01.02.03

Aceptado: 30.11.03

