

**EL EFECTO DEL ENTORNO
EN LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA.
MODELOS TEÓRICOS Y APLICACIONES ANALÍTICAS**

TESIS DOCTORAL
M^a ARANTZAZU DELGADO CAMÓN
Junio 2012

El Dr. Vicente Luís Cebolla Burillo, Investigador Científico del Instituto de Carboquímica de Zaragoza, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Dr. Javier Galbán Bernal, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

que la presente Memoria titulada: **"El efecto del entorno en la emisión de fluorescencia. Modelos teóricos y aplicaciones analíticas"**, correspondiente al Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza en fecha 24 de Junio de 2010, ha sido realizada por M^a Arantzazu Delgado Camón en el Instituto de Carboquímica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, codirigida por D. Vicente Luís Cebolla Burillo y D. Javier Galbán Bernal, para optar al grado de Doctor.

Y así mismo

AUTORIZAN

la presentación de la citada Memoria de Tesis Doctoral, para su defensa y calificación.

Expidiendo el presente certificado en Zaragoza, a 25 de Junio de 2012.

Vicente Luís Cebolla Burillo

Javier Galbán Bernal

Agradecimientos

Al repasar lo que han sido estos casi 10 últimos años, en los que empecé a trabajar en el laboratorio, es difícil recordar todos los momentos pasados, pero definitivamente llego a la conclusión de que soy una privilegiada: a parte de por haber tenido la oportunidad de trabajar en lo que me gusta, por la cantidad de gente con la que he compartido este camino.

Realmente quiero dar las gracias en primer lugar a mis directores de tesis, por todo lo que he aprendido de ellos y con ellos: Vicente, por darme la oportunidad de empezar, los ánimos para seguir adelante y, sobre todo, el gusto por la ciencia bien hecha, y Javier, por todo su esfuerzo, trabajo y por las curiosas conversaciones sobre lo divino y lo humano.

A Rosa y Susana, gracias por los ánimos y ayuda en todo momento, sobre todo en los periodos difíciles.

No quiero olvidar a mis "maestras shaolín": Vanesa y Elena (Mathews) y a mi "pequeña saltamontes": Elena (Rosemary). Gracias por compartir algo más que el trabajo: por las conversaciones, cafés, viajes, ánimos, fiestas, ...

Menos olvidar a mis compañeros de Biosensores Analíticos: Andrés, Melisa, Estefanía, Javi, Isa, Carlos, Mapi, que siempre me han recibido con una sonrisa cuando he ido a visitarlos estos últimos años.

Al resto de compañeros del departamento de Química Analítica: administración, profesores, a los de la antigua "comisión de festejos" y a las nuevas generaciones: "pólipos sangrantes".

Recordar también a las personas del Instituto de Carboquímica y en especial a: Carmen, Pilar, Luis, Edgar, Eva. Gracias por vuestra compañía, ánimo y ayuda.

Durante estos años también he tenido la oportunidad de trabajar en la Universidad del País Vasco, en San Sebastián. Gracias a todos por la acogida y la ayuda en todo momento.

A mis amigos de aquí y de allá: Caspe, "Flower Power", Taizé, África, América..., gracias por estar siempre. Gracias en especial a David (Salva), por su ejemplo de lucha y ánimo y por darme la razón principal para no rendirme cuando el trabajo se hacía tedioso, recordándome el valor del esfuerzo para conseguir lo mejor.

Siempre, gracias a mi familia como base de todo.

Arancha

Este trabajo ha sido posible gracias a la aportación de los siguientes proyectos:

- "Desarrollo de un nuevo sistema de detección para la caracterización de toda clase de polímeros y biopolímeros basado en fluorescencia generada por interacciones no covalente" Plan Nacional de I+D+i (CTQ2005-00227/PPQ), Instituto de Carboquímica, CSIC. Diciembre 2005-Diciembre 2008. Vicente L. Cebolla Burillo.

- "Estrategias para el desarrollo de nuevos sensores laminares de fluorescencia con transducción por fibra óptica para la detección general y específica de analitos" Plan Nacional de I+D+i (CTQ2008-00959, FLUOSENSO). Instituto de Carboquímica, CSIC. Enero 2009-Diciembre 2011. Vicente L. Cebolla Burillo.

- "Desarrollo de estrategias analíticas coordinadas basadas en Nanobiosensores Ópticos Autoindicadores (medidas "in-situ" e "in vivo") y Resonancia Magnética Nuclear (medidas en laboratorio) para la determinación simultánea de especies de interés clínico, alimentario y medioambiental. 1- Nanobiosensores Ópticos Autoindicadores" Plan Nacional de I+D+i (CTQ2008-06751-C02-01/BQU). Instituto Universitario de Investigación en Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza. Enero 2009-Diciembre 2011. Javier Galbán Bernal.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.- OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN Y

RESUMEN DEL TRABAJO 1

1.1.- A MODO DE PRESENTACIÓN	1
PARTE I: ESTUDIO Y UTILIZACIÓN DEL EFECTO DEL ENTORNO EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA	2
I.1.- Antecedentes y objetivo general	2
I.2.- Investigaciones previas sobre FDIC	6
I.3.- Efecto del entorno en medio líquido: objetivos específicos	8
PARTE II: ESTUDIO Y UTILIZACIÓN DEL EFECTO DEL ENTORNO EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN MEDIO SÓLIDO: SENSORES ÓPTICOS	10
II.1.- Sensores ópticos autoindicadores: investigaciones previas	10
II.2.- Modelado de la señal óptica fluorescente: objetivo general	12
II.3.- Utilización del FDIC para el desarrollo de sensores ópticos generales: objetivo específico	13

PARTE I

CAPÍTULO 2.- MODELO ANALÍTICO EN DISOLUCIÓN 21

2.1.- PLANTEAMIENTO GENERAL	23
2.2.- ECUACIÓN GENERAL DE FLUORESCENCIA: PARÁMETROS BÁSICOS	27
2.2.1.- Procesos de desactivación no radiativos	27
2.2.2.- Ecuación básica de la fluorescencia	29
2.3.- EFECTO DEL ENTORNO EN LA CONSTANTE RADIATIVA (k')	32

2.3.1.- Fluorescencia	32
2.3.2.- Implicaciones en la medida de la absorbancia	35
2.4.- EFECTO DEL ENTORNO EN LA CONSTANTE NO RADIATIVA (k^{nr})	37
2.4.1.- Formulación de k^{nr}	37
2.4.2.- Energía de los niveles en ausencia de disolvente	41
2.4.3.- Solvatación del fluoróforo	44
2.5.- MODELO GENERAL: EFECTO DEL ENTORNO EN LA FLUORESCENCIA	49
2.5.1.- Formulación general	49
2.5.2.- Simulación matemática	52
2.5.3.- Comportamiento analítico	60
<i>a) Efecto del índice de refracción</i>	60
<i>b) Efecto de la constante dieléctrica</i>	62
2.6.- MODELO ANALÍTICO: DISCUSIÓN DEL MODELO GLOBAL	64
2.6.1.- Aproximación empírica	64
2.6.2.- Aproximación formal	67
<i>a) Dependencia de la constante dieléctrica</i>	67
<i>b) Dependencia del índice de refracción</i>	70
<i>c) Modelo final</i>	71
2.7.- UN MODELO ANALÍTICO SIMPLIFICADO	71
2.7.1.- Simplificación sobre n_M	71
2.7.2.- Simplificación sobre $f_{\epsilon, M}$	74
2.7.3.- Modelo simplificado general	75
<i>a) Término independiente: fluorescencia del disolvente</i>	75
<i>b) Término en $X_{V,A}$: sensibilidad del método</i>	75
<i>c) Término en $X_{V,A}^2$: intervalo de respuesta lineal</i>	80
2.7.4.- Validación de la simplificación	81
2.8.- CONCLUSIONES	82

3.- DISCUSIÓN DEL MODELO PROPUESTO Y RESULTADOS EN MEDIO LÍQUIDO	87
3.1.- EXPERIMENTAL	87
3.1.1.- Fluoróforos	87
3.1.2.- Analitos	89
3.1.3.- Instrumentación y condiciones de medida	89
3.1.4.- Preparación y experimentos realizados	92
<i>a) Corrección de la dilución</i>	93
<i>b) Comparación del efecto de la adición de distintos analitos (a una determinada concentración)</i>	95
<i>c) Estudio del efecto de la concentración de analito</i>	96
3.2.- CASO GENERAL	96
3.2.1.- Efecto del disolvente	96
3.2.2.- Efecto del fluoróforo	99
3.2.3.- Efecto del analito. Cinética y sensibilidad	101
<i>a) Cinética del proceso</i>	101
<i>b) Naturaleza del analito I: longitud de la cadena. Validez del modelo</i>	105
<i>c) Naturaleza del analito II: grupo funcional. Linealidad</i>	110
3.3.- RESULTADOS EN DICLOROMETANO	115
3.3.1.- Estabilidad de las disoluciones	116
3.3.2.- Mecanismo del cambio de fluorescencia: formación de pares iónicos	117
3.3.3.- Adiciones de analitos	120
<i>a) Adición de alcanos</i>	120
<i>b) Adición de alcoholes. Cinética del proceso</i>	124
3.4.- CONCLUSIONES	128

4.- CAMBIOS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

COMO SISTEMA DE DETECCIÓN EN HPLC 133

4.1.- INTRODUCCIÓN 133

4.2.- ADAPTACIÓN DEL MODELO EN MEDIO LÍQUIDO AL SISTEMA
HPLC-GPC 136

4.3.- EXPERIMENTAL 138

4.3.1.- Materiales 138

4.3.2.- Sistema cromatográfico 139

4.3.3.- Selección de los parámetros de trabajo 142

a) Disolventes 142

b) Caudales de las bombas 143

c) Concentración del fluoróforo 145

d) Detección 146

e) Inyección de analitos 147

4.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 147

4.4.1.- Detección de polímeros en HPLC-GPC mediante FDIC 147

a) Efecto de la fase móvil en la señal 147

b) Efecto de la masa y del tamaño del polímero 150

c) Efecto del fluoróforo 154

4.4.2.- Detección de esfingolípidos en HPLC (fase reversa)
mediante FDIC 156

4.4.3.- Repetibilidad y sensibilidad de HPLC-FDIC 159

4.5.- CONCLUSIONES 160

PARTE II

5.- MODELO ÓPTICO PARA SENSORES DE FLUORESCENCIA 167

5.1.- INTRODUCCIÓN 167

5.1.1.- Teoría de Kubelka-Munk 167

5.1.2.- Modelos para fluorescencia en sólidos	172
<i>a) Modelo de Goldman</i>	173
<i>b) Modelo de Zweidinger y Winefordner</i>	180
<i>c) Modelo de Oelkrug</i>	183
<i>d) Otros modelos</i>	184
5.2.- PROPUESTA DE UN MODELO	185
5.2.1.- El paso óptico efectivo. Modelo mejorado	185
<i>a) Planteamiento general</i>	185
<i>b) Cálculo del valor de μ: simplificaciones</i>	190
<i>c) Formulación del modelo mejorado</i>	191
5.2.2.- Efecto de filtro interno. Modelo mejorado con efecto de filtro interno	194
<i>a) Planteamiento general</i>	194
<i>b) Evaluación del modelo</i>	198
<i>c) Comparación entre los modelos mejorados</i>	200
5.2.3.- El coeficiente de dispersión	200
5.2.4.- La celda de flujo	202
5.3.- COMPROBACIÓN DEL MODELO EN MEDIDAS REALES	204
5.3.1.- Introducción	204
5.3.2.- Experimental	205
5.3.3.- Resultados	206
<i>a) Cálculo de los distintos parámetros</i>	206
<i>b) Comparación de los resultados experimentales y teóricos</i>	208
5.4.- CONCLUSIONES	210
5.5.- ANEXO	212
A.5.1.- Valores calculados de μ para distintos valores de k , s y L	212

6.- DESARROLLO DE SENSORES ÓPTICOS GENERALES	217
6.1.- INTRODUCCIÓN	217
6.1.1.- El efecto FDIC en sensores ópticos	217
6.1.2.- Métodos de inmovilización	219
<i>a) Entrampamiento</i>	219
<i>b) Adsorción</i>	220
<i>c) Unión covalente</i>	221
6.2.- EXPERIMENTAL	223
6.2.1.- Reactivos	223
6.2.2.- Instrumentación	224
<i>a) Medidas de fluorescencia y absorción UV-VIS</i>	224
<i>b) Sistema FIA y condiciones de medida</i>	225
<i>c) Materiales para la síntesis y caracterización de la berberrubina</i>	229
6.2.3.- Procedimientos para la preparación de las láminas	230
<i>a) Entrampamiento en poliacrilamida (PAA)</i>	230
<i>b) Entrampamiento en otros polímeros</i>	232
<i>c) Unión covalente y adsorción en soportes comerciales derivatizados</i>	232
<i>d) Unión covalente en sílica gel y vidrio</i>	233
6.3.- CONSIDERACIONES GENERALES	234
6.3.1.- Ensayos previos	234
6.3.2.- Modelo matemático de respuesta	237
<i>a) Simplificación del modelo de fluorescencia en sólidos</i>	237
<i>b) Modelo general para FDIC en sólidos</i>	239
6.4.- SENSORES BASADOS EN EL ENTRAMPAMIENTO DEL FLUORÓFORO EN POLIACRILAMIDA	241
6.4.1.- Ideas generales y ensayos previos	241
6.4.2.- Mecanismos adicionales de cambio de fluorescencia: modelo matemático para sensores FDIC en geles	243

6.4.3.- Sensor de coralina en PAA para medio acuoso	246
<i>a) Preparación de las láminas</i>	246
<i>b) Efecto de la concentración de albúmina en la lámina</i>	248
<i>c) Ensayos con distintos analitos</i>	249
<i>d) Estudios adicionales</i>	249
6.4.4.- Sensores de coralina en PAA para medio acuoso/metanol	252
<i>a) Preparación de las láminas</i>	252
<i>b) Medida de PEGs</i>	253
6.5.- SENSOR DE BERBERRUBINA	254
6.5.1.- Síntesis de la berberrubina	254
<i>a) Irradiación por microondas</i>	255
<i>b) Pirólisis en vacío</i>	256
6.5.2.- Propiedades ópticas de la berberrubina como fluoróforo FDIC	256
6.5.3.- Berberrubina inmovilizada	263
6.6.- CONCLUSIONES	268
6.7.- ANEXOS	269
A.6.1.- Estructuras de los fluoróforos usados	269
A.6.2.- Espectros de H ¹ -RMN de las pruebas de síntesis de la berberrubina	272
CONCLUSIONES GENERALES	279
ANEXOS	285
A1.- Análisis de perfiles según la etapa controlante	285
A2.- Estudios con albúmina en láminas de GOx-FS-PAA	301
A3.- Abreviaturas y glosario	311
A4.- Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral	315

CAPÍTULO 1:
OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN Y
RESUMEN DEL TRABAJO

1.- OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN Y RESUMEN DEL TRABAJO

1.1.- A MODO DE PRESENTACIÓN

Está ampliamente reconocido que la fluorescencia molecular es, actualmente, una técnica instrumental fundamental. Su aplicación está aumentando continuamente en muchos campos de la ciencia, la tecnología o el conocimiento en general, debido no solamente a su extraordinaria sensibilidad, sino también a sus posibilidades multiparamétricas (medidas de decaimiento o anisotropía), a su capacidad de sondear la materia (microscopia de fluorescencia, procesos en el estado excitado) y a su flexibilidad instrumental (análisis remoto, construcción de sensores).

La presente Tesis Doctoral aborda aspectos teóricos y prácticos de la fluorescencia molecular, en medio líquido y sólido, que pueden resumirse globalmente en:

1.- Estudio y utilización del efecto del entorno molecular en la intensidad de fluorescencia, que se refiere a cómo las interacciones no covalentes que sufre un fluoróforo en presencia de un analito y un disolvente afectan a su emisión y a la utilización de esos cambios para obtener información analítica del entorno.

2.- Modelado de la señal fluorescente en sensores ópticos de fluorescencia, entendidos éstos como dispositivos en los que un fluoróforo es inmovilizado en una matriz sólida. Se pretende así mismo desarrollar nuevos sensores generales de este tipo utilizando los efectos del entorno molecular.

Se ha preferido no seguir el orden tradicional de dedicar un primer capítulo a realizar una exposición de la recopilación bibliográfica sobre el tema,

sino hacer una presentación de los diferentes capítulos de la Tesis Doctoral, explicar la relación que hay entre ellos y plantear los objetivos perseguidos. La parte bibliográfica específica se trata en cada uno de los capítulos individualmente.

PARTE I: ESTUDIO Y UTILIZACIÓN DEL EFECTO DEL ENTORNO EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN MEDIO LÍQUIDO

I.1.- Antecedentes y objetivo general

Es bien sabido que la fluorescencia molecular es muy sensible al entorno que rodea al fluoróforo. Desde un punto de vista analítico, el entorno es importante ya que puede usarse para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa de las moléculas no fluorescentes que lo conforman. A este respecto, una inspección bibliográfica muestra que se vienen desarrollando desde hace tiempo dos enfoques analíticos: uno es el conocido como "efecto de *quenching*" ("apagamiento" o desactivación de la fluorescencia) y otro que puede denominarse como "efecto del disolvente".

El "efecto de *quenching*" es, hasta la fecha, la alternativa metodológica más utilizada. En esta aproximación, los métodos analíticos están basados generalmente en la pérdida o "apagamiento" de la fluorescencia por interacción del fluoróforo y el analito. Son bien conocidos los diferentes tipos de interacciones como las colisionales, formación de excímeros y excíplejos, la transferencia de protones y electrones, o la transferencia de energía, y han sido, en su mayoría, bien descritas por la ecuación de Stern-Volmer convencional y otras derivadas de ésta. Existen varios libros¹ que describen adecuadamente el fenómeno del *quenching* y su utilización en diferentes ciencias y aplicaciones.

¹ Hay muchos libros de fluorescencia donde encontrar información sobre el tema. Son particularmente interesantes los libros de:

El "efecto del disolvente" en fluorescencia también ha sido estudiado ampliamente. A diferencia del *quencher* (agente que produce el *quenching*), la razón química para este efecto proviene de las interacciones no covalentes, ya sean no específicas (fuerzas de London, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido) o específicas (puentes de hidrógeno), establecidas entre el fluoróforo y el disolvente. Se han propuesto diferentes modelos^{2 3} para explicar este efecto, pero todos ellos se han dirigido a explicar cómo estas interacciones producen cambios en las longitudes de onda de los espectros de excitación y emisión del fluoróforo (en muchos casos, muy pequeños), sin explicar los cambios en el rendimiento cuántico (o en la intensidad de emisión). Su uso se ha restringido prácticamente a la relación entre fluoróforos y disolventes. Estos estudios han encontrado muchas aplicaciones físico-químicas particularmente en el desarrollo de escalas de polaridad o de acidez de las sustancias, o en estudios de polaridad de entornos⁴. Sin embargo, en muchos casos, estos cambios en las longitudes de onda vienen acompañados de cambios en el rendimiento cuántico.

Resultados previos del grupo de investigación proponen una extensión del llamado "efecto del disolvente". En trabajos anteriores se ha observado que la presencia de analitos, incluidas moléculas no fluorescentes, altera de modo general el nivel de emisión de los fluoróforos en disolventes, produciendo en

- Lakowicz, J. R.; "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 2ª Ed, **1999**, (o 3ª Ed, **2006**) Kluwer Academic/Plenum Press, New York. Chp.8 y 9 para quenching; Ch. 6 y 7 para efecto del disolvente.

- Valeur, B.; "Molecular Fluorescence. Principles and applications", Wiley VCH, **2002**, Weinheim; Ch. 4 para quenching; Ch. 8 para efecto del disolvente.

2 Lippert, E.; "Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singluettzustand" *Z. Elektrochem.* **1957**, 61, 962-975. Lippert, E.; "Dipolmoment und Elektronenstruktur von angerechten Molekullen" *Z. Naturforsch. A.* **1955**, 10, 541-545.

3 Magata, N.; Kubota, T.; "Molecular Interactions and Electronic Spectra" **1970**, Dekker, New York. Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M.; "Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules" *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, 29, 465-470.

4 Reichardt, C.; "Solvents and Solvet Effects in Organic Chemistry" 3rd, Updated and Enlarged Edition, Wiley-VCH, **2003**, Weinheim.

ocasiones incrementos en los rendimientos cuánticos, incluso sin desplazamiento de las longitudes de onda de emisión. Existen bastantes ejemplos, muy dispersos en la bibliografía, de fluoróforos que experimentan incrementos en la emisión en presencia de analitos muy distintos, por ejemplo, el caso del catión berberina cuya emisión aumenta en presencia de hidrocarburos saturados, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas⁵. A la inversa, existen otros muchos ejemplos en los que un analito dado incrementa la emisión de un número notable de fluoróforos diferentes. Se puede considerar, por ejemplo, el caso de los lípidos, que tienen una estructura apolar parcial y no son fluorescentes, pero que son, sin embargo, capaces de generar una elevada respuesta fluorescente en fluoróforos tales como la primulina, el catión berberina⁶, o el rojo de nilo⁷, etc. Entre otros ejemplos que se pueden citar, está también el caso de la albúmina de suero humano (HSA), que produce aumentos en la fluorescencia de emisión de fluoróforos de tipo squarylium⁸, catión berberina⁹, HPMO¹⁰ o diferentes

5 Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Domingo, M. P.; Henrion, P.; Vela, J.; "Enhancement of Fluorescence in Thin-Layer Chromatography Induced by the Interaction between *n*-Alkanes and an Organic Cation" *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1759-1766. Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Vela, J.; Garriga, R.; Domingo, M. P.; "Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. An Explanation of This Phenomenon" *Org. Lett.* **2000**, 2, 2311-2313.

6 Kasten, F. H.; "Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History and Applications" en Mason, W. T.; "Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity" 2nd Edition, Academic Press, **1999**, San Diego, Ch.2, p. 23-ss.

7 Fowler, S. D.; "Rapid Detection and Quantitation of Lipids on Thin-Layer Chromatography by Nile Red Fluorescence" en Touchstone, J. C.; "Chromatography in the Life Sciences" John Wiley & Sons, **1990**, New York, Ch. 2. Bonilla, E.; Prella, A.; "Application of Nile Blue and Nile Red, Two Fluorescent Probes, for Detection of Lipid Droplets in Human Skeletal Muscle" *J. Histochem. Cytochem.* **1987**, 35, 619-621. Brown, W. J.; Sullivan, T. R.; Greenspan, P.; "Nile Red Staining of Lysosomal Phospholipid Inclusions" *Histochemistry*, **1992**, 97, 349-354.

8 Nakazumi, H.; Colyer, C. L.; Kaihara, K.; Yagi, S.; Hyodo, Y.; "Red Luminescent Squarylium Dyes for Noncovalent HSA Labeling" *Chem. Lett.* **2003**, 32, 804-805.

9 Tan, Y.; Xie, J.; "A Study of the Interaction of Human Serum Albumin with Berberine Hydrochloride by a Fluorescence Method" *Zhongyao Zazhi*, **1996**, 21, 175-177.

hemicianinas (RB-627, RG-702, TOTO-1, YOYO-1, Indocyanine Green, ...) ¹¹. Así pues, ya sólo de la mera inspección de la bibliografía se puede concluir que bastantes fluoróforos muestran un alto grado de inespecificidad.

Aunque en bastantes ocasiones se suele recurrir a supuestas interacciones selectivas entre el fluoróforo y el analito a fin de justificar dichos incrementos de la intensidad de fluorescencia, los ejemplos anteriormente mencionados y el trabajo realizado con el catión berberina ha hecho que se replantee la visión convencional, extendida en la bibliografía y mayoritariamente asumida, de que dichos aumentos en la emisión se deben a interacciones selectivas no covalentes. Estas interacciones selectivas son específicas y direccionales (por ejemplo, puentes de hidrógeno) entre analito y fluoróforo ¹² y es conocido que producen incrementos en k^{nr} (constante de desexcitación no radiativa), es decir, apagamiento de la fluorescencia más que incrementos en la emisión ¹³.

10 Zhong, D.; Douhal, A.; Zewail, A. H.; "Femtosecond Studies of Protein-Ligand Hydrophobic Binding and Dynamics: Human Serum Albumin" *PNAS*, **2000**, 97, 14056-14061.

11 Harvey, M. D.; Bablekis, V.; Banks, P. R.; Skinner, C. D.; "Utilization of the Non-Covalent Fluorescent Dye, NanoOrange, as a Potential Clinical Diagnostic Tool. Nanomolar HSA Quantitation" *J. Chromatogr. B*, **2001**, 754, 345-356. Tatikolov, A. S.; Costa, S. M. B.; "Complexation of Polymethine Dyes with Human Serum Albumin (HSA): a Spectroscopic Study" *Biophys. Chem.* **2004**, 107, 33-49. Sowell, J.; Agnew-Heard, K. A.; Christian Mason, J.; Mama, C.; Strekowski, L.; Patonay, G.; "Use of Non-Covalent Labeling in Illustrating Ligand Binding to HSA Via Affinity Capillary Electrophoresis with Near-Infrared Laser Induced Fluorescence Detection" *J. Chromatogr. B*, **2001**, 755, 91-99.

12 Cebolla, V. L.; Mateos, E.; Garriga, R.; Jarne, C.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Gálvez, E. M.; Matt, M.; Delgado-Camón, A.; "Changes in Fluorescent Emission Due to Non-covalent Interactions as a General Detection Procedure for Thin-Layer Chromatography". *Chem. Phys. Chem.* **2012**, 13, 291-299.

13 Valeur, B.; "Molecular Fluorescence. Principles and applications", Wiley VCH, **2002**, Weinheim, p. 72-100.

No se puede hablar con rigor, por lo tanto, de selectividad en la fluorescencia generada en un sistema fluoróforo-analito-disolvente, sino de diferentes grados de emisión fluorescente en función del entorno molecular.

Los resultados obtenidos y su consiguiente interpretación sugirieron que los aumentos en el rendimiento cuántico de un fluoróforo producidos sin cambios en la longitud de onda de emisión puede explicarse a partir de interacciones no covalentes no específicas. Este fenómeno es general para fluoróforos en presencia de analitos. Parece pues posible desarrollar técnicas analíticas originales basadas en el control de los procesos radiativos y no radiativos a través de interacciones no covalentes.

El objetivo global de esta primera parte de la Tesis Doctoral es profundizar, tanto desde un punto de vista teórico como práctico, en la utilización analítica del efecto que, en una disolución, provoca el entorno no covalente químico próximo a un fluoróforo sobre su rendimiento cuántico (intensidad de fluorescencia).

I.2.- Investigaciones previas sobre FDIC

En relación con lo anterior, los trabajos del grupo de investigación en el que se sitúa esta Tesis muestran que este efecto de disolvente sobre un fluoróforo puede utilizarse, en presencia de analitos, para la detección cuantitativa de éstos utilizando Cromatografía en Capa Fina (TLC). Los principales resultados se resumen a continuación.

a) En un medio de *silica gel* el espectro de emisión de fluoróforos, tales como los cationes berberina o coralina, experimenta cambios (aumentos o disminuciones) en presencia de analitos sin sufrir variaciones en sus longitudes de onda de emisión. La intensidad de emisión de dichos cationes varía cuando

las moléculas presentes sólo absorben probablemente en la región UV o no muestran fluorescencia. De este modo, se han desarrollado diversos métodos analíticos para detectar moléculas sin grupos cromóforos, como hidrocarburos saturados o lípidos, por ejemplo, que presentan problemas de detección óptica. Esta determinación es cuantitativa ya que el aumento de la emisión es proporcional a la masa de analito. Su sensibilidad es del orden de los nanogramos^{14 15}.

b) Este sistema de detección se ha usado en cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC), usando placas de *silica gel* para la separación de la correspondiente muestra previa a la detección. En general, el fenómeno descrito ha permitido la detección de un elevado número de analitos, ya sea a través de aumentos o de *quenching* de fluorescencia. A este efecto se le denominó FDIC (*Fluorescence Detection by Intensity Changes*, detección de fluorescencia por cambios de intensidad)¹⁶. Esta denominación FDIC será usada, por extensión, a lo largo de la Tesis para hacer referencia al efecto del disolvente, esto es, a la variación de la emisión de un fluoróforo producida por un analito en un medio y que afecta exclusivamente al rendimiento cuántico de fluorescencia.

c) Los aumentos en la intensidad de fluorescencia son debidos a interacciones débiles de naturaleza no covalente establecidas entre el analito y el fluoróforo en la *silica gel*. Esto se demostró cualitativamente usando los modelos

14 Cebolla, V. L.; Jarne, C.; Domingo, P.; Domínguez, A.; Delgado-Camón, A.; Garriga, R.; Galbán, J.; Membrado, L.; Gálvez, E.M.; Cossío, F. P.; "Fluorescence Detection by Intensity Changes for High-Performance Thin-Layer Chromatography Separation of Lipids Using Automated Multiple Development" *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218, 2668-2675.

15 Mateos, E.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Vela, J.; Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cossío, F. P.; "Coralyne Cation, a Fluorescent Probe for General Detection in Planar Chromatography" *J. Chrom. A.* **2007**, 1146, 251-257.

16 Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cebolla, V. L.; Fernandes, F.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Garriga, R.; Vela, J.; Guermouche, M. H.; "General Contribution of Nonspecific Interactions to Fluorescence Intensity" *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3699-3705.

que describen las interacciones débiles y con el uso de herramientas computacionales. Más concretamente, dentro de las interacciones no covalentes, los aumentos se deben a interacciones no específicas ión-dipolo o dipolo-dipolo inducido, dependiendo de si el fluoróforo es iónico (coralina, berberina) o *zwitteriónico* (betaína de Reichardt). En el caso de los n-alcenos, las interacciones dipolares entre el fluoróforo y la cadena hidrocarbonada polarizable del alcano son las responsables de los aumentos de la emisión¹⁷. Así, el fenómeno se explica porque el alcano crea un entorno local hidrofóbico que aísla al fluoróforo y lo protege de otras vías no radiativas de desexcitación. En consecuencia, cuanto más larga (más polarizable) es la cadena alifática, mayor será el efecto de protección, provocando una disminución en la constante de desexcitación no radiativa (k^{nr}) en la expresión del rendimiento cuántico:

$$\Phi = \frac{k^r}{k^r + k^{nr}}$$

donde k^r es la constante de desexcitación radiativa. Por su parte, las responsables del *quenching* de fluorescencia que proporcionan determinados analitos son las interacciones no covalentes pero específicas (interacciones donador-aceptor, puentes de hidrógeno, etc.) que producen un aumento de k^{nr} .

I.3.- Efecto del entorno en medio líquido: objetivos específicos

De los estudios anteriores se extrajeron también dos conclusiones de interés, que han sido punto de partida para esta Tesis Doctoral y que se han desarrollado en profundidad en ella.

17 Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Vela, J.; Garriga, R.; Domingo, M. P.; "Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. An Explanation of This Phenomenon" *Org. Lett.* **2000**, 2, 2311-2313.

1.- El fenómeno también ocurre en medio líquido, tanto en disolventes acuosos como orgánicos, con ciertas particularidades en función de la polaridad del disolvente.

2.- La contribución de las interacciones no covalentes al incremento de la emisión sugiere que se trata de un fenómeno general, para cualquier medio, respecto tanto del analito como del fluoróforo. Este aspecto no ha sido tan apenas explorado en la bibliografía y es importante, ya que podría sentar las bases de procedimientos generales, como se han desarrollado los basados en el *quenching*.

Tomando esta idea inicial, en esta Memoria se presenta un modelo matemático que pretende explicar cómo las interacciones no covalentes disolvente-fluoróforo afectan a la absorbancia y a la intensidad de fluorescencia. El modelo incluye el efecto de las interacciones no específicas que contribuyen a los aumentos en la emisión. Posteriormente se presenta una extensión del modelo hacia disoluciones compuestas por dos sustancias, particularmente cuando una de ellas está en baja concentración (analito). El objetivo es proponer un modelo de uso analítico que relacione la concentración del analito con las propiedades químicas de analito, disolvente y fluoróforo, como base cuantitativa de la metodología. Esto compone el **capítulo 2**.

Una vez desarrollado el modelo teórico, en el **capítulo 3** se discuten los resultados obtenidos con él y su validación. Estos resultados conciernen a la emisión fluorescente de moléculas que no absorben radiación UV en el rango habitual de trabajo analítico (alcanos y alcoholes, fundamentalmente) en disolventes polares y apolares.

Para completar la sección dedicada al medio líquido, en el **capítulo 4** se presenta una aplicación de la detección FDIC para la caracterización de la distribución del peso molecular de mezclas de polímeros convencionales (poliestirenos, policarbonatos, polietilenglicoles) mediante GPC (cromatografía de permeación en gel) en modo HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Se discute también la aplicación y validación del modelo desarrollado. Los polímeros son separados mediante columnas de exclusión molecular y posteriormente detectados por FDIC usando los fluoróforos coralina y berberina.

PARTE II: ESTUDIO Y UTILIZACIÓN DEL EFECTO DEL ENTORNO EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN MEDIO SÓLIDO: SENSORES ÓPTICOS

II.1.- Sensores ópticos autoindicadores: investigaciones previas

El desarrollo de nuevos mecanismos como base de sensores ópticos es un campo de gran interés en la Química Analítica. Es bien sabido que en un sensor óptico hay dos componentes principales: el elemento de reconocimiento (que tiene como misión interactuar de forma selectiva con el analito, siendo ésta su principal característica) y un indicador (tiene como misión transformar esa interacción en una señal óptica perceptible, bien de absorción o bien de fluorescencia). Su principal característica es la sensibilidad.

Los sensores ópticos se pueden obtener inmovilizando cualquier tipo de fluoróforo. Este caso se ha centrado en la utilización de fluoróforos FDIC. Sin embargo, el desarrollo del modelo óptico de la señal fluorescente se ha llevado a cabo tomando como base el uso de una enzima modificada con un fluoróforo. Esto se debe tanto al interés que suscitan este tipo de moléculas como a la experiencia previa del grupo de trabajo. Por ello, se va a hacer una breve descripción de este último tipo de sensores.

Cuando los sensores se quieren utilizar en muestras reales, es conveniente simplificar al máximo la (bio)química del sistema y dotarla de estabilidad. Si además se quiere implementar el sensor en un sistema de monitorización en continuo, se hace necesario que la respuesta esté basada en un proceso (bio)químicamente reversible. Aparece así el concepto de sensor autoindicador reversible (SAR), que es aquel en el cual el elemento de reconocimiento, que puede ser de origen natural o de síntesis (receptor artificial), tiene también capacidad indicadora, y además puede reutilizarse un cierto número de veces. Dentro de los reactivos de origen natural merecen especial atención los que están basados en algunas proteínas de transporte y en algunos tipos de enzimas¹⁸. Algunas proteínas de transporte se caracterizan porque, como consecuencia de la unión a su ligando, sufren un cambio conformacional importante en alguna parte de su estructura. Si en esa zona existe un grupo fluorescente natural (por ejemplo, triptófano) o un resto molecular (natural o genéticamente incorporado) al que se puede unir un fluoróforo, cuando se une al ligando sufre un cambio de intensidad¹⁹ reversible²⁰. De igual manera, algunas enzimas presentan en su estructura un grupo fluorescente natural (el mismo triptófano o un grupo flavina) o un resto molecular al que se puede unir químicamente un fluoróforo. En algunos casos, durante la actividad bioquímica (oxidación, reducción, ...) de esa enzima se producen cambios reversibles en la fluorescencia de ese grupo, proporcionales o relacionados con la concentración del sustrato. En ambos casos, la proteína se puede utilizar como base de un sensor autoindicador.

18 Galbán, J.; Sanz-Vicente, I.; Ortega, E.; del Barrio, M.; de Marcos, S.; "Reagentless Fluorescent Biosensors Based on Proteins for Continuous Monitoring Systems" *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 3039-3054.

19 A esta propiedad de la proteína se le suele denominar "*switching ability*".

20 Dwyer, M.; Hellinga, H.; "Periplasmic Binding Proteins: a Versatile Superfamily for Protein Engineering" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 495-513.

El grupo de investigación ha desarrollado gran parte de su trabajo en el uso de enzimas como base de SAR. Algunos de los resultados principales se presentan a continuación:

a) Desarrollo de un dispositivo sensor para glucosa basado en la fluorescencia de la glucosa oxidasa químicamente modificada con fluoresceína (cuya fluorescencia cambia a lo largo de la reacción enzimática)²¹.

b) Puesta a punto de sensores ópticos de absorción molecular UV-VIS basado en las propiedades de absorción de la peroxidasa para la determinación de glucosa²² y ácido úrico²³.

c) Construcción de un prototipo comercial para la determinación de peróxido de hidrógeno y/o ácido peracético, basado en la absorción molecular de la peroxidasa²⁴ y/o catalasa²⁵.

II.2.- Modelado de la señal óptica fluorescente: objetivo general

Los sensores ópticos utilizan medidas de absorbancia y fluorescencia en superficies sólidas que contienen al reactivo y al analito. A pesar de la importancia de poder describir el comportamiento de la señal para predecir la

21 Sanz, V.; Galbán, J.; de Marcos, S.; Castillo, J. R.; "Fluorometric Sensors Based on Chemically Modified Enzymes: Glucose Determination in Drinks" *Talanta*, **2003**, 60, 415-423.

22 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "A Reagentless Optical Biosensor Based on the Intrinsic Absorption Properties of Peroxidase" *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 956-964.

23 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Uric Acid Determination Using Uricase and the Autotransducer Molecular Absorption Properties of Peroxidase" *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 60783, 211-218.

24 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Hydrogen Peroxide and Peracetic Acid Determination in Waste Water Using a Reversible Reagentless Biosensor" *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 583, 332-339.

25 Galbán, J.; Sanz, V.; de Marcos, S.; "Selective Peracetic Acid Determination in the Presence of Hydrogen Peroxide Using a Label Free Enzymatic Method Based on Catalase" *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 2117-2124.

información analítica, se han publicado relativamente pocos trabajos en el campo analítico dirigidos hacia el desarrollo de un modelo que describa la señales de fluorescencia de sólidos. En este apartado de la Tesis Doctoral ***se propone como objetivo general el desarrollo de un modelo matemático que describa la fluorescencia de sólidos (fluoróforos inmovilizados, en este caso) incorporando nuevas mejoras teóricas y varios aspectos analíticos.*** Para ello se parte de la teoría de Kubelka-Munk y se consideran los siguientes aspectos:

- La definición apropiada de los coeficientes de absorción (k^{KM}) y de dispersión (s^{KM}).
- La evaluación apropiada del efecto de analito, entendido como un efecto de filtro interno producido por la disolución de muestra.
- El efecto adicional producido por la celda sensora.

El modelo obtenido se utilizará no sólo para describir el funcionamiento de los sensores autoindicadores, sino para evaluar el uso de FDIC como base de sensores ópticos. Esto se describirá en el **capítulo 5**.

II.3.- Utilización del FDIC para el desarrollo de sensores ópticos generales: objetivo específico

De forma simultánea a los sensores autoindicadores y otros tipos de sensores específicos, han ido desarrollándose nuevos mecanismos indicadores. Los ejemplos más representativos²⁶ son los sensores basados en el efecto de plasmón superficial, los sensores interferométricos o los resonadores ópticos. En

²⁶ Kalantar-Zadeh, K.; Fry, B.; "Nanotechnology-Enabled Sensors" *Springer*, **2008**, Ch. 3.

estos casos, el mecanismo indicador es muy general y la selectividad se consigue mediante un elemento de reconocimiento capaz de alterar el índice de refracción del sensor, lo que limita en muchos casos su aplicación a reacciones antígeno-anticuerpo.

El FDIC aporta un mecanismo indicador novedoso que podría presentar algunas ventajas teóricas frente a los sensores de plasmón superficial e interferométricos:

- Al estar basados en fluorescencia presentan una mayor sensibilidad indicadora teóricamente.

- Al igual que las plataformas anteriores, también responden a cambios de índice de refracción, pero como se verá a lo largo de la Memoria, también responden a cambios en el momento dipolar del medio, materializado en la constante dieléctrica.

- Dado que es posible utilizar varios fluoróforos diferentes, las propiedades indicadoras pueden ajustarse en función de las necesidades del sistema a medir.

En este apartado, ***el objetivo específico es presentar los primeros ensayos dirigidos hacia el uso de FDIC como base de plataformas generales indicadoras.***

Se pretende evaluar la posible detección de analitos, tanto en flujo acuoso como orgánico, y sus mezclas, en láminas sensoras. El punto crucial en la fabricación de estos sensores es la inmovilización del fluoróforo en la matriz sólida. En la Memoria se muestran los distintos procedimientos de inmovilización estudiados y los resultados obtenidos, tanto positivos como negativos. Uno de

ellos, la inmovilización de fluoróforos mediante la unión covalente con la matriz sólida se ha evaluado especialmente a fin de verificar si los cambios en la emisión proceden del mismo mecanismo de interacción no covalente que en el caso de la impregnación en *silica gel*. De este modo, se ha unido un derivado de la berberina (berberrubina), obtenido mediante una síntesis eficiente (100%) en microondas, a la *silica gel* de manera covalente, manteniendo sus propiedades fluorescentes. Con ello se ha obtenido un sensor del que se discuten las propiedades. En el estudio se han incluido analitos que no son fluorescentes y/o no poseen buenas propiedades de absorción en el UV-VIS en las condiciones habituales de trabajo y, por tanto, presentan dificultades de ser analizados por procedimientos ópticos convencionales. Todo ello será objeto del **capítulo 6**.

PARTE I:
ESTUDIO Y UTILIZACIÓN DEL
EFFECTO DEL ENTORNO EN LA
INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
EN MEDIO LÍQUIDO

CAPÍTULO 2:
MODELO ANALÍTICO EN DISOLUCIÓN

2.- MODELO ANALÍTICO EN DISOLUCIÓN

Predecir el efecto del entorno molecular en la emisión fluorescente es una cuestión que no ha sido todavía teóricamente resuelta.

En los comienzos del trabajo en este tema del grupo de investigación, se obtuvieron aumentos en la intensidad de fluorescencia del catión berberina en presencia de alcanos sobre placas de *silica gel*, en ausencia de disolvente.

Un estudio computacional, basado en la teoría de orbitales moleculares y en mecánica molecular puso de manifiesto que las interacciones débiles, de naturaleza electrostática, entre la berberina y el correspondiente alcano, eran las responsables de dicha emisión fluorescente. La *silica gel* no se incluyó en la computación por dos motivos: primero, porque el aumento en la emisión no sólo ocurría en medio *silica gel* sino que también tenía lugar en disolución, por lo que se consideró que no era imprescindible para la justificación de los aumentos de fluorescencia, y segundo, porque su inclusión complicaba mucho los cálculos computacionales.

Se propuso un modelo matemático para esta interacción ión-dipolo inducido que justificaba los resultados experimentales y permitía predecir la detección de otros analitos diferentes²⁷. Para la interacción de un fluoróforo iónico tipo berberina, F, con un analito, A, el aumento de la intensidad es proporcional a la energía de interacción según:

$$U_{F,A} = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Z_F^2 e^2 \alpha_A}{2r^4}$$

27 Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Vela, J.; Garriga, R.; Domingo, M. P.; "Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. An Explanation of This Phenomenon" *Org. Lett.* **2000**, 2, 2311-2313.

donde r es la distancia media intermolecular fluoróforo-analito, Z_F es la carga del fluoróforo, ϵ_0 es la constante dieléctrica en el vacío y α_A es la polarizabilidad del analito.

A una temperatura y concentración dadas el aumento de la intensidad depende linealmente de la polarizabilidad de la molécula neutra que rodea al fluoróforo (α_A), ya que las magnitudes permanecen prácticamente constantes al pasar de un alcano a otro.

En el caso de fluoróforos dipolares, FD, la interacción correspondiente con el analito neutro (dipolo-dipolo inducido) puede ser modelada usando la ecuación de Debye²⁸. En el caso de analitos polarizables con momentos dipolares permanentes (por ejemplo, alcoholes), la ecuación para la interacción de energía queda:

$$U_{FD,A} = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0^2} \frac{\mu_{FD}^2 \alpha_A + \mu_A^2 \alpha_{FD}}{r^6}$$

donde μ_{FD} y μ_A son los momentos dipolares permanentes del fluoróforo dipolar y del analito respectivamente, y α_{FD} es la polarizabilidad del fluoróforo.

En el caso de analitos polarizables sin momentos dipolares permanentes, como los alcanos, la ecuación para la interacción de energía queda:

$$U_{FD,A} = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0^2} \frac{\mu_{FD}^2 \alpha_A}{r^6}$$

28 Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cebolla, V. L.; Fernandes, F.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Garriga, R.; Vela, J.; Guermouche, M. H.; "General Contribution of Nonspecific Interactions to Fluorescence Intensity" *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3699-3705.

Como consecuencia de dichas interacciones, el analito crea un entorno apolar que protege al fluoróforo de mecanismos no radiativos. Estos cambios en la emisión pueden ser considerados como una propiedad general de los fluoróforos en presencia de analitos²⁹.

Esta idea de "protección" es un modelo físico-químico que relaciona el aumento en la fluorescencia con propiedades físico-químicas de analito y fluoróforo. Sin embargo, no es un modelo para utilización analítica puesto que no permite relacionar el aumento de la fluorescencia con la concentración de analito.

El trabajo en los capítulos siguientes será intentar comprender la influencia de las interacciones débiles (no covalentes) en la emisión fluorescente en disolución, considerando el efecto del disolvente e intentando relacionar la emisión fluorescente con la concentración de analito. El objetivo final es poder diseñar aplicaciones analíticas basadas en el aprovechamiento de las interacciones débiles.

2.1.- PLANTEAMIENTO GENERAL

Desde siempre se ha reconocido que el disolvente, y en general el medio, juega un papel importante en la fluorescencia de los compuestos en disolución. La razón es la tendencia natural de cualquier compuesto químico a interactuar reversiblemente, de la forma más variada, con su entorno. Estas interacciones moleculares se denominan genéricamente no covalentes y abarcan desde aquellas con un carácter más específico (formación de puentes de hidrógeno, interacciones iónicas) hasta más generales (asociadas al carácter

29 Cebolla, V. L.; Mateos, E.; Garriga, R.; Jarne, C.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Gálvez, E. M.; Matt, M.; Delgado-Camón, A.; "Changes in Fluorescent Emission Due to Non-covalent Interactions as a General Detection Procedure for Thin-Layer Chromatography". *Chem. Phys. Chem.* **2012**, 13, 291-299.

polar o apolar de la sustancia). Estas últimas aparecen siempre, razón por la cual se han tomado como base para elaborar el modelo³⁰.

La capacidad de un medio para generar interacciones no específicas suele expresarse mediante la constante dieléctrica (ϵ_M) y el índice de refracción (n_M) de ese medio. Una revisión bibliográfica exhaustiva indica que los modelos que se han elaborado para predecir el efecto del disolvente se han centrado en explicar cómo estas interacciones producen desplazamientos en las longitudes de onda tanto de excitación como de emisión³¹, pero en la mayoría no se tienen en cuenta los cambios en el rendimiento cuántico y, por tanto, en la intensidad de fluorescencia. Esto provoca a veces situaciones analíticas o no analíticas incontroladas, que suelen derivar en errores de índole muy variada. Este modelo intenta también arrojar algo de luz sobre este efecto y, en la medida de lo posible, explicar cómo minimizar o eliminar estos efectos interferenciales.

Para su desarrollo se parte de que la intensidad de fluorescencia (F) depende tanto del rendimiento cuántico (Φ) como de la absorptividad molar (ϵ_F) y de que ambas dependen a su vez de las constantes de desactivación radiativa (k^r) y no radiativa (k^{nr}). Esta dependencia se recuerda en el apartado 2.2. A partir de aquí se siguen las siguientes etapas:

1.- Relacionar k^r con los valores de n_M y ϵ_M .

El efecto sobre k^r se basa en los estudios realizados por Toptygin sobre la ecuación de Strickler-Berg, lo que ha permitido reestructurar la ecuación de forma que el efecto del fluoróforo y del medio quedan diferenciados, pudiendo analizarse por separado. Dado que la k^r y la absorptividad molar están

³⁰ No obstante, en algunas partes del desarrollo, se han incluido tratamientos adicionales para contemplar también la existencia de interacciones más específicas.

³¹ Nicol, M. F.; "Solvent Effects on Electronic Spectra" *Appl. Spectrosc. Rev.* **1974**, 8, 183-227 y las referencias citadas en ésta de McRae, E. G. y Lippert, E.

estrechamente relacionadas, este mismo estudio ha permitido también un modelado adecuado de esta constante (que también se incluye en el trabajo).

Todo esto se trata en el apartado 2.3.

2.- Relacionar k^{nr} con los valores de n_M y ϵ_M .

Este apartado constituye el grueso del modelo. Para ello se ha considerado que:

a) En ausencia de procesos específicos (que afectan a fluoróforos concretos), los procesos de desactivación no radiativos fundamentales de la molécula son el cruce intersistemas (k^{CI}) y la conversión interna (k^{CI})³².

b) La velocidad de ambos procesos depende, entre otras cosas, de la diferencia de energía que existe entre los niveles involucrados³³. Es decir:

$$k^{CI} \approx E_{\text{singlete excitado}} - E_{\text{fundamental}} (\Delta E^{S-0})$$

$$k^{CI} \approx E_{\text{singlete excitado}} - E_{\text{triplete excitado}} (\Delta E^{S-T})$$

c) La solvatación del fluoróforo por el medio cambia los valores de (ΔE^{S-0}) y/o (ΔE^{S-T}) , por tanto los valores de las constantes k^{CI} y k^{CI} y, en consecuencia, el rendimiento cuántico de fluorescencia.

32 Hartmann, P.; Leiner, M. J. P.; Draxler, S.; Lippitsch, M. E.; "Specific Solvent Effect of Linear Alcohols on the Emission Spectrum and the Excited State Decay of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)" *Chem. Phys.* **1996**, 207, 137-146. Rohatgi-Mukherjee, K. K.; "Fundamentals of Photochemistry (Revised Edition)" New Age International Limited, **1986**, New Delhi, Ch.5

33 Ver referencias anteriores.

Esta dependencia se analiza en el apartado 2.4. Una vez hecho esto se puede deducir el efecto de las características del disolvente sobre la fluorescencia. Esto se estudia en el apartado 2.5.

3.- Relacionar los valores de n_M y ϵ_M con la composición del medio.

Los sistemas analíticos en disolución más sencillos están conformados por dos componentes, el disolvente y el soluto. Este último será el analito. Los valores de n_M y ϵ_M dependerán de la proporción de ambos componentes en la disolución. La forma en la que se relacionan entre sí estos parámetros se discute en el apartado 2.6.

4.- Desarrollar un modelo simplificado.

La ecuación general que se obtiene como consecuencia del desarrollo del modelo es bastante compleja. Para obtener pautas sencillas que permitan hacer predicciones aproximadas sobre el efecto del analito en la fluorescencia de un fluoróforo es necesario simplificar matemáticamente el modelo sin perder significado químico.

Esto se aborda en el apartado 2.7.

A lo largo del capítulo aparecen una serie de superíndices y subíndices. Los subíndices se refieren a sustancias: fluoróforo (F), analito (A), disolvente (D) y el medio en general (M). Los superíndices se refieren a estados energéticos (0 para fundamental, S para singlete excitado, T para triplete excitado), procesos (r para radiativo, nr para no radiativo, CIS para cruce intersistemas, CI para conversión interna) y otros (λ para longitud de onda, V para el vacío).

2.2.- ECUACIÓN GENERAL DE FLUORESCENCIA: PARÁMETROS BÁSICOS

En este apartado se revisan algunos conceptos básicos de fluorescencia molecular que están directamente relacionados con el desarrollo del modelo.

2.2.1.- Procesos de desactivación no radiativos

Una forma sencilla de describir los procesos fotofísicos que sufre una molécula durante un proceso de fluorescencia es mediante el diagrama de Perrin-Jabłoński. En él se representan los estados electrónicos singletes (S) y tripletes (T), así como los niveles vibracionales en cada uno de ellos, simbolizando con flechas las posibles transiciones entre los distintos niveles de energía (figura 2.1). En este caso también se han incorporado unas figuras que representan los estados electrónico y nuclear de la molécula.

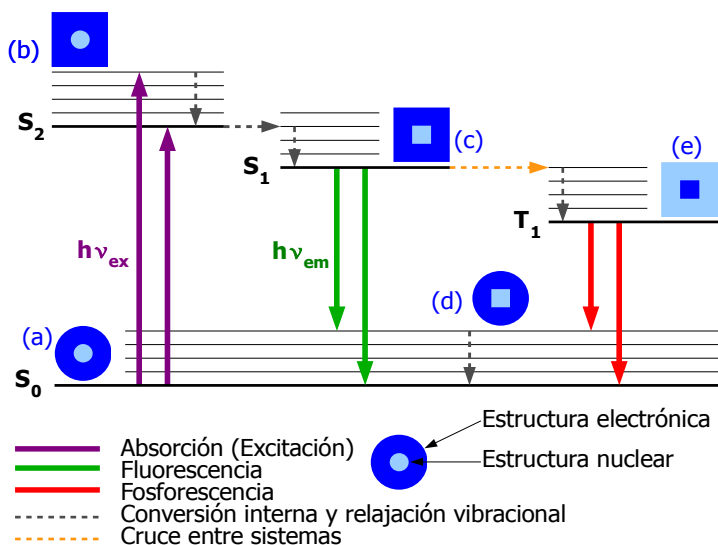


Figura 2.1.- Diagrama de Perrin-Jabłoński.

La figura intenta poner de manifiesto que, de acuerdo con el principio de Frank-Condon, las transiciones electrónicas entre orbitales son mucho más rápidas que los movimientos de reorganización de los núcleos. Por ello, partiendo de la configuración electrónica y la estructura del estado fundamental (a), tras la absorción la molécula adquiere la configuración electrónica del estado excitado, pero manteniendo la estructura del estado fundamental (b). Ya en el estado excitado la estructura se adapta a la nueva distribución electrónica (c), lo que provoca la estabilización de la molécula y la pérdida de energía. De nuevo, la aplicación del principio de Frank-Condon al proceso de fluorescencia explica que, tras la liberación del fotón, la molécula adquiere la distribución electrónica del estado fundamental, pero aún mantiene la estructura del excitado (d), hasta que se estabiliza perdiendo energía y recuperando su estructura original (a).

El diagrama muestra también los dos procesos de relajación no radiativa intramoleculares: la conversión interna y el cruce intersistemas³⁴. El primero se refiere a una transición entre dos estados electrónicos de la misma multiplicidad (paso (b) a (c)). El cruce intersistemas (CIS) es una transición no radiativa entre dos niveles vibracionales de igual energía que pertenecen a estados electrónicos de diferentes multiplicidades. Las transiciones entre estados electrónicos de diferente multiplicidad son prohibidas salvo que el acoplamiento *spin*-orbital sea lo suficientemente extenso como para que sean posibles. El proceso es similar a la conversión interna (CI) salvo que, en este caso, el electrón cambia su *spin*. En muchas moléculas el CIS tiene un cierto grado de prohibición cuántica, lo que implica baja probabilidad, pequeña constante de velocidad (k^{CIS}) y largo tiempo requerido para que tenga lugar. Aunque el diagrama no lo recoja, para que ambos procesos se produzcan es necesario que existan niveles vibracionales muy próximos (o incluso comunes) entre ambos estados. En realidad esos niveles existen en moléculas orgánicas de tamaño moderado (como las que se usan en

³⁴ La denominación "intersistemas" proviene de la traducción del término "*intersystem*". Probablemente la traducción más correcta sería "entre sistemas".

este trabajo), por lo que el diagrama de Jabłoński más realista en estas moléculas es como el indicado en la figura 2.2, en el que se observa que la distribución de niveles vibracionales tanto del estado fundamental como de los excitados permite estos procesos.

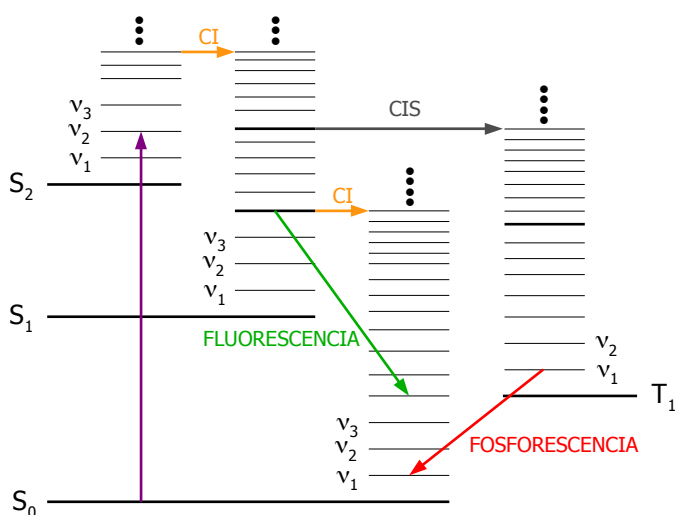


Figura 2.2.- Diagrama de Perrin-Jabłoński para moléculas orgánicas de tamaño moderado.

2.2.2.- Ecuación básica de la fluorescencia

El tratamiento general básico de la fluorescencia dice que si se hace incidir un haz de radiación (I_0) sobre una sustancia absorbente situada en un medio y cuya concentración es C_f , parte de ese haz resulta absorbido. La cantidad de luz absorbida es:

$$I_{\text{ABS}} = I_0 - I_T \quad (2.1)$$

La cantidad de luz transmitida viene dada por la ley de Beer-Lambert según:

$$I_T = I_0 10^{-\epsilon_F^\lambda C_F l} \quad (2.2)$$

donde ϵ_F^λ es la absortividad molar a la longitud de onda de excitación³⁵ y l es el paso óptico.

Tras la absorción la cantidad de luz fluorescente emitida por la sustancia es:

$$F = \Phi_F I_{ABS} \quad (2.3)$$

Combinando las dos expresiones anteriores se obtiene la ecuación general para la intensidad de fluorescencia:

$$F = \Phi_F I_0 \left(1 - 10^{-\epsilon_F^\lambda C_F l}\right) \quad (2.4)$$

En el caso de que la absorbancia sea baja, se puede hacer la aproximación $1 - 10^{-\epsilon_F^\lambda C_F l} = 2.3 \epsilon_F^\lambda C_F l$ llegando a la expresión conocida:

$$F = 2.3 \Phi_F I_0 \epsilon_F^\lambda C_F l \quad (2.5)$$

Pero la medida de fluorescencia requiere de un instrumento. Cuando se tiene en cuenta su efecto en el valor medido, la ecuación anterior cambia. La

³⁵ A lo largo de esta Memoria aparece con frecuencia la constante dieléctrica junto con la absortividad molar y ambos se suelen representar con el símbolo ϵ , lo que puede llevar a confusión. Por ello, se ha decidido dejar como constante dieléctrica el símbolo ϵ y utilizar como absortividad molar el símbolo ϵ .

forma en la que lo hace depende de las características del instrumento. En este caso se ha usado un luminómetro provisto de monocromadores tanto para aislar la longitud de onda de excitación como de emisión y, por lo tanto, la expresión queda:

$$F = K^{\text{ins}} \epsilon_F \Phi_F S_F C_F \quad (2.6)$$

donde K^{ins} es un parámetro que depende de las características específicas del instrumento y las condiciones instrumentales usadas (rendijas del monocromador, I_0 de la fuente de luz y tipo de iluminación, presencia o no del sistema corrector, ganancia, respuesta y voltaje del detector, etc.)³⁶. El parámetro S_F es muy importante. Como se sabe, el rendimiento cuántico indica la cantidad de luz emitida por la molécula tras la absorción. Cuando se utiliza un instrumento sólo se recoge la parte de luz que corresponde a la longitud de onda de emisión elegida. El parámetro S_F representa el perfil normalizado del espectro de emisión, es decir, $\sum_{\lambda} S_{F\lambda} = 1$, de forma que el producto $S_F \Phi_F$ indica la fracción de rendimiento cuántico específico que corresponde a la longitud de onda elegida en la medida.

El rendimiento cuántico es el cociente entre la constante de velocidad del proceso fluorescente (k^r) y la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos de desactivación posibles que incluyen tanto la fluorescencia como el resto de procesos no radiativos (k^{nr}), según:

$$\Phi_F = \frac{k^r}{k^r + k^{\text{nr}}} \quad (2.7)$$

³⁶ Ingle, J. D.; Crouch, S. R.; "Spectrometrical Analysis", Prentice Hall, **1988**, New Jersey, Ch. 15, p. 439-493.

Combinando las ecuaciones (2.6) y (2.7) y teniendo en cuenta la consideración anterior, la ecuación básica de la fluorescencia queda:

$$F = K^{ins} S_F C_F \left(\frac{\epsilon_F k^r}{k^r + k^{nr}} \right) \quad (2.8)$$

Para un fluoróforo dado, mientras no cambien las condiciones instrumentales de medida y el medio, todo es constante excepto la concentración.

2.3.- EFECTO DEL ENTORNO EN LA CONSTANTE RADIATIVA (k^r)

2.3.1.- Fluorescencia

Como se sabe, la k^r es la constante de emisión espontánea, cuyo valor fue deducido por Einstein³⁷, en el que aparece el efecto del medio a través de una función más o menos compleja del índice de refracción. Para un fluoróforo dado en un medio condensado k^r viene determinada por la ecuación de Strickler-Berg³⁸:

$$k^r = \frac{8 \cdot 2.303 \pi n_M^2}{c^2 N_A} \langle \nu_F^{-3} \rangle_{\text{Promedio}}^{-1} \frac{g_0}{g_1} \int \epsilon^\nu d \text{Ln}(\nu)$$

donde n_M es el índice de refracción del medio, c es la velocidad de la luz en el vacío, N_A es el número de Avogadro, ν_F es la frecuencia de la emisión de fluorescencia, g_0 y g_1 son las multiplicidades de los estados electrónicos involucrados en el proceso y ϵ^ν es la absorptividad molar del fluoróforo a la frecuencia ν .

³⁷ Einstein, A. "Zur Quantentheorie der Strahlung" *Physik. Z.* **1917**, 18, 121-128.

³⁸ Strickler, S. J.; Berg, R. A. "Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules" *J. Chem. Phys.* **1962**, 137, 814-822.

En esta ecuación, que ha sido usada generalmente para obtener estimaciones teóricas de k^r , se ve la relación directa de k^r con el índice de refracción del medio. Pero n_M también aparece oculto en otros parámetros, como ϵ^v .

Toptygin³⁹ ha presentado una formulación distinta de ambos parámetros en la que diferencia, por un lado, los términos que sólo dependen del fluoróforo y, por otro, los que dependen del medio, lo que permite evaluar de forma aislada el efecto del medio en la fluorescencia. Las expresiones son las siguientes:

1.- Para k^r :

$$k^r = k^{r,v} n_M f_{n,M}^2 \quad (2.9)$$

donde $k^{r,v}$ es el valor de k^r en el vacío, es decir, sin influencia del entorno. Este parámetro depende exclusivamente del fluoróforo y de la longitud de onda de excitación. El parámetro $f_{n,M}$ se denomina "corrección de campo local" y se discute a continuación.

2.- La dependencia de ϵ con el índice de refracción es:

$$\epsilon_F = \epsilon_F^v \frac{f_{n,M}^2}{n_M} \quad (2.10)$$

donde ϵ_F^v es la absorptividad molar intrínseca del fluoróforo en ausencia de medio (en el vacío) y sólo depende del fluoróforo y de la longitud de onda.

39 Toptygin, D.; "Effects of the Solvent Refractive Index and Its Dispersion on the Radiative Decay Rate and Extinction Coefficient of a Fluorescent Solute" *J. Fluoresc.* **2003**, 13, 201-219.

La forma en la que se explica el efecto del medio sobre k^f y ϵ_f es considerando que dicho medio es un dieléctrico continuo y que el fluoróforo se inserta (en forma de una cavidad), desplazando al medio y alterando sus propiedades dieléctricas. En función de cómo se considera que el fluoróforo se inserta, se obtienen los diferentes modelos de cavidad: cavidad sobreimpuesta (es decir, el fluoróforo no desplaza al disolvente), cavidad virtual (modelo de Lorentz-Lorenz), cavidad esférica real (Glauber-Levenstein) y cavidad elíptica (Shibuya). El parámetro $f_{n,M}$ de las ecuaciones anteriores es el que recoge la formación de esta cavidad. Su formulación matemática cambia para cada modelo.

Hay pocas evidencias experimentales dirigidas a validar o discriminar entre los diferentes tipos de modelos de cavidad. Los hay que sugieren que los modelos de cavidad esférica y elíptica son los más probables. En un principio, en el desarrollo del modelo, se consideró el uso de un modelo elíptico⁴⁰, dado por:

$$f_{n,M}^{\text{Shibuya}} = f_{n,M} = \frac{n_M^2}{(1-L_F)n_M^2 + L_F} \quad (2.11a)$$

donde L_F es un parámetro que oscila entre 0 y 1, y va asociado a la forma de la molécula. Sin embargo, dado que no se dispone de información sobre la forma del fluoróforo como para dar un valor adecuado de L_F , se ha optado finalmente por el modelo de cavidad esférica, que coincide con éste cuando $L_F=0.33$. Con esto la ecuación (2.11a) se transforma en:

$$f_{n,M} = \frac{3n_M^2}{2n_M^2 + 1} \quad (2.11b)$$

40 Shibuya, T.; "A Dielectric Model for the Solvent Effect on the Intensity of Light Absorption" *J. Chem. Phys.* **1983**, 78, 5175-5182.

Sustituyendo las ecuaciones (2.9) a (2.11) en (2.8) queda:

$$F = K_F^{ins} S_F C_F \epsilon_F^{\lambda, V} \left(\frac{f_{n, M}^4}{n_M f_{n, M}^2 + \frac{k^{nr}}{k_F^{r, V}}} \right) = K_F^{ins} \left(\frac{f_{n, M}^4}{n_M f_{n, M}^2 + \frac{k^{nr}}{k_F^{r, V}}} \right) \quad (2.12)$$

siendo K_F^{ins} la constante que agrupa los parámetros instrumentales y del fluoróforo (incluida la concentración). Esta ecuación se tomará como base para el resto del estudio teórico.

2.3.2.- Implicaciones en la medida de la absorbancia

De la ecuación (2.10) se deduce implícitamente una modificación de la ecuación de Beer-Lambert que puede aplicarse para cualquier especie absorbente. Según esto, la ecuación general $A = \epsilon_F^\lambda I C$ cambia a:

$$A = \epsilon_F^{\lambda, V} \frac{f_{n, M}^2}{n_M} I C \quad (2.13)$$

Esta ecuación puede ayudar a establecer una formulación más adecuada de la ecuación de Beer-Lambert que ponga de manifiesto el efecto del medio sobre la absorptividad molar y la absorbancia.

Desde el punto de vista práctico, el término $\frac{f_{n, M}^2}{n_M}$ establece una relación muy compleja con el índice de refracción pero puede simplificarse matemáticamente estableciendo empíricamente una relación con n_M . Tras ensayar diferentes posibilidades, se ha obtenido un buen ajuste sustituyendo el término por:

$$\frac{f_{n,M}^2}{n_M} = \frac{5.5 - n_M}{4} \quad (2.14)$$

Esta simplificación se puede aplicar para valores de índice de refracción que oscilen entre 1.3 y casi 2.5, ofrece mejores posibilidades que otras que se han ensayado previamente y es más simple que otros ajustes propuestos, como el de Kortum y Seiler⁴¹. La figura 2.3 muestra la calidad de la simplificación.

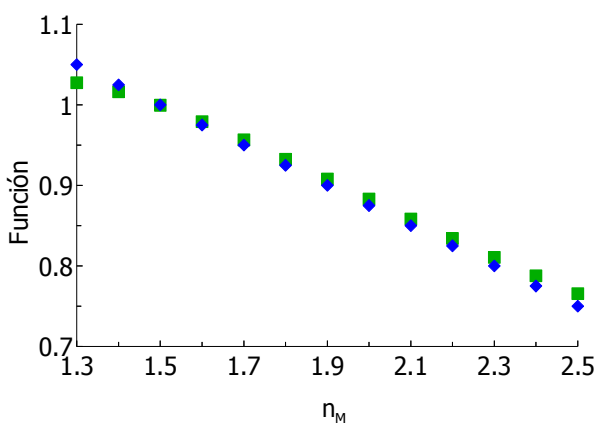


Figura 2.3.- Fiabilidad con la que $\frac{5.5 - n_M}{4}$ (♦) representa $\frac{f_{n,M}^2}{n_M}$ (■).

41 El modelo de Kortum y Seiler data del año 1939 (Kortum, G.; Seiler, M.; "Über physikalische Methoden mit chemischen Laboratorium. XLI. Die kritische Auswahl colorimetrischer, spektralphotometrischer und spektrographischer Methoden zur Absorptionsmessung" *Angew. Chem.* **1939**, 52, 687-693) y establece una relación entre la absorptividad específica (ϵ) manifestada por la sustancia en un medio y su absorptividad específica real (ϵ_{real}) que viene dada por: $\epsilon = \epsilon_{\text{real}} \frac{n}{(n+2)^2}$.

2.4.- EFECTO DEL ENTORNO EN LA CONSTANTE NO RADIATIVA (k^{nr})

2.4.1.- Formulación de k^{nr}

Como se ha comentado en la introducción, los procesos no radiativos más importantes son la conversión interna y el cruce intersistemas. Estos procesos son prácticamente universales para todos los fluoróforos. En algunas moléculas también aparece un tercer mecanismo de conversión no radiativa debido a la relajación rotacional⁴², estrechamente relacionado con la viscosidad del medio. Este mecanismo específico es importante en el decaimiento no radiativo de rotores moleculares⁴³, pero no se considerará aquí, pues el efecto de la viscosidad comienza a valores de ésta bastante más altos que los presentados por los disolventes orgánicos convencionales. Por tanto k^{nr} puede expresarse como:

$$k^{nr} = k^{CI} + k^{CIS} \quad (2.15)$$

Hay diferentes parámetros que afectan al valor de k^{nr} . De hecho la formulación matemática exacta de la misma es un tema no del todo aclarado.

Uno de los trabajos más importantes, a juzgar por las referencias que de él se hacen en la bibliografía, sobre la naturaleza y valor de esta constante fue desarrollado hace un tiempo por Englman y Jortner⁴⁴. El estudio que ellos

42 Ferreira, J. A. B.; Costa, S. M. B.; "Activationless Nonradiative Decay in Rhodamines: Role of NH and Lower Frequency Vibrations in Solvent Kinetic Isotope Effects" *Chem. Phys.* **2006**, 321, 197-208.
Biczok, L.; Berces, T.; Yatsunami, T.; Tachibana, H.; Inoue, H.; "The Role of Intersystem Crossing in the Deactivation of the Singlet Excited Aminofluorenes" *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, 3, 980-985.

43 Filevich, O.; Etchenique, R.; "1D and 2D Temperature Imaging with a Fluorescent Ruthenium Complex" *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7499-7503.

44 Englman, R.; Jortner, J.; "The Energy Gap Law for Radiationless Transitions in Large Molecules" *Molec. Phys.* **1970**, 18, 145-164.

desarrollaron era bastante complejo, pero se puede resumir en los siguientes puntos:

1.- La ecuación que describe k^{nr} se adapta al siguiente formato:

$$k^{nr} = A e^{-B} \quad (2.16)$$

2.- Los dos estados entre los que se produce la transición se pueden acoplar entre sí de dos formas distintas: acoplamiento fuerte y acoplamiento débil. La primera situación ocurre cuando los dos niveles energéticos están solapados (a través de un nivel vibracional común), mientras que la segunda se produce cuando no lo están (figura 2.4).

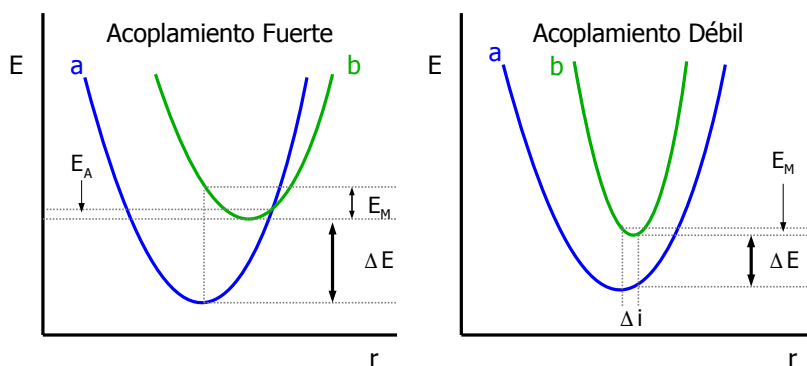


Figura 2.4.- Representación esquemática de los acoplamientos fuerte y débil.

3.- Los parámetros A y B de la ecuación (2.16) adquieren formas distintas en función de cual de los dos acoplamientos se produce.

- Acoplamiento fuerte: El parámetro B depende de E_A (ver figura), que es la energía del nivel vibracional común a los estados a y b, medida desde el estado b (estado inicial de la transición). El parámetro A depende de E_M que es el exceso de energía vibracional del estado b respecto del a.

- Acoplamiento débil: Ambos parámetros (A y B) dependen de E_M y, sobre todo, de la diferencia de energía electrónica entre ambos estados (ΔE). Este último parámetro es muy fácil de obtener a partir de los espectros: en el caso de la conversión interna es la diferencia (expresada en energías) entre las longitudes de onda de los máximos de fluorescencia y absorción. En el caso del cruce intersistemas es la diferencia (expresada en energías) entre las longitudes de onda de los máximos de fosforescencia y fluorescencia.

Los propios autores sugieren que el acoplamiento fuerte se producirá cuando ΔE sea grande y el débil cuando ΔE sea pequeño.

4.- Además Englman y Jortner plantearon para cada caso dos situaciones diferentes en función de si la temperatura afectaba o no a la constante. Cuando la temperatura afecta, el término B de la ecuación (2.16) adquiere la forma de la ecuación de Arrhenius siendo del tipo:

$$B = \frac{B'}{k_B T}$$

donde B' engloba al resto de los parámetros y k_B es la constante de Boltzmann.

5.- Finalmente los autores sugieren que la situación más habitual corresponde al caso de un acoplamiento débil e independiente de la temperatura.

Este modelo ha sido utilizado con cierta frecuencia sobre todo para describir la k^{nr} en procesos de conversión interna.

El problema más importante que surge es la dependencia con la temperatura. Como se sabe, la temperatura afecta a la fluorescencia. Aunque este es un hecho bien conocido, esa dependencia no está implícita en la ecuación que rige la fluorescencia de un compuesto (es decir, en (2.8)). El único sitio donde hacer incidir la temperatura es en las constantes de velocidad y dado que la k^r no depende de la temperatura, la mayoría de los investigadores hacen incidir el efecto de la temperatura en la fluorescencia precisamente sobre el valor de k^{nr} , lo que está en contra de lo indicado en el punto 5 de las conclusiones del trabajo de Englman y Jortner. Es por ello que en diferentes textos de fotofísica⁴⁵ y en artículos de investigación⁴⁶ (especialmente aquellos que involucran fenómenos de fluorescencia de organometales⁴⁷) se limitan a establecer que la k^{nr} tiene la forma de la ecuación de Arrhenius y la forma de la ecuación 2.16 pasa a ser:

$$k^{nr} = A e^{\frac{-E_a}{k_B T}} \quad (2.17)$$

donde los valores experimentales obtenidos para la E_a (energía de activación) son del orden de la energía vibracional, lo cual estaría de acuerdo con cualquiera de los dos modelos (acoplamiento fuerte o débil) de Englman y Jortner.

45 Rohatgi-Mukerjee, K. K.; "Fundamentals of Photochemistry" Rev. Edition, New Age International, **1986**, New Delhi, Ch. 5.

46 Hartmann, P.; Leiner, M. J. P.; Draxler, S.; Lippitsch, M. E.; "Specific Solvent Effects of Linear Alcohols on the Emission Spectrum and the Excited State Decay of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(I)" *Chem. Phys.* **1996**, 207, 137-146 (1996). Herbich, J.; Hung, C.; Thummel, R. P.; Waluk, J.; "Solvent Controlled Excited State Behavior: 2-(2'-Pyridil)indoles in Alcohol" *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3508-3518.

47 Claude, J. P.; Meyer, T. J.; "Temperature Dependence of Nonradiative Decay" *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 51-54.

De acuerdo con ambos, en esta memoria se considera para la k^{nr} una ecuación similar a la (2.17), en la que la energía de activación es proporcional a la diferencia de energía entre los dos estados involucrados:

$$k^{nr} = A e^{-\frac{E_a}{k_B T}} = A e^{-\frac{\omega \Delta E}{k_B T}} = A e^{-B_F \Delta E} \quad (2.18)$$

donde B_F agrupa la temperatura y la constante de proporcionalidad.

Estas dos constantes, para los procesos de conversión interna y de cruce intersistemas quedan⁴⁸:

$$k^{CI} = A_F^{CI} e^{-B_F^{CI} \Delta E^{S-0}} = A_F^{CI} e^{-B_F^{CI} (E^S - E^0)} \quad (2.19a)$$

$$k^{CIS} = A_F^{CIS} e^{-B_F^{CIS} \Delta E^{S-T}} = A_F^{CIS} e^{-B_F^{CIS} (E^S - E^T)} \quad (2.19b)$$

2.4.2.- Energía de los niveles en ausencia de disolvente

Las propiedades químicas de una sustancia dependen, en última instancia, de su distribución electrónica y de su conformación nuclear. Por ello, un fluoróforo tendrá diferentes propiedades químicas en el estado fundamental o en cualquiera de sus diferentes estados excitados. Entre estas propiedades se encuentra la fuerza con la que el medio solvata al fluoróforo. Esta diferencia de solvatación hace que las diferencias de energía dadas en (2.19) aumenten o disminuyan en función del entorno, por tanto k^{nr} y, como consecuencia, la intensidad de fluorescencia.

⁴⁸ Se recuerda que los subíndices 0, S y T representan los estados fundamental, singlete excitado y triplete excitado respectivamente.

De acuerdo con esto, la energía de cualquiera de los estados estará formada por dos aportaciones:

1.- La energía intrínseca, es decir, la energía de este estado en ausencia de disolvente (en el vacío) que será un parámetro termodinámico y constante de esa sustancia. Se representa como E^V .

2.- La energía de solvatación, es decir, la energía que la molécula pierde como consecuencia del proceso de solvatación. Se representa como E^{sol} y es variable en función de la composición del medio.

$$E = E^V - E^{sol} \quad (2.20)$$

De acuerdo con esto, los fluoróforos presentarán unas constantes no radiativas intrínsecas, que serán características para cada fluoróforo e independientes del medio:

$$k^{Cl, V} = A_F^{Cl} e^{-B_F^{Cl} \Delta E^{V, S-0}} \quad (2.21a)$$

$$k^{ClS, V} = A_F^{ClS} e^{-B_F^{ClS} \Delta E^{V, S-T}} \quad (2.21b)$$

y unas constantes no radiativas reales que cambiarán de acuerdo con las características de solvatación del entorno y que serán las que manifieste en un medio dado.

$$k^{Cl} = k^{Cl, V} e^{B_F^{Cl} (E^{sol, S} - E^{sol, 0})} \quad (2.22a)$$

$$k^{ClS} = k^{ClS, V} e^{B_F^{ClS} (E^{sol, S} - E^{sol, T})} \quad (2.22b)$$

La sustitución de las ecuaciones (2.22a) y (2.22b) en la ecuación (2.15) da la expresión de k^{nr} :

$$k^{nr} = k^{CI, V} e^{B_F^{CI}(E^{sol, S} - E^{sol, 0})} + k^{CIS, V} e^{B_F^{CIS}(E^{sol, S} - E^{sol, T})} \quad (2.23)$$

Muchos de los fluoróforos más interesantes son aquellos en los que los procesos de excitación implican transiciones $n \rightarrow \pi^*$ (moléculas aromáticas que contienen átomos de N, O, S, etc.). En estas moléculas, según la regla de El-Sayed⁴⁹:

$$\Delta E^{S-T} \ll \Delta E^{S-0} \quad (2.24)$$

y en consecuencia:

$$k^{CIS} \gg k^{CI} \quad (2.25)$$

por lo que parece razonable pensar que el cruce intersistemas es el camino de desactivación no radiativa más importante. Para hidrocarburos aromáticos policíclicos sin orbitales n-dadores el proceso de conversión interna juega un papel más importante en la desactivación no radiativa.

Se ha considerado que los sistemas químicos cumplen la expresión (2.25) y por eso:

$$k^{nr} = k^{CIS, V} e^{B_F^{CIS}(E^{sol, S} - E^{sol, T})} \quad (2.26)$$

49 El-Sayed, M. A.; "Spin-Orbit Coupling and the Rationless Processes in Nitrogen Heterocyclics" *J. Chem. Phys.* **1963**, 38, 2834-2838.

Para los sistemas que cumplen que $k^{nr} \approx k^{Cl}$ se puede aplicar un tratamiento similar al que se muestra a continuación. En cualquier caso, el resultado obtenido es cualitativamente similar y lo único que cambia es la magnitud del efecto.

2.4.3.- Solvatación del fluoróforo

El efecto del medio (disolvente y/o analito) en la fluorescencia están incluidos en la E^{sol} , de aquí que el modelado de este parámetro es realmente el aspecto clave a tener en cuenta. Como se sabe, el cálculo de E^{sol} es un concepto fundamental en la química de las disoluciones, de aquí que existan múltiples acercamientos⁵⁰ y modelos para describirlos. Se considera que hay tres formas generales de abordar el problema:

- Métodos Cuánticos. Se usa una descripción cuántica tanto del soluto como del disolvente, y ambos se representan con sus funciones de onda. Como es lógico, los modelos que se obtienen son de tipo computacional y no se pueden representar por funciones sencillas.

- Métodos Clásicos. Los sistemas se describen usando modelos de física clásica no cuántica. Dentro de ellos, uno de los más populares es el "Modelo del Continuo", según el cual el disolvente es un medio continuo, sin estructura, y cuya acción sobre el soluto viene dada fundamentalmente por su constante dieléctrica. Este será el modelo que se utilizará en esta memoria y ha sido el que se ha usado en la descripción de k^r .

- Métodos Mixtos. Suponen una combinación de los dos anteriores, de forma que una parte de la descripción es cuántica y la otra clásica. Lo más

50 Tomasi, J.; Perisco, M.; "Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent" *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2027-2094.

habitual es que el disolvente se represente como en un sistema clásico (por ejemplo, como un continuo) y el soluto mediante su función de onda. Hay también diferentes variantes.

En el "Modelo del Continuo" hay diferentes grados de complejidad que se pueden plantear. Como se sabe, desde el punto de vista electrostático una molécula es un conjunto de cargas eléctricas reducidas a un volumen. El tratamiento físico de este sistema se simplifica si se considera que en realidad esa molécula está formada por varias estructuras superpuestas de complejidad creciente: una carga puntual, un dipolo, un cuadrupolo y multipolos de orden superior. Es decir, la molécula se sustituye por la superposición de todas estas estructuras. Cada una de estas estructuras tiene su particular aportación a la energía de solvatación. Los modelos que las representan fueron desarrollados por diferentes autores: Bohr (carga puntual), Onsager⁵¹ (dipolo) y Kirkwood⁵² que fue quien hizo el modelo más completo del cual pueden derivarse los demás. De acuerdo con él la energía de solvatación es⁵³:

$$E^{\text{sol}} = \frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M} \frac{q_F^3}{r_F^3} + \frac{\left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) \frac{\mu_F^2}{r_F^3}}{1 - 2 \left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) \frac{\alpha_F}{r_F^3}} + \left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) \left(\frac{6\epsilon_M + 3}{6\epsilon_M + 4} \right) \frac{\eta_F^2}{r_F^5}$$

Carga Cuadrupolo Puntual (Bohr)
 Dipolo Eléctrico (Onsager)
 Cuadrupolo Eléctrico

(2.27)

51 Onsager, L.; "Electric Moments of Molecules in Lipids" *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 1486-1493.

52 Kirkwood, J. G.; "Theory of Solutions of Molecules Containing Widely Separated Charges with Special Application to Zwitterions" *J. Chem. Phys.* **1934**, 2, 351-361.

53 Yasuda, T.; Ikawa, S.; "On the Dielectric Continuum Solvent Model for Theoretical Estimates of the Conformational Equilibrium of Molecules with an Intramolecular Hydrogen Bond" *Chem. Phys.* **1998**, 238, 173-178.

donde ϵ_M es la constante dieléctrica, μ es el momento dipolar, r es el radio, α es la polarizabilidad y η es la parte anisótropa del momento cuadrupolar. El subíndice "F" representa la sustancia sobre la cual se está aplicando el efecto del medio y "M" el medio (disolvente).

Cuanto mayor es el número de términos que se considera, mejor dibujada (desde el punto de vista eléctrico) está la molécula, pero los cálculos se complican más. En general, se suele considerar que el modelo de Onsager es suficientemente representativo. Se añade también el término de Bohr para el caso de fluoróforos cargados. Este modelo no considera la capacidad de formación de puentes de hidrógeno, por ello Kirkwood-Fröhlich⁵⁴ idearon un procedimiento de corrección basado en el denominado "factor de correlación" " g_F " que altera el momento dipolar para incluir estas interacciones (ellos obtuvieron diferentes valores de g_F para diferentes sistemas). Por tanto:

$$E^{\text{sol}} = \frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M} \frac{q_F^3}{r_F^3} + \frac{\left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) \frac{g_F \mu_F^2}{r_F^3}}{1 - 2 \left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) \frac{\alpha_F}{r_F^3}} \quad (2.28)$$

A partir de aquí, la diferencia de la energía de solvatación entre los dos estados (singlete y triplete) se puede obtener simplemente sustituyendo los subíndices de ambos estados.

54 Véase, por ejemplo, la referencia: Magallanes, C.; Veriat, F.; Catenaccio, A.; "Kirkwood-Fröhlich Correlation Factor of Methanol" *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 402, 428-432.

Sin embargo, se pueden aplicar dos aproximaciones:

1.- La polarizabilidad va asociada al tamaño molecular. Un cambio en la polarizabilidad suele ir asociado a un cambio en el volumen (generalmente la polarizabilidad se suele dar en \AA^3). En realidad, la relación que existe entre ambas magnitudes viene dada por el índice de refracción:

$$\frac{n^2-1}{n^2+2} = \frac{\alpha}{r^3} \quad (2.29)$$

Se puede hacer una aproximación razonable al considerar que este cociente de índices de refracción va a ser muy similar en ambos estados (singlete y triplete), por tanto:

$$\frac{(n_F^S)^2-1}{(n_F^S)^2+2} = \frac{(n_F^T)^2-1}{(n_F^T)^2+2} = \frac{n_F^2-1}{n_F^2+2} = n_{c,F}^2 \quad (2.30)$$

donde $n_{c,F}^2$ se utiliza como notación simplificada y será de bastante utilidad más adelante. De acuerdo con esto la ecuación (2.28) se puede reorganizar a:

$$E^{\text{sol}} = \frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M} \frac{q_F^3}{r_F} + \frac{g_F \mu_F^2}{\alpha_F} n_{c,F}^2 \left(\frac{\left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right)}{1 - 2 \left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) n_{c,F}^2} \right)$$

2.- Asumiendo que la carga eléctrica del fluoróforo en ambos estados es la misma y que el cambio en el tamaño molecular es despreciable, el término de Bohr de la ecuación (2.27) apenas cambiará al pasar de un estado a otro. Con ello se tendrá:

$$\Delta E^{\text{sol}, S-T} = \frac{g_F^S(\mu_F^S)^2}{\alpha_F^S} (n_{c,F}^S)^2 \left(\frac{\left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right)}{1 - 2 \left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) (n_{c,F}^S)^2} \right) - \frac{g_F^T(\mu_F^T)^2}{\alpha_F^T} (n_{c,F}^T)^2 \left(\frac{\left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right)}{1 - 2 \left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) (n_{c,F}^T)^2} \right)$$

Los valores que tienen los índices de refracción de las sustancias en ambos estados pueden ser distintos, aunque las diferencias no serán muy grandes (los valores de índices de refracción oscilan habitualmente entre 1.3 y 2.8). Por ello se puede asumir que:

$$(n_{c,F}^S)^2 \approx (n_{c,F}^T)^2 = n_{c,F}^2$$

Para que esta suposición tenga poca relevancia, sólo se aplicará sobre el término que está entre paréntesis. Además, si se tienen en cuenta los valores orientativos de índices de refracción es fácil ver que $n_{c,F}^2$ oscilará, como mucho, entre 0.25 y 0.70, pudiendo establecer un valor promedio cercano a 0.5. Por ello, la ecuación anterior se puede simplificar a la siguiente:

$$\begin{aligned} \Delta E^{\text{sol}, S-T} &= \left(\frac{\left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right)}{1 - \left(\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right)} \right) \left(\frac{g_F^S(\mu_F^S)^2}{\alpha_F^S} (n_{c,F}^S)^2 - \frac{g_F^T(\mu_F^T)^2}{\alpha_F^T} (n_{c,F}^T)^2 \right) = \\ &= \left(\frac{\epsilon_M - 1}{\epsilon_M + 2} \right) \left(\frac{g_F^S(\mu_F^S)^2}{\alpha_F^S} (n_{c,F}^S)^2 - \frac{g_F^T(\mu_F^T)^2}{\alpha_F^T} (n_{c,F}^T)^2 \right) = f_{\epsilon, M} P^{S-T} \end{aligned} \quad (2.31)$$

donde el término P^{S-T} agrupa parámetros que sólo dependen del fluoróforo, mientras que $f_{\epsilon, M}$ depende sólo del medio. El hecho de poder separar los dos términos da más utilidad a la ecuación y al modelo.

Al sustituir la ecuación (2.31) en (2.26) queda:

$$k^{nr} = k^{CIS, V} e^{B_F^{CIS} P^{S-T} f_{\epsilon, M}} \quad (2.32)$$

2.5.- MODELO GENERAL: EFECTO DEL ENTORNO EN LA FLUORESCENCIA

2.5.1.- Formulación general

Al combinar las ecuaciones (2.32) y (2.12) queda la ecuación del modelo de fluorescencia, en la que se han agrupado bajo P_F los parámetros que dependen del fluoróforo (B_F^{CIS} y P^{S-T}) y en Y_F las constantes intrínsecas de los dos procesos de desactivación.

$$F = K_F^{ins} \left(\frac{f_{n, M}^4}{n_M f_{n, M}^2 + Y_F e^{P_F f_{\epsilon, M}}} \right) \quad (2.33)$$

donde:

$$Y_F = \frac{k^{CIS, V}}{k^{r, V}} \quad (2.34a)$$

y

$$P_F = B_F^{CIS} P^{S-T} \quad (2.34b)$$

La ecuación (2.33) es la ecuación general que explica el efecto del medio en la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo.

De la ecuación (2.33) se deduce que hay un gran número de parámetros que afectan a la señal de fluorescencia, algunos de los cuales dependen del fluoróforo (P_F y Y_F) y otros del medio (n_M y ϵ_M). El modelo permite evaluar cómo afecta individualmente cada uno de ellos a la señal de fluorescencia. Para ello, basta con fijar valores para todas las variables excepto la que se quiere estudiar. De los resultados obtenidos al realizar una simulación matemática se podrán obtener conclusiones de índole práctico sobre si la fluorescencia aumenta o disminuye, y la forma matemática de esa variación, al cambiar las características del medio. Así, se ha hecho la primera estimación de cómo afecta el valor de n_M a la fluorescencia y después de cómo lo hace ϵ_M . Sin embargo, las tendencias observadas en la intensidad de fluorescencia cambian mucho en función de los valores que se fijan para el resto de las variables.

Por ello se ha decidido hacer una simulación más completa variando simultáneamente los dos parámetros que dependen del medio (n_M y ϵ_M), usando además diferentes valores representativos de las variables que dependen del fluoróforo.

En este momento puede resultar interesante revisar qué reflejan estas dos propiedades del fluoróforo, P^{S-T} y Y_F . Como se ha visto en la ecuación (2.31), el valor de P^{S-T} viene dado por:

$$P^{S-T} = \left(\frac{g_F^S (\mu_F^S)^2}{\alpha_F^S} (n_{c,F}^S)^2 - \frac{g_F^T (\mu_F^T)^2}{\alpha_F^T} (n_{c,F}^T)^2 \right)$$

El numerador de cada fracción informa sobre la tendencia de la sustancia a dar interacciones polares (puentes de H, dipolo-dipolo, ...) y el denominador sobre la de dar interacciones dispersivas (apolares). Queda claro entonces que si la molécula es más polar (y menos apolar) en el estado triplete excitado que en el singlete entonces $P^{S-T} < 0$, si la molécula es más polar (y menos apolar) en el

estado singlete excitado que en el triplete entonces $P^{S-T} > 0$ y si la polaridad es similar, entonces $P^{S-T} = 0$, con lo que la fluorescencia se volvería independiente de la diferencia de constantes dieléctricas de soluto y disolvente. Para hacer la simulación se han tomado valores de P_F que oscilan entre 10 y -10.

Por su parte el valor de Y_F (ver (2.34)), es el cociente entre las constantes de velocidad de los procesos no radiativos y radiativo en ausencia del medio, es decir, indica la tendencia intrínseca de la sustancia a ser fluorescente. Un valor de $Y_F = 1$ indica que:

$$\left(Y_F = \frac{k^{CIS,V}}{k^{r,V}} \right) = 1 \Rightarrow k^{r,V} = k^{CIS,V}$$

Se trata, por tanto, de una sustancia que intrínsecamente tiene un rendimiento cuántico de 0.5 que, por otro lado, es un rendimiento cuántico bastante frecuente. Si la tendencia natural de la sustancia es a ser fluorescente, entonces:

$$k^{r,V} \gg k^{CIS,V} \Rightarrow Y_F \ll 1$$

A la inversa, una sustancia que tiene intrínsecamente poca tendencia a ser fluorescente implica que:

$$k^{r,V} \ll k^{CIS,V} \Rightarrow Y_F \gg 1$$

En el desarrollo de este modelo se han ensayado valores de Y_F que oscilan entre 10 y 0.1.

2.5.2.- Simulación matemática

En un primer estudio se ha considerado que el parámetro Y del fluoróforo es 1 ($Y_F=1$) y se han obtenido las curvas 3D de $F=f(n_M, \epsilon_M)$ para diferentes valores de P_F . La figura 2.5 muestra los resultados obtenidos (por simplicidad se ha considerado también que $K_F^{ins}=1$). Se trata de superficies de respuesta 3D que se han obtenido aplicando el modelo. En el caso de la figura 2.5A se han usado valores de P_F negativos y en la 2.5B valores de P_F positivos. Los colores de la curva corresponden a los valores de F y permiten evaluar mejor las diferencias.

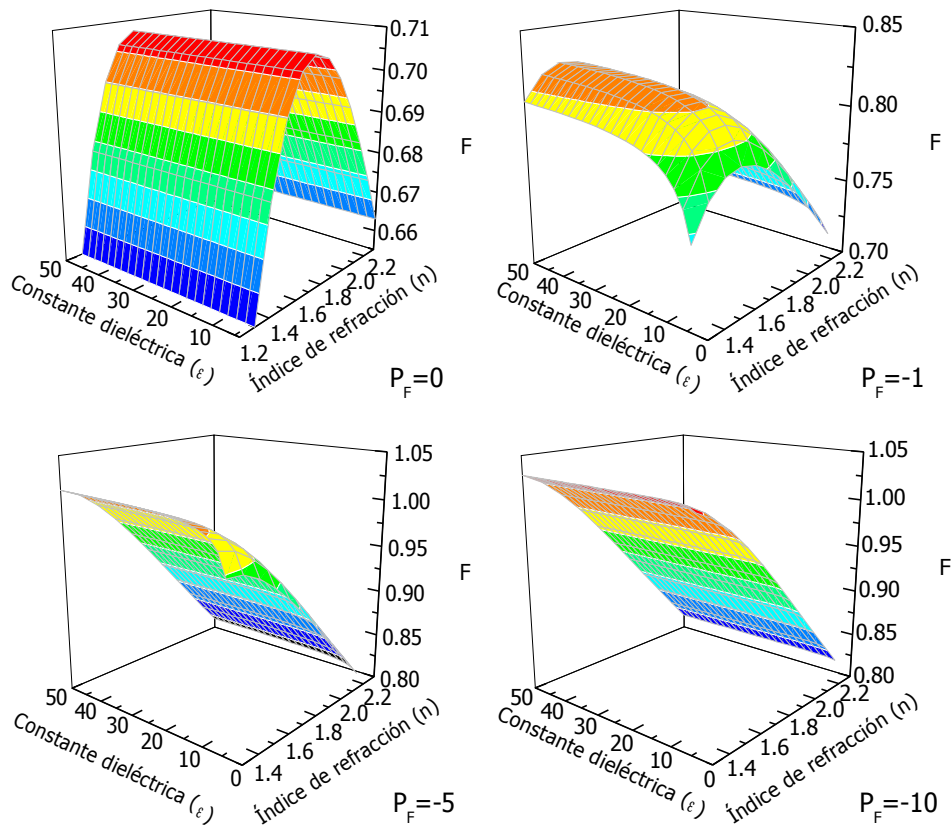


Figura 2.5A.- Efecto combinado de ϵ_M y n_M en la intensidad de fluorescencia: diferentes valores negativos de P_F ($K_F^{ins}=1$, $Y_F=1$, $n_F=1.6$).

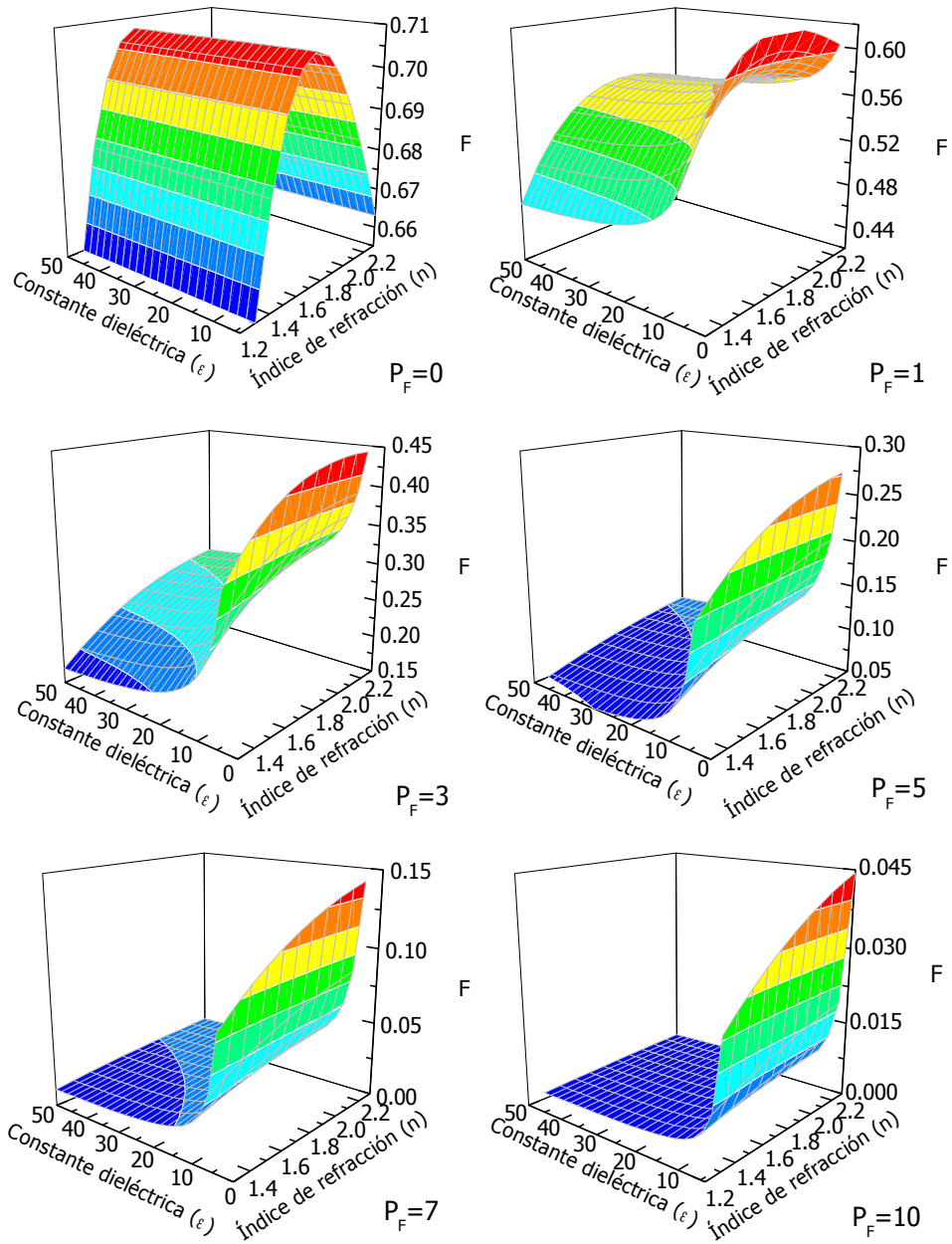


Figura 2.5B.- Efecto combinado de ϵ_M y n_M en la intensidad de fluorescencia: diferentes valores positivos de P_F ($K_F^{ins} = 1$, $Y_F = 1$, $n_F = 1.6$).

De estos datos se pueden obtener dos conclusiones generales:

1.- Cuanto mayor es el valor de P_F del fluoróforo menor es, en términos generales, la fluorescencia que se observa. Como se ha indicado, un valor de P_F positivo indica que el estado singlete tiene mayor polaridad (y menor apolaridad) que el estado triplete. Por tanto, el estado singlete reduce más su energía al exponerse al medio que el estado triplete, la diferencia entre ellos disminuye, la k^{CIS} aumenta y la intensidad de fluorescencia observada es menor. Si P_F es negativo, el estado singlete tiene menos polaridad que el estado triplete, el estado triplete reduce más su energía al exponerse al medio, la diferencia de energía aumenta, k^{CIS} baja y, por tanto, la F aumenta. Esto se puede representar de forma esquemática como aparece en la figura 2.6.

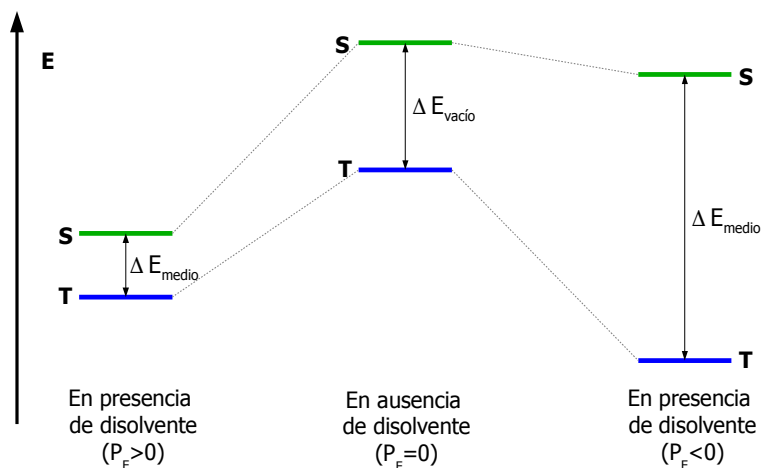


Figura 2.6.- Efecto genérico del medio en la F.

2.- Es una consecuencia de lo anterior, pero con mayor implicación analítica. Las gráficas indican que cuanto mayor es la P_F mayor es la "sensibilidad" que tiene el fluoróforo hacia el medio, es decir, mayor es la capacidad de detectar variaciones pequeñas de n_M o ϵ_M . Esto se puede cuantificar con tres ejemplos representativos:

- Si el valor de $P_F=0$, la F se mueve (a lo largo y ancho de la superficie de respuesta) entre 0.65 y 0.7, es decir, el cambio total de F que puede provocar el medio es del orden del 10%.

- Si el valor de $P_F=3$, la F se mueve entre 0.045 y 0.2, lo que supone un cambio de más del 100%.

- Si finalmente el valor de $P_F=10$, la F se mueve entre 0.045 y 0.0013, lo que indica que la fluorescencia cambia del orden de 35 veces.

Para poder comparar mejor las diferencias en cuanto a la forma matemática de la variación, la figura 2.7 muestra estas mismas figuras normalizadas al valor de F más alto en cada una de ellas (es decir, los valores de F de cada figura se han dividido entre el valor más alto de esa figura, de modo que el valor máximo de F es 1) y en la misma escala de fluorescencia.

El efecto de Y_F es, de algún modo, equiparable al de P_F . Si se tienen diferentes fluoróforos con un mismo valor de P_F pero valores crecientes de Y_F , estos se comportan de forma similar a tener el mismo valor de Y_F pero valores crecientes de P_F . Esto se puede ver en las figuras 2.8 y 2.9, que muestran valores de F (normalizados de igual manera a como se hizo en la figura 2.7) para valores de $Y_F=10$ y $Y_F=0.1$ respectivamente, usando algunos valores representativos de P_F .

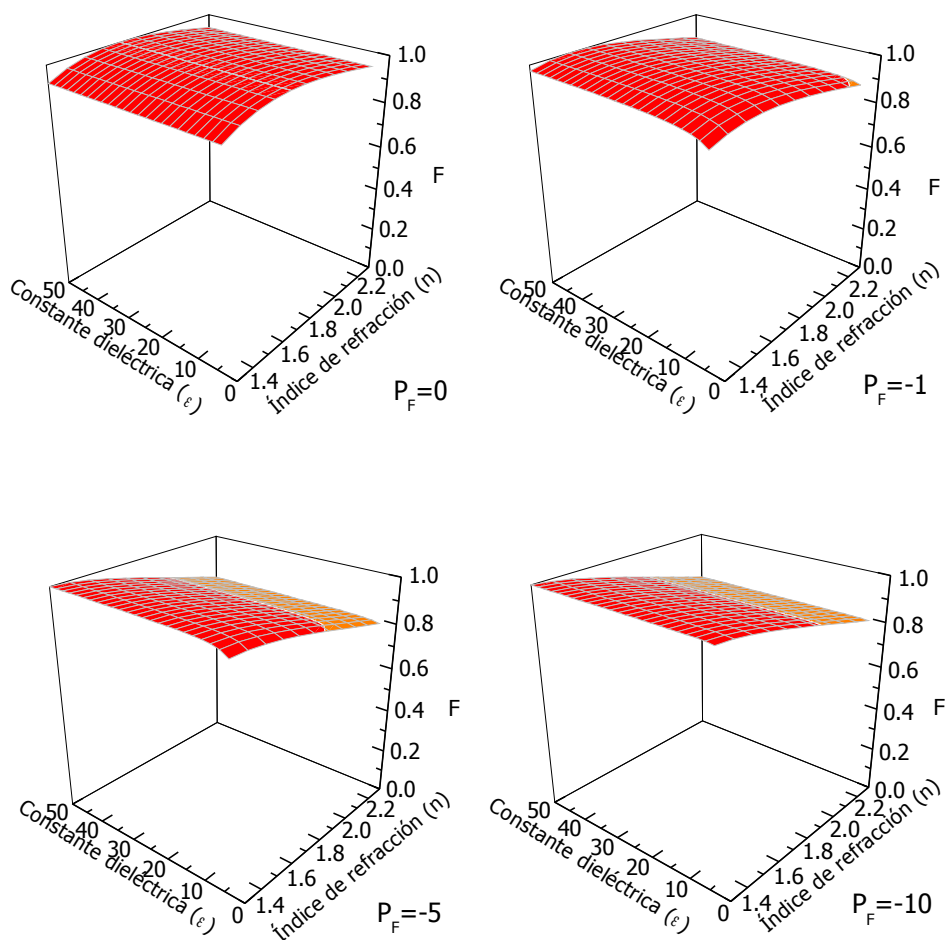


Figura 2.7A.- Efecto combinado de ϵ_M y n_M en la intensidad de fluorescencia: diferentes valores negativos de P_F ($K_F^{ins} = 1$, $Y_F = 1$, $n_F = 1.6$). Valores normalizados.

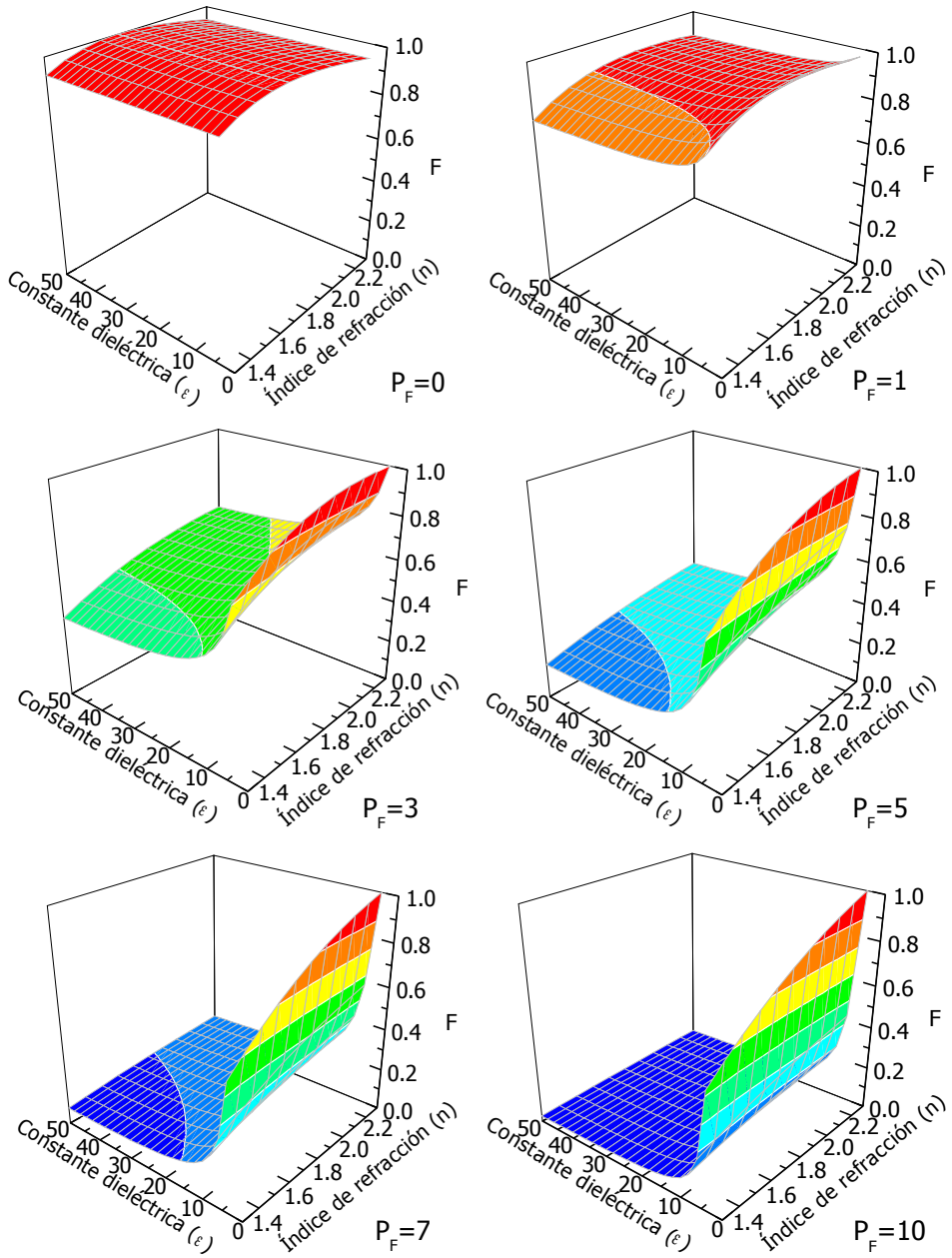


Figura 2.7B.- Efecto combinado de ϵ_M y n_M en la intensidad de fluorescencia: diferentes valores positivos de P_F ($K_F^{ins} = 1$, $Y_F = 1$, $n_F = 1.6$). Valores normalizados.

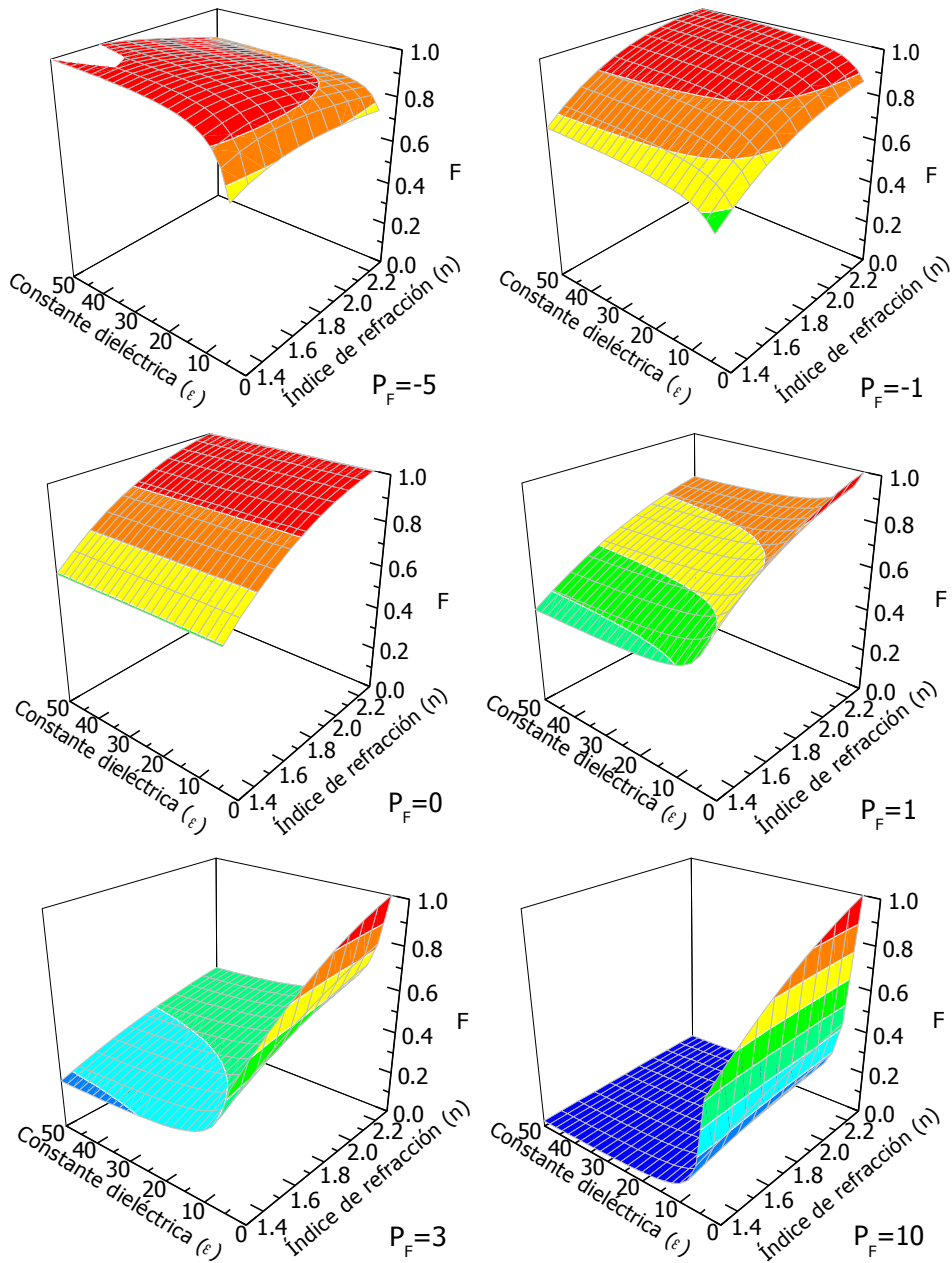


Figura 2.8.- Efecto combinado de ϵ_M y n_M en la intensidad de fluorescencia: diferentes valores positivos de P_F ($K_F^{\text{ins}} = 1$, $\gamma_F = 10$, $n_F = 1.6$). Valores normalizados.

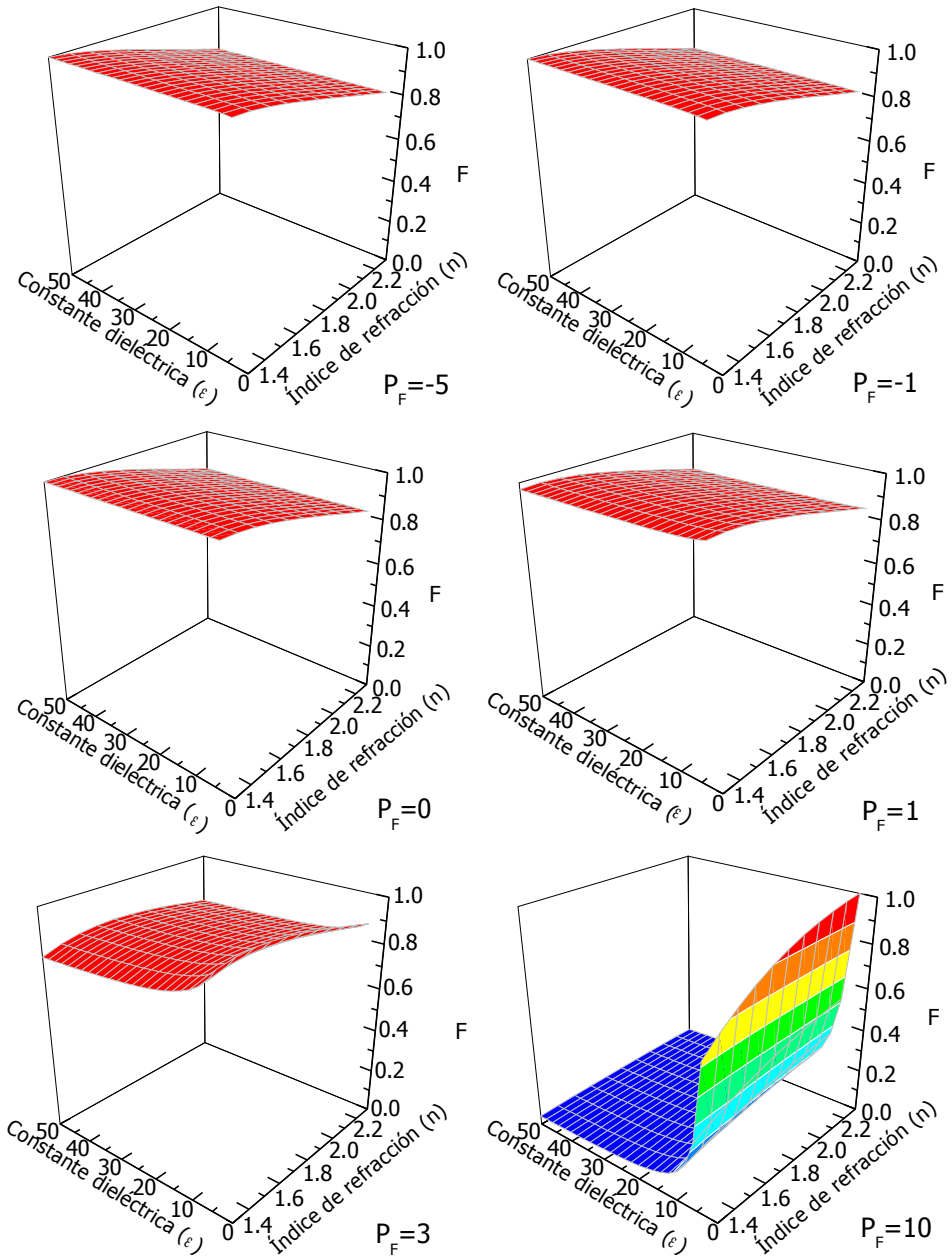


Figura 2.9.- Efecto combinado de ϵ_M y n_M en la intensidad de fluorescencia: diferentes valores positivos de P_F ($K_F^{ins} = 1$, $Y_F = 0.1$, $n_F = 1.6$). Valores normalizados.

2.5.3.- Comportamiento analítico

Ahora interesa centrar la discusión sobre los parámetros del medio de forma que se pueda deducir cómo, al cambiar la naturaleza del medio, cambiará la fluorescencia y si ese cambio tiene aplicación analítica.

a) Efecto del índice de refracción

El índice de refracción afecta de una forma moderada a la intensidad de fluorescencia. Su efecto es relativamente complejo, ya que es muy dependiente de las características del fluoróforo. Para poder explicar esto, se han extraído de la figura 2.5, a modo de resumen, los diferentes tipos de comportamientos de F al cambiar el índice de refracción. La figura 2.10 muestra los resultados.

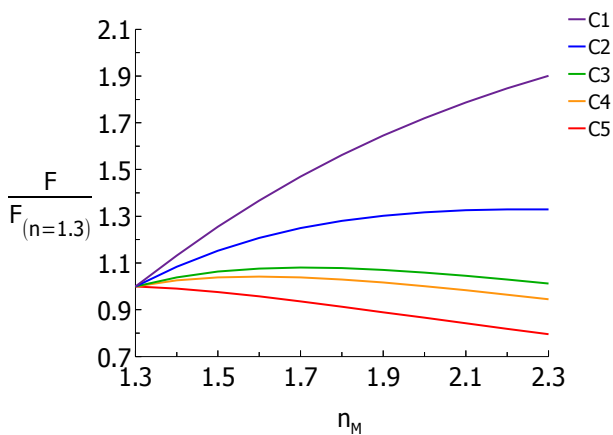


Figura 2.10.- Efecto de n_M en el valor de F para diferentes valores de P^{S-T} : 10 (-), 3 (-), 0 (-), -1 (-) y -10 (-). ($K_F^{ins}=1$, $Y_F=1$, $n_F=1.6$, $\epsilon_M=4$).

Para poder obtener conclusiones analíticas de estos resultados se ha trabajado con señales normalizadas al valor más bajo de los manejados, que se corresponde con el valor del agua ($n_M=1.3$). Tomando esta referencia, la adición de analito provoca un aumento del índice de refracción. Se pueden extraer dos

conclusiones generales:

1.- La F oscila entre dos valores límite que serán desde 0.8 hasta 1.9. Cualquier cambio del medio que produzca alteraciones de los índices de refracción como los indicados (entre 1.3 y 2.3) y que genere variaciones de intensidad de fluorescencia mayores del intervalo comprendido entre 0.8 y 1.9, indicará que se está produciendo una interacción entre el fluoróforo y el medio que no es una interacción típicamente inespecífica o de solvatación (por ejemplo, desactivaciones de origen molecular).

2.- La intensidad de fluorescencia varía con n_M de forma distinta pudiendo identificarse hasta 5 comportamientos diferentes (C_1 a C_5 en la figura):

C_1 : hay un aumento progresivo del parámetro con n_M . Se observa que, al principio, este aumento es lineal pero luego la linealidad se va perdiendo. Cualquier analito que provoque estos efectos sobre el medio generará un cambio de fluorescencia que será lineal para bajas concentraciones, pero que irá perdiendo posteriormente este comportamiento. Posiblemente se ajuste a una ecuación de segundo grado.

C_2 : al aumentar el valor de n_M la fluorescencia aumenta hasta alcanzar una situación estable (en la figura, a partir de $n_M=1.9$). Un fluoróforo que se encuentre en un medio en el que la concentración de analito genere estos cambios, sufrirá un leve aumento de fluorescencia con la concentración de analito, para luego estabilizarse y volverse independiente de dicha concentración.

C_3 : esta situación es interesante. Al inicio del intervalo, los aumentos de n_M producen aumentos de F mientras que al final del intervalo los aumentos de n_M provocan descensos. Esta especie de parábola describe la variación de F con la concentración de un analito cuyo comportamiento se ajuste a este caso.

C₄: es una situación contraria a C₂. Al principio, las variaciones de n_M no alteran el valor de F, pero sucesivos aumentos dan lugar a descensos en la F. Este caso es especialmente interesante desde el punto de vista analítico. Al hacer un estudio de calibración, se observará como si dicho analito no afectara a la señal. Incluso si la solubilidad del analito es baja, puede que ninguna concentración del mismo genere cambios de fluorescencia.

C₅: se trata de una situación opuesta a C₁, ya que cualquier aumento de n_M provoca descensos de la F. Obviamente, en este caso, la adición de analito provocará descensos proporcionales en la señal de fluorescencia.

En todos los casos los cambios observados son suaves de forma que, en un intervalo corto de valores de n_M (por ejemplo, 0.1 unidades), se puede considerar que F varía linealmente con n_M .

b) Efecto de la constante dieléctrica

El efecto de la constante dieléctrica es más enérgico que el del índice de refracción. En términos generales, se puede decir que:

1.- Un aumento en la constante dieléctrica tiende a disminuir la intensidad de fluorescencia tanto más cuanto más alto es el valor de P_F , es decir, cuanto mayor sea la diferencia de polaridad de los dos estados excitados.

2.- Sólo cuando los valores de P_F son negativos, un aumento de la constante dieléctrica favorece la intensidad de fluorescencia.

También en este caso se ha tratado de sintetizar en una sola figura los comportamientos generales que se derivan de los diagramas 3D. En la figura 2.11 se resumen estos comportamientos, en la que, de nuevo, para poder

comparar las diferentes curvas, se han normalizado los datos de F al valor obtenido usando el valor de la constante dieléctrica más bajo ($\epsilon_M=4$).

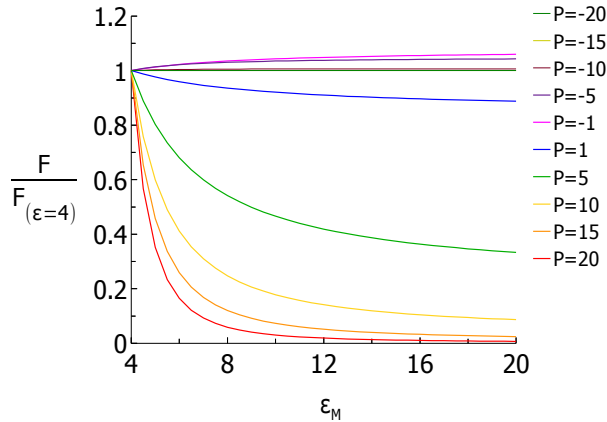


Figura 2.11.- Efecto de ϵ_M en el valor de F ($Y_F=1$, $n_M=1.35$)

Las conclusiones analíticas se pueden obtener de igual forma que con el índice de refracción.

1.- Si el fluoróforo presenta un valor de P_F elevado, los cambios pequeños del valor de ϵ_M pueden provocar cambios muy grandes en la intensidad de fluorescencia. Por ejemplo, si un fluoróforo con un valor de $P_F=20$ está disuelto en un disolvente de baja polaridad ($\epsilon_M=8$), al añadir sobre él un soluto (analito) de ϵ_A menor, pequeñas cantidades de analito provocarán aumentos importantes de la fluorescencia y esto permitirá desarrollar un método sensible para la determinación de ese analito. Dicho método tendrá, sin embargo, un intervalo de respuesta lineal corto. Por el contrario, si se añade un analito de ϵ_A mayor, pequeñas cantidades apenas variarán la fluorescencia.

2.- Si ese mismo ensayo se realiza con un fluoróforo de P_F menor ($P_F=1$), los cambios de fluorescencia serán menos importantes, lo que probablemente dará lugar a métodos de menor sensibilidad pero probablemente de un mayor

intervalo de respuesta lineal. Finalmente, si P_F es negativo, las variaciones serán de signo contrario (el analito disminuirá la fluorescencia), la sensibilidad menor y también los intervalos de respuesta lineal.

2.6.- MODELO ANALÍTICO: DISCUSIÓN DEL MODELO GLOBAL

2.6.1.- Aproximación empírica

El objetivo del estudio teórico que se presenta no es tanto elucidar el efecto del disolvente sobre la intensidad de fluorescencia de una sustancia sino justificar que estos cambios tienen una aplicación analítica. Para ello se parte de la base de que, en una disolución, tanto el disolvente (D) como el soluto (que será el analito, (A), afectan a la intensidad de fluorescencia del fluoróforo, en una extensión que depende de la proporción relativa en la que se encuentren ambos. En este apartado se va a especificar cómo es esa relación, lo que permitiría obtener el modelo analítico que se está buscando.

Se han considerado dos formas distintas de abordar esta parte final del modelo, que se pueden denominar: aproximación formal y aproximación empírica.

Esta es la alternativa que se utilizó inicialmente en el desarrollo del modelo. Se basa en considerar que la fluorescencia obtenida con una mezcla (o una disolución) es la media ponderada de los valores de fluorescencia obtenidos con cada uno de los componentes por separado, siendo las fracciones en volumen (X_v) los factores de ponderación. El uso de X_v se ha considerado después de revisar la bibliografía y encontrar diferentes publicaciones en las que se usa para obtener propiedades físicas ponderadas en disolución, como el

momento dipolar⁵⁵, relacionados con este trabajo. Con esto, la ecuación del modelo queda de la siguiente forma:

$$F = F_D X_{v,D} + F_A X_{v,A} = F_D + (F_A - F_D) X_{v,A} \quad (2.35)$$

donde F_D y F_A son las fluorescencias observadas cuando sólo el analito o el disolvente están presentes en el medio. Estos valores se obtendrían a partir de la ecuación (2.33), sustituyendo el índice de refracción y la constante dieléctrica del medio, por el del analito (para F_A) o el disolvente (para F_D) respectivamente. Es importante indicar que para un analito y un disolvente dados F_A y F_D son constantes. Si se considera, de nuevo, un efecto de solvatación preferencial por parte del analito o del disolvente, la ecuación queda:

$$F = F_D + \frac{K^{PS}(F_A - F_D)X_{v,A}}{1 + X_{v,A}(K^{PS} - 1)} \quad (2.36)$$

La anterior ecuación se puede arreglar de la siguiente forma:

$$\frac{F - F_D}{F_D} = \Delta F = \left(\frac{F_A - F_D}{F_D} \right) \frac{K^{PS} X_{v,A}}{1 + X_{v,A}(K^{PS} - 1)} \quad (2.37)$$

55 Sengwa, R. J.; Abhilasha, M.; "A Comparative Study of Non-Polar Solvents Effect on Dielectric Relaxation and Dipole Moment of Binary Mixtures of Mono Alkyl Ethers of Ethylene Glycol and of Diethylene Glycol with Ethyl Alcohol" *J. Mol. Liq.* **2006**, 123, 92-104. Boer, G. J.; Sokolik, I. N.; Martin, S. T.; "Infrared Optical Constants of Aqueous Sulfate-Nitrate-Ammonium Multi-component Tropospheric Aerosols from Attenuated Total Reflectance Measurements: Part II. An Examination of Mixing Rules" *J. Quant. Spectros. Rad. Trans.* **2007**, 108, 39-53. Mehra, R.; "Application of Refractive Index Mixing Rules in Binary Systems of Hexadecane and Heptadecane with *n*-Alkanols at Different Temperatures" *Proc. Indian Acad. Sci.* **2003**, 115, 147-154.

La ventaja de ΔF como parámetro de medida sobre F es que el primero es independiente de la K_F^{ins} , es decir, de las condiciones instrumentales y de la concentración de fluoróforo usadas. Obviamente esta ecuación admite dos situaciones límite dependiendo de la concentración de analito: para concentraciones bajas se debería esperar una relación lineal mientras que para concentraciones altas se pierde la linealidad.

$$1 \gg X_{v,A}(K^{\text{PS}} - 1) \Rightarrow 1 + X_{v,A}(K^{\text{PS}} - 1) \approx 1 \Rightarrow \Delta F = K^{\text{PS}} \left(\frac{F_A - F_D}{F_D} \right) X_{v,A} \quad (2.38a)$$

$$1 \ll X_{v,A}(K^{\text{PS}} - 1) \Rightarrow 1 + X_{v,A}(K^{\text{PS}} - 1) \approx X_{v,A}(K^{\text{PS}} - 1) \Rightarrow \Delta F = \frac{F_A - F_D}{F_D} \frac{K^{\text{PS}}}{(K^{\text{PS}} - 1)} \quad (2.38b)$$

La aproximación empírica desarrollada presenta ventajas e inconvenientes. Las ventajas más importantes son:

1.- Explica comportamientos que se han observado experimentalmente en diferentes sistemas, ya que, en muchos casos, el efecto de la concentración del analito en la señal de fluorescencia produce un primer tramo de respuesta lineal seguido de otro tramo en el que deja de haber tal respuesta.

2.- Permite predecir que la sensibilidad de una sustancia por este método dependerá de la diferencia $F_D - F_A$, es decir, de la diferencia de señales que se obtengan cuando el fluoróforo se encuentra solo en presencia del disolvente (F_D) o del analito (F_A). De acuerdo con esto, las figuras 2.7, 2.8 y 2.9 permitirían hacer predicciones sobre cómo variaría F para diferentes valores de $X_{v,A}$. Para ello, habría que seguir los siguientes pasos:

a) Conocidos (o estimados) los valores de P_F y Y_F del fluoróforo, se va a la correspondiente figura.

b) A partir de los datos de los valores de n_D y ϵ_D , se obtiene el valor de F_D . Lo mismo para F_A .

c) Se unen los puntos F_D y F_A por una línea, y esta da la variación de F en función de la concentración de analito.

Por el contrario, los inconvenientes son:

1.- Simplifica bastante la realidad, ya que parte de una dependencia supuesta dada por la ecuación (2.35).

2.- Según la ecuación, la relación de F con X es lineal y esta dependencia sólo se pierde por el hecho de que exista solvatación preferencial.

2.6.2.- Aproximación formal

Esta aproximación, más laboriosa, busca encontrar una relación teórica entre ϵ_M y n_M , y la concentración del analito.

a) Dependencia de la constante dieléctrica

Como se sabe, la constante dieléctrica de una sustancia es consecuencia de sus propiedades físico-químicas a nivel molecular, sobre todo de su polarizabilidad (α) y de su momento dipolar (μ). Para una sustancia pura, la ecuación que relaciona α , μ y ϵ es la ecuación de Langevin-Debye (o simplemente, ecuación de Debye), que viene dada por:

$$\left(\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2}\right) = \frac{4\pi N}{3} \left(\alpha + \frac{\mu^2}{3k_B T}\right) = \frac{4\pi N_A \rho}{3M} \left(\alpha + \frac{\mu^2}{3k_B T}\right) \quad (2.39)$$

donde N es el número de moléculas de sustancia por unidad de volumen, M es la masa molar, ρ es la densidad de la sustancia, N_A es el número de Avogadro, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura.

Esta ecuación admite diferentes formulaciones en función de las unidades en las que se expresen las diferentes magnitudes⁵⁶. Posteriormente, Onsager⁵⁷ mejoró el modelo químico-físico propuesto por Debye y propuso la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{(\epsilon-n^2)(2\epsilon+n^2)}{\epsilon(2+n^2)^2}\right) = \frac{4\pi N}{3} \left(\frac{\mu^2}{3k_B T}\right) \quad (2.40)$$

En ella la polarizabilidad de la molécula ha sido sustituida por su índice de refracción de acuerdo con (2.29). El propio Onsager introdujo una versión simplificada de esta ecuación para cuando la sustancia tenía carácter polar, es decir, cuando

$$\epsilon - n^2 \approx \epsilon \Rightarrow 2\epsilon + n^2 \approx 2\epsilon \quad (2.41)$$

con lo que la ecuación (2.40) queda:

$$\epsilon = \frac{2\pi N}{3} \left(\frac{\mu^2}{3k_B T}\right) (2+n^2)^2$$

⁵⁶ En general, los valores de α se suelen tabular en \AA^3 , los de μ en Debyes y los de ρ en g mL^{-1} . En este caso la ecuación anterior es:

$$\left(\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2}\right) = 2.5 \frac{\rho}{M} (\alpha + 8.1\mu^2)$$

⁵⁷ Onsager, L.; "Electric Moments of Molecules in Liquids" *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 1486-1493.

Cuando el medio está conformado por "n" sustancias diferentes, Onsager⁵⁸ demostró que la constante dieléctrica del medio viene dada por:

$$\epsilon_M = \frac{2\pi}{3} \sum_{i=1}^n N_i \left(\frac{\mu_i^2}{3k_B T} \right) (2 + n_i^2)^2 \quad (2.42)$$

lo que indica que la ϵ_M se obtiene por combinación de las constantes dieléctricas de las sustancias que lo componen, siendo la fracción molar en volumen ($X_{v,i}$) el factor de ponderación. Para una mezcla de un soluto (A) y un disolvente (D):

$$\epsilon_M = \epsilon_D - (\epsilon_D - \epsilon_A) X_{v,A} \quad (2.43)$$

En algunos casos puede ocurrir que el fluoróforo sea químicamente más afín a uno de los dos componentes de la disolución, interaccionando prioritariamente con él (solvatación preferencial). Hay varias formas de poner de manifiesto este efecto, pero un modelo sencillo se basa en usar la constante de solvatación preferencial K_ϵ^{PS} ⁵⁹.

58 Onsager, L.; "Electric Moments of Molecules in Liquids" *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 1486-1493.

59 Para incluir este efecto, un modelo simple se basa en que las fracciones molares de analito y disolvente en torno al fluoróforo ($X_{D,loc}$ y $X_{A,loc}$) son diferentes de las fracciones molares que se corresponden con la composición real. Estas fracciones molares locales están en equilibrio con las fracciones molares generales y a partir de aquí se define la constante de solvatación preferencial (K_ϵ^{PS}):

$$K_\epsilon^{PS} = \frac{X_{A,loc} X_D}{X_{D,loc} X_A}$$

Si $K_\epsilon^{PS} = 1$ no hay solvatación preferencial. Cuando $K_\epsilon^{PS} > 1$, el fluoróforo está solvatado preferencialmente por el analito y para $K_\epsilon^{PS} < 1$, aparece solvatación preferencial por el disolvente.

De acuerdo con ello, la ecuación anterior queda:

$$\epsilon_M = \epsilon_D + (K_\epsilon^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D) X_{v,A} \quad (2.44)$$

b) Dependencia del índice de refracción

La ecuación de Lorentz-Lorenz establece la dependencia del índice de refracción de un medio con la polarizabilidad de las moléculas que lo componen⁶⁰, tanto para una sustancia pura como para una mezcla de ellas.

$$\frac{n^2-1}{n^2+2} = \frac{2\pi}{3} N \alpha \quad (2.45)$$

$$\frac{n_M^2-1}{n_M^2+2} = \frac{2\pi}{3} \sum_{i=1}^n N_i \alpha_i \quad (2.46)$$

Al igual que en el caso de la ecuación de Onsager, al combinar de estas dos ecuaciones se desprende que el índice de refracción de una mezcla se puede obtener por ponderación de los índices de refracción de las especies que la componen, siendo las fracciones molares en volumen el factor de ponderación. En definitiva:

$$\left(\frac{n_M^2-1}{n_M^2+2} \right) = \left(\frac{n_D^2-1}{n_D^2+2} \right) + \left[\left(\frac{n_A^2-1}{n_A^2+2} \right) - \left(\frac{n_D^2-1}{n_D^2+2} \right) \right] X_{v,A} \quad (2.47)$$

que permite relacionar n_M^2 con la concentración de analito. Usando de nuevo la idea de la solvatación preferencial:

$$\left(\frac{n_M^2-1}{n_M^2+2} \right) = \left(\frac{n_D^2-1}{n_D^2+2} \right) - \left[\left(\frac{n_D^2-1}{n_D^2+2} \right) - K_n^{PS} \left(\frac{n_A^2-1}{n_A^2+2} \right) \right] X_{v,A} \quad (2.48)$$

⁶⁰ No hay que confundir esta ecuación con la (2.29) en la que se establece la relación entre la polarizabilidad de una molécula y su tamaño.

donde K_n^{PS} tiene el mismo significado que antes, pero referido a este tipo de interacciones. Usando la misma notación que en (2.44):

$$n_{c,M}^2 = n_{c,D}^2 - [n_{c,D}^2 - K_n^{PS} n_{c,A}^2] X_{v,A} \quad (2.49)$$

c) Modelo final

Para obtener el modelo analítico final basta con sustituir las expresiones de ϵ_M (2.44) y de n_M^2 (2.35) en la ecuación (2.33). Es obvio que el resultado será una ecuación muy complicada y difícil de manejar e interpretar, pero permitirá establecer una relación más fidedigna entre F y la concentración del analito.

2.7.- UN MODELO ANALÍTICO SIMPLIFICADO

Como se ha dicho en el apartado 2.6.2, el modelo final obtenido a partir de la aproximación formal es muy complejo. En este apartado, se va a dar un paso más en el desarrollo del modelo consistente en obtener un modelo simplificado que describa de una forma más sencilla el efecto de los índices de refracción y la constante dieléctrica de analito y disolvente y que pueda ser utilizado con fines analíticos.

2.7.1.- Simplificación sobre n_M

Se ha visto en la ecuación (2.45) que, de acuerdo con Debye, hay una relación lineal entre $n_{c,M}^2$ y la $X_{v,A}$. El índice de refracción del medio aparece reiteradamente en la ecuación de F (2.33) recogido en dos parámetros: $f_{n,M}^4$ y $\eta_M f_{n,M}^2$. Aunque cada uno de ellos establece una compleja relación con n^2 , si se tiene en cuenta que n se mueve en un intervalo pequeño de valores, se puede intentar aproximar esos dos parámetros a funciones sencillas de n^2 . Haciendo

simulaciones para un entorno de valores de n comprendido entre 1.3 y 1.9, se obtienen las siguientes ecuaciones de ajuste:

$$f_{n,M}^4 = 0.98 + 4.34 n_{c,M}^2 \quad r^2 = 0.996$$

$$n_M f_{n,M}^2 = 0.65 + 5.58 n_{c,M}^2 \quad r^2 = 0.999$$

La figura 2.12 muestra gráficamente la bondad del ajuste. Teniendo en cuenta (2.45):

$$f_{n,M}^4 = (1 + 4.4 n_{c,D}^2) + 4.4 [k_n^{PS} n_{c,A}^2 - n_{c,D}^2] X_{v,A}$$

$$n_M f_{n,M}^2 = (0.65 + 5.6 n_{c,D}^2) + 5.6 [k_n^{PS} n_{c,A}^2 - n_{c,D}^2] X_{v,A}$$

Ambas expresiones pueden reorganizarse de la siguiente forma:

$$f_{n,M}^4 = (1 + 4.4 n_{c,D}^2) \left[1 + \frac{k_n^{PS} n_{c,A}^2 - n_{c,D}^2}{0.23 + n_{c,D}^2} X_{v,A} \right] = (1 + 4.4 n_{c,D}^2) [1 + N_a X_{v,A}] \quad (2.50a)$$

$$n_M f_{n,M}^2 = (0.65 + 5.6 n_{c,D}^2) \left[1 + \frac{k_n^{PS} n_{c,A}^2 - n_{c,D}^2}{0.12 + n_{c,D}^2} X_{v,A} \right] = (0.65 + 5.6 n_{c,D}^2) [1 + N_b X_{v,A}] \quad (2.50b)$$

Las fracciones que están dentro de los corchetes, que se han representado como N_a y N_b , son enormemente interesantes analíticamente hablando. El numerador es, básicamente, la diferencia en valor absoluto entre los valores de n_c^2 para el analito y el disolvente, mientras que el cociente completo representa la diferencia relativa respecto del disolvente. Por tanto, este cociente da una idea de la capacidad (o, en términos analíticos, la sensibilidad) que tiene el analito de alterar el índice de refracción del medio.

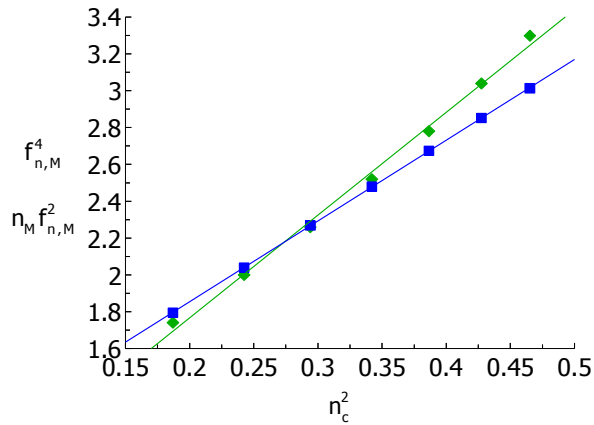


Figura 2.12.- Linealización de $n_M f_{n,M}^2$ (◆) y $f_{n,M}^4$ (■) respecto de n_c^2 .

Finalmente se pueden añadir dos simplificaciones.

1.- Como ya se ha indicado, el parámetro K_n^{PS} pone de manifiesto la solvatación preferencial por parte del analito. Este valor no tiene por que ser igual a K_ϵ^{PS} dado que los tipos de interacciones dominantes son distintos, pero en un modelo simplificado se podría considerar que ambos son similares:

$$K^{PS} = K_n^{PS} = K_\epsilon^{PS} \quad (2.51a)$$

2.- Aunque los valores de N_a y N_b son diferentes, dado que se está desarrollando un modelos simplificado, se puede admitir que ambos se pueden aproximar a un promedio (N):

$$N_a \approx N_b \approx N_{D,A} = \frac{K_n^{PS} n_{c,A}^2 - n_{c,D}^2}{0.175 + n_{c,D}^2} \quad (2.51b)$$

Por tanto, las ecuaciones (2.50) se pueden simplificar finalmente a:

$$f_{n,M}^4 = (1 + 4.4n_{c,D}^2)[1 + N_{D,A} X_{v,A}] \quad (2.52a)$$

$$n_M f_{n,M}^2 = (0.65 + 5.6n_{c,D}^2)[1 + N_{D,A} X_{v,A}] \quad (2.52b)$$

2.7.2.- Simplificación sobre $f_{\epsilon,M}$

La ecuación (2.31) muestra la dependencia del término $f_{\epsilon,M}$ con el valor de ϵ_M . A su vez, la ecuación (2.40) relaciona ϵ_M con la concentración de analito. Combinando ambas, considerando (2.51a) y reorganizando la ecuación resultante se llega a:

$$f_{\epsilon,M} = \frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} = \frac{(\epsilon_D - 1) + \left(K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D \right) X_{v,A}}{(\epsilon_D + 2) + \left(K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D \right) X_{v,A}} \quad (2.53)$$

Al sustituir (2.52) y (2.53) en (2.33) se obtiene:

$$F = K_F^{ins} \frac{(1 + 4.4n_{c,D}^2)[1 + N_{D,A} X_{v,A}]}{(0.65 + 5.6n_{c,D}^2)[1 + N_{D,A} X_{v,A}] + Y_F e^{P_F \left(\frac{(\epsilon_D - 1) + \left(K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D \right) X_{v,A}}{(\epsilon_D + 2) + \left(K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D \right) X_{v,A}} \right)}} \quad (2.54)$$

Este formato de ecuación es útil dado que la dependencia funcional de los diferentes términos está claramente definida y separada. Por un lado se tienen los parámetros que dependen del fluoróforo, por otro, los que lo hacen del medio, y entre ellos los que varían con el índice de refracción: $N_{D,A}$, $(1 + 4.4n_{c,D}^2)$

y $(0.65 + 0.56n_{c,D}^2)$, o con la constante dieléctrica: $\frac{(\epsilon_D - 1) + \left(K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D \right) X_{v,A}}{(\epsilon_D + 2) + \left(K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D \right) X_{v,A}}$.

2.7.3.- Modelo simplificado general

La ecuación (2.54) establece una relación muy compleja entre la señal de fluorescencia y la concentración de analito. Por un lado, la concentración se encuentra tanto en el numerador como en el denominador de la fracción; por otro, en el numerador y denominador del exponente. Una forma más fácil de ver el efecto de la concentración es aplicando un desarrollo de Taylor sobre la función usando la X como variable. De acuerdo con él:

$$F = F_{(X_{v,A}=0)} + \left(\frac{dF}{dX_{v,A}} \right)_{(X_{v,A}=0)} X_{v,A} + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2F}{dX_{v,A}^2} \right)_{(X_{v,A}=0)} X_{v,A}^2 + \dots \quad (2.55)$$

a) *Término independiente: fluorescencia del disolvente*

El primer término del desarrollo se obtiene sustituyendo $X_{v,A}=0$ en la ecuación, que es el valor debido sólo al disolvente utilizado: de aquí que se le denomine F_D .

$$F_{(X_{v,A}=0)} = F_D = K_F^{ins} \frac{(1 + 4.4n_{c,D}^2)}{0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} \quad (2.56)$$

b) *Término en $X_{v,A}$: sensibilidad del método*

Cuando el valor de $X_{v,A}$ sea bajo los términos del polinomio de orden superior ($X_{v,A}^2$ en adelante) son despreciables, por lo que la ecuación (2.55) queda:

$$F = F_{(X_{v,A}=0)} + \left(\frac{dF}{dX_{v,A}} \right)_{(X_{v,A}=0)} X_{v,A} \quad (2.57)$$

y la señal de fluorescencia variará linealmente con la concentración del analito, obteniéndose el intervalo de respuesta del método analítico. Por su parte,

$\left(\frac{dF}{dX_{v,A}}\right)_{(X_{v,A}=0)}$ será la pendiente de la recta de calibrado, es decir, la sensibilidad del método. El valor obtenido para este parámetro es bastante complejo y se puede expresar de la siguiente manera:

$$\left(\frac{dF}{dX_{v,A}}\right)_0 = K_F^{ins} \left(\frac{1 + 4.4n_{c,D}^2}{0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2}\right)}} \right) \left(\frac{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2}\right)}}{0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2}\right)}} \right) \cdot \left(N_{D,A} - 3P_F \frac{K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D}{(\epsilon_D + 2)^2} \right) \quad (2.58)$$

El término se compone del producto de 3 factores:

- El primero de ellos coincide con el valor de F_D de la ecuación (2.56).
- El segundo es un factor que depende tanto del fluoróforo que se esté usando como del disolvente. El valor más alto que puede tomar este término es 1, que sería cuando el término exponencial fuera mucho más grande que $(0.65 + 5.6n_{c,D}^2)$.
- El tercero es el factor más importante desde el punto de vista analítico.

Incluye, por un lado, el parámetro $N_{D,A}$ que como se ha dicho antes en (2.51b) manifiesta la diferencia de índices de refracción del analito y el fluoróforo; por otro, incluye el término:

$$\frac{K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D}{(\epsilon_D + 2)^2} = E_{D,A} \quad (2.59)$$

que es el equivalente a $N_{D,A}$, pero con las constantes dieléctricas. Finalmente incluye el término que sólo depende del fluoróforo (P_F), por ello se puede reescribir de la siguiente forma:

$$\left(\frac{dF}{dX_{v,A}} \right)_0 = F_D \left(\frac{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}}{0.65 + 5.6 n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} \right) (N_{D,A} - 3 P_F E_{D,A})$$

que al sustituirlo en la ecuación (2.57) se obtiene:

$$F = F_D + F_D \left(\frac{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}}{0.65 + 5.6 n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} \right) (N_{D,A} - 3 P_F E_{D,A}) X_{v,A} \quad (2.60)$$

En el apartado 2.6.3 ya se han comentado las ventajas que supone sustituir el parámetro convencional de medida F por ΔF , definido según (2.48). Aplicando la misma definición se tiene:

$$\frac{F-F_D}{F_D} = \Delta F = \left(\frac{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}}{0.65 + 5.6 n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} \right) (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) X_{V,A} \quad (2.61)$$

De esta ecuación se pueden obtener las siguientes conclusiones analíticas sobre la pendiente de la recta de calibrado, y , por tanto, de la sensibilidad:

1.- Atendiendo únicamente al índice de refracción, cuanto mayor es el valor absoluto de $N_{D,A}$, es decir, cuanto mayor sea la diferencia entre el índice de refracción del analito y del disolvente, mayor es la pendiente de la recta. La pendiente será positiva si $n_A > n_D$ y será negativa si $n_A < n_D$.

2.- Atendiendo únicamente a la constante dieléctrica, cuanto mayor es el valor absoluto de $E_{D,A}$, es decir, cuanto mayor es la diferencia de constantes dieléctricas de analito y disolvente, mayor es la pendiente de la recta. La pendiente será positiva si $\epsilon_A > \epsilon_D$ y negativa si $\epsilon_A < \epsilon_D$. El efecto real de la diferencia de constantes dieléctricas viene muy modulado por el fluoróforo, dado que si P_F es grande, tenderá a amplificar las diferencias, mientras que si es pequeño tenderá a amortiguarlas. De aquí la importancia en la elección del fluoróforo.

3.- Atendiendo a ambos parámetros (puesto que, en muchos casos, los analitos van a provocar cambios de ambos parámetros simultáneamente) se puede conseguir un efecto de sinergia si ambos cambian en direcciones contrarias. Por ejemplo, si se cumple simultáneamente que: $n_A > n_D$ y $\epsilon_A < \epsilon_D$, o bien, $n_A < n_D$ y $\epsilon_A > \epsilon_D$, ambos parámetros favorecen el aumento de fluorescencia y la sensibilidad tenderá a ser alta (positiva o negativa respectivamente). Por el contrario, si ambos parámetros cambian de forma paralela se producirá un efecto

inhibidor en la fluorescencia. Los cambios de fluorescencia tenderán a anularse y la sensibilidad será baja.

4.- Finalmente, el término que precede a $(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A})$ tiene también su importancia. Este término puede valer entre 0 y 1, por tanto afectará disminuyendo la sensibilidad o, en el mejor de los casos, sin cambiarla. La situación óptima se producirá cuando:

$$0.65 + 5.6n_{c,D}^2 \ll Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}$$

↓

$$\left(\frac{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}}{0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} \right) \approx \frac{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}}{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} = 1$$

(2.62)

Esta aproximación es tanto más probable cuanto mayores son los valores de P_F y de ϵ_D . Es importante, sin embargo, ver que ambos parámetros (P_F y ϵ_D) tienen también mucha importancia en el valor de $(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A})$. Esto dificulta bastante las predicciones a partir del modelo. En un modelo simplificado representativo se podría aplicar esta aproximación, con lo que la ecuación (2.61) quedaría:

$$\Delta F = (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) X_{v,A} \quad (2.63)$$

Esta ecuación se propone como modelo matemático simplificado general para aquella zona de concentraciones en la que se observa una variación lineal entre ΔF y la concentración de analito.

c) Término en $X_{v,A}^2$: intervalo de respuesta lineal

Para concentraciones mayores de analito el término $X_{v,A}^2$ empieza a ser importante y termina el intervalo de respuesta lineal. Este término es matemáticamente más complejo que el anterior y adquiere la siguiente forma:

$$\left(\frac{d^2 F}{dX_{v,A}^2} \right)_0 = -K_F^{ins} \left(\frac{1 + 4.4n_{c,D}^2}{0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} \right) \left(\frac{Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}}{\left(0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)} \right)^2} \right) \cdot \left\{ \begin{aligned} & \left(0.65 + 5.6n_{c,D}^2 - Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)} \right) \left(N_{D,A} - 3P_F \frac{K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D}{(\epsilon_D + 2)^2} \right)^2 + \\ & + \left(0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)} \right) \left(N_{D,A} - 6P_F \frac{(K^{PS} \epsilon_A - \epsilon_D)^2}{(\epsilon_D + 2)^3} \right) \end{aligned} \right\} \quad (2.64)$$

Si sobre esta ecuación, difícil de manejar, se aplica la definición dada para F_D (2.56) y la aproximación (2.62) se obtiene:

$$\left(\frac{d^2 F}{dX_{v,A}^2} \right) = -F_D 3P_F E_{D,A} \left[(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) + (N_{D,A} - 2E_{D,A}(\epsilon_D + 2)) \right] \quad (2.65)$$

Sustituyendo (2.60) y (2.65) en (2.55) se obtiene:

$$F = F_D + F_D (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) X_{V,A} - \frac{3}{2} F_D P_F E_{D,A} [(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) + (N_{D,A} - 2E_{D,A}(\epsilon_D + 2))] X_{V,A}^2 \quad (2.66)$$

A partir de ahí se puede calcular ΔF :

$$\Delta F = (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) X_{V,A} - \frac{3}{2} P_F E_{D,A} [(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) + (N_{D,A} - 2E_{D,A}(\epsilon_D + 2))] X_{V,A}^2 \quad (2.67)$$

El término cuadrático es bastante parecido al término en X pero con signo negativo, lo que quiere decir que cuanto mayor sea la pendiente de la recta de calibrado, mayor va a ser el valor del coeficiente del término cuadrático y, por tanto, la concentración de analito para la que empezará a tener peso será mayor. Es decir, cuanto más sensible sea la determinación del analito, menor será el intervalo de respuesta lineal.

2.7.4.- Validación de la simplificación

El modelo simplificado permite evaluar mucho mejor el efecto de las variables y de los parámetros en la intensidad de fluorescencia y en ΔF . Es importante saber hasta qué punto es este modelo una buena representación de la ecuación general.

Para ello se han hecho algunas simulaciones representativas de resultados experimentales que se incluirán posteriormente. Estas simulaciones se basan en el uso de metanol como disolvente ($\epsilon_D=33.4$, $n_D=1.3290$) y 2-dodecanol como analito ($\epsilon_D=5.8$, $n_D=1.4428$). Se ha considerado que no hay solvatación preferencial del analito o del disolvente sobre el fluoróforo ($K^{PS}=1$).

Los fluoróforos pueden tomar cualquier valor de P_F . Para hacer una simulación más realista se han considerado valores para los que las fracciones molares en volumen no son demasiado grandes (por debajo de 0.1).

En la figura 2.13 se representan los resultados obtenidos para algunos valores de P_F . Como se ve, el error va creciendo al incrementarse el valor de P_F .

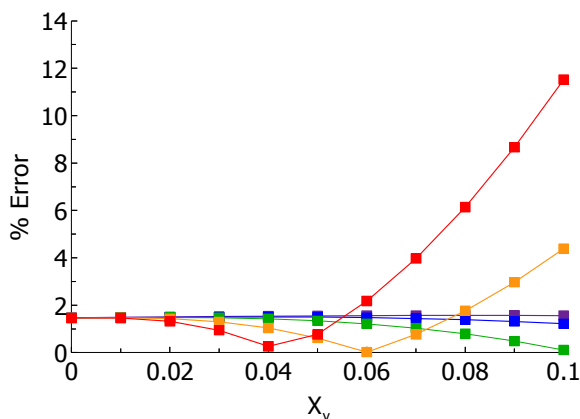


Figura 2.13.- Errores cometidos en la fluorescencia como consecuencia de la simplificación, para distintos valores de P_F : (■)=150, (■)=100, (■)=50, (■)=25 y (■)=10.

2.8.- CONCLUSIONES

1.- Se ha desarrollado un modelo matemático que permite predecir cómo cambia el rendimiento cuántico de un fluoróforo (y por tanto la intensidad de fluorescencia observada), en función de las características del disolvente en el que se encuentre, siempre y cuando sólo se produzcan interacciones de tipo no específico.

2.- El modelo está basado en tres pilares fundamentales:

a) Debido a la diferencia de polaridad de los estados excitados singlete y triplete, al cambiar la composición del medio que rodea al fluoróforo, cambia la diferencia de energía entre ambos estados, consecuentemente, la constante de desactivación no radiativa del fluoróforo, y por tanto su rendimiento cuántico de fluorescencia.

b) El índice de refracción del medio actúa sobre el valor de las constantes de desactivación radiativa y no radiativa del fluoróforo, alterando también el rendimiento cuántico del fluoróforo.

c) El efecto global que el medio tendrá sobre el fluoróforo, también dependerá de las propiedades químicas características de dicho fluoróforo. Así, un mismo cambio en el entorno puede hacer aumentar, disminuir o no cambiar la intensidad de fluorescencia, en función de las propiedades que el fluoróforo tenga.

3.- El modelo se ha extendido al caso de una disolución compuesta por un soluto y un disolvente y permite relacionar el cambio de fluorescencia observado con el cambio de concentración del soluto.

4.- A partir de simulaciones matemáticas realizadas con la ecuación que describe el modelo se consiguen explicar de forma cualitativa las variaciones de fluorescencia, aparentemente arbitrarias, que se observan experimentalmente al cambiar la naturaleza del soluto o su concentración.

5.- Se ha elaborado una versión simplificada del modelo que permite establecer la existencia de un rango de respuesta lineal entre el cambio de intensidad de fluorescencia observado y la concentración del soluto. Esta ecuación simplificada tiene un gran interés analítico dado que el soluto se puede considerar como el analito presente en una disolución.

CAPÍTULO 3:
DISCUSIÓN DEL MODELO PROPUESTO

3.- DISCUSIÓN DEL MODELO PROPUESTO Y RESULTADOS EN MEDIO LÍQUIDO

El modelo presentado en el capítulo anterior se ha diseñado para explicar el efecto general que el entorno de un fluoróforo en disolución ejerce sobre su rendimiento cuántico y, por tanto, sobre su fluorescencia. En este capítulo se discute su aplicación analítica. Para ello es importante recordar que el modelo no predice cambios debidos a otros fenómenos específicos asociados a las características químicas concretas del fluoróforo, disolvente y el analito, que también pueden ocurrir en el medio. Así, en este apartado se muestran y discuten los resultados obtenidos según el comportamiento general pero también otros en los que hay efectos específicos que deben ser tenidos en cuenta.

3.1.- EXPERIMENTAL

3.1.1.- Fluoróforos

En este trabajo se ha realizado un estudio de los fluoróforos berberina y coralina, dos cationes aromáticos de la familia de las protoberberinas, solubles en disolventes de distintas polaridades, en los que presentan características espectroquímicas adecuadas. Se ha usado cloruro de coralina de Acros Organics, hemisulfato de berberina de Sigma-Aldrich y cloruro de berberina de Sigma. En determinadas pruebas se ha usado el *zwitterion* squarylium III de Sigma-Aldrich, un fluoróforo que, a diferencia de los anteriores, no tiene carga neta. (Figura 3.1).

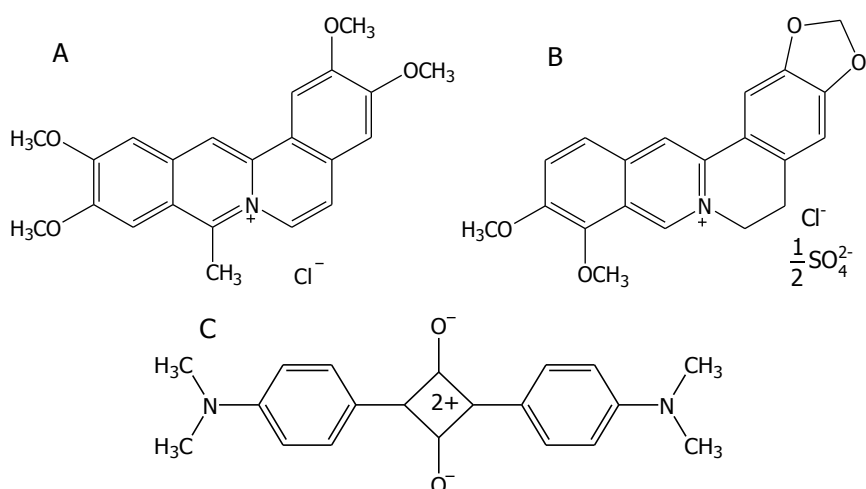


Figura 3.1.- Estructuras de los fluoróforos: (A) coralina, (B) berberina y (C) squarylium III.

Como patrón de referencia de fluorescencia se han usado disoluciones de sulfato de quinina dihidratado de Scharlau en agua (con una concentración de H_2SO_4 de 0.1M).

Estas medidas se han llevado a cabo en disolventes de calidad espectroscópica, para evitar que las posibles impurezas también puedan provocar cambios en la fluorescencia de los fluoróforos. Se han usado metanol (Uvasol[®], $\geq 99.9\%$), diclorometano (Uvasol[®], $\geq 99.9\%$) y acetonitrilo (99.9%) de Merck.

Además de los productos anteriores, en determinados experimentos se han utilizado otros fluoróforos como: azul de tetrazolio, betaína de Reichardt, *indocyanine green*, *stains all*, naranja de tiazol, rojo de nilo y auramina 0 (ver anexo A.6.1). Otros disolventes utilizados también en pruebas concretas han sido: cloroformo, ácido acético, dimetilformamida, de calidad espectroscópica, y agua bidestilada.

3.1.2.- Analitos

A la hora de elegir las moléculas para este estudio se ha tenido en cuenta su miscibilidad o solubilidad en los distintos disolventes así como sus propiedades espectroscópicas. En principio, se han buscado moléculas que no tengan grupos cromóforos o que no absorban en el intervalo habitual de trabajo analítico, siendo, por tanto, moléculas que no se detectan fácilmente. Por otro lado, dado que el fenómeno estudiado se refiere a interacciones electrostáticas débiles, igualmente interesa que estas moléculas no provoquen, en la medida de lo posible, interacciones específicas como puentes de hidrógeno o similares.

Los compuestos que mejor cumplen estos requisitos son los alcanos. Se han usado n-pentano de Scharlau, n-decano, n-dodecano, n-hexadecano de Fluka. También se han incluido en el estudio los alcoholes 1-hexanol y 1-decanol de Fluka y 1-butanol y 2-dodecanol de Aldrich. Estos compuestos pueden provocar interacciones específicas por puentes de hidrógeno, pero poseen una cadena hidrocarbonada de cierta longitud.

Así mismo, se han usado también dos fosfolinas: dodecilosfosfolina (12-fosfolina) y hexadecilosfosfolina (16-fosfolina) de Avanti Polar Lipids, en medio metanol y dodecilsulfato de sodio (SDS) de Sigma-Aldrich en medio acuoso (ver estructuras en figura 3.13), y se ha estudiado el efecto de la concentración de analito.

3.1.3.- Instrumentación y condiciones de medida

Las medidas espectroscópicas se han llevado a cabo con un espectrofluorímetro FluoroMax-P de Yobin Ivon (Horiba) completamente controlado por el software para espectroscopía DataMax. El equipo trabaja con una lámpara de arco de Xe cuyas fluctuaciones de intensidad temporales o de

perfil son corregidas por un detector de referencia del propio equipo. Antes de empezar cada medida se comprueba que los monocromadores están calibrados tomando como referencia el pico Raman del agua.



Figura 3.2.- Espectrofluorímetro FluoroMax-P de Yobin Ibon (Horiba).

En todas las medidas de espectroscopía se han usado cubetas de cuarzo Suprasil de 3500 μL de volumen total, con cierre hermético, y 1 cm de paso óptico (111-QS) de Hellma. Para las medidas, las cubetas están limpias y completamente secas. Las cubetas se guardan en una disolución de HNO_3 de concentración 1.5 M.

Para determinar el índice de refracción de los distintos disolventes y disoluciones se ha usado un refractómetro ABBE tipo 3_T de Atago. Sólo se utilizan 3 cifras decimales debido a la volatilidad de los disolventes que dificulta la determinación del cuarto decimal.

Las medidas se han realizado a temperatura ambiente siendo la temperatura de los líquidos de 24°C tomada con un termopar de marca Thermocoax TKI 05/25/DIN de tipo K.

Para ayudar a la disolución de los fluoróforos se ha usado un baño de ultrasonidos MEDI-II de Selecta.

Las condiciones instrumentales para obtener los espectros de emisión de fluorescencia dependen del fluoróforo y del medio en el que está disuelto. Todas las medidas de fluorescencia se han hecho con las condiciones expuestas en la tabla 3.1. El tiempo de integración en todos los casos ha sido de 0.1 s y se han tomado datos cada 1 nm.

FLUORÓFORO	DISOLVENTE	λ_{EX} (nm)	RENDIJAS (nm)
Cloruro de berberina	Diclorometano	360	2-2
	Metanol	351	5-5
	Acetonitrilo	351	5-5
	Agua	360	2-2
Cloruro de coralina	Diclorometano	410	1-1
	Metanol	410-426	2-2
	Acetonitrilo	410-426	2-2
	Cloroformo	410	1-1
	Ácido acético	410	1-1
	Dimetilformamida	410	1-1
	Agua	410	2-2
Sulfato de berberina	Diclorometano	365	2-2
	Metanol	351	5-5
	Acetonitrilo	351	5-5
Squarylium III	Diclorometano	618	2-2
Indocyanine green	Metanol	786	1-1
Rojo de Nilo	Metanol	546	1-1
Stains All	Metanol	585	2-2
Auramina 0	Metanol	420	3-3
Betaina de Reichardt	Metanol	427	3-3
Azul de tetrazolio	Metanol	425	3-3
Naranja de tiazol	Metanol	426	3-3
Quinina	Agua/H ₂ SO ₄ 0.1M	350	2-2

Tabla 3.1.- Condiciones instrumentales usadas para cada fluoróforo en las medidas de fluorescencia con el espectrofluorímetro.

Sólo se han modificado estas condiciones de operación en el experimento cuyo objetivo era la comparación de la fluorescencia nativa del cloruro de berberina en los tres disolventes: diclorometano, metanol y acetonitrilo (apartado 3.3.2), utilizando 360 nm como longitud de onda de excitación y rendijas de 2-2 nm en todos los casos. En el experimento en el que se comparó la fluorescencia nativa del cloruro de coralina en los tres disolventes, se ha usado una longitud de onda de excitación de 410 nm y rendijas 2-2 nm.

3.1.4.- Preparación y experimentos realizados

Todas las disoluciones de fluoróforo necesarias se han preparado a partir de disoluciones más concentradas para minimizar el gasto de disolvente y los errores en el momento de pesar el producto. Las disoluciones originales se han introducido durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos para asegurar su completa disolución. En general, la concentración de trabajo de los fluoróforos ha sido de 1 mgL^{-1} salvo en el caso del squarylium III que ha sido 100 veces menor, para evitar la formación de agregados. En el caso del squarylium III, además se han utilizado ultrasonidos durante 60 minutos, realizando pausas para evitar el calentamiento de la muestra. Para las medidas realizadas en diclorometano, ya que se observó que los espectros de emisión de los fluoróforos evolucionan con el tiempo, por motivos que se comentarán más adelante, para asegurar la obtención de espectros estables, las disoluciones se han preparado 24 horas antes de ser utilizadas en las medidas, y en el caso del squarylium III, con 7 días de antelación^{61 62}. Se ha tenido un especial cuidado en evitar la evaporación del disolvente y todas las disoluciones se han guardado protegidas de la luz.

61 Nakazumi, H.; Colyer, C.L.; Kaihara, K.; Yagi, S.; Hyodo, Y.; "Red Luminescent Squarylium Dyes for Noncovalent HSA Labeling" *Chem. Lett.* **2003**, 32, 804-805.

62 Welder, F.; Paul, B.; Nakazumi, H.; Yagi, S.; Colyer, C.L.; "Symmetric and Asymmetric Squarylium Dyes as Noncovalent Protein Labels: a Study by Fluorimetry and Capillary Electrophoresis" *J. Chromatogr. B*, **2003**, 793, 93-105.

La metodología del trabajo en disolución ha consistido en realizar adiciones sucesivas de los analitos en la propia cubeta de medida de la siguiente forma: sobre un volumen de disolución de fluoróforo de una concentración determinada se van añadiendo alícuotas de la disolución de analito para posteriormente corregir matemáticamente su concentración y la intensidad inicial de cada adición con respecto a la dilución. Se ha elegido este método porque es más rápido, sencillo e igual de reproducible que la preparación de disoluciones individuales en distintos matraces.

Los experimentos se han realizado por duplicado o triplicado, con el fin de asegurar que los resultados eran repetibles.

a) Corrección de la dilución

Como se ha comentado en el párrafo anterior, es necesario recalcular tras cada adición la concentración de analito ($C_{i,A}$), así como la intensidad inicial ($F_{0,i}$), que dependerá solamente de la concentración de fluoróforo presente en ese momento ($C_{i,F}$), corrigiéndolas con respecto a la dilución. Se parte de un volumen V_0 de disolución de fluoróforo de concentración inicial $C_{0,F}$ y de intensidad F_0 al que se van añadiendo volúmenes V_i de disolución de analito de concentración $C_{0,A}$. El volumen final de cada adición será la suma de V_0 y de los V_i que se hayan añadido hasta el momento⁶³.

Por tanto la concentración de analito y la intensidad inicial en cada adición serán:

$$C_{i,A} = \frac{C_{0,A} \cdot V_i}{V_0 + V_i} \quad (3.1)$$

⁶³ Los volúmenes pueden considerarse aditivos ya que no hay mucha diferencia de densidades de los disolventes con respecto a las disoluciones de los analitos.

$$F_{0,i} = \frac{F_0 \cdot V_0}{V_0 + V_i} \quad (3.2)$$

Estas correcciones son posibles porque el analito y el fluoróforo están disueltos en el mismo disolvente y además el analito no tiene propiedades espectroscópicas que afecten a la fluorescencia que se está midiendo.

En el caso de los experimentos para la obtención de las gráficas de calibrado de los fluoróforos en los distintos disolventes, se parte de un volumen inicial (V_0) de disolvente al que se añaden volúmenes V_i de disolución de fluoróforo de concentración $C_{0,F}$. La concentración de fluoróforo C_F se calcula mediante la siguiente expresión:

$$C_{i,F} = \frac{C_{0,F} \cdot V_i}{V_0 + V_i} \quad (3.3)$$

Tal como indica la ecuación (3.3), para corregir el efecto de la dilución provocado tras cada adición de analito, se presupone una variación lineal de la señal y la concentración. El resultado de la calibración es muy importante ya que podría confundirse el efecto del analito con una falta de linealidad. En este caso, se ha trabajado siempre a concentraciones lo suficientemente bajas de fluoróforo como para asegurar el trabajo en la zona lineal de la curva de calibrado o con una variación de concentración lo suficientemente pequeña como para que la relación sea lineal. La figura 3.3 muestra los estudios de calibrado realizados con coralina y berberina (cloruro), así como con squarylium III.

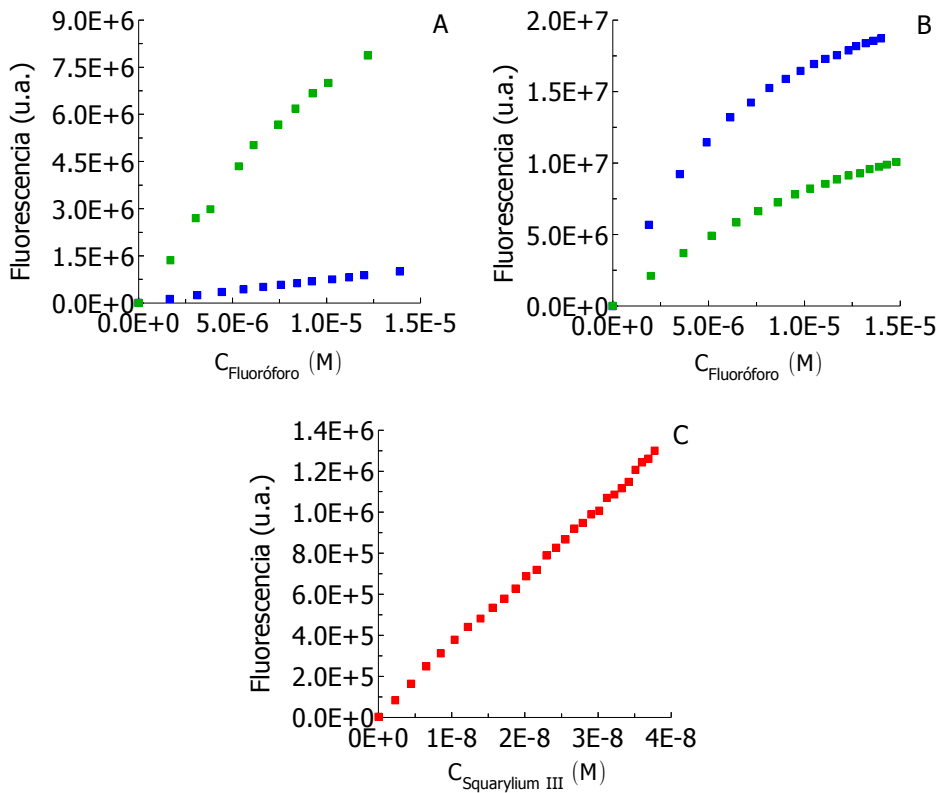


Figura 3.3.- Representación de las curvas de calibrado en diclorometano (A) y metanol (B) de cloruro de berberina (■) y cloruro de coralina (■) y de squarylium III (■) en diclorometano (C). En estas gráficas la concentración de los fluoróforos está expresada en molaridad, ya que es de esta forma como se aplica la ley de Beer-Lambert. La concentración de fluoróforo inicial elegida en los experimentos de adiciones ha sido de 1 mgL^{-1} , que corresponde a $2.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ en el caso de la coralina y $2.69 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ en el caso de la berberina. Para el squarylium III la concentración elegida ha sido de 0.01 mgL^{-1} que corresponde a $3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

b) Comparación del efecto de la adición de distintos analitos (a una determinada concentración)

Sobre 2 mL de disolución de fluoróforo (1 mgL^{-1}) se ha añadido directamente a la cubeta 1 mL de disolución de alcano o alcohol de forma que la concentración molar final de los analitos fuera la misma en todos los casos (1.115 M), para poder realizar así una comparación correcta de los cambios

provocados en la fluorescencia. Se ha comprobado que la altura de la cubeta era suficiente para que la radiación incidente atravesara la disolución antes y después de añadir el analito, y se han registrado los espectros de las disoluciones antes y después de añadir el analito, comprobando que eran estables con el tiempo. El valor de intensidad inicial (F_0 , antes de añadir el analito) se ha corregido como se han indicado anteriormente para obtener $F_{0,i}$ y poderlo comparar con el valor obtenido tras la adición de analito (F). Esta

comparación se lleva a cabo calculando el cociente $\Delta F = \frac{F - F_{0,i}}{F_{0,i}}$, que nos indica

si se ha producido un aumento (cuando el cociente es mayor que 0) o una disminución (si el cociente es menor que 0) de la fluorescencia nativa del fluoróforo en cada disolvente. Cuanto mayor es ΔF (su valor absoluto), mayor es el efecto del entorno en ese caso concreto.

c) Estudio del efecto de la concentración de analito

En los estudios de la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de analito se han adicionado alícuotas de 100 μL de la disolución de analito a una cubeta que contiene inicialmente 2 mL de disolución del fluoróforo 1 mgL^{-1} en el mismo disolvente que el analito, registrando los espectros tras cada adición. Una vez completado el volumen de la cubeta se corrigen las concentraciones y las intensidades con la dilución, como se ha especificado en el apartado 3.1.4.a.

3.2.- CASO GENERAL

3.2.1.- Efecto del disolvente

El modelo general descrito en la ecuación (2.33) se ha probado con disoluciones de coralina de 1 mgL^{-1} en distintos disolventes. La ecuación anterior

se ha reorganizado, ya que muchos de los parámetros no son conocidos, de forma que se obtiene:

$$\frac{f_{n,M}^4}{F} = \frac{n_M f_{n,M}^2}{K_F^{ins}} + \frac{Y_F}{K_F^{ins}} e^{P_F f_{\epsilon,M}} \quad (3.4)$$

o bien

$$K_F^{ins} \frac{f_{n,M}^4}{F} = n_M f_{n,M}^2 + Y_F e^{P_F f_{\epsilon,M}} \quad (3.5)$$

Es difícil comprobar el ajuste del modelo (3.5) a los valores experimentales dado que no es posible disponer de algunos de los parámetros indicados. Finalmente ha sido posible encontrar un conjunto de disolventes (agua, acetonitrilo, metanol, dimetilformamida, diclorometano, cloroformo, ácido acético glacial) de propiedades ácido-base diferentes, con valores de n y ϵ conocidos, y en los que la coralina es soluble. Se han seguido los siguientes pasos:

1.- Se han preparado disoluciones de estas sustancias de tres concentraciones diferentes y , manteniendo constantes las condiciones instrumentales, se han obtenido los valores de fluorescencia, y a partir de ellos

$$\frac{K_F^{ins}}{F} \cdot$$

2.- Se han obtenido los valores promedio para esas concentraciones obteniendo los siguientes resultados: 1.05 (agua), 2.10 (acetonitrilo), 0.775 (metanol), 0.35 (DMF, dimetilformamida), 2.3 (diclorometano), 1.85 (cloroformo) y 2.6 (ácido acético).

3.- A partir de los datos tabulados se han obtenido los valores de:

$$\left(K_F^{ins} \frac{f_{n,M}^4}{F} - n_M f_{n,M}^2 \right)$$

4.- Finalmente se ha obtenido el Ln de la expresión anterior y se ha representado frente a $f_{\epsilon,M}$, obteniéndose los resultados de la figura 3.4. Como puede verse, al aumentar el valor de $f_{\epsilon,M}$ el valor del Ln aumenta de forma proporcional, lo que estaría indicando un valor de P_F positivo para la coralina (como se verá más adelante). De todos modos se hace necesario realizar más ensayos, estos resultados parecen validar el modelo obtenido.

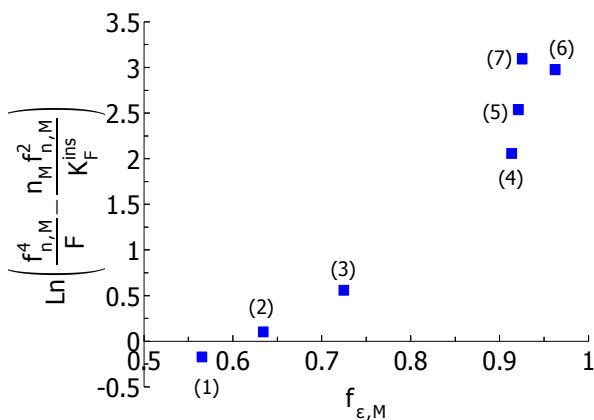


Figura 3.4.- Validación del modelo general usando coralina en distintos disolventes: (1) cloroformo, (2) ácido acético, (3) diclorometano, (4) metanol, (5) acetonitrilo, (6) agua y (7) dimetilformamida.

3.2.2.- Efecto del fluoróforo

Como se ha indicado en el modelo, en función del fluoróforo que se emplee cambiarán:

- Los valores de P_F , que dependen, al menos, de los momentos dipolares y las polarizabilidades del fluoróforo en ambos estados,
- La diferencia de energía entre el nivel excitado singlete y triplete,
- El valor de Y_F , que depende de las constantes de velocidad intrínsecas de los procesos radiativo y no radiativo, y
- La solvatación preferencial (para los diferentes tipos de interacciones no covalentes) que sufra el fluoróforo por parte del analito o del disolvente.

Cada fluoróforo tendrá valores concretos de esos parámetros y, por lo tanto, la respuesta a un determinado analito cambiará de uno a otro. La química computacional permite la estimación teórica de algunos de los parámetros de la molécula (relacionados con esas capacidades), pero no de todos ellos, por lo que resulta difícil establecer *a priori* cuál va a ser más sensible a un determinado analito. Se han realizado cálculos teóricos para algunos fluoróforos (tabla 3.2), pero los valores que se han obtenido no han permitido establecer de forma teórica cual es la respuesta esperable.

Fluoróforos	$\mu_F^{S(V)}$ (Debyes)	$\mu_F^{T(V)}$ (Debyes)	ΔE_F^{S-T} (Kcalmol ⁻¹)
Auramina 0	4.1	2.59	35.7
Berberina	1.9	2.9	21.4
Coralina	4.4	1.4	20.9
<i>Stains All</i>	1.3	1.8	22.6
Naranja de tiazol	3.3	1.7	24.2
Azul de tetrazolio	3.9	4.4	(*)
Betaína de Reichardt	12.1	0.0	15.4
<i>Indocyanine Green</i>	53.4	36.9	10.9
Rojo de Nilo	8.4	9.5	31.0

Tabla 3.2.- Valores de los momentos dipolares del fluoróforo y las diferencias de energía calculados usando el paquete de Gaussian03. Se ha usado el método DFT tipo B3LYP en combinación con el nivel 6-31G(d, p). Para las energías de excitación se ha empleado el funcional B3LYP (TD-B3LYP) usando geometrías optimizadas del estado fundamental B3LYP. $\mu_F^{S(V)}$ y $\mu_F^{T(V)}$ son los momentos dipolares del fluoróforo en el vacío en el estado singlete excitado y triplete excitado respectivamente y ΔE_F^{S-T} es la diferencia de energía de estos dos estados excitados. (*) Dato no computado.⁶⁴

No obstante, para mostrar experimentalmente un ejemplo de cómo los diferentes fluoróforos responderán de forma distinta al mismo analito en el mismo disolvente, la figura 3.5 muestra los resultados obtenidos usando 2-dodecanol como analito y metanol como disolvente. Se observa que en todos los casos existe un comportamiento lineal entre ΔF y la concentración de 2-dodecanol, que correspondería a la simplificación establecida en la ecuación (2.63) del modelo, que se pierde para concentraciones más altas de analito debido a que los términos del polinomio de orden superior empiezan a tener más peso.

⁶⁴ Gracias a Víctor Polo por su colaboración.

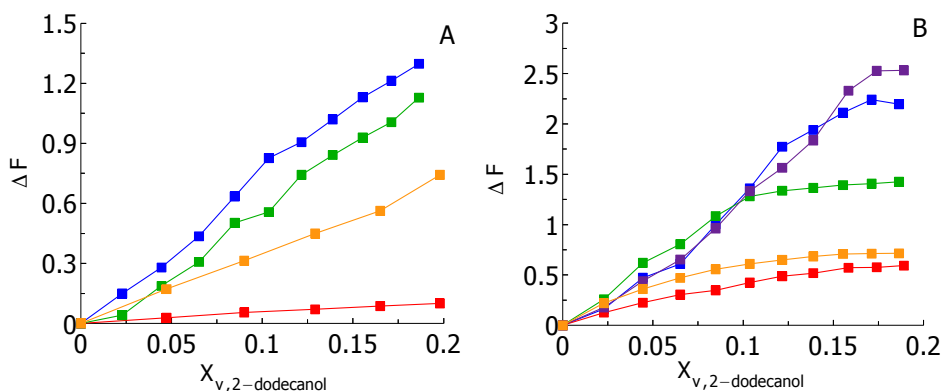


Figura 3.5.- Respuesta de las adiciones de 2-dodecanol en metanol a distintos fluoróforos. (A) lineal: coralina (■), berberina (▲), azul de tetrazolio (■) y betaína de Reichardt (■); (B) no lineal: *indocyanine green* (■), *auramina 0* (■), *stains all* (■), *naranja de tiazol* (■) y *rojo de nilo* (■).

3.2.3.- Efecto del analito. Cinética y sensibilidad

a) Cinética del proceso

Una cuestión práctica importante relacionada con el efecto que produce la adición de un analito a la disolución de un fluoróforo es la cinética del proceso. Este factor puede esconder efectos como la formación de agregados, pares iónicos, micelas, ... y es relevante tenerlo en cuenta en este caso, que se realizan adiciones consecutivas en la cubeta. Para poder trabajar en condiciones estables antes de cada adición, que conduzcan a resultados reproducibles, es necesario comprobar cuánto tiempo tarda en estabilizarse la señal de los fluoróforos en los distintos disolventes.

En primer lugar, se ha hecho un estudio cinético en disolventes polares, metanol y acetonitrilo. Así, en metanol, se han añadido varios alcoholes de cadena larga (1-hexanol, 1-decanol y 2-dodecanol) y un alcano (n-pentano, alcanos más largos ya no son solubles a la concentración de trabajo) a disoluciones de coralina y berberina (cloruro) de 1 mgL^{-1} . El procedimiento se

explica en el apartado 3.1.4. Se han tomado medidas durante varios minutos antes y después de la adición del analito, para ver la evolución temporal de la señal. En la figura 3.6 puede verse el resultado con 2-dodecanol.

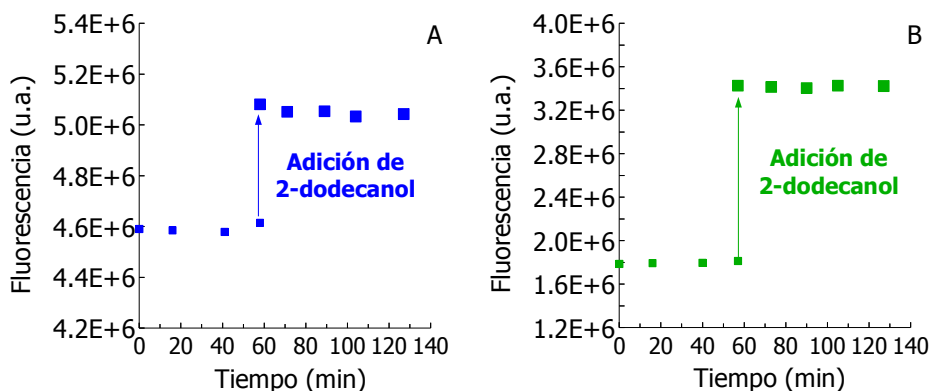


Figura 3.6.- Evolución temporal del valor de intensidad a la longitud de onda del máximo de disoluciones de coralina (A) y berberina (B) en metanol antes (■) y después (■) de la adición de 2-dodecanol. Los puntos correspondientes a los fluoróforos antes de añadir el analito están corregidos con la dilución.

En ambos casos se obtiene una respuesta estable inmediatamente después de la adición, por lo que se deduce que la cinética del proceso es muy rápida.

Se ha repetido el estudio usando 1-butanol adicionado sobre disoluciones de los mismos fluoróforos a las mismas concentraciones en acetonitrilo (figura 3.7) obteniéndose un resultado similar.

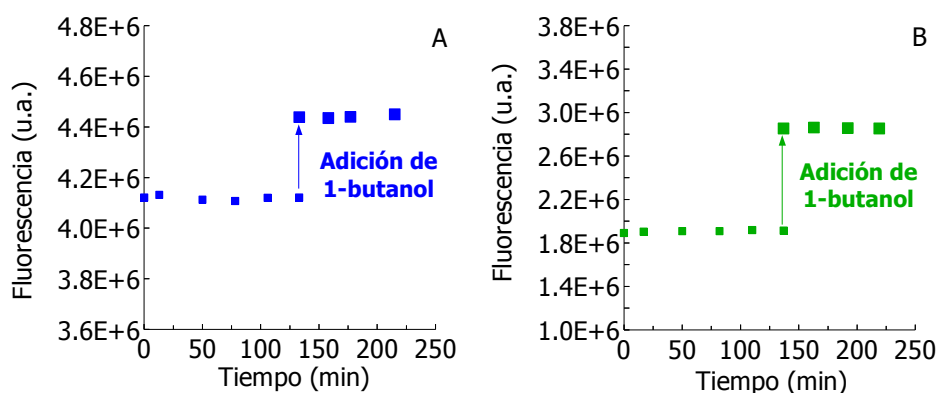


Figura 3.7.- Evolución temporal del valor de intensidad a la longitud de onda del máximo de disoluciones de coralina (A) y berberina (B) en acetonitrilo antes (■) y después (■) de la adición de 1-butanol. Los puntos correspondientes a los fluoróforos antes de añadir el analito están corregidos con la dilución.

Sin embargo, en el caso del disolvente de baja polaridad, diclorometano, los espectros correspondientes a las disoluciones de fluoróforos tardan varias horas en estabilizarse tras su preparación (figura 3.8).

En diclorometano, también se ha estudiado la evolución temporal tras hacer una adición de analito a disoluciones de fluoróforos, preparadas con 24 horas de antelación, para asegurar que estaban inicialmente estables. A diferencia de lo que ocurría en los disolventes polares, los espectros no se estabilizan inmediatamente tras la adición de los analitos, a la concentración habitual de trabajo: en el caso de los n-alcanos, son necesarias ~ 3 horas, y en el caso de los alcoholes, se requieren tiempos más largos, ~ 70 horas ó 40 horas en el caso de disoluciones de berberina y coralina, respectivamente. Como ejemplo, en la figura 3.9 se presentan los resultados obtenidos para cloruro de coralina en diclorometano, antes y después de la adición de n-hexadecano, y también 2-dodecanol.

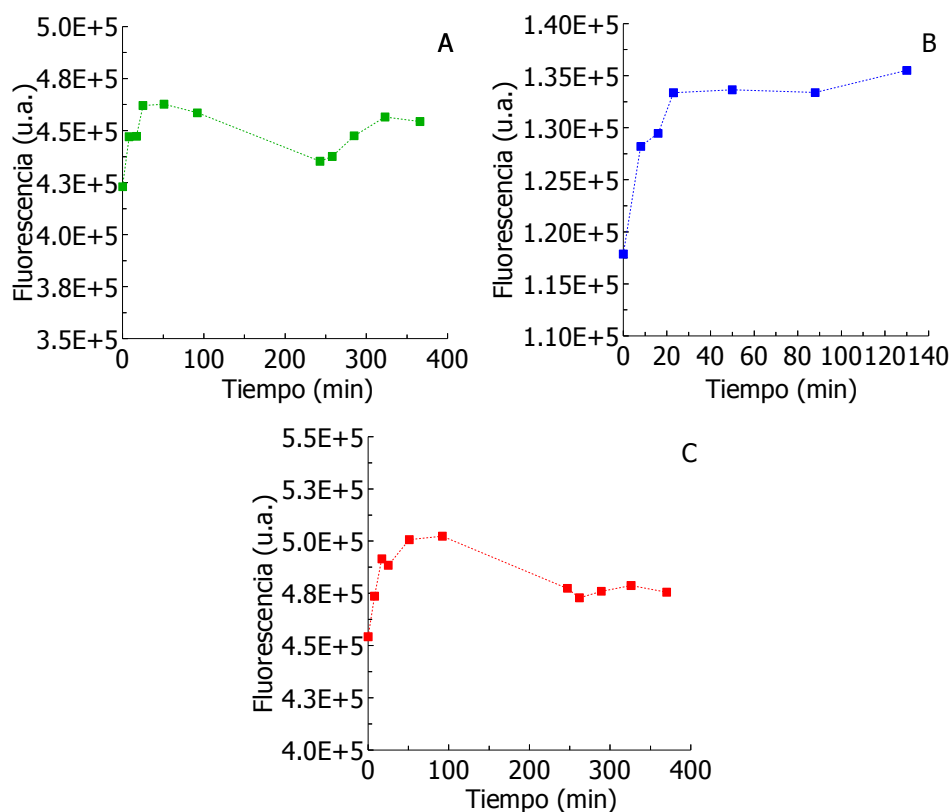


Figura 3.8.- Evolución temporal de la fluorescencia a la longitud de onda del máximo de disoluciones de 1 mgL⁻¹ de concentración de los distintos fluoróforos en diclorometano: cloruro de berberina (■), cloruro de coralina (■) y sulfato de berberina (■).

Como se indicará más adelante en los apartados 3.3.2 y 3.3.3, los resultados en diclorometano se interpretarán a la luz de la formación de pares iónicos entre los fluoróforos catiónicos berberina o coralina y los contraiones cloruro y sulfato.

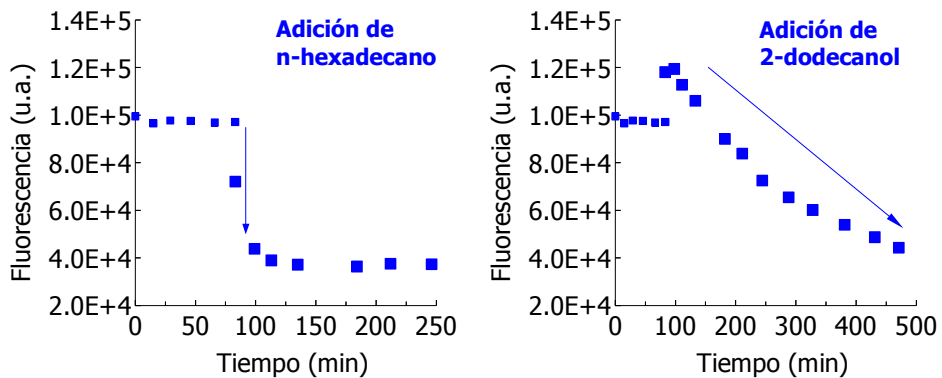


Figura 3.9.- Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda del máximo de disoluciones de 1 mgL⁻¹ de concentración de cloruro de coralina en diclorometano, antes (■) y después (■) de la adición de n-hexadecano y 2-dodecanol.

b) Naturaleza del analito I: longitud de la cadena. Validez del modelo

Según la ecuación (2.63) es posible hacer una predicción cualitativa de cómo las características del analito afectan a la señal de fluorescencia. Cuando un analito presenta un índice de refracción mayor que el del disolvente, el parámetro $N_{D,A}$, definido en la ecuación (2.51b), es positivo y su valor será tanto mayor cuanto mayor sea la diferencia. Así se observará un aumento de fluorescencia proporcional a la concentración del analito. Por otro lado, si el valor de P_F del fluoróforo es positivo, cuando la constante dieléctrica del analito es más baja que la del disolvente, el valor del parámetro $E_{D,A}$ (ver ecuación (2.59)) es negativo, tanto más cuanto mayor sea la diferencia. También así la fluorescencia aumentará proporcionalmente a la concentración del analito.

Sustancias que pertenecen a la misma serie homóloga, como los alcoholes lineales, se comportan de esa manera: al aumentar la longitud de la cadena aumenta el índice de refracción y disminuye la constante dieléctrica (ver tabla 3.3), por lo que es de esperar que, para los mismos valores de concentración (expresados como X_v), al aumentar la longitud de cadena del

alcohol aumentará la fluorescencia. Es en este tipo de compuestos en lo que se ha centrado este apartado, no sólo por su interés, sino porque muchos de los estudios previos del grupo tuvieron como objeto ensayar esta metodología sobre los alcoholes de diferente cadena.

Nº Carbonos	1	2	3	4	6	10	12
n	1.3388	1.3611	1.3850	1.3988	1.4178	1.4372	1.4400
ϵ	33	25.3	20.8	17.8	13.3	7.9	5.8

Tabla 3.3A.- Valores de los índices de refracción y las constantes dieléctricas⁶⁵ de la serie de los alcoholes.

Compuesto	n-pentano	n-decano	n-dodecano	n-hexadecano	Acetonitrilo	DCM
n	1.3388	1.3611	1.3850	1.3988	1.4178	1.4372
ϵ	33	25.3	20.8	17.8	13.3	7.9

Tabla 3.3B.- Valores de los índices de refracción y las constantes dieléctricas de otros compuestos usados en este capítulo.

Por ejemplo, en un estudio anterior⁶⁶ las señales obtenidas trabajando en un sistema en flujo continuo (tipo FIA) en el que sobre una disolución portadora conteniendo agua y berberina se inyectaron volúmenes iguales (20 mL) de alcoholes de diferente cadena, fueron como las indicadas en la figura 3.10. Estas señales ahora se pueden entender considerando las constantes dieléctricas y los índices de refracción de los diferentes alcoholes dados en la tabla 3.3. Usando otros portadores de constante dieléctrica más baja, el metanol produjo señales negativas mientras que los demás dieron señales positivas. Estas variaciones también se pueden explicar tomando como base el modelo propuesto.

65 Lide, D. R.; "CRC Handbook of Chemistry and Physics" 90ª Ed. CRC Press, **2009-2010**.

66 Gálvez, E. M.; "Nuevas sondas moleculares fluorescentes basadas en variaciones de la intensidad de emisión debidas a interacciones dipolares inducidas" Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, **2004**.

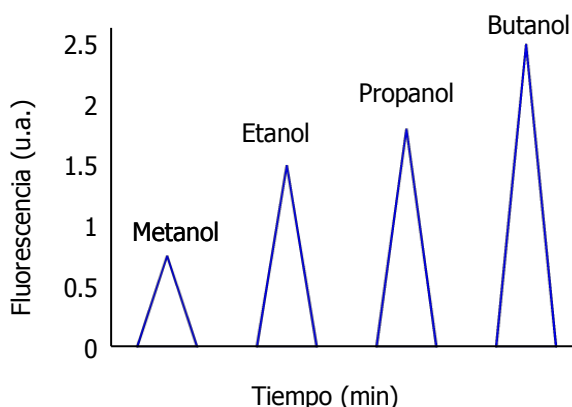


Figura 3.10.- Variación de la fluorescencia de la berberina en agua (metanol) en presencia de 20 mL de diferentes alcoholes. Medidas en flujo.

En este trabajo se han realizado ensayos utilizando disoluciones (de la misma molaridad) de alcoholes de cadena de longitud mayor que la indicada en la figura 3.10: 1-hexanol, 1-decanol y 1-dodecanol en metanol con coralina y berberina (cloruro y sulfato de 1 y 3 mgL^{-1}) como fluoróforos, medidos a las longitudes de onda de emisión del máximo. Es importante indicar que no se pudieron realizar ensayos utilizando 1-pentanol, por problemas de solubilidad del alcohol en este medio. No obstante, pareció interesante sustituirlo por n-pentano que, a pesar de pertenecer a una familia de compuestos diferente, permite, como luego se verá, validar los valores de P_F obtenidos. Los resultados aparecen en la tabla 3.4. En ella se indican:

- Los valores de $N_{D,A}$ y $E_{D,A}$ calculados a partir de los datos de la tabla 3.3 y las ecuaciones (2.51b) y (2.59). Se ha considerado que no hay solvatación preferencial por parte del analito (respecto del medio) sobre el fluoróforo ($K^{PS}=1$).

- Los valores de X_v calculados ($C_A=1.10$ M en todos los casos).

- Los valores de ΔF obtenidos experimentalmente (media de tres réplicas).

- El valor de P_F calculado a partir de la aplicación de la ecuación (2.67). Este cálculo permitirá elucidar la coherencia y cumplimiento del modelo propuesto.

Cloruro de Berberina (0.67 mgL⁻¹)						
Disolvente	Analito	X_v	N_{D,A}	E_{D,A}	Δ F	P_F
Metanol	n-pentano	0.128	0.0422	-0.0254	0.357	28.6
Metanol	1-hexanol	0.140	0.1283	-0.0163	0.402	44.7
Metanol	1-decanol	0.218	0.1552	-0.0205	0.769	38.0
Metanol	2-dodecanol	0.250	0.1591	-0.0222	0.889	33.7
Sulfato de Berberina (0.67 mgL⁻¹)						
Disolvente	Analito	X_v	N_{D,A}	E_{D,A}	Δ F	P_F
Metanol	n-pentano	0.128	0.0422	-0.0254	0.339	27.2
Metanol	1-hexanol	0.140	0.1283	-0.0163	0.399	44.4
Metanol	1-decanol	0.218	0.1552	-0.0205	0.769	38.0
Metanol	2-dodecanol	0.250	0.1591	-0.0222	0.889	33.7
Cloruro de Coralina (0.67 mgL⁻¹)						
Disolvente	Analito	X_v	N_{D,A}	E_{D,A}	Δ F	P_F
Metanol	n-pentano	0.128	0.0422	-0.0254	0.130	10.9
Metanol	1-hexanol	0.140	0.1283	-0.0163	0.097	10.3
Metanol	1-decanol	0.218	0.1552	-0.0205	0.102	4.2
Metanol	2-dodecanol	0.250	0.1591	-0.0222	0.093	2.5

Tabla 3.4.- Valores de ΔF de las disoluciones en metanol de los analitos mencionados en el texto usando los fluoróforos que se indican. (Trabajo a temperatura ambiente, en torno a 24° C).

Como puede verse, la intensidad de fluorescencia aumenta en todos los casos después de la adición ($\Delta F > 0$). Además se ha comprobado que los valores de ΔF no cambian con la concentración de fluoróforo (1 ó 3 mgL⁻¹) y tampoco se han observado cambios significativos en las longitudes de onda de emisión. En la figura 3.11 se muestran los espectros de las adiciones de 2-dodecanol, aunque se obtiene un comportamiento similar con los otros analitos.

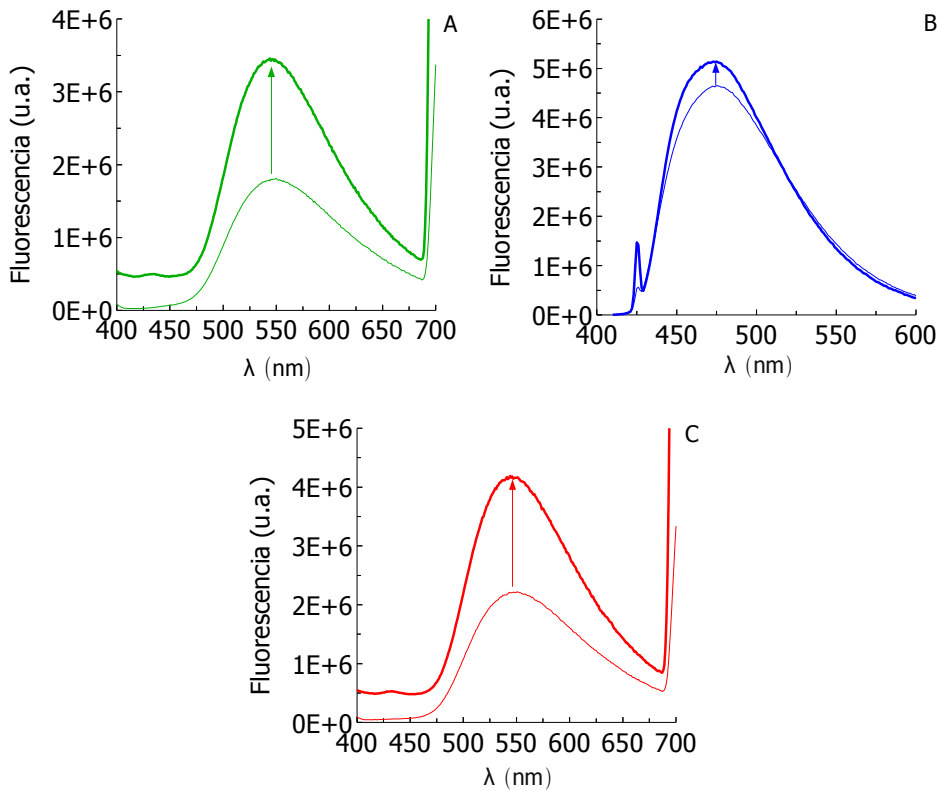


Figura 3.11.- Emisión de fluorescencia de cloruro de berberina (A), cloruro de coralina (B) y sulfato de berberina (C) en metanol antes (-) y después (=) de la adición de 2-dodecanol. Los espectros antes de añadir el analito están corregidos con la dilución.

Los valores de P_F obtenidos para la berberina son bastante similares, independientemente de si se obtiene de sulfato o de cloruro. No se observan resultados rechazables y el valor medio resultante es 36.0 con una DER=18%.

En cuanto al de la coralina, se obtienen dos parejas de valores distintos, sin embargo la aplicación del test Q de Dixon para el dato de 4.2 da un valor de Q_{EXP} de 0.726 que es menor que los valores de $Q_{TABULADOS}$ (0.765, 0.829 y 0.926 para el 90%, 95% y 99% de confianza respectivamente). El valor medio de P_F es 7.0 con una DER en torno al 60%, lo cual da una idea de la poca fiabilidad del

resultado. Es importante indicar que estos valores se han obtenido a partir de una única concentración de cada analito, por lo que se trata de valores aproximados. No obstante, la similitud observada entre estos valores de P_{F_r} valida de alguna manera el modelo y permite su uso para predecir la sensibilidad con la que se puede determinar un analito o una sustancia concreta.

c) Naturaleza del analito II: grupo funcional. Linealidad

El modelo simplificado predice un comportamiento lineal de la variación de fluorescencia con respecto a la fracción en volumen del analito para concentraciones bajas de analito. En este apartado se muestran algunos resultados obtenidos. Para ello, se han hecho adiciones sucesivas de varios analitos a disoluciones de coralina y berberina (en medio polar: metanol y agua), para ver cómo responden analitos de distinta naturaleza pero con algo en común: una cadena hidrocarbonada larga. Se ha usado 2-dodecanol, disoluciones de 12 y 16-fosfocolina en metanol y dodecilsulfato de sodio (SDS) en agua (figura 3.12). De estos compuestos, el 2-dodecanol, la 12-fosfocolina y el dodecilsulfato de sodio presentan la misma longitud de cadena y diferente grupo funcional. Esto permite completar el estudio iniciado en el apartado anterior.

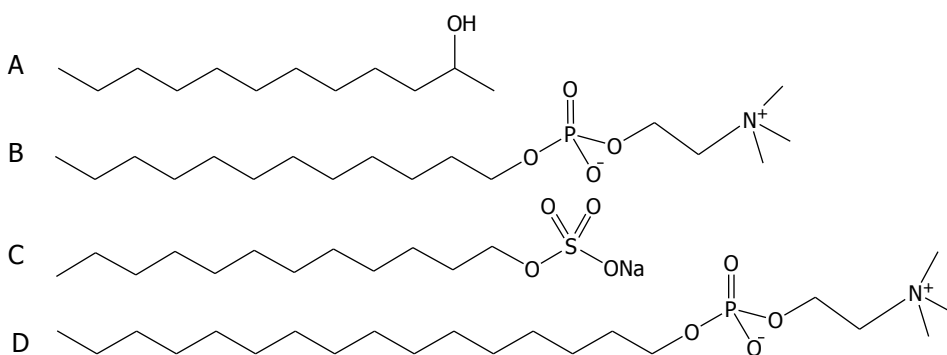


Figura 3.12.- Estructuras de los analitos: (A) 2-dodecanol, (B) 12-fosfocolina, (C) dodecilsulfato de sodio. y (D) 16-fosfocolina dodecil sulfato de sodio.

Un primer ejemplo corresponde al sistema 2-dodecanol en metanol. En la figura 3.13 aparece la respuesta de este alcohol a disoluciones de coralina y berberina.

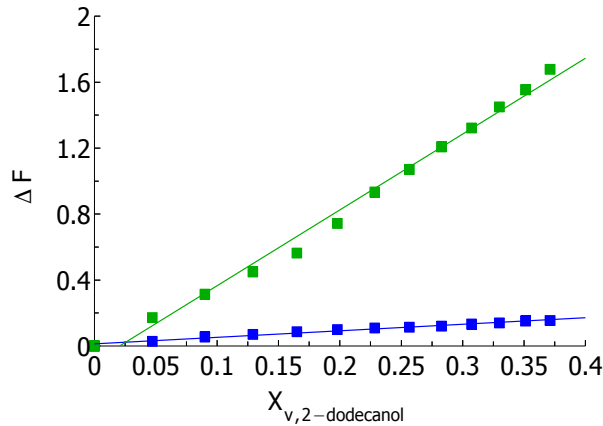


Figura 3.13.- Adiciones de 2-dodecanol a disoluciones de berberina (■) y coralina (■) en metanol.

Como puede verse, los resultados se ajustan a una respuesta lineal. Las rectas de regresión son:

$$\Delta F_{Berberina} = 4.599 X_{V,2-dodecanol} - 0.094 \quad (R^2=0.99)$$

$$\Delta F_{Coralina} = 0.395 X_{V,2-dodecanol} + 0.013 \quad (R^2=0.98)$$

A partir de los datos de la figura 3.14 es posible calcular con mayor precisión y exactitud el valor de P_F para los fluoróforos. Para ello es más conveniente usar el modelo basado en un polinomio de segundo grado (ecuación (2.67)). En la tabla 3.5 se indican los nuevos valores de $N_{D,A}$ y $E_{D,A}$ (calculados a partir de los datos de la tabla 3.3) y los valores de P_F estimados para cada caso. Estos valores están de acuerdo con los dados en la tabla 3.4.

$E_{D,A}$	-0.0224		P_F
$N_{D,A}$	0.1591	Berberina	36.0
K^{PS}	1	Coralina	3.2

Tabla 3.5.- Valores de los parámetros del modelo simplificado. $N_{D,A}$ y $E_{D,A}$ y se han calculado a partir de los datos que aparecen en las tablas 3.3 y 3.4.

Un segundo ejemplo también en metanol, es la adición de 2 fosfocolinas de distinta longitud de cadena: 12-fosfocolina y 16-fosfocolina. En la figura 3.14 aparecen los resultados obtenidos con berberina y coralina.

El trabajo con estos analitos, que son sólidos a la temperatura de trabajo, es algo más complicado que con 2-dodecanol (líquido a temperatura ambiente) puesto que es necesario preparar disoluciones que nunca pueden alcanzar las concentraciones de un analito líquido. Al comparar la pendiente de la recta de calibrado de la 12-fosfocolina con la del 2-dodecanol se observa el gran efecto del grupo funcional sobre la sensibilidad. No se han podido encontrar para este analito (ni para su homólogo 16-fosfocolina) valores de índice de refracción y/o constante dieléctrica que permitan validar cuantitativamente el modelo.

Con 16-fosfocolina se ha trabajado a concentraciones aún menores que con 12-fosfocolina. Puede observarse aquí, de nuevo, el efecto de la longitud de la cadena ya que las pendientes de las líneas de regresión son mayores para las adiciones de 16-fosfocolina que para las de 12-fosfocolina, demostrando que para una misma concentración de analito habrá mayor variación de la intensidad de fluorescencia cuanto mayor sea la cadena alifática.

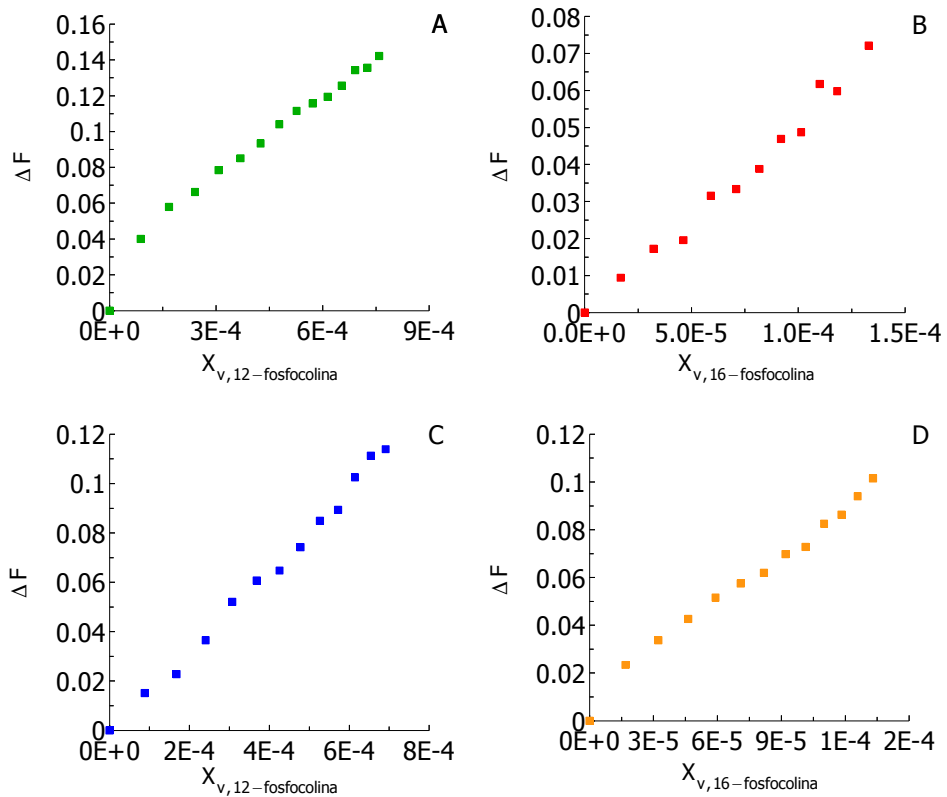


Figura 3.14.- Adiciones de 12-fosfocolina y 16-fosfocolina a disoluciones de 1 mgL^{-1} de berberina (A y B) y coralina (C y D) en metanol. Las regresiones son respectivamente:

A) $\Delta F = 160.85X_{v,12\text{-fosfocolina}} + 0.024$ ($R^2=0.96$) ;

B) $\Delta F = 528.28X_{v,16\text{-fosfocolina}} + 0.001$ ($R^2=0.98$) ;

C) $\Delta F = 166.13X_{v,12\text{-fosfocolina}} + 0.002$ ($R^2=0.994$) y

D) $\Delta F = 681.42X_{v,16\text{-fosfocolina}} + 0.008$ ($R^2=0.990$) .

Un último ejemplo son las adiciones de SDS sobre una disolución de berberina en medio acuoso. La berberina presenta una fluorescencia muy baja en este medio por lo que pueden observarse mucho mejor los aumentos de fluorescencia (figura 3.15), pero desde el punto de vista del cumplimiento del modelo es más complejo dado que el valor de F_D se estima con mucha más imprecisión.

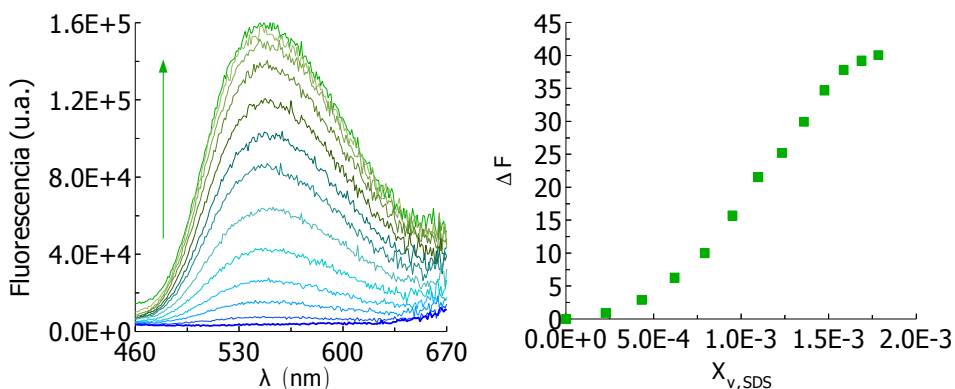


Figura 3.15.- Espectro y cálculos de las adiciones de SDS a berberina de 1 mgL^{-1} en agua. Los espectros están corregidos con la dilución. El espectro de la berberina en agua, antes de las adiciones es (-).

En este caso no se obtiene una respuesta lineal. El resultado tampoco se ajusta al modelo de la ecuación (2.67). Sin embargo, cuando se estudia con más detalle la zona de concentraciones más bajas, sí se obtiene un buen ajuste de la ecuación (2.67) (figura 3.16).

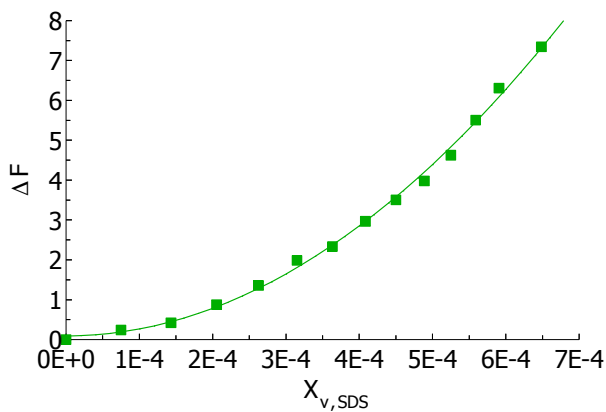


Figura 3.16.- Adiciones de SDS a berberina de 1 mgL^{-1} en agua. La regresión es:
 $\Delta F = 0.089 + 71.95 X_{v,SDS} + 1.71 \cdot 10^7 X_{v,SDS}^2$, $R^2 = 0.997$.

Como se sabe, el SDS forma micelas por encima de su concentración micelar crítica (CMC) y es bien conocido que la formación de micelas puede alterar la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos, aumentándola o disminuyéndola. Las concentraciones de SDS usadas en este trabajo están por debajo de la CMC (en torno a 8 mM⁶⁷, es decir, $X_v=0.002$). En general, el aumento se atribuye a un efecto de protección, según el cual la micela puede aumentar la rigidez estructural de la molécula minimizando el cruce intersistemas. Sin embargo, en la actualidad existen modelos que permiten describir el comportamiento dieléctrico de una micela y predecir cómo varía su constante dieléctrica e índice de refracción a partir de los correspondientes a las sustancias que las forman⁶⁸.

Es por ello que en próximos estudios se intentará extender el modelo propuesto para intentar explicar matemáticamente los cambios de intensidad de fluorescencia que se observan en estos medios organizados.

3.3.- RESULTADOS EN DICLOROMETANO

Como se ha indicado anteriormente, en este trabajo se intenta dar un modelo que explique las variaciones de la intensidad de fluorescencia de fluoróforos como consecuencia de interacciones no específicas (regidas, en última instancia, por la constante dieléctrica y el índice de refracción), del medio en el que se encuentran, y la utilización analítica de estos efectos. Sin embargo, en algunos sistemas concretos se producen interacciones específicas entre el fluoróforo y el analito o disolvente. Estas interacciones no pueden ser completamente interpretadas bajo un modelo general, pero su estudio resulta importante porque puede completar el catálogo de efectos que se producen y

67 Van Os, N. M.; Haak, J. R.; Rupert, L. A.; "Physicochemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants" Elsevier, New York, 1993.

68 Lamouche, G.; Lavallard, P.; Gascoi, T.; "Optical Properties of Dye Molecules as a Function of the Surrounding Dielectric Medium" *Phys. Rev. A*, **1999**, 59, 4668-4674.

usarlo posteriormente para explicar efectos anómalos en otros sistemas.

Los resultados que se han obtenido en diclorometano como disolvente suponen un ejemplo de comportamiento atípico, por lo que se ha hecho un estudio más detallado de coralina y berberina fundamentalmente en presencia de algunos analitos citados anteriormente, cuando se usa este disolvente. El diclorometano es además un disolvente muy importante en separaciones por cromatografía líquida de polímeros (objeto del siguiente capítulo), lo que justifica la especial relevancia tanto de los resultados aquí obtenidos como de su interpretación.

3.3.1.- Estabilidad de las disoluciones

Como se ha indicado en el apartado 3.2.3, se observó que en diclorometano los espectros de coralina y berberina (cloruro y sulfato) evolucionan con el tiempo, a diferencia de lo que sucede en disolventes polares como metanol o acetonitrilo.

Para poder trabajar en condiciones estables, que conduzcan a resultados reproducibles, en los siguientes ensayos llevados a cabo en este disolvente se han preparado las disoluciones con 24 horas de antelación, teniendo especial cuidado en evitar la evaporación del disolvente y protegiéndolas de la luz. Cuando se han hecho las adiciones a las disoluciones de fluoróforo en diclorometano, se han tomado varias medidas de cada adición a distintos tiempos y no se ha hecho una nueva adición hasta que el espectro de la anterior no se ha estabilizado.

3.3.2.- Mecanismo del cambio de fluorescencia: formación de pares iónicos

Se han preparado disoluciones de 1 mgL^{-1} de coralina y berberina (cloruro) en diclorometano, metanol y acetonitrilo y se han registrado los espectros de fluorescencia en las mismas condiciones instrumentales (figura 3.17).

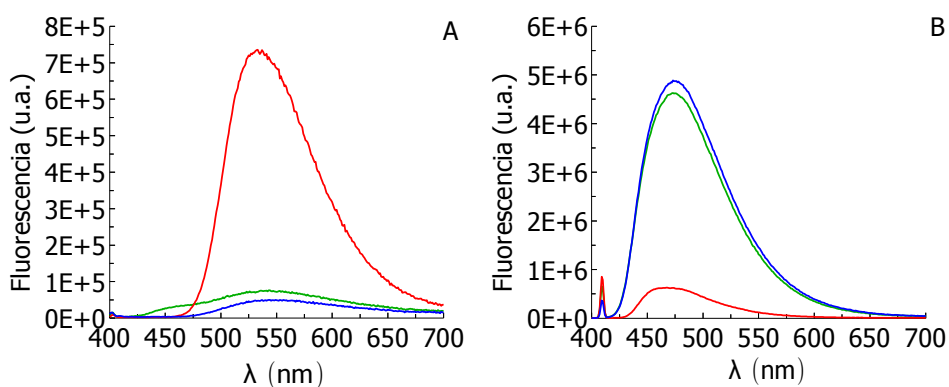


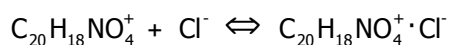
Figura 3.17.- Espectros de fluorescencia de cloruro de berberina (A) y cloruro de coralina (B) de 1 mgL^{-1} , usando rendijas de 2 nm, en metanol (-), diclorometano (-) y acetonitrilo (-). Utilizando sulfato de berberina, en lugar de cloruro, los espectros obtenidos fueron similares.

Como se ve en la figura, en diclorometano la berberina da mayor intensidad de fluorescencia que en metanol o acetonitrilo, pero por el contrario, la coralina es más fluorescente en los disolventes polares que en diclorometano. Los resultados en diclorometano muestran un comportamiento que no puede explicarse satisfactoriamente sólo a la luz del modelo general de fluorescencia. Los resultados en diclorometano, incluídas las adiciones de analito, pueden explicarse teniendo en cuenta que los fluoróforos berberina y coralina no están completamente dissociados en este disolvente, en sus iones libres. Las fuerzas electrostáticas entre iones juegan un papel importante en la asociación de iones en pares, en disolución, y son atenuadas por la permitividad del disolvente. La

formación de pares iónicos describe la asociación de iones con cargas opuestas en disolución, para formar especies químicas llamadas "pares iónicos". La formación de pares iónicos tiene lugar con frecuencia en disolventes no acuosos de constantes dieléctricas <30, incluso aunque los iones sean monovalentes o estén fuertemente solvatados⁶⁹. A permitividades moderadas o bajas las fuerzas electrostáticas entre iones cargados son lo suficientemente grandes como para crear pares iónicos sin necesidad de eliminar las moléculas del disolvente de las capas de solvatación.

Este hecho ya se observó en una Tesis Doctoral del grupo de investigación⁷⁰.

En el caso del cloruro de berberina en diclorometano ($\epsilon=9.08$), Megyesi y Biczók⁷¹ proponen la formación de pares iónicos:



Dicho cloruro fue aportado al medio como contraión del fluoróforo (cloruro de berberina) o bien añadido directamente como sal orgánica. Los autores obtienen una constante de equilibrio de $1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ para la interacción del catión berberina (B^+) con el ión cloruro (Cl^-), valor obtenido combinando medidas de fluorescencia estáticas y con resolución temporal. Estos autores también concluyen que el par iónico altera significativamente las propiedades fotofísicas de la berberina, siendo el par iónico (BCI) mucho menos fluorescente que el catión libre (B^+). Prueban que la constante de velocidad radiativa disminuye significativamente mientras que la desactivación no radiativa se

69 Marcus, Y.; Hefter, G.; "Ion Pairing" *Chem. Rev.* **2006**, 106, 4585-4621.

70 Mateos, E.; "Contribución de las interacciones no-específicas a los procesos fotofísicos intermoleculares. Aplicación analítica" Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, **2006**.

71 Megyesi, M.; Biczók, L.; "Effect of Ion Pairing on the Fluorescence of Berberine, a Natural Isoquinoline Alkaloid" *Chem. Phys. Lett.* **2007**, 447, 247-251.

acelera marcadamente por la formación de pares iónicos. La relación de los rendimientos cuánticos del par iónico cloruro de berberina-catión berberina

$\left(\frac{\Phi_{\text{BCl}}}{\Phi_{\text{B}^+}}\right)$ es 0.026, y la relación de constantes de fluorescencia $\left(\frac{k_{\text{BCl}}^r}{k_{\text{B}^+}^r}\right)$ es 0.37. Así,

la emisión del catión berberina libre disminuye debido al contraión Cl^- .

Para este tipo de fluoróforos se cree que el mecanismo predominante en el *quenching* de haluros es la transferencia de electrones del anión al fluoróforo, como sugiere Lakowicz⁷². Así, la sustitución del anillo quinolínicó aumenta la afinidad por los electrones y por ello, la eficiencia del *quenching*.

En la figura 3.17 se ve que la emisión del cloruro de coralina es mucho menor en diclorometano que en metanol o acetonitrilo. Puesto que en disolventes polares hay más interacciones con las moléculas del disolvente que provocan mecanismos de decaimiento no radiativo, lo que compite con la fluorescencia, este resultado sugiere que el *quenching* por par iónico en diclorometano es muy eficiente en el caso de la coralina y mayor que en el caso de la berberina.

Los espectros mostrados en esta figura (3.17) en parte corroboran esta hipótesis, pero en parte no. El principal punto de discrepancia viene de los resultados obtenidos con sulfato de berberina, ya que en ese caso no ha habido adición de cloruro en el medio y, sin embargo, el efecto de desactivación sigue existiendo. Se piensa que, en ambos casos, el cloruro responsable de la desactivación proviene del propio disolvente. Por un lado por la polaridad de la molécula de diclorometano, pero fundamentalmente por la presencia de Cl^- libre consecuencia del proceso de síntesis de la molécula, ya que el HCl es un

⁷² Lakowicz, J. R.; "Principles of Fluorescence Spectroscopy" 3rd. Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2006**, New York, p. 306.

subproducto de la síntesis de hidrocarburos ligeros clorados⁷³. Es por ello que dependiendo de la pureza del diclorometano habrá una mayor o menor concentración de Cl⁻ presente en el medio. No se ha hecho una determinación específica de la concentración de cloruro en el disolvente, pero sí se ha detectado una fuerte acidez en el preparado comercial, a pesar de utilizar un disolvente de alta calidad.

3.3.3.- Adiciones de analitos

Se han hecho adiciones de varios alcanos (n-decano, n-dodecano y n-hexadecano) y alcoholes (1-decanol y 2-dodecanol) a la concentración habitual de trabajo, a disoluciones de coralina y berberina (cloruro y sulfato) en diclorometano. Se han usado las dos berberinas para ver hasta qué punto afecta el contraión en este medio y se puede contrastar la hipótesis anteriormente indicada.

a) Adición de alcanos

Los espectros obtenidos antes y después de las adiciones de alcanos a coralina y berberina en diclorometano muestran dos diferencias principales con respecto a aquellos obtenidos en medio polar. Por un lado, los espectros en diclorometano no se estabilizan inmediatamente después de las adiciones. En el caso de los alcanos, los espectros se estabilizan tras ~3 horas. Por otro lado, la adición de alcanos induce disminuciones en lugar de aumentos de fluorescencia a las concentraciones de alcano estudiadas, a pesar de la concentración de fluoróforo de 1 ó 3 mgL⁻¹. La tabla 3.6 muestra los valores de ΔF para los alcanos estudiados ($\Delta F < 0$) y los índices de refracción de las disoluciones. Esto también puede observarse en la figura 3.18.

73 Rossberg, M.; "Chlorinated Hydrocarbons" Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, 2006.

Analito	X_v	ΔF		
		Cloruro de berberina	Cloruro de coralina	Sulfato de berberina
n-decano	0.218	-0.35	-0.43	-0.23
n-dodecano	0.223	-0.39	-0.44	-0.38
n-hexadecano	0.328	-0.63	-0.60	-0.53
1-decanol	0.218	0.14	0.49	0.08
2-dodecanol	0.250	-0.23	-0.89	-0.15

Tabla 3.6.- Valores de ΔF obtenidos para algunos analitos en diclorometano a temperatura ambiente (24° C). Las concentraciones de fluoróforo en todos los casos fueron de 0.667 mgL⁻¹.

De acuerdo con el modelo general (considerando sus valores de n y ϵ), los alcanos deberían producir un incremento en la fluorescencia de la berberina y la coralina. El descenso de fluorescencia provocado por los alcanos, que no tienen posibilidad de producir *quenching* estableciendo interacciones específicas con los fluoróforos, es un fenómeno inesperado e interesante de explicar. La disminución de emisión de los fluoróforos obtenida en diclorometano después de la adición de alcanos puede justificarse teniendo en cuenta el equilibrio de formación de pares iónicos en este disolvente. Los alcanos disminuyen considerablemente el valor de la constante dieléctrica del medio (tabla 3.3), haciendo el medio más apolar, y por ello, desplazando el equilibrio de formación de pares iónicos hacia una mayor concentración de pares iónicos. Como los pares contraión-fluoróforo son menos fluorescentes que los cationes libres, se obtiene una disminución de la emisión tras la adición de alcanos. El equilibrio de formación de pares iónicos puede justificar también el largo tiempo requerido para la estabilización de los espectros después de las adiciones en diclorometano.

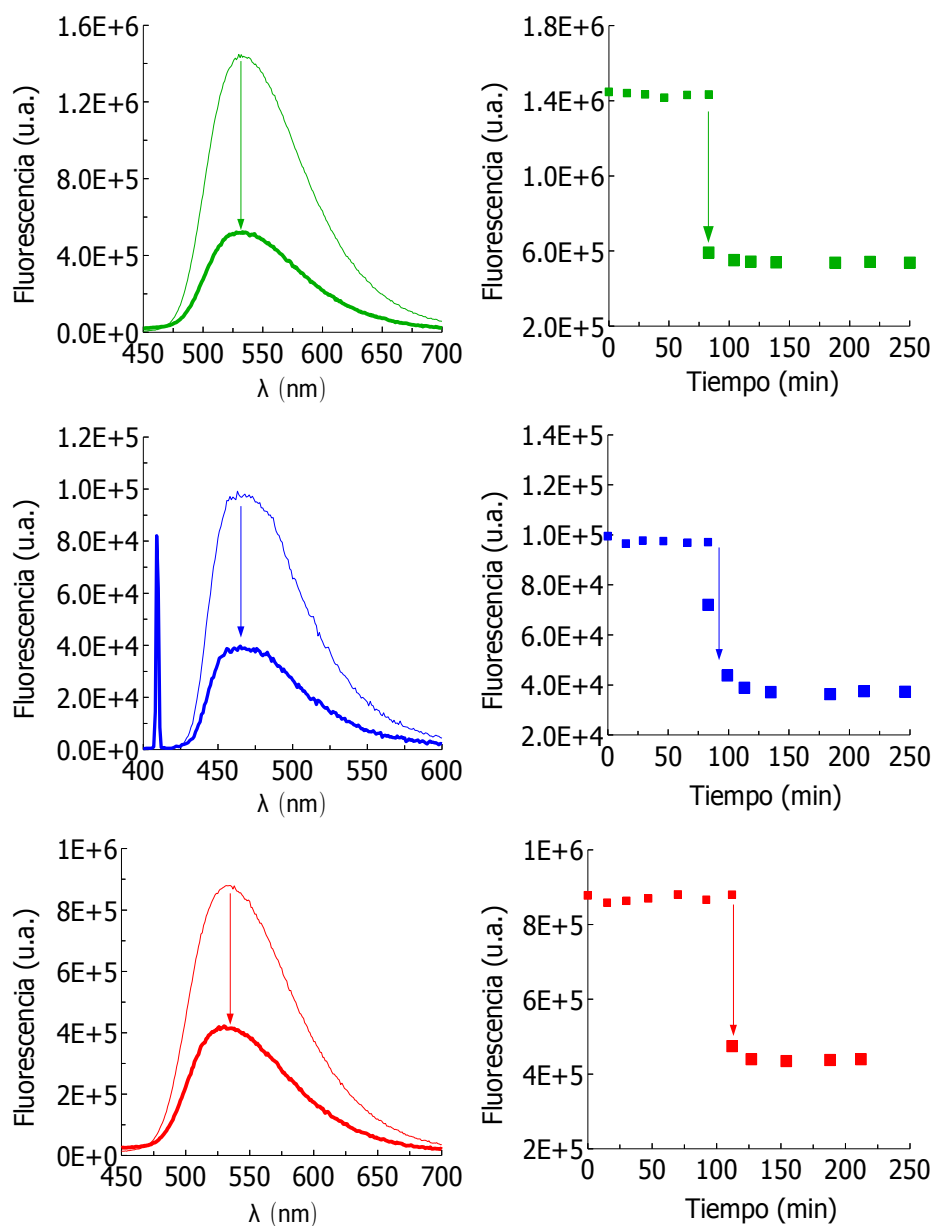


Figura 3.18.- Emisión de fluorescencia de cloruro de berberina (■), cloruro de coralina (■) y sulfato de berberina (■) en diclorometano antes (-) y después (-) de la adición de n-hexadecano. La columna de la derecha presenta la evolución temporal del valor de intensidad a la longitud de onda del máximo. Los espectros y puntos correspondientes a los fluoróforos antes de añadir el analito están corregidos con la dilución.

Para confirmar que el *quenching* producido por la adición de alcanos en diclorometano se debe al desplazamiento del equilibrio de formación de pares iónicos, se ha estudiado la adición de varios alcanos (n-decano, n-dodecano y n-hexadecano) a un fluoróforo no iónico (squarylium III, ver figura 3.1), de forma que no puede existir equilibrio de formación de pares iónicos. Pues bien, después de la adición de alcanos a una disolución de este fluoróforo en diclorometano se obtiene un aumento de la intensidad (tabla 3.7), que puede ser explicado por el efecto de protección de la cadena apolar del hidrocarburo frente a otros procesos de desexcitación no radiativos. Cuanto mayor es la longitud de la cadena alifática, hay mayor aumento de la intensidad de emisión. Además, los espectros que corresponden a las adiciones de alcanos a las disoluciones de squarylium III no evolucionan con el tiempo, y son estables después de cada adición, como puede verse en la figura 3.19.

Analito	Índice de refracción (n) en disolución	ΔF
n-decano	1.416	0.33
n-dodecano	1.418	0.41
n-hexadecano	1.422	0.49

Tabla 3.7.- Valores de ΔF y del índice de refracción de las muestras del fluoróforo squarylium III en diclorometano, a temperatura ambiente (24°C). Las concentraciones de analito y fluoróforo, en todos los casos, después de la adición del analito, son de 1.115 M y 0.0067 mgL⁻¹ respectivamente.

Hay que recordar que, en disolventes polares, las adiciones tanto de los alcanos como de los alcoholes a disoluciones de coralina y berberina producen aumentos de fluorescencia (tabla 3.4). Es más, se puede observar que los valores de ΔF son bastante similares, por ejemplo en el caso de pentano y los alcoholes, a pesar de que la permitividad del pentano es mucho menor (tabla 3.7). Estos resultados implican que el equilibrio de formación de pares iónicos no debe considerarse en disolventes polares, en los que las fuerzas electrostáticas

entre los iones se atenúan por la alta permitividad del disolvente, y puede descartarse una formación importante de pares iónicos.

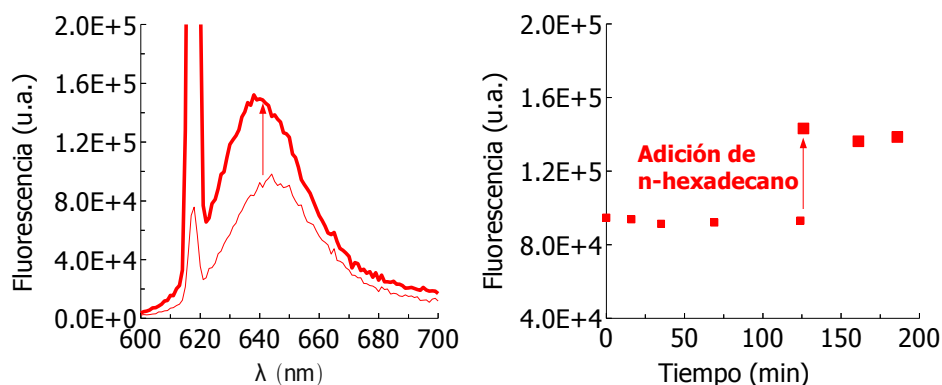


Figura 3.19.- Emisión de fluorescencia de squarylium III en diclorometano antes (-, ■) y después (-, ■) de la adición de n-hexadecano. La gráfica de la derecha presenta la evolución temporal del valor de intensidad a la longitud de onda del máximo. Los espectros y puntos correspondientes a los fluoróforos antes de añadir el analito están corregidos con la dilución.

b) Adición de alcoholes. Cinética del proceso

Finalmente, la adición de alcoholes en diclorometano produce aumentos o descensos de intensidad en las disoluciones de fluoróforo dependiendo de la concentración de alcohol y la longitud de la cadena. La estabilidad de los espectros con el tiempo también depende de estas variables. Así, cuando se adiciona 1-decanol 1.115 M se obtiene un ligero aumento de la emisión ($\Delta F > 0$) con los tres fluoróforos (ver tabla 3.6) y se puede considerar el espectro de emisión correspondiente como estable después de 3 horas. Sin embargo, a mayor concentración (1.693 M) se observa *quenching* con los tres fluoróforos (-0.23, -0.89 y -0.15 para cloruro de berberina, cloruro de coralina y sulfato de berberina respectivamente). En este caso, el espectro de fluorescencia no es estable 3 horas después de la adición y sigue disminuyendo incluso 24 horas después.

La adición de un alcano de mayor longitud, 2-dodecanol (1.115 M), produce *quenching* de fluorescencia y el espectro se estabiliza con el tiempo, después de ~ 40 horas en el caso de la coralina y de ~ 70 en el caso de las berberinas (figura 3.20).

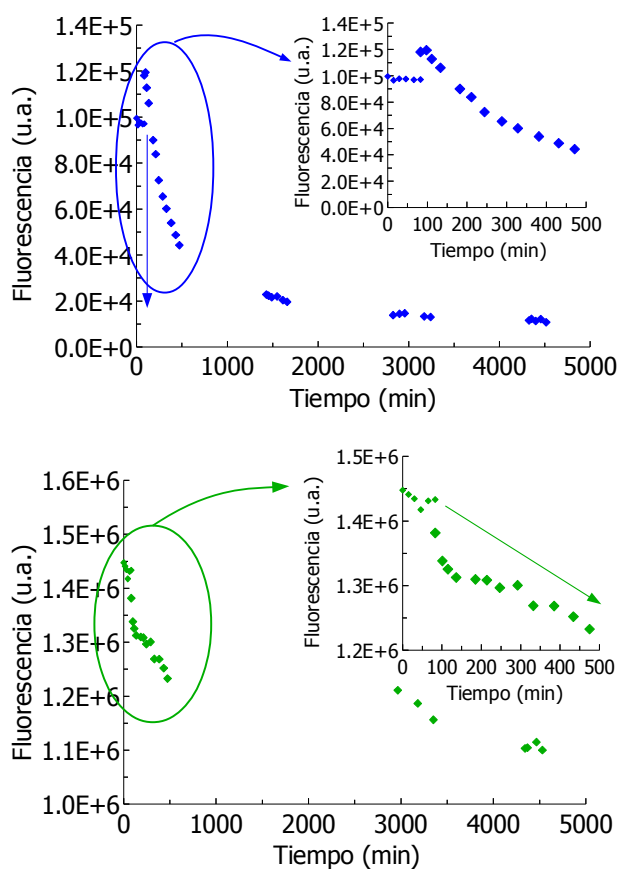


Figura 3.20.- Evolución del máximo de emisión de cloruro de coralina (◆) y cloruro de berberina (◆) en diclorometano antes (•) y después (◆) de la adición de 2-dodecanol. La intensidad inicial (antes de la adición) está corregida con la dilución. Cuando las medidas se han prolongado más de una jornada de trabajo, se ha medido una disolución estándar de quinina de 1 mgL^{-1} a la vez que las muestras, para corregir los cambios de intensidad debidos a la lámpara del espectrofluorímetro después de ser apagada y encendida.

En realidad el efecto de los alcoholes sigue el comportamiento observado con los alcanos:

a) El 2-dodecanol tiene una constante dieléctrica menor que el diclorometano, por lo tanto su presencia debería favorecer la formación de pares iónicos (al igual que los alcanos), y provocar un descenso de la fluorescencia. De los ensayos anteriores parece claro que la formación de pares iónicos no es un proceso instantáneo sino que viene regido por una cinética que, en primera instancia, dependerá de la constante dieléctrica total del medio: cuanto mayor es la constante dieléctrica del medio menor es la velocidad del proceso y, por tanto, más tiempo tarda la disolución en estabilizarse. Esta es la razón por la que en 2-dodecanol la señal tarda más en estabilizarse que en los alcanos.

b) El 1-decanol tiene una constante dieléctrica muy similar (aunque algo menor) que la del diclorometano. En concentraciones pequeñas de 1-decanol la constante dieléctrica del medio es prácticamente la misma que en diclorometano por lo que el equilibrio de formación de pares iónicos no se verá afectado. Al aumentar la concentración de 1-decanol, la constante dieléctrica del medio disminuirá y se incrementará la formación de pares iónicos, eso sí a una velocidad muy lenta.

Se ha considerado interesante estudiar con más detalle el efecto de la concentración del alcohol en la estabilidad del espectro de emisión. Se han adicionado distintas concentraciones de 2-dodecanol (6 disoluciones de 0.199 M a 1.468 M) a 6 cubetas con la misma disolución de coralina de 1 mgL^{-1} . La figura

3.22 muestra la representación de los valores de $\frac{F_{0,i}}{F}$ frente a la concentración de 2-dodecanol.

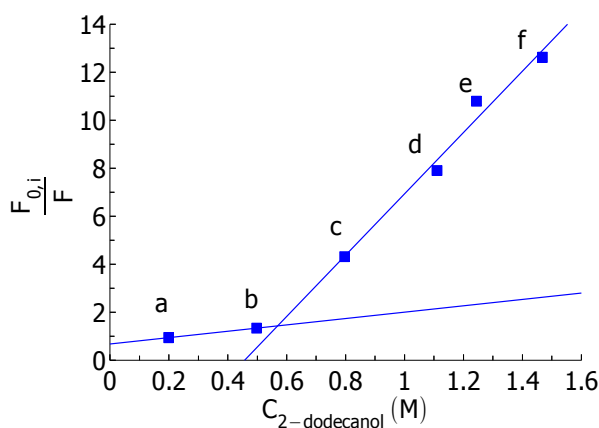


Figura 3.21.- Adiciones de 2-dodecanol a coralina de 1 mgL^{-1} en diclorometano. Valores del índice de refracción de las disoluciones: (a) 1.424, (b) 1.424, (c) 1.425, (d) 1.425, (e) 1.425 y (f) 1.427.

Se obtiene *quenching* para todas las concentraciones, pero se observa un aumento brusco de éste a partir de la adición de una determinada concentración de alcohol, aproximadamente 0.570 M . Además, por debajo de esta concentración la estabilización del espectro tarda ~ 3 horas. Para mayores concentraciones de alcohol se necesita más tiempo para la estabilización (más de 40 horas).

Estos resultados se pueden interpretar sobre la base de la hipótesis anterior. Para concentraciones bajas de 2-dodecanol no hay cambio sustancial de la constante dieléctrica y, por tanto, de la extensión en la que se forman los pares iónicos respecto de lo que ocurre en diclorometano. Para concentraciones altas se facilita la formación de estos pares, pero la lenta cinética del proceso ralentiza la estabilidad de la intensidad de fluorescencia. Sin embargo esta hipótesis puede adolecer de una pequeña contradicción experimental: al ir aumentando la concentración de 2-dodecanol se debería observar un descenso continuo de la fluorescencia, más que un punto de ruptura.

Es por ello que se ha elaborado una segunda hipótesis consistente en un mecanismo basado en la formación de micelas inversas, dada la alta concentración de 2-dodecanol ensayada. En diclorometano, la exposición de las cabezas hidrofílicas al disolvente del entorno es energéticamente desfavorable. En este caso los grupos hidrofílicos (-OH) están en el interior de la micela y los hidrofóbicos (las cadenas hidrocarbonadas) se extienden hacia fuera. El *quenching* puede atribuirse al paso de los fluoróforos de un medio de constante dieléctrica baja, como es el diclorometano, a un medio con una constante dieléctrica localmente alta en el interior de la micela, donde pueden tener lugar interacciones con los grupos hidrofílicos del alcohol y también con los aniones cloruro y sulfato, también en el interior de la micela. Según los resultados experimentales (figura 3.21), se puede asumir que la difusión del fluoróforo al interior de la micela es bastante lenta. No se dispone, por el momento, del valor de CMC del 2-dodecanol en diclorometano, ni de datos adicionales que permitan contrastar adecuadamente ambas hipótesis.

3.4.- CONCLUSIONES

Se ha realizado un estudio de aplicación y validación del modelo desarrollado para explicar la fluorescencia de un fluoróforo en un medio de composición dada. Las conclusiones más importantes derivadas de ello son:

1.- Se ha comprobado el cumplimiento del modelo utilizando berberina y coralina como fluoróforos y alcoholes de cadena lineal de diferente longitud como analitos. Considerando la variación del índice de refracción y la constante dieléctrica de estos compuestos, los resultados experimentales se ajustan a las predicciones del modelo.

2.- Se ha comprobado el cumplimiento del modelo utilizando como analitos compuestos de la misma longitud de cadena y distinto grupo funcional. Se ha observado la linealidad de las respuestas entre la señal de fluorescencia (ΔF) y la concentración de los analitos (expresadas como fracción en volumen). Para el caso del SDS se ha contrastado la validez del modelo con la posible formación de agrupaciones micelares.

3.- Se han obtenido los valores de P_F tanto para la berberina como para la coralina (con mayor fiabilidad para la primera), lo que indirectamente valida el modelo.

4.- Se ha estudiado el uso del diclorometano como disolvente. Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- La hipótesis de partida, que consideraba la formación de pares iónicos, se confirma si bien el origen del contraión podría estar en el propio disolvente.

- La formación de pares iónicos parece un proceso cinéticamente lento, cuya velocidad depende de la constante dieléctrica del medio.

- La adición de compuestos de menor constante dieléctrica que el diclorometano (alcanos o 2-dodecanol) desplaza el equilibrio, aumentando la formación de pares iónicos, lo que provoca resultados contrarios a los esperables por el entorno, pero explicables considerando un mecanismo específico.

- Se ha valorado la posibilidad de que la formación de micelas inversas pueda explicar también el cambio de fluorescencia para el caso del 2-dodecanol.

CAPÍTULO 4:
CAMBIOS EN LA INTENSIDAD DE
FLUORESCENCIA COMO SISTEMA DE
DETECCIÓN EN HPLC

4.- CAMBIOS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA COMO SISTEMA DE DETECCIÓN EN HPLC

4.1.- INTRODUCCIÓN

Una aplicación natural del fenómeno descrito en el capítulo anterior es en sistemas de detección para técnicas de separación instrumentales. Como se ha introducido en el capítulo 1, los cambios de intensidad debidos al efecto del entorno se han aplicado como método de detección en TLC y se ha denominado: FDIC (*Fluorescence Detection by Intensity Changes*, detección de fluorescencia debido a cambios de intensidad)⁷⁴.

Tras el estudio teórico de estos cambios de intensidad de emisión en medio líquido, se presenta en este capítulo la aplicación de los efectos del entorno molecular como un sistema de detección para la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Lo que puede aportar la FDIC en HPLC es su teórica capacidad de dar respuestas genéricas y, por tanto, de actuar como un detector de los denominados tipo "bulk"⁷⁵. Estos detectores⁷⁶, tales como el detector de índice de refracción⁷⁷

74 Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cebolla, V. L.; Fernandes, F.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Garriga, R.; Vela, J.; Guermouche, M. H.; "General Contribution of Nonspecific Interactions to Fluorescence Intensity". *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3699-3705. Mateos, E.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Vela, J.; Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cossío, F. P.; "Coralyn Cation, a Fluorescent Probe for General Detection in Planar Chromatography" *J. Chrom. A.* **2007**, 1146, 251-257.

75 Carga, mole. Se refiere a detectores que responden a una variación óptica general, sin diferenciar el tipo de analito.

76 Scott, R. P. W.; "Liquid Chromatography Detectors". *J. Chrom. Lib.* **1986**, 33, Elsevier, Amsterdam p. 49-88.

77 Meira, G.; En: "Modern Methods of Polymer Characterization" Barth, H.G.; Mays, J.W.; Wiley-Interscience, **1991**, New York, p. 76.

(refractometría diferencial, R.I.) o el evaporativo de dispersión de luz⁷⁸ (ELSD) son importantes y casi únicos para algunas aplicaciones, ya que proporcionan una respuesta para todo tipo de analitos⁷⁹, si bien son especialmente utilizados en la detección de aquellas moléculas que presentan malas propiedades ópticas, tales como polímeros o lípidos, y son normalmente preferibles al uso de técnicas de derivatización basadas en fluorescencia o absorción molecular, las cuales son complejas y, en ocasiones, producen artefactos analíticos. En este contexto, la detección FDIC ya ha demostrado sus cualidades para la detección y cuantificación de analitos no fluorescentes o compuestos que no contienen grupos cromóforos (o presentan propiedades de absorción muy débiles en el UV-VIS) habiéndose ensayado para detectar hidrocarburos saturados en productos de petróleo^{80 81} y lípidos⁸², entre otros compuestos. La sensibilidad de la detección de estos métodos es alta, puesto que el entorno rígido proporcionado por la *silica gel* favorece la interacción directa de la cadena hidrocarbonada de los analitos (la cual es altamente polarizable) con el fluoróforo^{83 84}.

78 Dreux, M.; Lafosse, M.; En: "Carbohydrate Analysis" El Rassi, Z.; (ed.) *Journal of Chromatography Library*, Elsevier, **1995**, Amsterdam, p. 58.

79 Poole, C. F.; "The Essence of Chromatography" Elsevier, **2002**, Amsterdam, p. 457.

80 Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Domingo, M. P.; Henrion, P.; Garriga, R.; González, P.; Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Vela, J.; "Quantitative Applications of Fluorescence and Ultraviolet Scanning Densitometry for Compositional Analysis of Petroleum Products in Thin-Layer-Chromatography" *J. Chromatogr. Sci.* **1999**, 37, 219-226.

81 Matt, M.; Gálvez, E. M.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Bacaud, R.; Pessayre, S.; "Improved Separation and Quantitative Determination of Hydrocarbon Types in Gas Oil by Normal Phase High-performance TLC with UV and Fluorescence Scanning Densitometry" *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 1665-1674.

82 Cebolla, V. L.; Jarne, C.; Domingo, P.; Domínguez, A.; Delgado-Camón, A.; Garriga, R.; Galbán, J.; Membrado, L.; Gálvez, E. M.; Cossío, F. P.; "Fluorescence Detection by Intensity Changes for High-Performance Thin-Layer Chromatography Separation of Lipids Using Automated Multiple Development". *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 2668-2675.

83 Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Vela, J.; Garriga, R.; Domingo, M. P.; "Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. An Explanation of This Phenomenon" *Org. Lett.* **2000**, 2, 2311-2313.

En este trabajo se ha usado la detección FDIC en dos tipos de problemas analíticos que involucran compuestos con malas propiedades espectroscópicas:

- Por un lado, se evaluará la aplicación de la FDIC al problema de caracterización de distribución de pesos moleculares de polímeros convencionales. Normalmente, esta caracterización se realiza usando fases estacionarias de GPC⁸⁵ y detección usando detectores tipo *bulk* como los citados anteriormente. Para llevar a cabo esto, hay que acoplar la detección FDIC a la separación GPC, evaluar la respuesta y el mecanismo FDIC de diferentes polímeros, como poliestirenos, policarbonatos y polietilenglicoles (PEG's) de diferente peso molecular, y comprobar la viabilidad de uso de la técnica en mezclas de polímeros de diferentes tamaños moleculares.

- Por otro lado se incluirá la aplicación de la detección FDIC en combinación con HPLC (usando fase inversa) para evaluar la respuesta de una determinada clase de lípidos, los esfingolípidos, que presentan problemas de detección mediante las técnicas ópticas convencionales.

El objetivo final de este capítulo no es desarrollar un método cromatográfico concreto para una familia de compuestos sino evaluar y presentar las posibilidades analíticas que presenta la FDIC como detector, estudiando los distintos parámetros (medio, analitos, fluoróforos) que influyen en la señal analítica final obtenida en el sistema HPLC estudiado y racionalizar la respuesta de los diferentes analitos a la luz del modelo desarrollado en el capítulo 2 para la variación de la señal de fluorescencia en medio líquido.

84 Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Domingo, M. P.; Henrion, P.; Vela, J.; "Enhancement of Fluorescence in Thin-Layer Chromatography Induced by the Interaction between *n*-Alkanes and an Organic Cation" *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1759-1766 (2000).

85 La GPC (cromatografía de permeación en gel) se basa en la separación por tamaño de los analitos. En medio acuoso se denomina SEC (cromatografía de exclusión).

4.2.- ADAPTACIÓN DEL MODELO EN MEDIO LÍQUIDO AL SISTEMA HPLC-GPC

Del modelo matemático desarrollado en el capítulo 2, que describe el efecto del entorno en la fluorescencia de una sustancia, se obtiene la expresión de la ecuación (2.33):

$$F = K_F^{ins} \left(\frac{f_{n,M}^4}{n_M f_{n,M}^2 + Y_F e^{P_F f_{\epsilon,M}}} \right)$$

Para aplicaciones cuantitativas, en las que se quiere determinar un analito que se encuentra en una fracción en volumen $X_{v,A}$ en la muestra, se cumple la expresión (2.67):

$$\Delta F = \frac{F - F_D}{F_D} = (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) X_{v,A} - \frac{3}{2} P_F E_{D,A} \left[(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) + (N_{D,A} - 2E_{D,A}(\epsilon_D + 2)) \right] X_{v,A}^2$$

que se puede simplificar a la (2.63) para respuesta lineal:

$$\Delta F = \frac{F - F_D}{F_D} = (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) X_{v,A}$$

Para adaptar el modelo cuando se usa FDIC como detección en cromatografía es necesario hacer varias consideraciones, conceptualmente sencillas pero que pueden alterar la ecuación general:

1.- El parámetro analítico que se mide no es ΔF sino la variación de fluorescencia observada sobre la línea de base (ΔF_{HPLC}), es decir:

$$\Delta F_{\text{HPLC}} = F - F_D = \Delta F \cdot F_D \quad (4.1)$$

La diferencia fundamental es que la señal usada (ΔF_{HPLC}) no está corregida por la constante instrumental, que de acuerdo con la ecuación (2.12) viene dada por:

$$K_F^{\text{ins}} = K^{\text{ins}} S_F C_F \epsilon_F^{\lambda, \nu}$$

por lo que la señal dependerá de todos estos parámetros. Así:

$$\Delta F_{\text{HPLC}} = K^{\text{ins}} S_F C_F \epsilon_F^{\lambda, \nu} \left(\frac{1 + 4.4n_{c,D}^2}{0.65 + 5.6n_{c,D}^2 + Y_F e^{P_F \left(\frac{\epsilon_D - 1}{\epsilon_D + 2} \right)}} \right) (N_{D,A} - 3P_{F-D,A}) X_{V,A} \quad (4.2)$$

2.- En general se utiliza el área del pico cromatográfico (A) en lugar de la altura (variación máxima equivalente a ΔF_{HPLC}). Considerando que los picos cromatográficos son triángulos, el área ($A_{\Delta F, \text{HPLC}}$) vendrá dada por:

$$A_{\Delta F, \text{HPLC}} = \frac{\Delta F_{\text{HPLC}} \cdot \Delta t}{2}$$

y, por tanto:

$$A_{\Delta F, \text{HPLC}} = \frac{1}{2} (\Delta t) F_D (N_{D,A} - 3P_{F-D,A}) X_{V,A} \quad (4.3)$$

En la mayoría de ensayos realizados la duración del pico cromatográfico no cambia mucho y se puede considerar constante.

3.- En muchas ocasiones las calibraciones se realizan usando como variable independiente la masa de analito (m_A) en lugar de su relación en volumen. La relación de ambas variables viene dada por la densidad del analito (ρ_A) y el volumen de disolución de analito inyectado (V_{iny}).

4.- Finalmente, en función de los caudales de fase móvil y portador del fluoróforo la señal cambiará, de aquí que sea necesario incluir una constante instrumental que considere esas variables.

$$A_{\Delta F, HPLC} = \frac{1}{2}(\Delta t)F_D(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A})K_{HPLC} \frac{m_A}{\rho_A V_{iny}} \quad (4.4)$$

4.3.- EXPERIMENTAL

4.3.1.- Materiales

Para la detección en el sistema HPLC se han usado los mismos fluoróforos descritos en el apartado 3.1.1, es decir, hemisulfato de berberina y cloruro de coralina. En este caso no ha sido necesario utilizar cloruro de berberina pues, como se ha demostrado previamente, las dos berberinas tienen un comportamiento similar.

Se ha trabajado tanto en medio orgánico como acuoso, para lo cual se han usado metanol ($\geq 99.9\%$) y diclorometano ($\geq 99.8\%$) de Chromasolv® de Sigma-Aldrich, en medio orgánico, y agua bidestilada (MilliQ, 18M Ω), en medio acuoso. Todos los disolventes se han desgasificado en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos antes de ser introducidos en el sistema.

A la hora de elegir los analitos que se han usado en este método, se han seguido los mismos criterios que en el capítulo anterior, es decir, se han usado polímeros solubles o miscibles en los distintos disolventes y que no absorben o emiten en el intervalo de longitudes de onda de trabajo. Así pues, en medio orgánico se han seleccionado poliestirenos de pesos moleculares comprendidos entre 10850 y 3220000 g mol^{-1} de Polymer Labs, policarbonatos de 30600 y 50000 g mol^{-1} de Fluka. Para las medidas en medio acuoso se han usado polietilenglicoles de pesos moleculares que abarcan desde 1420 a 23000 g mol^{-1} de Sigma (figura 4.1). En todos los casos se trata de patrones, y por tanto, la polidispersidad es baja (1 para los poliestirenos y polietilenglicoles y 2 para los policarbonatos).

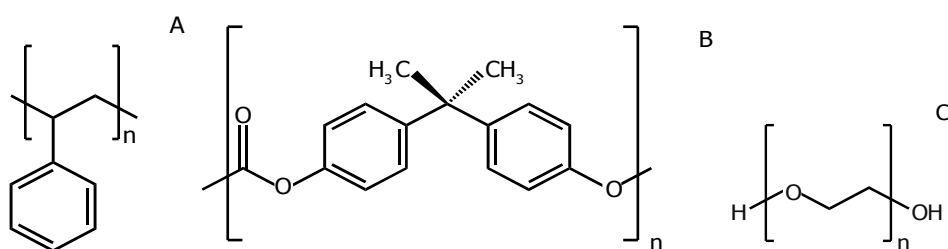


Figura 4.1.- Estructuras de los polímeros usados: (A) poliestireno, (B) policarbonato y (C) polietilenglicol.

Se han usado también los siguientes esfingolípidos: D-esfingosina, N-acetil-D-esfingosina, esfingomiolina, glucocerebrósido y galactocerebrósido, de Sigma-Aldrich en un sistema cromatográfico de fase reversa.

4.3.2.- Sistema cromatográfico

Aunque se ha trabajado tanto en medio orgánico como acuoso el sistema cromatográfico ha sido básicamente el mismo. Consta de dos bombas isocráticas: la bomba 1 impulsa la fase móvil (con o sin analito inyectado) que pasa a través de la columna y la bomba 2 hace llegar la disolución de fluoróforo,

para la detección, hasta el punto de mezcla (celda de acero inoxidable) donde los dos flujos se unen antes de llegar al detector (figura 4.2).

El caudal de la bomba 1 siempre tiene que ser superior al de la bomba 2 para evitar que la disolución de fluoróforo alcance la columna. También, para impedir que el flujo vaya hacia la bomba 2, hay colocada una válvula anti-retorno entre el punto de mezcla y dicha bomba.

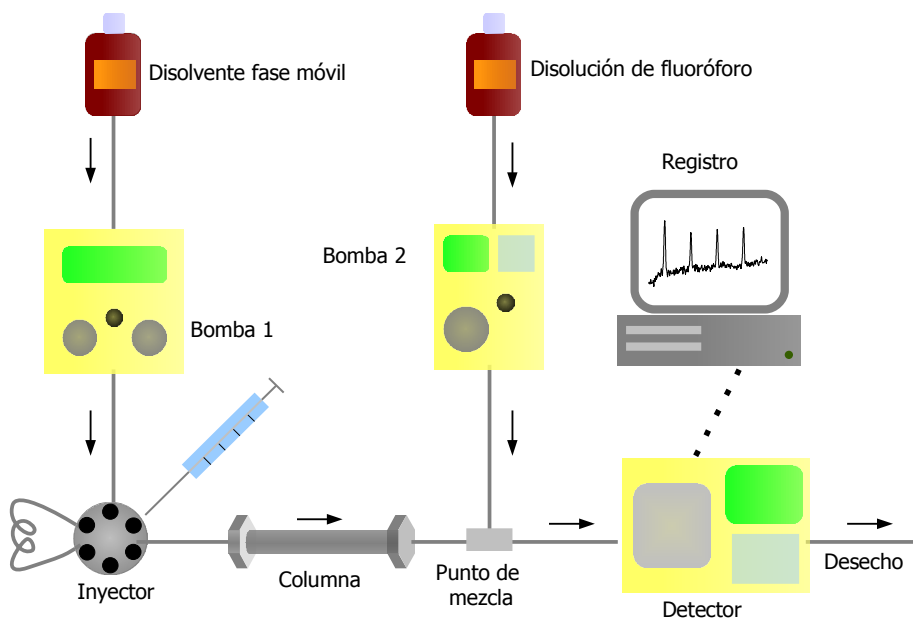


Figura 4.2.- Sistema cromatográfico de HPLC con detección FDIC.

Las separaciones cromatográficas de los analitos se han llevado a cabo en las siguientes columnas (dependiendo del medio y del tamaño del analito):

- Columna Styragel HT6E de poliestireno-divinilbenceno, que sirve para un intervalo de pesos moleculares de 5000 a $1 \cdot 10^7$ gmol^{-1} en medio orgánico, de Waters. Se ha usado con los poliestirenos y los policarbonatos.

- Columna PL-aquagel-OH Mixed 8 μm , empaquetada con un copolímero macroporoso funcionalizado con un polihidroxilo sumamente hidrofílico, cuyo intervalo de peso molecular efectivo es 100 a $1 \cdot 10^7$ gmol^{-1} , para medio acuoso, de Varian, para los polietilenglicoles.

- Columna Supelcosil LC-18 5 μm (25 cm x 4.6 mm) de fase reversa para HPLC, de Supelco, utilizada en las pruebas con esfingolípidos en medio orgánico.

Los analitos, disueltos en el disolvente adecuado, se han introducido en el sistema con un inyector manual 7725i de Rheodyne con una válvula de 6 vías y bucles de volumen 5 ó 50 μL .

Para impulsar la fase móvil a través de la columna se ha usado una bomba de HPLC 515 de Waters (bomba 1) y para la introducción de la disolución de fluoróforo post-columna se ha usado una bomba PU-2080 Plus de Jasco (bomba 2). El detector de fluorescencia ha sido un detector FP-2020 de Jasco.

El control del sistema, la adquisición de datos y su posterior tratamiento se han llevado a cabo con el *software* para cromatografía Waters Millenium.

4.3.3.- Selección de los parámetros de trabajo

Para elegir las variables, se ha tenido presente cómo se produce la señal analítica final. En este sistema la línea de base cromatográfica está determinada por la mezcla de flujos que vienen de la elución (fase móvil) y de la disolución de fluoróforo, al pasar por el detector. A partir de ella, las señales de los analitos son picos positivos (aumento de fluorescencia) o negativos (*quenching*) de fluorescencia, según el entorno en el que se encuentran con el fluoróforo.

Con respecto al diseño del sistema cromatográfico, la línea de base depende del tipo y la concentración del fluoróforo y de la naturaleza y caudales de los disolventes utilizados, así como de los parámetros instrumentales del detector de fluorescencia (longitudes de onda, rendijas, ganancia, ...). Por todo ello, antes de cualquier inyección de analito es necesario buscar las mejores condiciones para obtener una buena línea de base, es decir, estable, sin deriva y con el menor ruido posible.

a) Disolventes

El disolvente en el que está disuelto el fluoróforo puede ser el mismo que la fase móvil o no, debiendo ser miscibles en el segundo caso.

Se ha optado por el diclorometano como fase móvil para las medidas de poliestirenos y policarbonatos, ya que es compatible con la columna y permite la elución de los polímeros a temperatura ambiente. En el caso de los polietilenglicoles se ha usado agua bidestilada como eluyente, ya que estos polímeros son muy solubles en agua en estas condiciones. La elución en todos los casos ha sido en condiciones isocráticas, para evitar variaciones en la línea de base.

En cuanto al disolvente del fluoróforo para la detección, y teniendo en cuenta que la fluorescencia nativa del fluoróforo depende de él, se ha elegido el metanol para los trabajos en medio orgánico por su miscibilidad con el diclorometano y por la buena solubilidad de los fluoróforos en él, ya que esto debería aumentar la sensibilidad de la respuesta. En medio acuoso el disolvente para la detección ha sido agua bidestilada. De esta forma se minimizan también los problemas causados por el diclorometano.

b) Caudales de las bombas

La elección de los flujos de cada una de las bombas es determinante en la estabilidad de la línea de base. Hay que tener en cuenta que se está trabajando con dos bombas, lo que produce una serie de interferencias de tipo electrónico que se reflejan en la línea de base.

Por otro lado, también es importante recalcar que, en las medidas en las que se usan dos disolventes distintos (uno para la fase móvil y otro para la disolución del fluoróforo), la combinación de los caudales de las bombas influye de manera determinante en el medio en el que se encuentran el fluoróforo y el analito, siendo posible diseñar un entorno adecuado al tipo de señal que se quiera obtener.

El caudal de la fase móvil (B1) se ha variado desde 0.6 hasta 1 mLmin⁻¹, eligiendo éste segundo por ser el recomendado para un rendimiento óptimo de las columnas usadas.

El caudal de la disolución de fluoróforo (B2) se ha elegido en función del propio fluoróforo y de la línea de base. Cuanto mayor es este caudal, hay mayor cantidad de fluoróforo en el punto de mezcla, aumentando así la sensibilidad y la magnitud de la señal analítica. (El nivel de la línea de base, fluorescencia de

base, no varía de la misma manera debido a la proporción de los disolventes en los que los fluoróforos presentan distinta fluorescencia nativa). Pero se ha observado también que este aumento provoca un empeoramiento de la línea de base.

Hay que recordar que el caudal de esta disolución nunca puede ser superior al de la fase móvil para evitar que el fluoróforo alcance la columna. Se han hecho pruebas con caudales entre 0.6 y 0.9 mLmin⁻¹ de las que se ha escogido 0.8 mLmin⁻¹ como caudal de la bomba 2, pues representa el mejor compromiso entre una buena sensibilidad y la estabilidad de la línea de base.

El efecto del entorno puede servir también para modular la respuesta que queremos obtener. Esto puede comprobarse en la figura 4.3. En ella se representa el área de los picos obtenidos al inyectar la misma masa (100 µg) de poliestireno de 10850 gmol⁻¹ en función de la fracción en volumen de diclorometano presente en el detector (que varía al hacer distintas combinaciones de los caudales de las dos bombas).

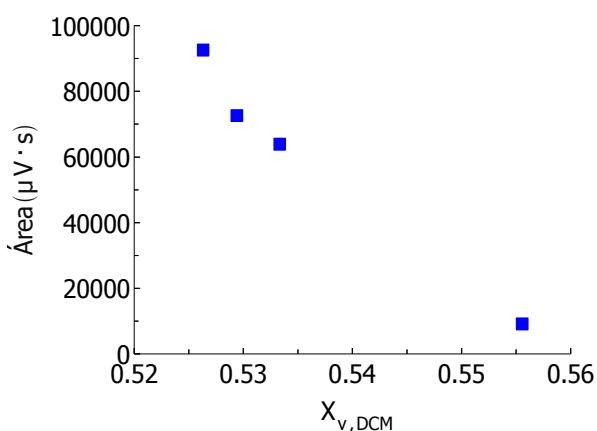


Figura 4.3.- Variación de la proporción de diclorometano. (Señales de poliestireno de 10850 gmol⁻¹ (100 µg); B1=diclorometano (0.8 a 1 mLmin⁻¹), B2=berberina 20 mgL⁻¹ en metanol (0.7-0.9 mLmin⁻¹)).

Al aumentar la proporción de diclorometano en la mezcla el área del pico negativo cada vez es menor, lo que implica que la señal es cada vez más positiva, pudiendo llegar a invertirse el signo de la señal si se encuentran las condiciones adecuadas. En este caso, esto no ha sido posible debido a las limitaciones instrumentales del propio equipo.

c) Concentración del fluoróforo

Considerando el parámetro $A_{\Delta F, HPLC}$ que describe ahora el modelo (4.4), al aumentar la concentración de fluoróforo aumenta la constante instrumental y, por lo tanto, la señal obtenida. En medio orgánico se han elegido 20 mgL^{-1} como concentración habitual de trabajo del fluoróforo en metanol porque se consigue una buena línea de base, aunque se han hecho pruebas con concentraciones mayores.

En la figura 4.4 se muestra el efecto de la concentración de berberina en metanol en la respuesta de una disolución de poliestireno de peso molecular de $520000 \text{ g mol}^{-1}$ en diclorometano ($17 \text{ } \mu\text{g}$). Como puede verse, a menor concentración de berberina se obtienen respuestas menores.

En medio acuoso se ha trabajado con una concentración de 60 mgL^{-1} de fluoróforo, debido a la baja intensidad de fluorescencia en este medio, especialmente de la berberina.

En trabajos previos se usó una concentración de 200 mgL^{-1} de fluoróforo en diclorometano⁸⁶. Sin embargo, esta concentración no es viable en este caso porque produce la precipitación del fluoróforo por las paredes de las conducciones y en la celda del detector, haciendo irreproducibles las medidas.

86 Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cebolla, V. L.; Fernandes, F.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Garriga, R.; Vela, J.; Guermouche, M. H.; "General Contribution of Nonspecific Interactions to Fluorescence Intensity". *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3699-3705.

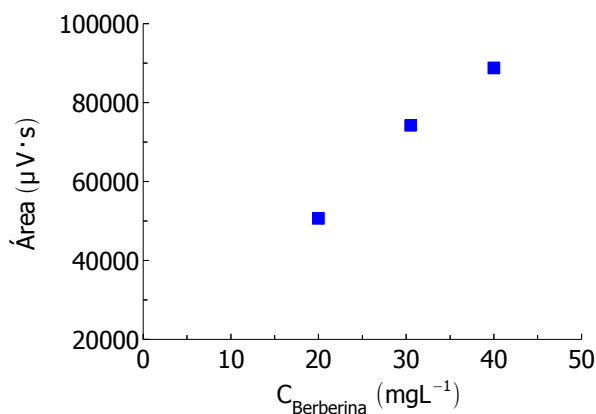


Figura 4.4.- Poliestireno 520000 (17 μg): (B1=1 mLmin⁻¹ (diclorometano), B2=0.8 mLmin⁻¹ (berberina/metanol)).

d) Detección

La detección de fluorescencia se ha hecho a las longitudes de onda de los máximos de los espectros de fluorescencia de los fluoróforos en los distintos medios (tabla 4.1).

Medio	Berberina		Coralina	
	Excitación	Emisión	Excitación	Emisión
Orgánico	355 nm	520 nm	410 nm	470 nm
Acuoso	360 nm	520 nm	415 nm	470 nm

Tabla 4.1.- Longitudes de onda de excitación y emisión de los fluoróforos en los distintos medios.

En medio orgánico se ha usado una anchura de rendija de 18 nm y ganancia 1 debido a la elevada intensidad de fluorescencia que presentan los fluoróforos en estos disolventes. Por el contrario, se ha usado rendija de 40 nm y ganancia de 100 para las medidas en medio acuoso.

e) Inyección de los analitos

Una vez determinados los parámetros instrumentales se han inyectado los distintos analitos. En este punto se ha tenido en cuenta que la concentración o masa de analito está limitada por las especificaciones de las columnas, ya que admiten sólo una determinada cantidad máxima de analito para asegurar su funcionamiento óptimo. Esto disminuye bastante el intervalo de concentraciones a usar cuando se trabaja con polímeros de muy distinto peso molecular, como es el caso de los poliestirenos (de 10850 a 3220000 gmol^{-1}).

Los polímeros se han disuelto en el disolvente de la fase móvil correspondiente.

4.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1.- Detección de polímeros en HPLC-GPC mediante FDIC

a) Efecto de la fase móvil en la señal

La ecuación (4.1) indica que, para un analito dado, el signo (aumento o disminución) de la señal fluorescente obtenida respecto de la línea de base cambiará dependiendo de las propiedades de la fase móvil. Cuando $N_{D,A} > P_F E_{D,A}$ el analito producirá señales de fluorescencia mayores que F_0 , y el resultado final será un pico positivo con respecto a la línea de base. Por el contrario, cuando $N_{D,A} < P_F E_{D,A}$ la intensidad de fluorescencia en presencia del analito será menor que F_0 , por lo que se obtendrá *quenching* de fluorescencia.

Los polímeros, debido al efecto de relajación del dieléctrico, presentan constantes dieléctricas muy bajas, del orden de 2-3, por lo que se comportan como sustancias de polaridad escasa. En estos casos la constante dieléctrica equivale al índice de refracción al cuadrado:

$$\epsilon_A \approx n_A^2$$

Para la determinación de polietilenglicol (PEG) se utiliza agua como fase móvil. El agua tiene una constante dieléctrica elevada ($\epsilon=80.1$) y un índice de refracción bajo ($n=1.333$), de aquí que la presencia de PEG en el medio provoque un descenso en la ϵ y un incremento de n , jugando ambos a favor del aumento de fluorescencia de la berberina, que es lo que se observa en la figura 4.5C.

Para la determinación cromatográfica de poliestireno ($\epsilon=2.6$) y policarbonato ($\epsilon=2.8$) es necesario utilizar diclorometano como fase móvil para conseguir la adecuada solubilidad de los polímeros y del fluoróforo. Como ya se ha explicado en el capítulo anterior, la fluorescencia de la berberina en diclorometano no se puede explicar por el mecanismo general. El diclorometano forma pares iónicos con la berberina, lo que disminuye su fluorescencia. La presencia de polímeros hace disminuir la constante dieléctrica del medio y favorece la formación de dichos pares iónicos, de aquí que la señal obtenida para ambos polímeros sea negativa. Esto se muestra en las figuras 4.5 A y B.

4.- CAMBIOS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA COMO SISTEMA DE DETECCIÓN EN HPLC

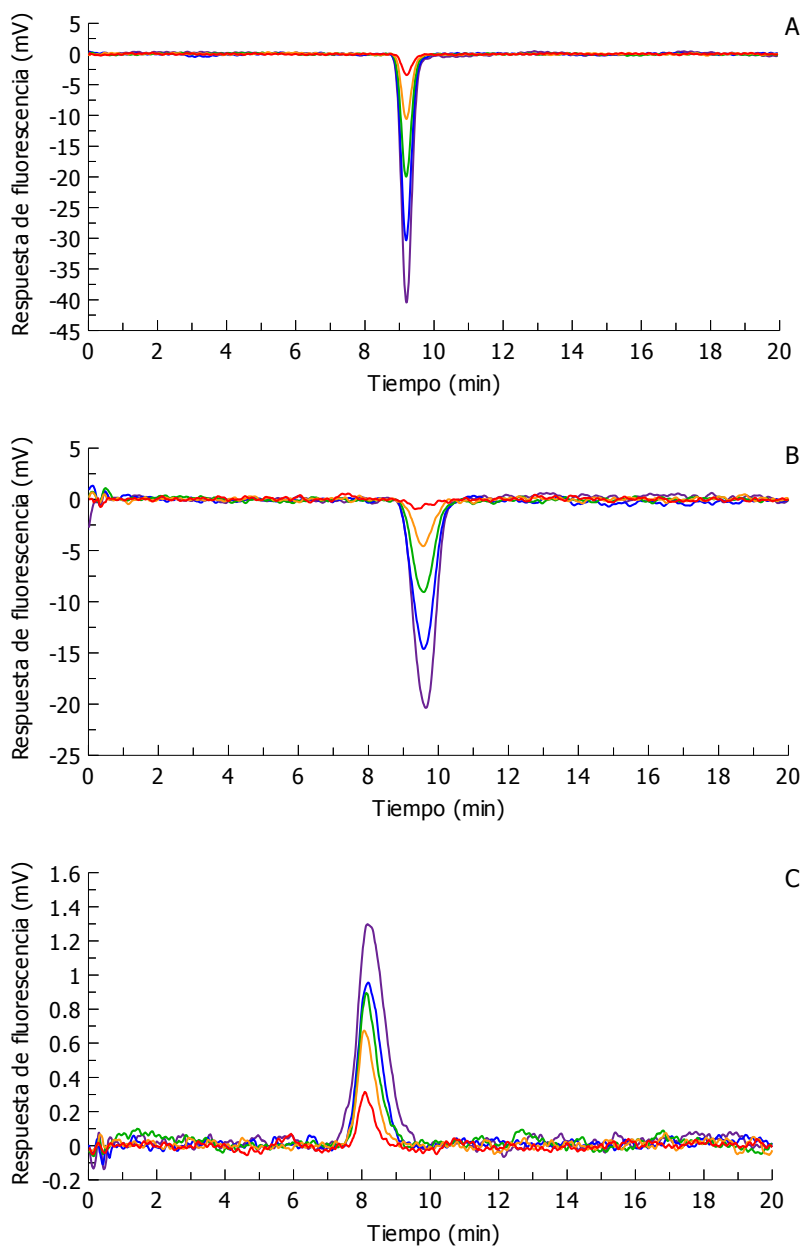


Figura 4.5.- Cromatogramas de poliestireno 70600 (A), policarbonato 30600 (B) y polietilenglicol 23000 (C) usando berberina como fluoróforo.

b) Efecto de la masa y del tamaño del polímero

Como cabría esperar, para un polímero dado, a mayor masa inyectada hay una mayor respuesta de FDIC expresada en unidades de área. Como muestra la figura 4.6 y contempla el modelo, se observa un aumento del área de pico con relación a la masa inyectada para el poliestireno de 70600 gmol^{-1} , el policarbonato de 30600 gmol^{-1} y el polietilenglicol de 23000 gmol^{-1} , cuyos cromatogramas aparecen en la figura 4.5.

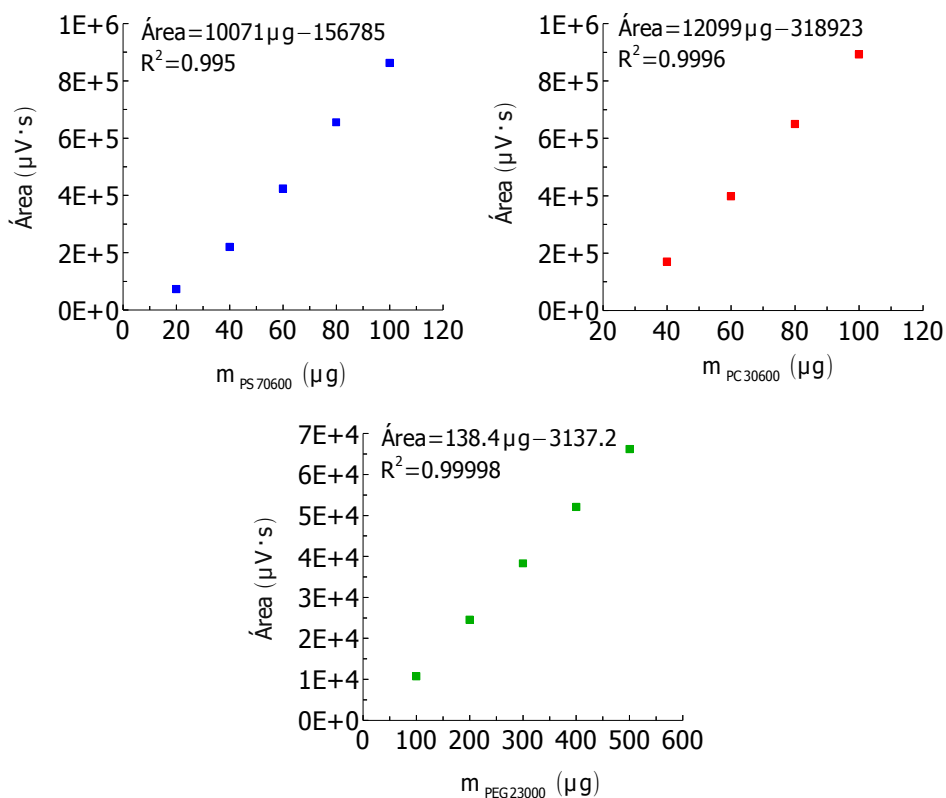


Figura 4.6.- Relación de la masa inyectada con las áreas de los picos de las señales de los distintos polímeros: poliestireno 70600 (■), policarbonato 30600 (■) y polietilenglicol 23000 (■).

Aunque las regresiones muestran una linealidad adecuada ($R^2=0.99-0.9999$), las líneas dan valores negativos para $\text{masa}=0$. Aún no puede darse una explicación para este detalle en particular, pero todo indica a que es causado por una baja sensibilidad del método, que se comentará más adelante.

El peso molecular también influye en la respuesta de la detección FDIC. Como se supone que el polímero y el fluoróforo están a una distancia corta, un polímero mayor puede interactuar con varias moléculas de fluoróforo al mismo tiempo. Así, al final se obtiene una respuesta constante por mol de unidad monomérica (y, por tanto, por gramo de polímero), lo que hace que la señal aumente al aumentar el número de moles de polímero según su tamaño. Esto se muestra en la figura 4.7, en la que se han inyectado masas iguales de poliestirenos de distinto tamaño y se ha calculado el área del pico en función del número de moles del polímero. En realidad la figura es un resumen de los estudios de calibración que se han realizado para todos los polímeros. Las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para todos ellos se muestran en la tabla 4.2.

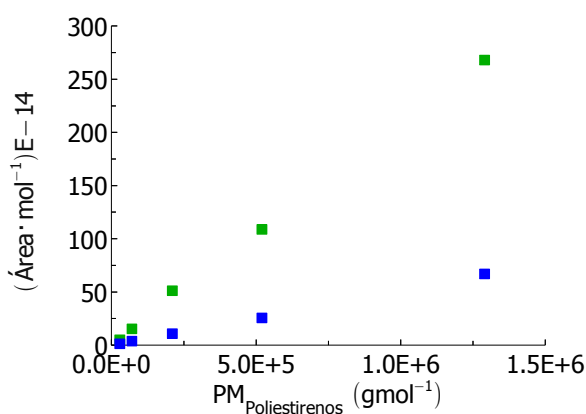


Figura 4.7.- Respuesta por mol de polímero para poliestirenos 50 μg de 28500, 70600, 210500, 520000 y 1290000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ de peso molecular detectados con coralina (\blacksquare) y berberina (\blacksquare), las dos disueltas en metanol ($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. (La fase móvil ha sido diclorometano bombeado a $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Peso Molecular	PENDIENTE	O.O.	R ²
POLIESTIRENOS EN DCM			
28500	9092.2	-170885	0.9951
70600	10071	156785	0.9946
210500	4297.5	-21396	0.9797
520000	4583	-27678	0.9846
1290000	5942.3	-34626	0.9655
3220000	4740.4	-33745	0.9682
POLICARBONATOS EN DCM			
50000	7953.7	-120239	0.9979
30600	12099	-318923	0.9996
POLIETILENGLICOLES EN AGUA			
1420	5.0987	22.4	0.9961
4250	5.963	773	0.9997
12600	5.8472	-869.7	0.9900
23000	6.8906	-3020.4	0.9970

Tabla 4.2.- Ecuaciones de las rectas de calibrado de los distintos polímeros obtenidas con 4 ó 5 puntos, según el polímero.

Este efecto se ilustra en la figura 4.8. Así el polímero influye en la fluorescencia del fluoróforo, no como un todo, sino como una serie de monómeros individuales.



Figura 4.8.- Representación de la influencia del polímero en el fluoróforo.

La figura 4.9 muestra que la técnica GPC-FDIC puede aplicarse una caracterización de distribución de pesos moleculares de mezclas de polímeros. En este caso se han usado mezclas de dos o tres polímeros de la misma familia, simulando mezclas reales similares a las que se obtienen en la industria de polímeros.

4.- CAMBIOS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA COMO SISTEMA DE DETECCIÓN EN HPLC

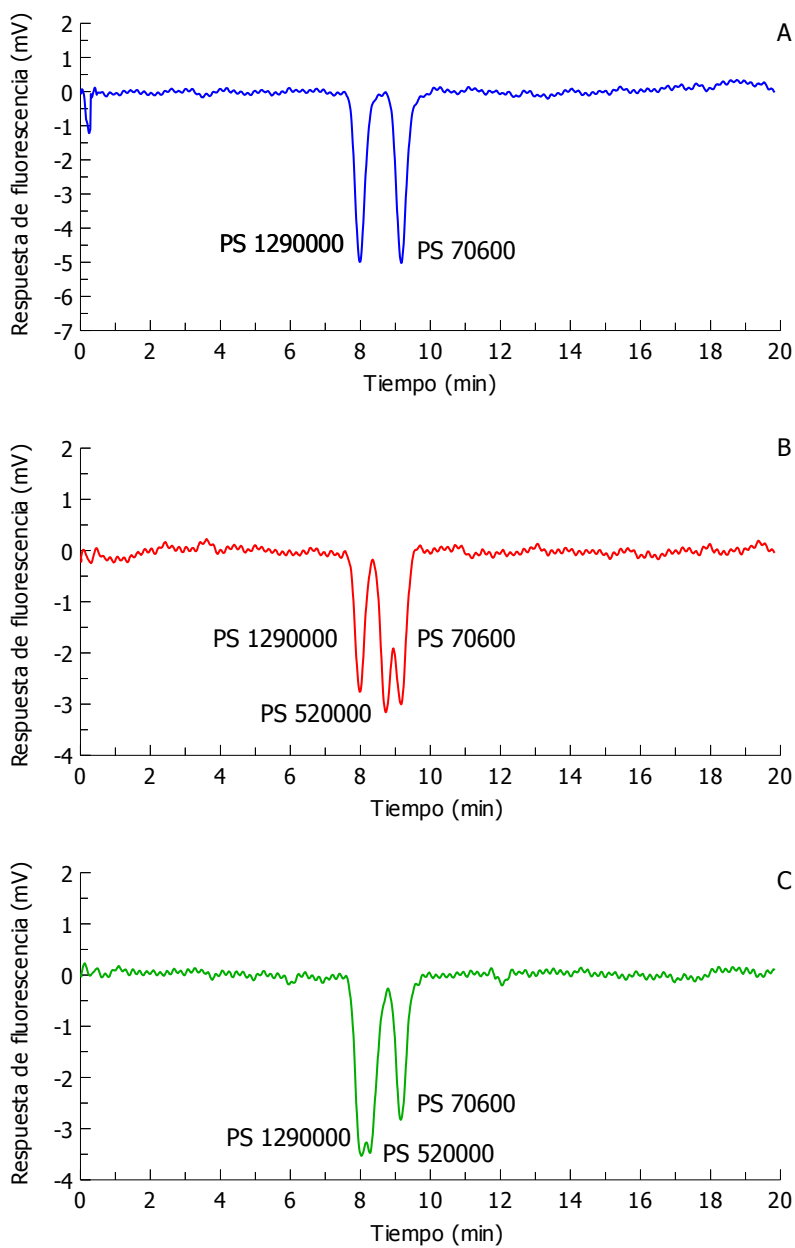


Figura 4.9.- Cromatogramas de mezclas de poliestirenos: (A) 1290000 y 70600 (25 μg); (B) 1290000, 520000 y 70600 (17 μg); (C) 1290000 (11 μg), 210500 y 70600 (17 μg). (Fase móvil: diclorometano a 1mLmin^{-1} y detección con berberina en metanol de 20mgL^{-1} a 0.8mLmin^{-1}).

c) Efecto del fluoróforo

La naturaleza y las propiedades del fluoróforo afectan de manera importante a la respuesta y la sensibilidad de la detección FDIC. El parámetro P_F muestra explícitamente esta dependencia. Sin embargo, también hay que tener en cuenta la solvatación preferencial por el analito o por la fase móvil que aparece en los términos $N_{D,A}$ y $E_{D,A}$ a través de las constantes de solvatación preferencial K_n^{PS} y K_ϵ^{PS} .

En el capítulo anterior se ha mostrado las propiedades de la coralina y la berberina a la hora de detectar las variaciones en su entorno debidas a la adición de analitos o a la variación del medio. La tabla 4.3 muestra los valores de la respuesta FDIC por gramo de polímero (RPG) usando coralina o berberina en la detección.

Peso molecular	RPG·10 ⁹	
	BERBERINA	CORALINA
28500	4.89	17.67
70600	5.38	21.59
210500	5.17	24.32
520000	4.92	20.97
1290000	5.18	20.73

Tabla 4.3.- Respuesta FDIC por gramo de polímero de poliestirenos de distinto peso molecular usando coralina y berberina (20 mgL⁻¹ en metanol) a 0.8 mLmin⁻¹. La fase móvil es diclorometano bombeado 1 mLmin⁻¹.

Como puede verse, la coralina presenta más sensibilidad que la berberina. La figura 4.10 muestra los cromatogramas correspondientes.

4.- CAMBIOS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA COMO SISTEMA DE DETECCIÓN EN HPLC

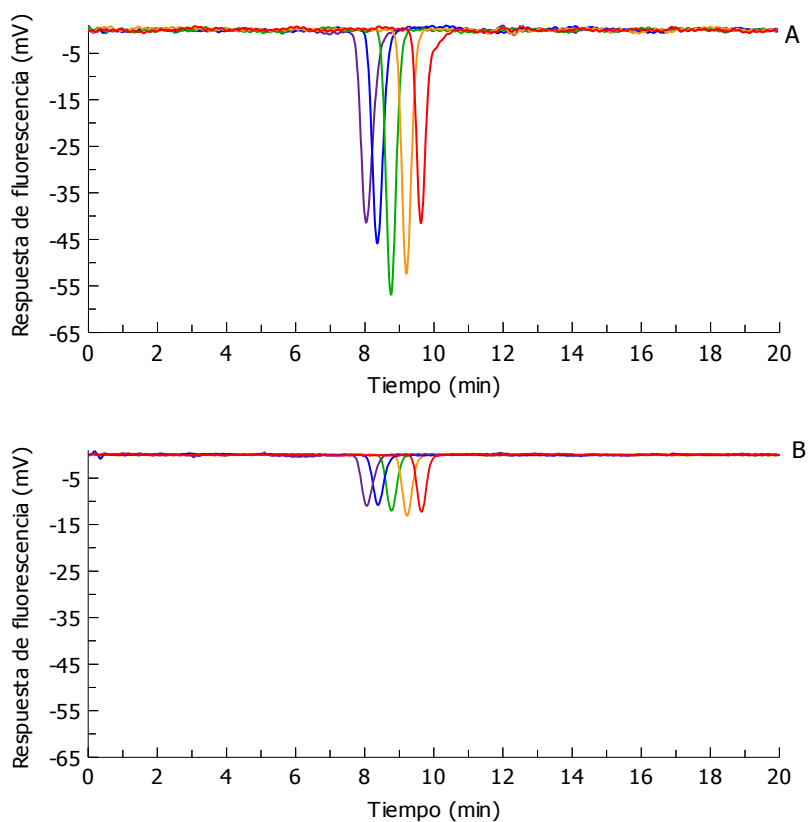


Figura 4.10.- Cromatogramas de 50 μg de poliestirenos 28000 (-), 70600 (-), 210500 (-), 520000 (-) y 1290000 (-) detectados con coralina (A) y berberina (B) de 20 mgL^{-1} en metanol a 0.8 mLmin^{-1} . La fase móvil es diclorometano a 1 mLmin^{-1} .

El efecto de la concentración de berberina sobre la respuesta FDIC del poliestireno de 520000 se ha mostrado en la figura 4.3. Las concentraciones estudiadas han sido 20, 30 y 40 mgL^{-1} . La señal de fluorescencia (F) depende linealmente de la concentración de fluoróforo, y por tanto, a menores concentraciones menores respuestas FDIC.

Además de berberina y coralina, también pueden usarse otros fluoróforos como detección FDIC acoplada a sistemas de separación HPLC o GPC. La elección del fluoróforo viene determinada por sus propiedades de solubilidad y su intensidad de fluorescencia nativa en los disolventes, y determinará la respuesta y la sensibilidad para un analito dado.

La técnica no está limitada a GPC de analitos solubles en medios orgánicos. Como muestran los resultados con PEGs, se puede utilizar agua (o disolventes acuosos) para SEC (*Size Exclusion Chromatography*, la versión en agua de la GPC) de muestras solubles en agua.

4.4.2.- Detección de esfingolípidos en HPLC (fase reversa) mediante FDIC

Una publicación reciente⁸⁷ resume los resultados del trabajo del grupo de investigación sobre la aplicación de FDIC para la detección de diferentes clases de lípidos neutros y polares en TLC. Una profundización de la aplicación, tanto en TLC como en HPLC para la detección de esfingolípidos se está desarrollando en el marco de otra Tesis Doctoral del grupo. Los esfingolípidos son una familia de lípidos que poseen malas propiedades ópticas y cuya detección reviste alto interés ya que están relacionados con las enfermedades de tipo lisosomal.

Se presentan los resultados preliminares de las posibilidades de acoplamiento de HPLC, usando fase reversa, con FDIC para la detección de esfingolípidos. Como se verá este sistema también ilustra la validez del modelo propuesto para este sistema de detección.

87 Cebolla, V. L.; Jarne, C.; Domingo, P.; Domínguez, A.; Delgado-Camón, A.; Garriga, R.; Galbán, J.; Membrado, L.; Gálvez, E. M.; Cossío, F. P.; "Fluorescence Detection by Intensity Changes for High-Performance Thin-layer Chromatography Separation of Lipids Using Automated Multiple Development" *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218, 2668-2675.

En lo referente a la naturaleza de la fase móvil, se ha usado la recomendada para esfingolípidos, esto es, la mezcla de diclorometano:metanol en una proporción 1:1, también para la preparación de las disoluciones de los esfingolípidos y de los fluoróforos de la detección.

El sistema HPLC y el modo de introducción del fluoróforo es diferente al expuesto para los polímeros. Se ha usado una columna de fase estacionaria reversa (octadecilsilano, C₁₈). Dado que los fluoróforos usados (coralina y berberina) no se retienen en esta fase estacionaria, el fluoróforo correspondiente se ha disuelto en la fase móvil que posteriormente se ha introducido en la columna, evitando de esta manera el uso de una segunda bomba para la disolución de detección. Para una muestra dada, se obtiene una mayor sensibilidad usando el sistema con una sola bomba.

Todos los esfingolípidos ensayados proporcionan picos cromatográficos positivos con respecto a la línea de base (aumentos de fluorescencia). En las condiciones utilizadas, la berberina proporciona una sensibilidad mayor que la coralina. También se han ensayado varias concentraciones de berberina. Los resultados obtenidos muestran una respuesta lineal entre la señal de fluorescencia (F) y la concentración de berberina.

Se han obtenido curvas de calibración para varios esfingolípidos en las condiciones mencionadas: D-esfingosina, N-acetil-D-esfingosina, esfingomiolina, glucocerebrósido y galactocerebrósido. La tabla 4.4 muestra la pendiente de las curvas de calibración y el intervalo de respuesta lineal. Los cinco esfingolípidos proporcionan una sensibilidad similar, lo cual es coherente con los resultados obtenidos con los polímeros y demuestra que la detección FDIC puede usarse para su detección.

Esfingolípido	Pendiente ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g}\cdot 10^2$)
D-esfingosina	69030	8.12
N-acetil-D-esfingosina	70080	3.80
Glucocerebrósido	54490	6.92
Galactocerebrósido	57730	3.15
Esfingomielina	58145	5.33

Tabla 4.4.- Calibrados de los distintos esfingolípidos en medio diclorometano:metanol (1:1) con la columna Supelcosil™. La fase móvil es berberina de 10 mgL^{-1} a 0.8 mLmin^{-1} .

Los picos obtenidos para estos compuestos presentan una estructura compleja (ver en figura 4.11 los resultados obtenidos para esfingomielina, por ejemplo). Se observa un primer pico muy intenso y bien definido, seguido de una segunda señal más baja y una tercera menor aún. Como se ve en la figura, este desdoblamiento de picos no afecta a la linealidad de las respuestas (obtenidas a partir del primer pico), pero puede dificultar la resolución cromatográfica. Hasta la fecha no se tiene una hipótesis razonable de estos hechos. Una posible causa podrían ser los efectos de mezcla que se producen por los caudales que provienen de ambas bombas, que pueden dar lugar a la aparición de zonas de inhomogeneidad en cuanto a los valores de ϵ y n de la mezcla obtenida. Existen en la bibliografía diferentes ensayos en los que se observan los efectos de mezcla⁸⁸.

La obtención de picos positivos concuerda con lo que predice el modelo, debido a la elevada constante dieléctrica de la mezcla cloroformo/metanol y el alto índice de refracción que presentan los esfingolípidos en general.

88 Lammertyn, J.; Verboven, P.; Veraverbeke, E. A.; Vermeir, S.; Irudayaraj, J.; Nicolai, B. M.; "Analysis of Fluid Flow and Reaction in a Flow Injection Analysis Biosensor" *Sensor Actuator B*, **2006**, 114, 728-736.

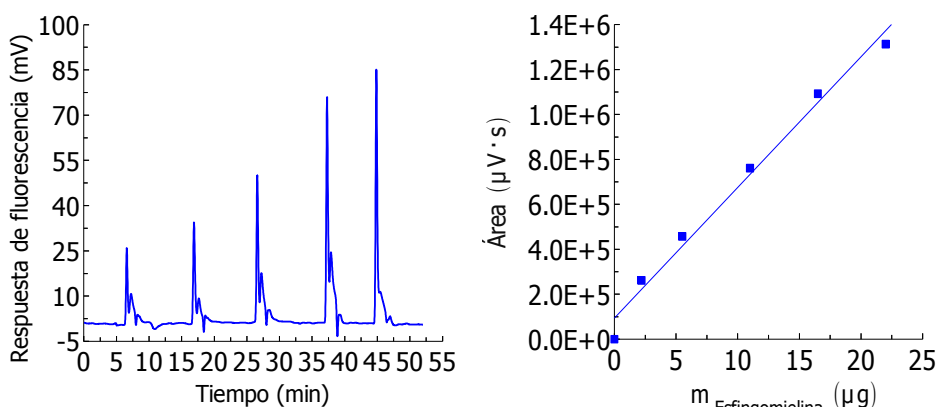


Figura 4.11.- Cromatograma y regresión lineal de distintas cantidades de esfingomielina, obtenidas por el método descrito.

4.4.3.- Repetibilidad y sensibilidad de HPLC-FDIC

Se han obtenido señales con buena repetibilidad. Como ejemplo, se ha calculado la desviación estándar relativa de una muestra patrón de poliestireno de 520000 gmol^{-1} medida durante varios días en las mismas condiciones (fase móvil de diclorometano 1 mLmin^{-1} y detección con berberina de 20 mgL^{-1} en metanol a 0.8 mLmin^{-1}). Ésta ha sido de 7.71 % donde se ha calculado un área media de $50692 \pm 3620 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ ($n=7$, para un intervalo de confianza del 95%).

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, los métodos analíticos basados en la detección FDIC se han desarrollado principalmente para TLC. La sensibilidad de la detección en estos métodos es alta puesto que el entorno rígido proporcionado por la *silica gel* favorece la interacción directa de la cadena hidrocarbonada de los analitos (la cual es altamente polarizable) con el fluoróforo, en ausencia de disolvente.

En el caso de los polímeros en medio orgánico, si bien la técnica permite caracterizar convenientemente el peso molecular de los polímeros, las señales

obtenidas son, en ocasiones, de baja intensidad y el ruido instrumental impide distinguirlas correctamente. En las regresiones de los polímeros se han obtenido valores negativos para masa=0. Debido a esto, el intervalo de aplicación de la técnica con berberina se limita a polímeros de peso molecular mayor de 10000, que es el límite inferior de los polímeros detectados en medio orgánico.

Este problema se ha intentado solventar de varias maneras: inyectando muestras más concentradas usando un bucle de menor volumen, usando coralina para la detección, trabajando con distintas fases móviles y disolventes para la detección, variando los caudales de las bombas, etc. Pero en todos los casos se ha preferido trabajar en condiciones cromatográficas reales, es decir, no sobrepasar los límites de la columna y priorizar una buena línea de base. El trabajo futuro apunta al uso de fluoróforos que proporcionen mayores cambios de intensidad por unidad de masa de analito.

Sin embargo, hay ciertos casos en los que la respuesta FDIC en medio líquido es muy sensible y puede ser de bastante utilidad analítica. Éste es el caso de aquellos lípidos que presentan estructuras muy ordenadas en medios apolares, como el caso de la sulfátida. En investigaciones que se están llevando a cabo en otra Tesis Doctoral del grupo, se muestra una detección FDIC muy sensible en estos medios, por debajo de la concentración micelar crítica de este lípido.

4.5.- CONCLUSIONES

1.- Los resultados concuerdan con los obtenidos en espectroscopía. Utilizando diclorometano como fase móvil se obtienen disminuciones atribuibles a la alteración del equilibrio de formación de pares iónicos. Empleando agua se observan aumentos de señal tal como predice el modelo.

2.- En general, se han obtenido buenos resultados, pues a pesar de la complejidad del sistema, pueden detectarse polímeros de distinta naturaleza en distintos medios.

3.- Se ha determinado que la variación de la señal en el caso de polímeros grandes es función del número de moles del polímero.

4.- Pueden detectarse también mezclas de ellos, lo que abre una vía hacia el desarrollo de un nuevo sistema de detección de distribuciones de polímeros de distinto peso molecular.

5.- Se ha demostrado que, eligiendo bien las diferentes variables puestas en juego, se puede modificar el tipo de señal que se quiere obtener, adecuándola a las necesidades concretas de cada tipo de análisis.

6.- Aunque existen problemas de sensibilidad, relacionados con el sistema en sí y con la debilidad del fenómeno, se ha obtenido buena repetibilidad en las medidas.

PARTE II:
ESTUDIO Y UTILIZACIÓN DEL
EFFECTO DEL ENTORNO EN LA
INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
EN MEDIO SÓLIDO:
SENSORES ÓPTICOS

CAPÍTULO 5:
MODELO ÓPTICO PARA
SENSORES DE FLUORESCENCIA

5.- MODELO ÓPTICO PARA SENSORES DE FLUORESCENCIA

5.1.- INTRODUCCIÓN

Muchos de los sensores ópticos actuales se basan en las medidas de absorción o fluorescencia en superficies sólidas que contienen el transductor activo y/o el reactivo óptico. A pesar de la existencia de una cantidad sustancial de trabajo sobre la naturaleza del reactivo que se usa, se ha prestado relativamente poca atención al desarrollo de modelos matemáticos que describan fácilmente pero con precisión el comportamiento óptico y permitan predecir la información analítica. Las publicaciones de Eddowes⁸⁹, Barlett y Toh⁹⁰ o Álvarez-Icaza y Bilitewski⁹¹ son excepciones significativas a esto, pero tampoco en estos casos se considera el comportamiento óptico, como aspecto más destacable.

En este capítulo se propone un modelo óptico originalmente diseñado para sensores de fluorescencia enzimáticos pero aplicable al uso de la FDIC como base de una plataforma sensora inespecífica, de forma que se pueda predecir el efecto que producen la concentración del fluoróforo, el coeficiente de dispersión de la lámina sensora y el efecto de filtro interno sobre la señal de fluorescencia.

5.1.1.- Teoría de Kubelka-Munk

La descripción matemática de la propagación de la luz en un medio se suele hacer de forma simplificada utilizando la denominada "Teoría del

89 Eddowes, M. J. en: Cass, A. E.G. (Editor); "Biosensors: A practical Approach" The Practical Approach Series, IRL Press (Oxford University Press), **1990**, Oxford, p. 237.

90 Barlett, P.; Toh, Ch-S.; en: Cooper, J. M.; Cass, A. E. G. (Editors); "Biosensors (Practical Approach Series)" (2nd Edition) The Practical Approach Series, Oxford University Press, **2004**, Oxford, p. 59.

91 Álvarez-Icaza, M.; Bilitewski, U.; "Mass Production of Biosensors" *Anal. Chem.* **1993**, 65, 525A-533A.

Transporte Radiativo (TTR)⁹²⁻⁹³. En esta teoría se considera que los procesos básicos de interacción de la radiación con el medio (absorción, emisión y dispersión) son independientes entre sí y, además, se ignoran las propiedades ondulatorias de la radiación (la polarización o las interferencias de la radiación) o bien, se añaden como un término adicional. Para aplicar la TTR, se considera un elemento de volumen infinitesimal del medio a estudiar y, tras realizar un balance de energía, se obtienen las correspondientes ecuaciones diferenciales-integrales (ecuaciones de transferencia radiativa) cuya resolución da el modelo deseado. Dependiendo de cómo se diseña esta ecuación se pueden obtener dos modelos, que son: la aproximación de difusión (en la que el balance de energía se expresa a partir de la primera ley de difusión de Fick⁹⁴) y la teoría de Kubelka-Munk⁹⁵, que es la más aceptada.

La "Teoría de dos flujos de Kubelka-Munk" fue descrita inicialmente para explicar el comportamiento óptico de la pintura absorbida sobre una superficie, pero ha sido aplicada o tomada como punto de partida, de modo casi general, para explicar el comportamiento de la luz en sólidos de sistemas físicos. Esta teoría parte de varios supuestos:

a) El medio que se está estudiando es homogéneo.

b) El medio es una lámina de dimensiones finitas en el eje z, es decir, tiene un determinado espesor L, pero es infinita en las otras dos dimensiones. Esto es muy importante ya que implica que la radiación sólo puede salir del medio en la dirección del eje z.

92 Ishimaru, A.; "Diffusion of Light in Turbid Material" *Appl. Opt.* **1989**, 28, 2210-2215.

93 Oelkrug, D.; en: Lakowicz, J. R.; (Editor) "Topic in Fluorescence Spectroscopy" Vol. 4, (Ch. 8): Probe Design and Chemical Sensing, 3rd. Ed. Plenum Press, **1994**, New York, p. 3223-253 .

94 Matcher, S. J.; Elwell, C. E.; Cooper, C. E.; Cope, M.; Delphy, D.T.; "Performance Comparison of Several Published Tissue Near-Infrared Spectroscopy Algorithms" *Anal. Biochem.* **1995**, 227, 54-68.

95 Kubelka, P.; Munk, F.; "Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche" *Z. Tech. Phys.* **1931**, 12, 593-601.

c) El medio se ilumina con luz monocromática y difusa en la dirección del eje z.

A partir de aquí se deduce implícitamente que dentro del medio la radiación sólo viaja en la dirección del eje z, pero a la hora de salir del medio lo hace en los dos sentidos, el incidente y el de retroceso, obteniéndose los haces I_f (sentido incidente o "forward") e I_b (sentido de retroceso o "backward"). Sólo cuando la radiación deja el medio se asume una propagación en todas las direcciones disponibles del espacio. La condición de iluminación difusa (condición c)) es muy importante porque si se aplica iluminación con radiación colimada es posible que parte de la radiación incidente sea reflejada especularmente, y en este caso, se tengan que añadir otras dos ecuaciones diferenciales considerando los cambios de intensidad de esas componentes especulares (este es el "Modelo de cuatro flujos de Kubelka-Munk"^{96 97 98}). En cualquier caso, el modelo de dos flujos se ha usado mucho para describir las propiedades ópticas de materiales inhomogéneos⁹⁹ y será el punto de inicio.

Para desarrollar el modelo matemático, se parte de una lámina de espesor L sobre la que se hace incidir una radiación monocromática de intensidad I_0 . A continuación se considera un elemento diferencial de espesor dx deduciéndose qué ocurre con la intensidad de la radiación dentro de ese elemento (figura 5.1).

96 Murphy, A. B.; "Modified Kubelka-Munk Model for Calculation of the Reflectance of Coatings with Optically-rough Surfaces" *J. Phys. D.* **2006**, 39, 3571-3581.

97 Niklasson, G. A.; "Comparison between Four Flux Theory and Multiple Scattering Theory" *Appl. Opt.* **1987**, 26, 4034-4036.

98 Vargas, W. E.; Niklasson, G. A.; "Applicability conditions of the Kubelka-Munk Theory " *Appl. Opt.* **1997**, 36, 5580-5586.

99 Ver referencia anterior: *Appl. Opt.* **1997**, 36, 5580-5586.

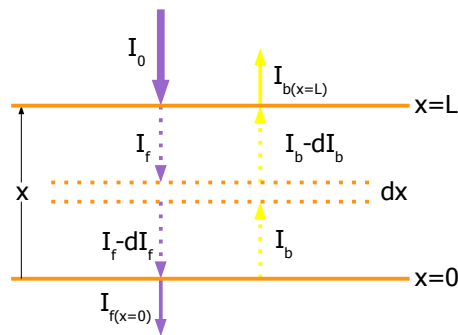


Figura 5.1.- Planteamiento general de la teoría de Kubelka-Munk.

El planteamiento de Kubelka-Munk es establecer un balance energético en ese elemento diferencial para las dos haces, I_f e I_b . El haz I_f pierde intensidad no sólo por absorción sino también por dispersión. A cambio, I_f gana intensidad por la luz dispersada hacia él en los elementos diferenciales vecinos. Por tanto:

$$-dI_f = -(s_{EX}^{KM} + k^{KM}) I_f dx + s_{EX}^{KM} I_b dx \quad (5.1a)$$

Le ocurre lo mismo al haz que viaja en sentido contrario (I_b):

$$dI_b = -(s_{EX}^{KM} + k^{KM}) I_b dx + s_{EX}^{KM} I_f dx \quad (5.1b)$$

siendo k^{KM} y s_{EX}^{KM} los coeficientes de absorción y dispersión de Kubelka-Munk respectivamente, a la longitud de onda de excitación (se necesita el superíndice KM para las diferentes comparaciones del modelo). Las ecuaciones del tipo de las formuladas en (5.1a) y (5.1b) reciben el nombre de "Ecuaciones de Transferencia de Energía". Como indicó posteriormente Paul Kubelka¹⁰⁰, las ecuaciones (5.1a) y (5.1b) son una simplificación de la ecuación original cuando el material es perfectamente mate, la iluminación es perfectamente difusa y el medio es totalmente isotrópico.

100 Kubelka, P.; "New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials. Part I" *J. Op. Soc. Am.* **1948**, 38, 448-457.

La resolución de este sistema de ecuaciones diferenciales para esa lámina conduce a:

$$I_f = I_0 \frac{a^{KM} \text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} x) + b^{KM} \text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} x)}{a^{KM} \text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) + b^{KM} \text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L)} \quad (5.2a)$$

$$I_b = I_0 \frac{\text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} x)}{a^{KM} \text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) + b^{KM} \text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L)} \quad (5.2b)$$

donde Sh y Ch son las funciones trigonométricas hiperbólicas definidas como:

$$\text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) = \frac{e^{b^{KM} s_{EX}^{KM} L} - e^{-b^{KM} s_{EX}^{KM} L}}{2} \quad (5.3a)$$

$$\text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) = \frac{e^{b^{KM} s_{EX}^{KM} L} + e^{-b^{KM} s_{EX}^{KM} L}}{2} \quad (5.3b)$$

y a^{KM} y b^{KM} son:

$$a^{KM} = \frac{s_{EX}^{KM} L + k^{KM} L}{s_{EX}^{KM} L} = \frac{s_{EX}^{KM} + k^{KM}}{s_{EX}^{KM}} \quad (5.3c)$$

$$b^{KM} = \sqrt{(a^{KM})^2 - 1} = \frac{1}{s_{EX}^{KM}} \sqrt{2k^{KM} s_{EX}^{KM} + (k^{KM})^2} \quad (5.3d)$$

A partir de las ecuaciones (5.2a) y (5.2b) se puede establecer cuánto valdrá I_f después de atravesar la lámina en el sentido incidente (en $x=0$, ya que según la figura 5.1, este punto corresponde a ese valor de x), así como I_b después de atravesar la lámina en sentido opuesto ($x=L$). Sustituyendo:

$$\frac{I_{f(x=0)}}{I_0} = \frac{b^{KM}}{a^{KM} \text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) + b^{KM} \text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L)} \quad (5.4a)$$

$$\frac{I_{b(x=L)}}{I_0} = \frac{\text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L)}{a^{KM} \text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) + b^{KM} \text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L)} \quad (5.4b)$$

Estas ecuaciones permiten conocer la intensidad de luz en el sentido incidente y reflejado respecto de la incidente como consecuencia de la interacción de la luz con la superficie sólida. El cociente dado en la ecuación (5.4a) es la transmitancia del material (T) y el de la ecuación (5.4b) es su reflectancia (R). Como es bien sabido si el espesor del material es muy grande ($T \approx 0$), la reflectancia se hace independiente de L y se representa por R_∞ . En estas condiciones la ecuación (5.4b) se transforma en:

$$\frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{k^{KM}}{s^{KM}}$$

que es la ecuación que se utiliza en espectroscopía para la reflectancia.

5.1.2.- Modelos para fluorescencia en sólidos

En la bibliografía se pueden encontrar varios tratamientos matemáticos que, partiendo de la teoría de Kubelka-Munk, permiten la descripción general de la fluorescencia producida en superficies sólidas. Las diferencias entre unas y otras radican, no sólo en la forma de resolver matemáticamente el problema, sino también en la definición de los valores de los coeficientes de dispersión (s^{KM}) y absorción (k^{KM}). Se comentan los más interesantes.

a) *Modelo de Goldman*

Es uno de los modelos más completos, ya que ha abordado tanto las medidas de absorción como las medidas de fluorescencia. Es importante indicar que fue desarrollado para explicar las señales obtenidas en cromatografía de capa fina¹⁰¹, tanto por absorción (densitometría) como por fluorescencia. Para la parte de absorción¹⁰², el modelo desarrollado es básicamente el de Kubelka-Munk, descrito en las ecuaciones (5.4a) y (5.4b). A partir de estas ecuaciones se obtienen tanto la transmitancia, T , de la lámina (señal leída por transmisión) como la reflectancia, R , (señal leída por reflexión) según:

$$T = \frac{I_f}{I_0} = \frac{b^{KM}}{a^{KM} \text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) + b^{KM} \text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L)} \quad (5.5a)$$

$$R = \frac{I_b}{I_0} = \frac{\text{Sh}(b^{KM} s^{KM} L)}{a^{KM} \text{Sh}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L) + b^{KM} \text{Ch}(b^{KM} s_{EX}^{KM} L)} \quad (5.5b)$$

donde k^{KM} y s_{EX}^{KM} eran los auténticos coeficientes de absorción y dispersión del medio, es decir:

$$k^{KM} = k = 2.3 \sum_i \epsilon_i C_i \quad s_{EX}^{KM} = s_{EX} \quad (5.6)$$

Lo que hizo Goldman fue darle una formulación analítica a las ecuaciones anteriores. Para ello consideró que cuando se hace incidir radiación sobre un punto de la placa de TLC, la dispersión es provocada exclusivamente por el material de la placa de *silica gel* (el coeficiente de dispersión es característico de un medio dispersante) mientras que la absorción es sólo debida a la sustancia

101 Goldman, J.; Goodall, R. R; "Quantitative Analysis on Thin Layer Chromatograms: A Theory for Light Absorption Methods with an Experimental Verification" *J. Chromatogr. A.* **1968**, 32, 24-42.

102 Goldman, J.; "Quantitative analysis on Thin-Layer Chromatograms: Theory of Absorption and Fluorescent Densitometry" *J. Chromatogr. A.* **1973**, 78, 7-19.

que está siendo detectada (analito, A), es decir:

$$s_{EX} = s_{SILICA} \quad k = 2.3 \sum_i \epsilon_i C_i \quad (5.7)$$

donde ϵ_A es la absortividad molar y C_A la concentración de analito.

Al incluir (5.6) y (5.7) en (5.3), el autor pudo hacer una serie de simulaciones teóricas que le permitieron estudiar cómo serían las respuestas cuantitativas que obtendría para los parámetros T y R en función de la k, es decir, de la concentración de analito. En las figuras 5.2 y 5.3 se muestran los datos simulados para los valores de s y k más habituales. En ellas se representan T y R, medidas en "formato" absorbancia, es decir, $-\log T$ y $-\log R$ en función de kx (magnitud proporcional a la concentración de analito) para diferentes valores de sx . Las líneas representadas estarían simulando estudios de calibración.

Sus conclusiones generales son que las lecturas realizadas por T dan lugar a rangos de respuesta lineal muy superiores a los observados con R, si bien estos dependen de una forma crítica de los valores del coeficiente de dispersión del material.

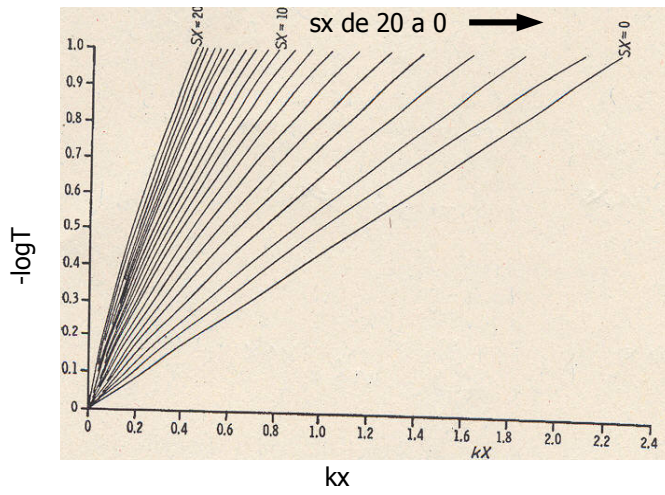


Figura 5.2.- $-\log T$ en función de kx para diferentes valores de sx .

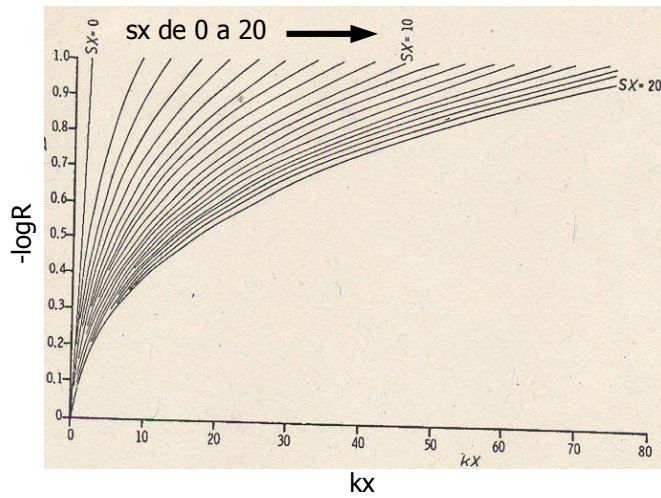


Figura 5.3.- $-\log R$ en función de kx para diferentes valores de sx .

Desde el punto de vista de esta Tesis Doctoral, lo que realmente interesa es que Goldman también usa la teoría de Kubelka-Munk para conseguir un modelo que describe la luminiscencia de superficies sólidas para ser usada como detector de TLC. Para ello considera lo siguiente:

a) Los procesos de excitación y fluorescencia actúan de forma independiente dentro del medio ya que son de diferente longitud de onda. Por lo tanto, las ecuaciones (5.5a) y (5.5b) se siguen cumpliendo para la radiación de excitación.

b) Al igual que la radiación de excitación, dentro del medio sólo habrá dos haces de fluorescencia desplazándose a lo largo del eje z pero en sentidos opuestos. Estos haces son, por analogía, el haz F_f ("*forward*") y el F_b ("*backward*").

c) Para obtener los valores de F_f y F_b a la salida de la lámina hay que plantear un nuevo par de ecuaciones diferenciales adicionales similares a (5.1a) y (5.1b)

$$-dF_f = -[s_{EM}F_f + s_{EM}F_b + \frac{1}{2}(I_f + I_b)\Phi k]dx \quad (5.8a)$$

$$dF_b = -[s_{EM}F_f - s_{EM}F_b + \frac{1}{2}(I_f + I_b)\Phi k]dx \quad (5.8b)$$

donde s_{EM} es el coeficiente de dispersión a la longitud de onda de fluorescencia (que Goldman atribuye de nuevo al medio y o al analito) y Φ el rendimiento cuántico de fluorescencia. Al igual que para las componentes de absorción, cada elemento diferencial pierde intensidad por la luz que se dispersa fuera de él, y gana intensidad tanto por la luz que se dispersa hacia él por elementos próximos

como por fluorescencia (el $\frac{1}{2}$ es consecuencia de considerar que la mitad de la radiación fluorescente va globalmente en cada sentido, aunque se podrían definir otros patrones).

El tratamiento de este par de ecuaciones diferenciales supone logicamente incluir los valores de I_f e I_b dados por las ecuaciones (5.2a) y (5.2b) en las nuevas ecuaciones diferenciales (5.8a) y (5.8b), y luego resolver el sistema (se recuerda que x es la variable dependiente), por lo que la resolución matemática es muy compleja. El resultado obtenido fue:

$$F_{f,G} = I_o \Phi \left[\frac{[b(a-1)s_{EX} + 2bs_{EM}]Sh(bs_{EX}L)}{2bs_{EX}(s_{EM}L + 1)[aSh(bs_{EX}L) + bCh(bs_{EX}L)]} + \frac{[b^2s_{EX} + 2s_{EM}(a-1)]Ch(bs_{EX}L) - [b^2(2s_{EM}L + 1)s_{EX} + 2s_{EM}(a-1)]}{2bs_{EX}(s_{EM}L + 1)[aSh(bs_{EX}L) + bCh(bs_{EX}L)]} \right] \quad (5.9a)$$

$$F_{b,G} = I_o \Phi \left[\frac{[b(2s_{EM}L + 1)(a-1)s_{EX} - 2bs_{EM}]Sh(bs_{EX}L)}{2bs_{EX}(s_{EM}L + 1)[aSh(bs_{EX}L) + bCh(bs_{EX}L)]} + \frac{[b^2(2s_{EM}L + 1)s_{EX} - 2s_{EM}(a-1)]Ch(bs_{EX}L) - [2s_{EM}(a-1) - b^2s_{EX}]}{2bs_{EX}(s_{EM}L + 1)[aSh(bs_{EX}L) + bCh(bs_{EX}L)]} \right] \quad (5.9b)$$

Como se ha indicado, la aplicación más importante de estos modelos fue la TLC, de aquí que se considerer implícitamente que sólo hay una especie absorbente y/o fluorescente a la hora de realizar la lectura, y que no existe efecto de filtro interno.

De nuevo, a partir de estas ecuaciones Goldman realizó simulaciones que permitieron establecer cómo serían las curvas de calibrado obtenidas, evaluar los rangos de respuesta lineal para los fluoróforos embebidos en el material y predecir cómo sería el efecto del coeficiente de dispersión sobre ambas componentes de la luz fluorescente.

Las figuras 5.4 y 5.5 muestran estos resultados (las componentes están normalizadas en I_0 y en el rendimiento cuántico Φ): la primera para valores altos de kx y la segunda para valores bajos.

Las figuras muestran varios aspectos importantes:

- Al contrario de lo que ocurre en absorción, la componente F_b da mayores valores de intensidad que la componente en el sentido incidente, por lo que resulta más práctico leer la fluorescencia retrodispersada.

- En general, hay un comportamiento lineal mejor para F_b que para la componente F_r .

- Desde el punto de vista de la sensibilidad hay un valor óptimo de sx (en torno a 5).

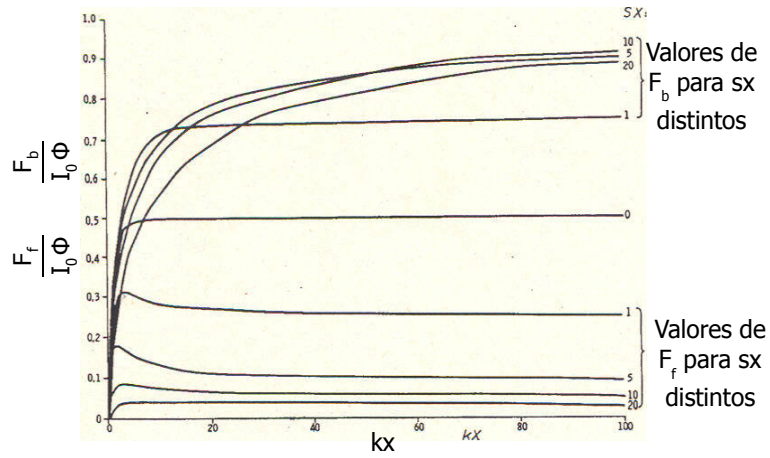


Figura 5.4.- Variación de F_f y F_b (normalizados para I_0 y Φ) con kx obtenidos para diferentes valores de sx (valores altos de kx).

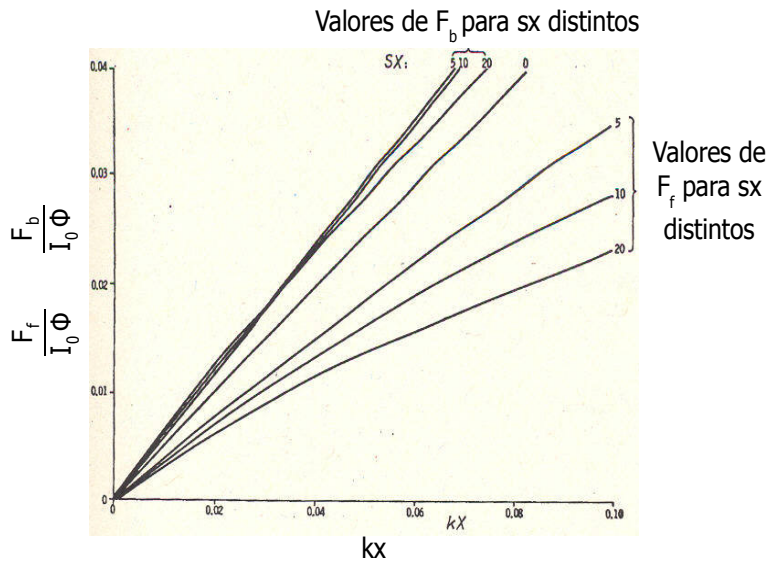


Figura 5.5.- Variación de F_f y F_b (normalizados para I_0 y Φ) con kx obtenidos para diferentes valores de sx (valores bajos de kx).

Posteriormente Hurtubise¹⁰³ ¹⁰⁴ demostró la aplicación de esta teoría para la cuantificación en TLC sobre placas de sílice y alúmina, estableciendo algunas conclusiones interesantes sobre el uso de F_b y F_f y determinando algunos valores del coeficiente de dispersión.

b) Modelo de Zweidinger y Winefordner

Casi simultáneamente, Zweidinger y Winefordner¹⁰⁵ propusieron un modelo para fosforescencia en fase sólida de baja temperatura, que también puede aplicarse para describir la luminiscencia sólida, usando la teoría de Kubelka-Munk de un modo algo distinto. En lugar de obtener la intensidad de luz emitida en los dos sentidos (F_f y F_b), calculan la cantidad total de intensidad de luz emitida. Para ello, aplicando un balance de energía sencillo, determinan la cantidad de luz absorbida (I_{abs}) por la sustancia retenida en el sólido:

$$I_{abs} = I_0 - I_f - I_b \quad (5.10)$$

donde I_f e I_b son las dos intensidades definidas por las ecuaciones (5.4a) y (5.4b). A continuación y aplicando la definición del rendimiento cuántico obtienen la intensidad total de luz emitida (F_{lum}):

$$F_{lum} = \Phi \cdot I_{abs} \quad (5.11)$$

103 Hurtubise, R. J.; "Comparison of Experimental and Theoretical Calibration Curves in Solid-Surface Fluorescence Analysis" *Anal. Chem.* **1977**, 49, 2160-2164.

104 Hurtubise, R. J.; "Luminiscence from solid surfaces" en Ed. S.G. Schulman "Molecular Luminescence Spectroscopy. Part 2: Methods and Applications" John Wiley & Sons, **1988**, USA, p. 1-77.

105 Zweidinger, R.; Winefordner, J. D.; "Improved Instrumentation for Phosphorimetry of Organic Molecules in Rigid Media" *Anal. Chem.* **1970**, 42, 639-646.

Al sustituir los valores de I_f e I_b en (5.10), ésta en (5.11) y reorganizar la ecuación resultante, derivan la siguiente expresión para la fluorescencia total emitida por el sólido:

$$F_{ZW} = 2\Phi \frac{k}{s_{EX} b} I_0 \left[\frac{\left(1 + \frac{k}{s_{EX} b}\right) e^{s_{EX} b \bar{L}} + \left(1 - \frac{k}{s_{EX} b}\right) e^{-s_{EX} b \bar{L}} - 2}{\left(1 + \frac{k}{s_{EX} b}\right)^2 e^{s_{EX} b \bar{L}} - \left(1 - \frac{k}{s_{EX} b}\right)^2 e^{-s_{EX} b \bar{L}}} \right] \quad (5.12)$$

siendo \bar{L} el paso óptico medio para reflectancia difusa (que los autores asemejan al espesor del sólido, L). El subíndice ZW se refiere al modelo de Zweidinger-Winefordner y los valores de k y s son iguales a los utilizados por Goldman. Como puede deducirse, obtienen la fluorescencia total emitida macroscópicamente en vez de la correspondiente a las componentes incidente y de retroceso.

A pesar de la aparente diferencia que existe entre los dos modelos, es relativamente fácil demostrar que son coherentes, es decir, que:

$$F_{ZW} = F_{f,G} + F_{b,G} \quad (5.13)$$

El resultado es, de hecho, lógico porque la dispersión no modifica la intensidad de fluorescencia global, sino que sólo afecta a la intensidad relativa de las componentes incidente y de retroceso. El modelo de Zweidinger-Winefordner también se ha aplicado para describir la fluorescencia de micropartículas en suspensión¹⁰⁶.

106 Horowitz, B.; Gridin, V. V.; Bulatov, V.; Schechter, I.; "Laser-Induced Fluorescence of Perylene in a Microparticle Suspension Environment" *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3191-3197.

Desde el punto de vista analítico, uno de los aspectos más importantes del modelo de Zweidinger-Winefordner proviene de las simplificaciones que se aplican sobre la ecuación (5.10), que permiten transformar un modelo muy complejo en una ecuación más práctica analíticamente. En particular son interesantes aquellas que derivan de considerar que el coeficiente de dispersión es elevado pero que:

- La dispersión es moderada y la concentración de analito es baja:

$$F = 4.6 \epsilon_A \Phi I_0 L \left(\frac{1}{1 + 2sL} \right) C_A \quad (5.14)$$

que expresa la existencia de un rango de respuesta lineal y el efecto negativo de la dispersión en la señal.

- La dispersión es muy alta y la concentración de analito es baja:

$$F = 2 \Phi I_0 L \sqrt{\frac{\epsilon_A C_A}{s}} \quad (5.15)$$

en cuyo caso la señal de fluorescencia depende de la raíz cuadrada de la concentración de analito.

c) Modelo de Oelkrug

Oelkrug ha realizado diferentes trabajos dirigidos a modelar la intensidad de fluorescencia desde superficies sólidas. Por ejemplo, ha desarrollado un modelo^{107 108} para la descripción de la fluorescencia de sólidos bajo iluminación puntual, lo que es de especial interés en microscopía de fluorescencia (usando radiación de excitación altamente enfocada). En el caso concreto de la fluorescencia bajo luz difusa, describió un modelo partiendo de las ecuaciones de Kubelka-Munk (incluyendo efectos de no homogeneidad del sólido), lo que complica el procedimiento matemático de resolución. Su aportación más interesante es incluir el efecto de la absorción del medio sólido (es decir, el efecto de filtro interno) a las longitudes de excitación ($k_{FI,EX}^{KM}$) y de fluorescencia ($k_{FI,EM}^{KM}$).

Las ecuaciones que obtuvo concuerdan con las ecuaciones de Goldman pues explican en términos generales el efecto del k_{abs} del fluoróforo en la fluorescencia. Además predicen apropiadamente que, para valores altos de este parámetro, la componente F_f tiende hacia un máximo para disminuir después. Sin embargo, el efecto de filtro interno no se explica satisfactoriamente. Esto puede verse en la figura 5.6.

Como se sabe, el efecto del filtro interno hace disminuir la intensidad de fluorescencia. En teoría cuanto mayor es el filtro interno la intensidad de fluorescencia es más baja.

107 Oelkrug, D.; en: Lakowicz, J. R. "Topic in Fluorescence Spectroscopy", volumen 4: "Probe Design and Chemical Sensing" (Ch. 8), Plenum Press, **1994**, p. 223-253.

108 Oelkrug, D.; Brun, M.; Mammel, U.; "Spatial Fluorescence Profiles in Multiple Light-Scattering Systems" *J. Lumiscen.* **1994**, 60-61, 422-425.

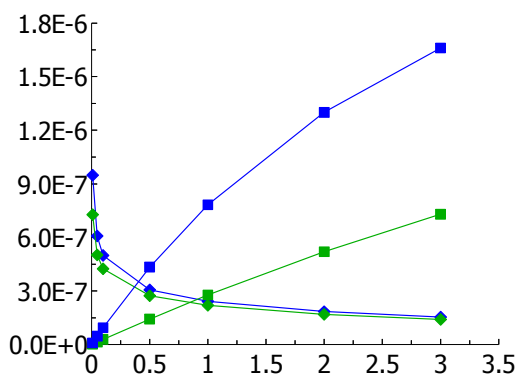


Figura 5.6.- Dependencia de los valores de $\frac{F}{I_0\Phi}$ con el coeficiente de absorción debido al efecto de filtro interno para el modelo de Oelkrug (F_r : ■, F_b : ■) y para el modelo propuesto en este trabajo (ecuaciones (5.33a) y (5.33b) (F_r : ◆, F_b : ◆). En todos los casos $k_{abs} = 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ y $k_{FI,EX} = k_{FI,EM}$.

d) Otros modelos

El modelo clásico para fluorescencia desarrollado por Pollak^{109 110} se basa también en la teoría de Kubelka-Munk, pero incorpora la idea de que el sólido se comporta frente a la radiación como un resistor eléctrico. Esto da lugar, por una parte, a una falta de comprensión del modelo en su conjunto, y por otra a ecuaciones algo más complejas. Posteriormente se han desarrollado también otras variantes más complejas de Kubelka-Munk aplicadas a reflectancia difusa¹¹¹.

109 Pollak, V.; "The Surface Intensity of Fluorescence Excited in a Turbid Medium", *Opt. Acta.* **1974**, 21, 51-58.

110 Pollak, V.; "Fluorescence Photometry in Thin-Layer Chromatograms and Electropherograms" *J. Chromatogr.* **1977**, 133, 49-57.

111 Berntsson, O.; Burger, T.; Folestad, S.; Danielsson, L. G.; Kuhn, J.; Fricke, J.; "Effective Sample Size in Diffuse Reflectance Near-IR Spectrometry" *Anal. Chem.* **1999**, 71, 617-623.

5.2.- PROPUESTA DE UN MODELO

El modelo que se propone se basa en los modelos anteriormente desarrollados, incluyendo nuevas mejoras que han ido surgiendo revisando algunos de los planteamientos. En particular las diferencias estriban en:

1.- Redefinir el paso óptico efectivo del sólido. A partir de aquí se propodrá un primer método mejorado respecto del modelo de Goldman, tomado como referencia.

2.- Revisar la forma de incluir el efecto de filtro interno. Se ha elaborado un segundo modelo (Modelo mejorado con efecto de filtro interno) que incluye tanto la mejor definición del paso óptico como la inclusión del filtro interno. Sin embargo, para que este modelo se pueda aplicar es necesario que exista algo de filtro interno en el sistema, ya que de lo contrario el modelo se vuelve inestable y hay que aplicar el modelo mejorado.

3.- Dar información sobre el coeficiente de dispersión.

4.- Considerar el efecto adicional producido por la celda sensora.

5.2.1.- El paso óptico efectivo

a) Planteamiento general

Uno de los aspectos más controvertidos de la teoría de Kubelka-Munk es el significado de los coeficientes de absorción (k^{KM}) y de dispersión (s^{KM}) en las ecuaciones (5.1a) y (5.1b). Como se ha indicado, los coeficientes se consideran normalmente como si fueran los coeficientes de absorción y dispersión a las longitudes de onda correspondientes (ecuaciones (5.7a) y (5.7c)), pero esto no

es algo implícito en la teoría de Kubelka-Munk. El mismo Kubelka¹¹² sugirió que ambos coeficientes no eran exactamente k y s pero sí estaban relacionados con ellos, y propuso una relación que más tarde fue señalada por otros autores^{113 114}.

Una de las aportaciones recientes más interesantes ha sido la desarrollada por Yang^{115 116} que ha elaborado la denominada "Teoría Revisada de Kubelka-Munk". En esencia esta teoría distingue entre la longitud del medio (L) y el paso óptico real (l). El primero es obviamente el espesor del sólido, mientras que el segundo pone de manifiesto que, como consecuencia de la dispersión, hay un cambio en la dirección de propagación del fotón dentro del medio y muestra una trayectoria no rectilínea, recorriendo una distancia superior a L y, por tanto, aumentando el paso óptico efectivo (figura 5.7).

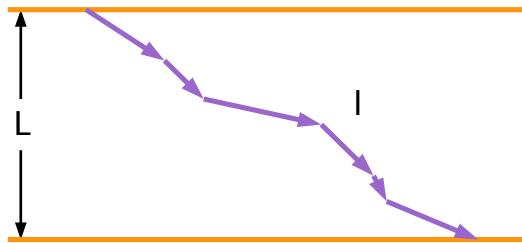


Figura 5.7.- Aspectos básicos de la teoría revisada de Kubelka-Munk.

112 Kubelka, P.; "New Contributions to the Optics of Intensity Light-scattering Material (Part I)" *J. Opt. Soc. Amer.* **1948**, 38, 448-457.

113 Oelkrug, D.; en: Lakowicz, J. R. "Topic in Fluorescence Spectroscopy", volumen 4: "Probe Design and Chemical Sensing" (Ch. 8), Plenum Press, **1994**, p. 223-253.

114 Philips-Invernizzi, B.; Dupont, D.; Caze, C.; "Bibliographical Review for Reflectance of Diffusing Media" *Opt. Eng.* **2001**, 40, 1082-1092.

115 Yang, L.; Kruse, B.; "Revised Kubelka-Munk Theory I. Theory and Application" *J. Opt. Soc. Am.* **2004**, 21, 1933-1941.

116 Yang, L.; Miklavcic, S. J.; "Theory of Light Propagation Incorporating Scattering and Absorption in Turbid Media" *Opt. Lett.* **2005**, 30, 792-794.

El cociente entre esas dos magnitudes es lo que el autor llama SIPV (*Scattering Induced Path Variation Factor*), es decir, variación del camino inducida por dispersión, y lo representa como μ :

$$\mu = \frac{I}{L} \quad (5.16)$$

Es claro, por tanto, que en las ecuaciones del modelo el valor de L debería ser sustituido por μL . En sus artículos, los autores describen un procedimiento para el cálculo de μ , que viene dado por:

$$\mu = \frac{I}{L} = \alpha s \frac{1 - 2b^{KM} s^{KM} L e^{-b^{KM} s^{KM} L} - e^{-2b^{KM} s^{KM} L}}{b^{KM} s^{KM} \left[1 - 2e^{-b^{KM} s^{KM} L} + e^{-2b^{KM} s^{KM} L} \right]} \quad (5.17)$$

De acuerdo con este planteamiento, la relación entre los coeficientes reales de dispersión y absorción (s y k), y los de Kubelka-Munk (k^{KM} y s^{KM}) dependen del valor de μ .

$$s_{EX}^{KM} = \mu s_{EX} \quad (5.18a)$$

$$k^{KM} = 2\mu k \quad (5.18b)$$

A la hora de incluir μ en la ecuación de fluorescencia es importante matizar que dicho parámetro sólo afecta a los coeficientes de la radiación de excitación. Puesto que, en ausencia de filtro interno, la radiación de fluorescencia no sufre absorción el paso óptico de esta radiación no se ve afectado por μ y su valor se calculará por:

$$s_{EM}^{KM} = s_{EM} \quad (5.18c)$$

Para entender la repercusión que este cambio tiene en el modelo, se ha estudiado teóricamente cómo varía μ para diferentes valores de k (entre 0.01 y 10 cm^{-1}), s (entre 10 y 1000 cm^{-1}) y L (entre 0.01 y 0.3 cm). Los resultados más representativos se muestran en el anexo A.5.1. En la figura 5.8 se muestra el resultado de calcular μ para diferentes valores de una recta de calibrado (diferentes valores de k), usando tres valores de s diferentes.

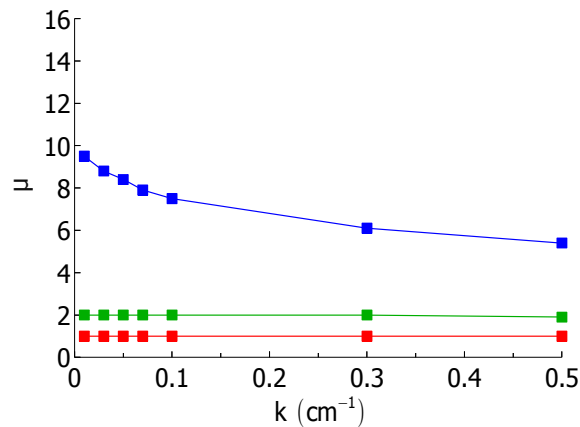


Figura 5.8.- μ para diferentes valores de k (cm^{-1}) y s (cm^{-1}): $s=30$ (■), $s=100$ (■) y $s=500$ (■) para $L=0.03$ cm .

En la figura 5.9 muestra los mismos resultados para una lámina de espesor mayor.

De estos resultados pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Los valores de μ son, en la mayoría de las condiciones, mayores que la unidad, lo que implica que el paso óptico efectivo es mayor que el real. Incluso en algunos casos estos valores están por encima de 10, lo que indicaría que la lámina se comporta como si su espesor fuera 10 veces mayor a lo que es en realidad.

- Al aumentar s aumenta el valor de μ . Así, cuanto mayor sea la capacidad de dispersión de un sólido mayor será su efecto sobre el paso óptico real.

- Al aumentar k disminuye el valor de μ . Dado que en fluorescencia se suele trabajar con valores de k más bajas que en absorción, el efecto será menor.

- Al aumentar L aumenta el valor de μ . Por tanto, el incremento del espesor provoca un efecto multiplicativo en el paso óptico.

- Una consecuencia adicional importante es que se pueden diseñar láminas con valores de s lo suficientemente pequeños como para que μ no sea significativamente distinto de 1.

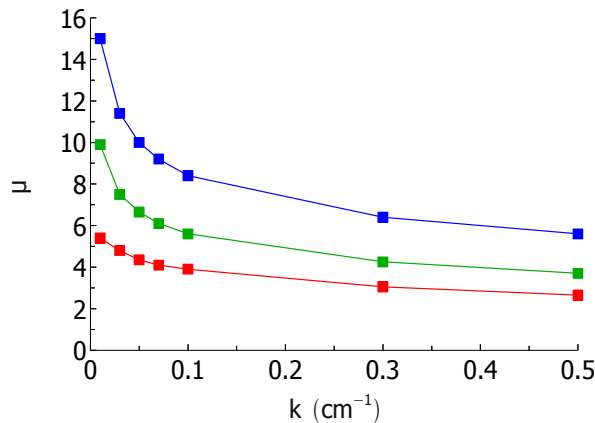


Figura 5.9.- μ para diferentes valores de k (cm⁻¹) y s (cm⁻¹): $s=30$ (■), $s=100$ (■) y $s=500$ (■) para $L=0.3$ cm.

b) Cálculo del valor de μ : simplificaciones

Para calcular el valor de μ , es necesario sustituir los valores de s^{KM} y k^{KM} dados por (5.18) en la ecuación (5.17), lo que da lugar a una expresión muy compleja que sólo permite calcular el valor de μ por tanteo, lo que complica la aplicabilidad del método. Para evitar este problema, Yang¹¹⁷ propone dos simplificaciones basadas en dos situaciones límite dependiendo de los valores relativos de k y s :

- Cuando la lámina interacciona mucho con la luz, es decir, la lámina presenta una elevada absorción y dispersión, entonces $b^{KM} s^{KM} L \gg 1$ y la expresión (5.17) se puede simplificar a:

$$\mu = \left[\frac{s^2}{k^2 + ks} \right]^{\frac{1}{4}} \quad (5.19)$$

Así el valor de μ puede predecirse de los coeficientes de dispersión y absorción. La figura 5.10 muestra el efecto de k y s cuando $L=0.03$ cm, el espesor común (por ejemplo, para placas de TLC y láminas de poliacrilamida usadas en este trabajo).

- Cuando la lámina interacciona muy poco con la luz, es decir, la absorción de la lámina es muy baja en comparación con su dispersión, es decir, $b^{KM} s^{KM} L \ll 1$:

$$\mu = 2sL \quad (5.20)$$

117 Yang, L.; Miklavcic, S. J.; "Revised Kubelka-Munk Theory III. A General Theory of Light Propagation in Scattering and Absorptive Media" *J. Opt. Soc. Am.* **2005**, 22, 1866-1873.

se obtiene una expresión mucho más sencilla y en la que μ ya no depende del coeficiente de absorción.

Dependiendo de las características de la lámina sensora se usará una u otra simplificación.

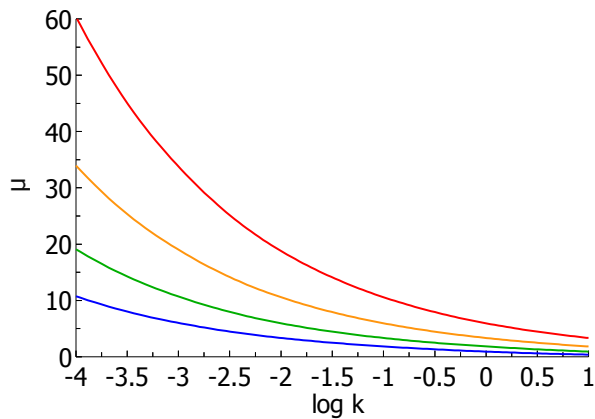


Figura 5.10.- Dependencia de μ con k para distintos valores de s (en todos los casos $L=0.03$ cm). $s=1000$ (-), $s=100$ (-), $s=10$ (-) y $s=1$ (-).

c) Formulación del modelo mejorado

La inclusión del valor de μ en las ecuaciones de Goldman conforma el primer modelo mejorado propuesto. Para entender el impacto que puede tener la introducción de la μ sobre los modelos ya existentes, es interesante ver como cambian los resultados obtenidos en un modelo ya conocido, como el de Goldman. Cuando se definen los coeficientes de Kubelka-Munk como en las ecuaciones (5.18), el modelo de Goldman para $F_{f,G}$ y $F_{b,G}$ se puede reformular como:

$$F_{f,G(\mu)} = I_0 \Phi \left[\frac{[b(a-1)\mu s_{EX} + 2bs_{EM}] \text{Sh}(b\mu s_{EX} L)}{2b\mu s_{EX}(s_{EM} L + 1)[a\text{Sh}(b\mu s_{EX} L) + b\text{Ch}(b\mu s_{EX} L)]} \right. \\ \left. + \frac{[b^2\mu s_{EX} + 2s_{EM}(a-1)] \text{Ch}(b\mu s_{EX} L) - [b^2(2s_{EM} L + 1)\mu s_{EX} + 2s_{EM}(a-1)]}{2b\mu s_{EX}(s_{EM} L + 1)[a\text{Sh}(b\mu s_{EX} L) + b\text{Ch}(b\mu s_{EX} L)]} \right] \quad (5.21a)$$

$$F_{b,G(\mu)} = I_0 \Phi \left[\frac{[b(2s_{EM} L + 1)(a-1)\mu s_{EX} - 2bs_{EM}] \text{Sh}(b\mu s_{EX} L)}{2b\mu s_{EX}(s_{EM} L + 1)[a\text{Sh}(b\mu s_{EX} L) + b\text{Ch}(b\mu s_{EX} L)]} \right. \\ \left. + \frac{[b^2(2s_{EM} L + 1)\mu s_{EX} - 2s_{EM}(a-1)] \text{Ch}(b\mu s_{EX} L) - [2s_{EM}(a-1) - b^2\mu s_{EX}]}{2b\mu s_{EX}(s_{EM} L + 1)[a\text{Sh}(b\mu s_{EX} L) + b\text{Ch}(b\mu s_{EX} L)]} \right] \quad (5.21b)$$

donde el subíndice μ indica la inclusión de este parámetro en el modelo, a y b son ahora:

El modelo original predice que s_{EX} no afecta a la intensidad mientras que el modelo mejorado predice que a mayor s_{EX} hay mayor intensidad, debido al incremento en el valor de μ . En ambos casos s_{EM} apenas afecta a la fluorescencia. Para ver esto se han simulado los valores de intensidad de fluorescencia sobre las dos componentes de F (F_f y F_b) que se obtienen con el nuevo modelo dado por las ecuaciones (5.21a) y (5.21b), en comparación con los que se deducen si no se hace la corrección, es decir, considerando $\mu=1$. En la figura 5.11 se representan los valores de F_f y F_b normalizados en I_0 y Φ , para un espesor $L=0.03$ cm.

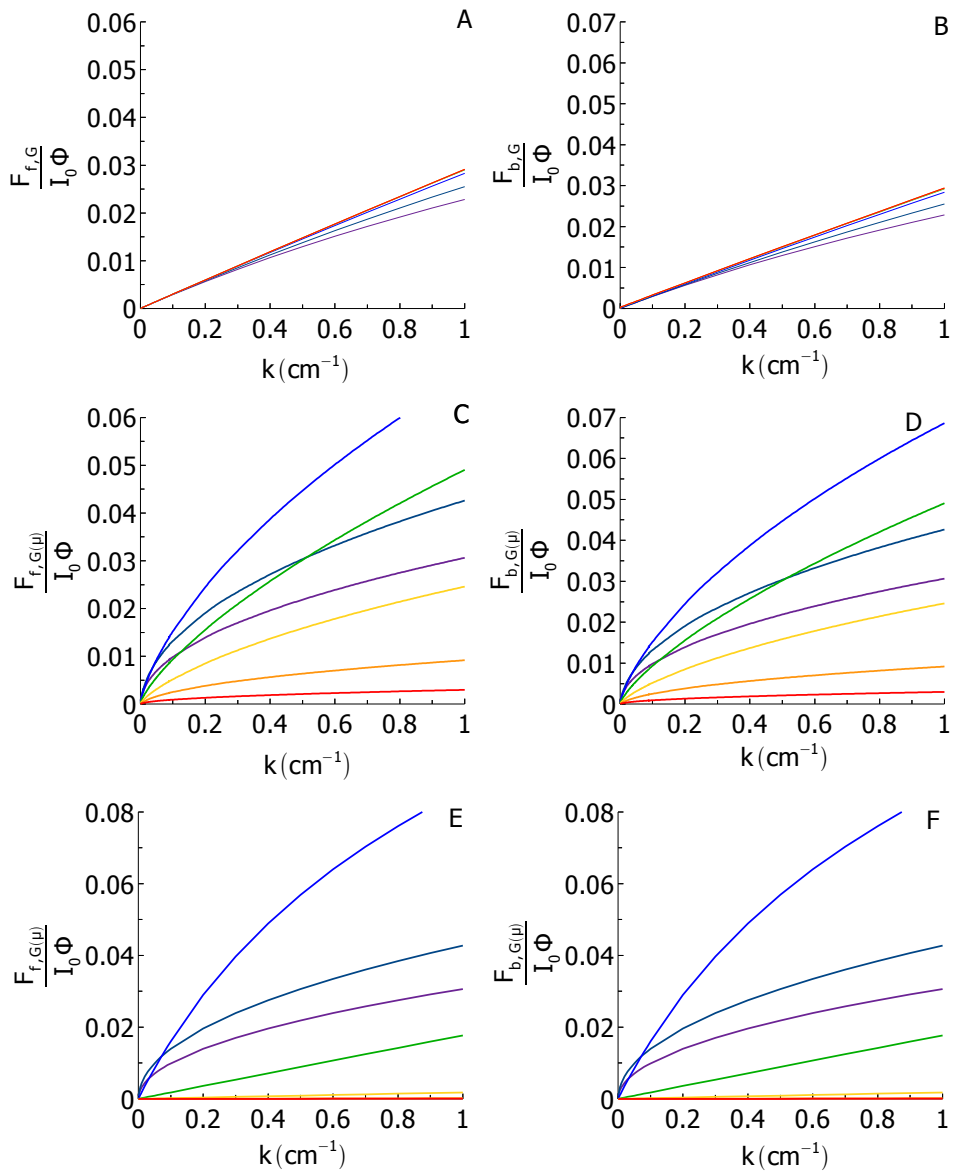


Figura 5.11.- Valores de $F_{f,G}$ (A), $F_{b,G}$ (B), $F_{f,G(\mu)}$ (C) y $F_{b,G(\mu)}$ (D) (con μ de la ecuación (5.23)) y $F_{f,G(\mu)}$ (E) y $F_{b,G(\mu)}$ (F) (con μ de la ecuación (5.24)) con respecto a k (cm^{-1}) para $L=0.03$ cm y distintos valores de s (cm^{-1}): 0.01 (-), 0.1 (-), 1 (-), 10 (-), 100 (-), 500 (-) y 1000 (-).

Como puede apreciarse, el hecho de no considerar el paso óptico efectivo predice que la variación de la intensidad de fluorescencia con k es prácticamente lineal para valores de s menores de 100. También hay una tendencia manifiesta a que la señal sea cada vez menor conforme aumenta s . Ahora bien, si se consideran los resultados obtenidos con el modelo de la teoría revisada de Kubelka-Munk, se aprecia que el comportamiento es más errático y menos predecible para ambas simplificaciones de μ . Sí es cierto que para s menor que 100 la respuesta es también lineal, pero por encima de este valor los rangos de linealidad se acortan mucho más rápido. Además, el efecto de s sobre la intensidad no es tan predecible como en el caso anterior.

Desde el punto de vista analítico, el aspecto más importante de estas ecuaciones es cómo predicen el efecto de la matriz sólida en la sensibilidad y el rango lineal de las medidas de fluorescencia. Como se ha expuesto en la ecuación (5.7) que el coeficiente de absorción (k) es directamente proporcional a la concentración de analito. Los coeficientes de dispersión dependen del tamaño y la concentración de los centros dispersivos de la lámina sensora. Cuando la relación de pesos moleculares del analito y reactivo es parecida a la del reactivo solo, no se espera que s cambie como consecuencia de la interacción analito-reactivo y se puede considerar independiente de la concentración de analito.

5.2.2.- Efecto de filtro interno. Modelo mejorado con efecto de filtro interno

a) Planteamiento general

Como se sabe, es bastante habitual que en fluorescencia se produzcan efectos de filtro interno por la disolución que contiene el analito. Como luego se verá, cuando el efecto proviene exclusivamente de la disolución, el problema puede minimizarse diseñando adecuadamente la celda de flujo. Sin embargo,

dado que las láminas sensoras en las que se encuentra el reactivo y a las que tiene que acceder el analito, no suelen ser selectivas en cuanto al transporte, es muy probable que las especies se instalen en ellas, provocando una interferencia adicional. Para racionalizar el error que esto provoca en la señal y estudiar su minimización, ésto se debe incluir también en el modelo.

¿Cómo incluir el efecto de filtro interno en el modelo? Se verá primero el efecto de filtro interno de excitación y luego el de emisión.

1.- El efecto de filtro interno sobre la longitud de onda de excitación hay que incorporarlo en las ecuaciones (5.1a) y (5.1b). Para hacerlo basta con considerar que el coeficiente de absorción (k^{KM}) tiene dos sumandos, el que corresponde a la radiación absorbida por el analito (k_{abs}^{KM}) y el debido al efecto de filtro interno de excitación ($k_{FI,EX}^{KM}$). Por tanto en estas ecuaciones el valor de k^{KM} viene ahora dado por:

$$k^{KM} = k_{FI,EX}^{KM} + k_{abs}^{KM} \quad (5.22)$$

Es importante indicar que, en las ecuaciones que definen la fluorescencia (5.8a) y (5.8b), el valor de k^{KM} sólo incluirá la parte correspondiente a la absorción.

2.- El efecto de filtro interno sobre la longitud de onda de fluorescencia ($k_{FI,EM}^{KM}$) hay que incorporarlo en las ecuaciones (5.8a) y (5.8b), como una fuente más de pérdida de intensidad en los correspondientes elementos diferenciales.

Con esto, las nuevas ecuaciones diferenciales para obtener el modelo matemático serán:

$$-dI_f = -\left(s_{EX}^{KM} + k_{abs}^{KM} + k_{FI,EX}^{KM}\right) I_f dx + s_{EX}^{KM} I_b dx \quad (5.23a)$$

$$dI_b = -\left(s_{EX}^{KM} + k_{abs}^{KM} + k_{FI,EX}^{KM}\right) I_b dx + s_{EX}^{KM} I_f dx \quad (5.23b)$$

para el proceso de absorción y:

$$-dF_f = -\left[\left(s_{EM}^{KM} + k_{FI,EM}^{KM}\right) F_f + s_{EM}^{KM} F_b + \frac{1}{2}(I_f + I_b) \Phi k_{abs}^{KM}\right] dx \quad (5.24a)$$

$$dF_b = -\left[s_{EM}^{KM} F_f - \left(s_{EM}^{KM} + k_{FI,EM}^{KM}\right) F_b + \frac{1}{2}(I_f + I_b) \Phi k_{abs}^{KM}\right] dx \quad (5.24b)$$

para la fluorescencia. En todos los casos los valores de s^{KM} y k^{KM} vendrán dados por (5.18) para incorporar el parámetro μ .

Aunque desde el punto de vista conceptual la incorporación de un segundo efecto de filtro interno (para la fluorescencia) sólo supone una ligera complicación, desde el punto de vista matemático el modelo es bastante más complejo. En este punto se agradece la inestimable colaboración del *profesor Fernando Falceto del Departamento de Física Teórica*, quién orientó en la resolución del sistema haciendo uso de herramientas de cálculo diferencial. Las ecuaciones obtenidas para las dos componentes vienen dadas por:

$$\begin{aligned}
 F_{f,FI} &= I_0 \Phi \mu_{EX} k_{abs} \cdot \\
 &\cdot \left[\frac{[bB \alpha_{EX} + \alpha_{EM}(A+1)(a+1)] \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + [b \alpha_{EM}(A+1) + B \alpha_{EX}(a+1)] \text{Ch}(\alpha_{EX}L)}{2(\alpha_{EX}^2 - \alpha_{EM}^2)(a \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + b \text{Ch}(\alpha_{EX}L))(A \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + B \text{Ch}(\alpha_{EM}L))} \right. \\
 &\left. - \frac{[bB \alpha_{EM} + \alpha_{EX}(A+1)(a+1)] \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + [b \alpha_{EM}(A+1) + B \alpha_{EX}(a+1)] \text{Ch}(\alpha_{EM}L)}{2(\alpha_{EX}^2 - \alpha_{EM}^2)(a \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + b \text{Ch}(\alpha_{EX}L))(A \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + B \text{Ch}(\alpha_{EM}L))} \right] \\
 &\quad (5.25a)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 F_{b,FI} &= I_0 \Phi \mu_{EX} k_{abs} \cdot \\
 &\cdot \left[\frac{\text{Sh}(\alpha_{EM}L)[b \alpha_{EX}(A+1) - B \alpha_{EM}(a+1)] \text{Sh}(\alpha_{EX}L)}{2(\alpha_{EX}^2 - \alpha_{EM}^2)(a \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + b \text{Ch}(\alpha_{EX}L))(A \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + B \text{Ch}(\alpha_{EM}L))} \right. \\
 &+ \frac{\text{Sh}(\alpha_{EM}L)[\alpha_{EX}(a+1)(A+1) - bB \alpha_{EM}] \text{Ch}(\alpha_{EX}L)}{2(\alpha_{EX}^2 - \alpha_{EM}^2)(a \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + b \text{Ch}(\alpha_{EX}L))(A \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + B \text{Ch}(\alpha_{EM}L))} \\
 &+ \frac{\text{Ch}(\alpha_{EM}L)[bB \alpha_{EX} - \alpha_{EM}(A+1)(a+1)] \text{Sh}(\alpha_{EX}L)}{2(\alpha_{EX}^2 - \alpha_{EM}^2)(a \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + b \text{Ch}(\alpha_{EX}L))(A \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + B \text{Ch}(\alpha_{EM}L))} \\
 &+ \frac{\text{Ch}(\alpha_{EM}L)[B \alpha_{EX}(a+1) - b \alpha_{EM}(A+1)] \text{Ch}(\alpha_{EX}L)}{2(\alpha_{EX}^2 - \alpha_{EM}^2)(a \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + b \text{Ch}(\alpha_{EX}L))(A \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + B \text{Ch}(\alpha_{EM}L))} \\
 &\left. - \frac{B \alpha_{EX}(a+1) - b \alpha_{EM}(A+1)}{2(\alpha_{EX}^2 - \alpha_{EM}^2)(a \text{Sh}(\alpha_{EX}L) + b \text{Ch}(\alpha_{EX}L))(A \text{Sh}(\alpha_{EM}L) + B \text{Ch}(\alpha_{EM}L))} \right] \\
 &\quad (5.25b)
 \end{aligned}$$

En estas ecuaciones se han sustituido los valores de s^{KM} y k^{KM} por sus correspondientes valores en función de k y s . La aclaración sobre lo que representan los diferentes términos se indica en la tabla 5.1.

1.- Los factores α_{EX} y α_{EM} se han definido por comodidad.			
		$\alpha_{EX} = \mu_{EX} b s_{EX}$	(5.26a)
		$\alpha_{EM} = \mu_{EM} b s_{EM}$	(5.26b)
2.- Los valores de a y b son los definidos en (5.3c) y (5.3d) tras haber sustituido k^{KM} y s^{KM} por su valores en (5.18).			
		$a = \frac{s_{EX} + 2(k_{abs} + k_{FI,EX})}{s_{EX}}$	(5.27a)
		$b = \frac{2}{s_{EX}} \sqrt{(k_{abs} + k_{FI,EX}) s_{EX} + (k_{abs} + k_{FI,EX})^2}$	(5.27b)
3.- Los valores de A y B se definen igual que a y b pero a la longitud de onda de emisión.			
		$A = \frac{s_{EM} + 2k_{FI,EM}}{s_{EM}}$	(5.27c)
		$B = \frac{2}{s_{EM}} \sqrt{k_{FI,EM}^2 + k_{FI,EM} s_{EM}}$	(5.27d)
4.- Los valores que toman μ_{EX} y μ_{EM} dependen de la aproximación que se aplique.			
Si se aplica (5.19)		Si se aplica (5.20)	
$\mu_{EX} = \left(\frac{s_{EX}^2}{(k_{abs} + k_{FI,EX})^2 + (k_{abs} + k_{FI,EX}) s_{EX}} \right)^{\frac{1}{4}}$	(5.29a)	$\mu_{EX} = 2 s_{EX} L$	(5.29c)
$\mu_{EM} = \left(\frac{s_{EM}^2}{k_{FI,EM}^2 + k_{FI,EM} s_{EM}} \right)^{\frac{1}{4}}$	(5.29b)	$\mu_{EM} = 2 s_{EM} L$	(5.29d)

Tabla 5.1.- Explicación de los parámetros que integran las ecuaciones (5.25).

b) Evaluación del modelo

Desde el punto de vista analítico, el modelo predice adecuadamente que a mayor efecto de filtro interno habrá más disminución de la fluorescencia, que las variaciones de la intensidad causadas por los filtros internos primario y secundario son similares y que el coeficiente de dispersión apenas modifica su comportamiento. Sin embargo hay que destacar otros aspectos:

- El filtro interno sólo afecta a la fluorescencia cuando k_{FI} es mayor que k_{abs} (figura 5.12).

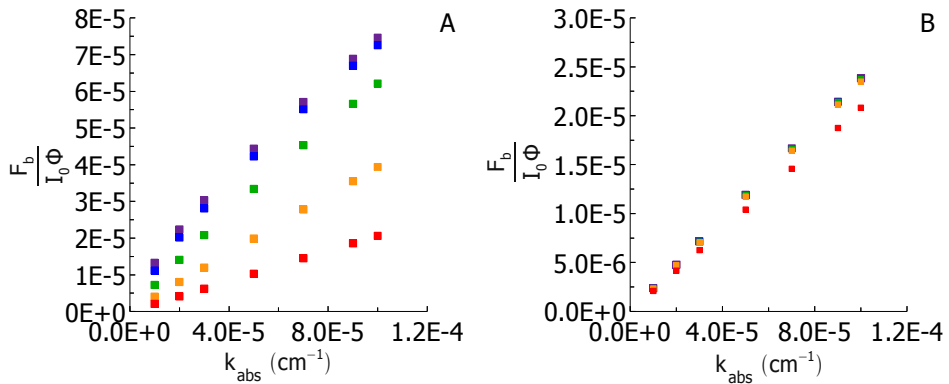


Figura 5.12.- Variación de la componente F_b de fluorescencia (como $\frac{F}{I_0 \Phi}$) frente a k_{abs} para distintos valores de k_{FI} ($L=0.03$). $k_{FI} = 10^{-2}$ (■), $k_{FI} = 10^{-3}$ (■), $k_{FI} = 10^{-4}$ (■), $k_{FI} = 10^{-5}$ (■) y $k_{FI} = 10^{-7}$ (■). (A) μ de la ecuación (5.19), (B) μ de la ecuación (5.20).

- El efecto del coeficiente de dispersión en la pendiente de F frente a k presenta un máximo que depende de k_{FI} , usando μ de la ecuación (5.19). Cuando se usa μ de la ecuación (5.20) desaparece el máximo al aumentar k_{FI} .

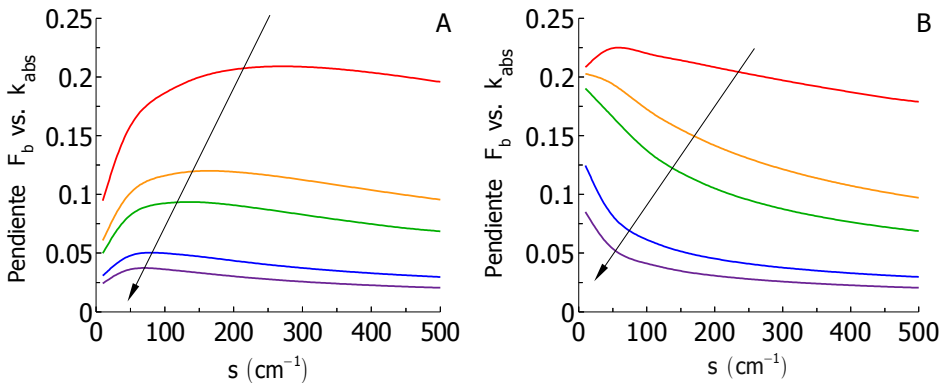


Figura 5.13.- Variación de la pendiente de F_b frente a k_{abs} con el coeficiente de dispersión de la lámina para distintos valores de efecto de filtro interno ($L=0.03$ cm). $k_{FI} = 0.01$ (—), $k_{FI} = 0.05$ (—), $k_{FI} = 0.1$ (—), $k_{FI} = 0.5$ (—) y $k_{FI} = 1$ (—). (A) μ de la ecuación (5.19), (B) μ de la ecuación (5.20).

Una conclusión muy importante es que para aumentar la linealidad, se podría inducir algo de filtro interno en la lámina sensora (por ejemplo, añadiendo una especie absorbente durante la preparación de la lámina). Sin embargo, esto podría ser a costa de perder sensibilidad.

c) Comparación entre los modelos mejorados

En la figura 5.14 se comparan los resultados obtenidos con ambos modelos mejorados, el primero (descrito por las ecuaciones (5.21a) y (5.21b)) y el de filtro interno (ecuaciones (5.25a) y (5.25b)). La comparación resulta, en realidad, complicada. El primer modelo (modelo mejorado) sólo se cumple si no hay filtro interno y el segundo sólo se cumple si lo hay. Para combinar ambos casos se ha considerado que el filtro interno existente es muy bajo (de forma que no afectará al primer modelo). Como se ve, los resultados son cualitativamente similares.

5.2.3.- El coeficiente de dispersión

El coeficiente de dispersión del sólido es el responsable de tener que aplicar todo este tratamiento matemático. Este parámetro se puede medir si se dispone de un dispositivo de esfera integradora, pero es difícil obtener en tablas, por ello es importante disponer de algún tipo de modelo que permita hacer una estimación (aunque sea aproximada) de su valor.

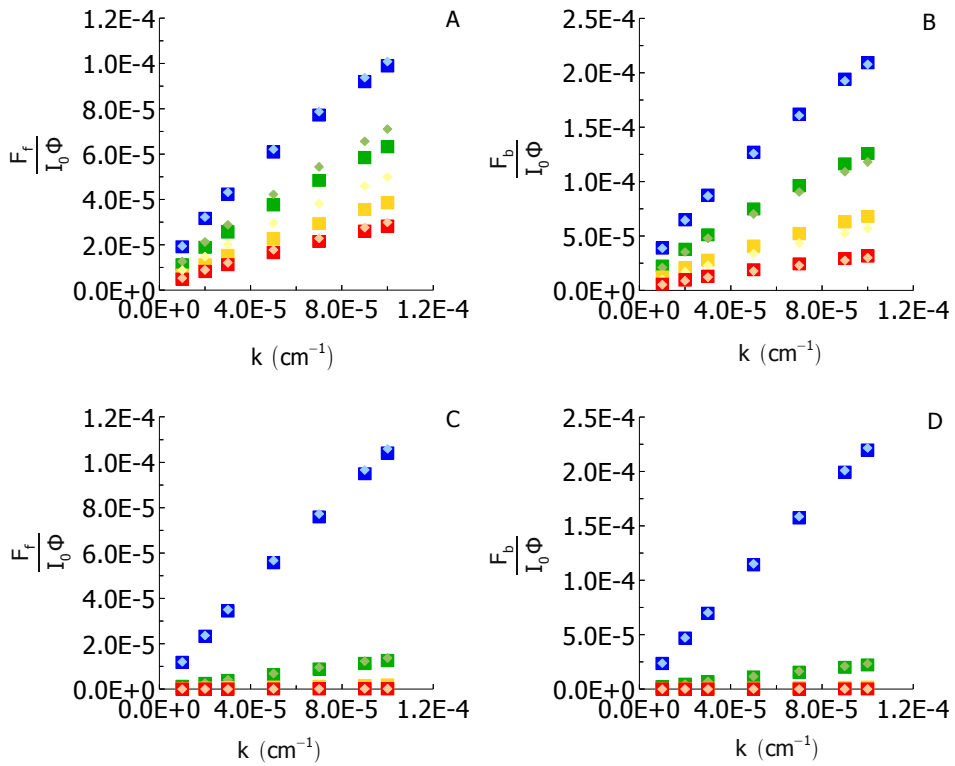


Figura 5.14.- Comparación de los resultados obtenidos para la intensidad de fluorescencia

(como $\frac{F}{I_0\Phi}$, $F_{r,FI}$ son (A) y (C) y $F_{b,FI}$ son (B) y (D)) del modelo matemático que incluye el efecto de filtro interno (■) y del modelo mejorado (*) para diferentes valores de s_{EX} ($s=1$ (-), $s=10$ (*), $s=100$ (-) y $s=1000$ (-)). ($L=0.03$ cm). ((A) y (B) para μ de la ecuación (5.19); (C) y (D) para μ de la ecuación (5.20). La k_{FI} no puede ser estrictamente 0 porque las ecuaciones darían valores indeterminados. Para esta comparación se ha usado $k_{FI}=1 \cdot 10^{-8}$.

Cuando se usan láminas de poliacrilamida, dado su alto contenido en agua, se propone asimilar esta lámina a un medio líquido de alta turbidez, por lo que puede usarse la teoría de Rayleigh como una buena aproximación¹¹⁸, en la que el coeficiente de dispersión se relaciona empíricamente con la concentración de los componentes de la lámina como:

118 Yamakawa, H.; "Modern Theory of Polymer Solutions" Harper and Row, **1971**, New York, p. 191.

$$s = \frac{K_{Rh,\lambda}}{1000} \sum_i C_i M_i^2 \quad (5.29)$$

donde $K_{rh,\lambda}$ es la constante de Rayleigh y C y M son la concentración y el peso molecular de las distintas especies del material. En el apartado 5.3 se verá una aplicación de esta ecuación.

5.2.4.- La celda de flujo

El contacto entre la lámina sensora y la muestra puede hacerse usando distintos dispositivos, siendo los más usuales las celdas de flujo. Se han diseñado y construido dos tipos de celdas de flujo denominadas "celda de flujo original y" (CFO) y "celda de flujo de filtro interno mínimo" (CFFIM). Su esquema general puede verse en la figura 5.15.

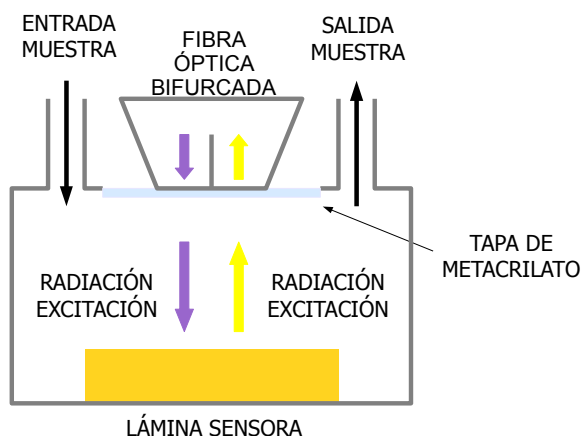


Figura 5.15A.- Celda de flujo original (CFO).

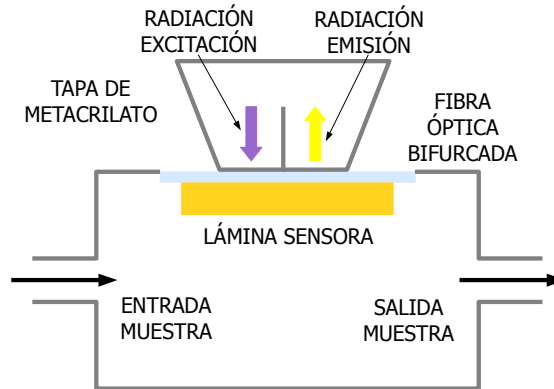


Figura 5.15B.- Celda de flujo de filtro interno mínimo (CFFIM).

La configuración de la CFFIM es similar a la usada cuando se inmovilizan reactivos sobre fibras ópticas, por lo que las conclusiones obtenidas para esta celda pueden aplicarse también a este método de inmovilización. En ambas celdas la fluorescencia se mide a 180° , y en consecuencia, a partir de aquí sólo se considera la componente F_b .

En la CFO tanto el haz de excitación como el de fluorescencia tienen que pasar a través de la disolución de muestra, por lo que se producen efectos de filtro interno adicionales que deben incluirse en las ecuaciones (5.25a) y (5.25b) sustituyendo I_0 por:

$$I_0 10^{-(k_{FI,EX} + k_{FI,EM})d} = I_0 T_{FI,EX} T_{FI,EM} \quad (5.30)$$

donde d es el paso óptico de la celda de flujo y $T_{FI,EX}$ y $T_{FI,EM}$ son las transmitancias de la disolución de muestra a su paso por la celda a las correspondientes longitudes de onda.

En la CFFIM este efecto de filtro interno adicional puede eliminarse de F_b y puede usarse la ecuación (5.25b). Sin embargo, se observa un peor contacto entre la muestra y la lámina.

Debido a que el paso óptico de la celda (d) es normalmente mayor que el espesor de la lámina (L), lo que no modifica los valores de μ , este efecto de filtro interno adicional es normalmente más importante que el observado en la lámina, y por ello, se puede recomendar el uso de la CFFIM.

5.3.- COMPROBACIÓN DEL MODELO EN MEDIDAS REALES

5.3.1.- Introducción

Como se ha indicado, el modelo aquí propuesto se desarrolló originalmente para ser utilizado en sensores ópticos basados en la fluorescencia de las enzimas. Estos sensores estaban conformados por un gel de poliacrilamida (muy transparente) conteniendo atrapada glucosa oxidasa químicamente modificada con un fluoróforo. El sensor estaba pensado para el análisis de glucosa y se basa en los cambios de fluorescencia de la enzima durante la reacción. Por ello, para estudiar la validez del modelo desarrollado, se ha hecho un estudio del efecto del filtro interno utilizando un sensor de glucosa basado en glucosa oxidasa químicamente modificada con un derivado de fluoresceína (GOx-FS) y atrapada en una lámina de poliacrilamida (PAA). El sensor se basa en la medida de la componente F_b por lo que realmente se validará la ecuación (5.25b).

El procedimiento que se va a seguir es el siguiente: a partir de ensayos previos con la lámina de GOx-FS-PAA y la disolución de naranja de metilo, se obtienen a través de medidas experimentales todos los parámetros que aparecen en la ecuación 5.25b. Con ello se estiman los valores de fluorescencia que se

debería obtener. A continuación se obtiene experimentalmente esos valores y se comparan con los primeros.

Para ello se han inyectado en el sistema disoluciones de naranja de metilo de distinta concentración, elegido éste por ser un cromóforo que absorbe en la zona de trabajo del sensor: 490 y 520 nm (figura 5.16).

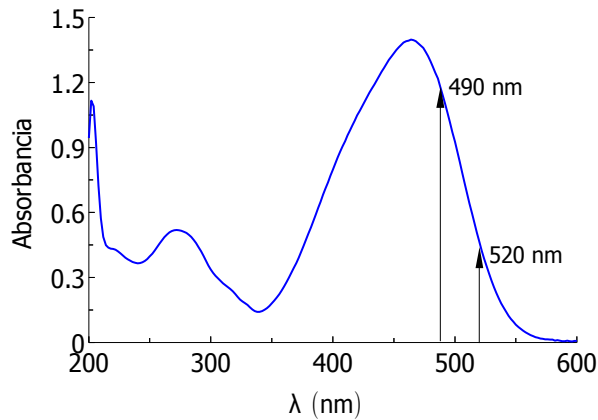


Figura 5.16.- Espectro de absorción de naranja de metilo en tampon de fosfatos 0.1M a pH=6.5.

5.3.2.- Experimental

Se ha usado glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, E.C. 1.1.3.4 de Sigma, de 157500 UIg⁻¹ de sólido liofilizado modificada químicamente con el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido fluorescein-5(6)-carboxamido hexanoico también de Sigma, como marcador fluorescente. La lámina de poliacrilamida se ha preparado según el procedimiento explicado en el apartado 6.2.3¹¹⁹.

119 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Fluorometric Sensors Based on Chemically Modified Enzymes: Glucose Determination in Drinks" *Talanta* **2003**, 60, 415-423.

Para comprobar el efecto de filtro interno se han usado distintas disoluciones de naranja de metilo (Riedel-de Haën, AG) en medio tamponado a pH=6.5 de fosfatos (KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 de Sigma en agua bidestilada). Estas disoluciones se han introducido en un sistema FIA explicado en el apartado 6.2.2.b.

Las medidas de absorbancia se han realizado con un espectrofotómetro de Agilent modelo HP8453A *diode-array* y el espesor de la lámina se ha obtenido con un microscopio electrónico.

5.3.3.- Resultados

a) Cálculo de los distintos parámetros

Los coeficientes de filtro interno que aparecen en las ecuaciones se han obtenido a partir de las medidas de absorción de las disoluciones de naranja de metilo, de concentraciones 2, 10 y 20 mgL^{-1} , aplicando la ecuación (5.6) como $k = 2.3\epsilon C = 2.3 A$ (cuando el valor de $l=1$ cm).

$C_{\text{N. Metilo}} (\text{mgL}^{-1})$	A_{490}	A_{520}	$k_{\text{FI}, 490}$	$k_{\text{FI}, 520}$
2	0.117	0.049	0.269	0.112
10	0.573	0.234	1.320	0.540
20	1.141	0.466	2.628	1.07

Tabla 5.2.- Valores de absorbancia y coeficientes de absorción para las disoluciones de naranja de metilo.

El coeficiente de dispersión de la lámina de GOx-FS se mide a partir de su absorbancia a las longitudes de onda usadas. Puede calcularse el valor de la constante de Rayleigh a partir de la expresión¹²⁰:

120 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "A Reagentless Optical Biosensor Based on the Intrinsic Absorption Properties of Peroxidase" *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 956-964.

$$1 - T_{\lambda} = \frac{K_{Rh,\lambda}}{1000} LCM \quad (5.31)$$

donde T es la transmitancia derivada del valor de absorbancia medido, L es el espesor de la lámina que en este caso es 0.0386 cm (medido con microscopio electrónico), C es la concentración molar de la enzima en la lámina y M es el peso molecular de la enzima. La concentración de la enzima en la lámina se calcula teniendo en cuenta que el rendimiento de inmovilización es del 1.4%, por lo que $C = 1.806 \cdot 10^{-6}$ M. El peso molecular de la GOx es 155kD. Sustituyendo los valores se obtiene:

$$K_{Rh,490} = 0.483 \text{ mol g}^{-2} \text{ cm}^2$$

$$K_{Rh,520} = 0.438 \text{ mol g}^{-2} \text{ cm}^2$$

La relación entre K_{Rh} y s es la que aparece en la ecuación (5.7d). Los valores de s obtenidos son:

$$s_{490} = 20.96 \text{ cm}^{-1}$$

$$s_{520} = 19.00 \text{ cm}^{-1}$$

El coeficiente de absorción de la lámina, k_{abs} , se obtiene a partir de las absorbancias de la lámina cuando no contiene GOx-FS, con la siguiente expresión:

$$k_{abs} = 2.303 \left(\frac{A_{490} + A_{520}}{2} \right) \quad (5.32)$$

de forma que su valor es:

$$k_{abs} = 0.281 \text{ cm}^{-1}$$

b) Comparación de los resultados experimentales y teóricos

La inyección de las disoluciones de naranja de metilo en el sistema provocan la disminución de la señal, debido al efecto de filtro interno (figura 5.17).

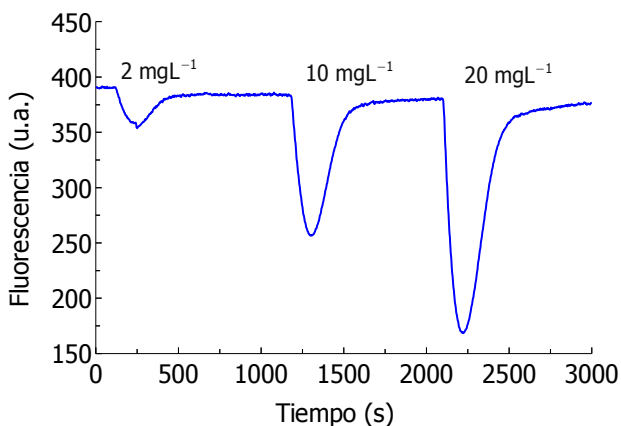


Figura 5.17.- Inyecciones de las disoluciones de naranja de metilo en el sistema FIA con la celda CFFIM y lámina de GOx-FS. (Caudal=0.6 mLmin⁻¹, volumen de muestra=0.3 mL, $\lambda_{\text{EX}}=490$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=520$ nm, pH = 6.5 de fosfatos 0.1 M, rendijas 15 nm excitación y emisión).

En la figura 5.18 aparecen los resultados obtenidos con la CFO frente a la concentración de naranja de metilo usando las dos expresiones para μ . La intensidad de fluorescencia está normalizada con la obtenida cuando no hay filtro interno. Se ha tenido en cuenta la expresión (5.30) para incluir el efecto de filtro interno adicional ($d=0.15$ cm).

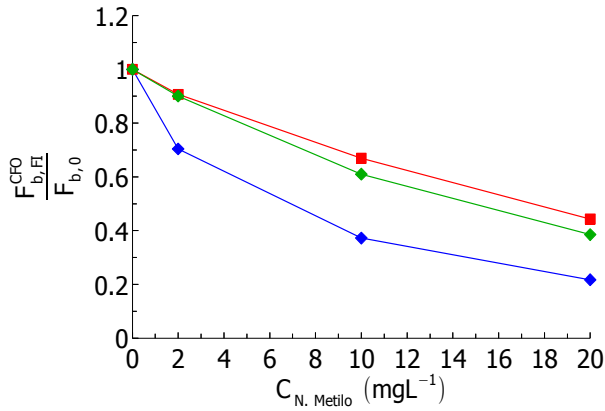


Figura 5.18.- Valores teóricos (\blacksquare) y experimentales (\blacklozenge) para μ de la expresión (5.19) y (\blacklozenge) para μ de la expresión (5.20) de $\frac{F_{b,FI}}{F_{b,0}}$ frente a la concentración de naranja de metilo con la CFO.

En la figura 5.19 aparecen los resultados utilizando la CFFIM.

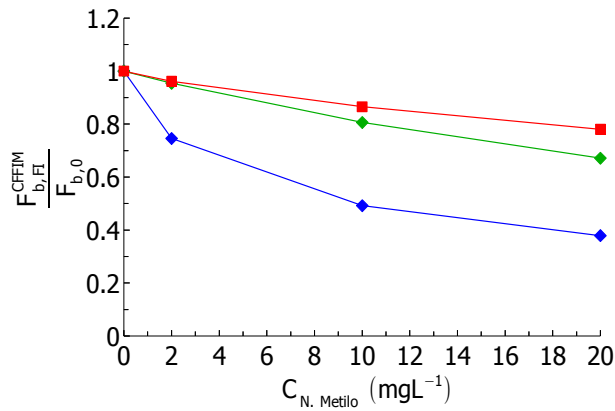


Figura 5.19.- Valores teóricos (\blacksquare) y experimentales (\blacklozenge) para μ de la expresión (5.19) y (\blacklozenge) para μ de la expresión (5.20) de $\frac{F_{b,FI}}{F_{b,0}}$ frente a la concentración de naranja de metilo con la CFFIM.

Como se puede observar, los resultados experimentales se ajustan bien al modelo desarrollado para baja interacción. Por otro lado, teniendo en cuenta los valores de s y k de la lámina, estos son los valores que cabría esperar obtener.

5.4.- CONCLUSIONES

1.- Se ha desarrollado un modelo matemático que describe la señal de fluorescencia desde superficies sólidas. Estos modelos pueden ser aplicables tanto a sensores ópticos de fluorescencia como a aplicaciones derivadas del uso de la FDIC.

2.- Ambos modelos descansan en la "Teoría de dos Flujos de Kubelka-Munk" y la aplicación posterior que hizo Goldman, de aquí que el resultado sea la obtención de ecuaciones que describen tanto la intensidad observada en el sentido incidente (F_f) como de retroceso (F_b).

3.- El primer modelo (modelo mejorado) incorpora como novedad conceptual el parámetro denominado "*Scattering Induced Path Variation*" (μ) que es un factor multiplicativo de incremento del paso óptico eficaz debido a la dispersión. Las simulaciones realizadas permiten comprobar que μ puede adquirir valores mucho mayores que 1, lo que manifiesta su importancia.

4.- El segundo (modelo mejorado con efecto de filtro interno) permite modelar el efecto de filtro interno (tanto en el lado de la excitación como en el de fluorescencia) sobre la fluorescencia de sólidos. El modelo requiere que el efecto de filtro interno se produzca. En caso contrario hay que aplicar el modelo anterior.

5.- Se ha validado experimentalmente el modelo para un sensor que contiene glucosa oxidasa químicamente modificada con un fluóforo,

inmovilizada en poliacrilamida, usando una disolución de naranja de metilo como interferencia.

5.5.- ANEXO

A.5.1.- Valores calculados de μ para diferentes valores de k , s y

L

L	μ	L	μ	L	μ	L	μ
k=0.01 s=30		k=0.1 s=30		k=1 s=30		k=10 s=30	
0.01	1	0.01	1	0.01	1	0.01	1
0.02	1	0.02	1	0.02	1	0.02	1
0.03	1	0.03	1	0.03	1	0.03	1
0.07	1.3	0.07	1.3	0.07	1.2	0.07	1.1
0.1	2	0.1	2	0.1	1.6	0.1	1.1
0.3	5.4	0.3	3.9	0.3	2.4	0.3	1.2
k=0.01 s=100		k=0.1 s=100		k=1 s=100		k=10 s=100	
0.01	1	0.01	1	0.01	1	0.01	1
0.02	1.2	0.02	1.2	0.02	1.2	0.02	1.1
0.03	2	0.03	2	0.03	1.9	0.03	1
0.07	4.6	0.07	4.1	0.07	3	0.07	1.7
0.1	6.3	0.1	5	0.1	3.1	0.1	1.7
0.3	9.9	0.3	5.6	0.3	3.2	0.3	1.7
k=0.01 s=300		k=0.1 s=300		k=1 s=300		k=10 s=300	
0.01	2	0.01	2	0.01	1.9	0.01	1.6
0.02	4	0.02	3.9	0.02	3.3	0.02	2.3
0.03	5.9	0.03	5.4	0.03	3.9	0.03	2.3
0.07	11.2	0.07	7.3	0.07	4.2	0.07	2.3
0.1	12.6	0.1	7.4	0.1	4.2	0.1	2.3
0.3	13.2	0.3	7.4	0.3	4.2	0.3	2.3
k=0.01 s=500		k=0.1 s=500		k=1 s=500		k=10 s=500	
0.01	3.3	0.01	3.3	0.01	3.1	0.01	2.4
0.02	6.6	0.02	6.1	0.02	4.4	0.02	2.6
0.03	9.5	0.03	7.5	0.03	4.7	0.03	2.6
0.07	14.3	0.07	8.4	0.07	4.8	0.07	2.6
0.1	14.8	0.1	8.4	0.1	4.8	0.1	2.6
0.3	15	0.3	8.4	0.3	4.7	0.3	2.6
k=0.01 s=700		k=0.1 s=700		k=1 s=700		k=10 s=700	
0.01	4.6	0.01	4.6	0.01	4	0.01	2.7
0.02	9.1	0.02	7.7	0.02	5.1	0.02	2.9

5.- MODELO ÓPTICO PARA SENSORES DE FLUORESCENCIA

0.03	12.5	0.03	8.8	0.03	5.2	0.03	2.9
0.07	16.1	0.07	9.2	0.07	5.2	0.07	2.9
0.1	16.3	0.1	9.2	0.1	5.2	0.1	2.9
0.3	16.3	0.3	9.2	0.3	5.2	0.3	2.9
k=0.01 s=1000		k=0.1 s=1000		k=1 s=1000		k=10 s=1000	
0.01	6.6	0.01	6.3	0.01	5	0.01	3.2
0.02	12.3	0.02	9.3	0.02	5.6	0.02	3.2
0.03	15.7	0.03	9.9	0.03	5.6	0.03	3.2
0.07	17.7	0.07	10	0.07	5.6	0.07	3.2
0.1	17.8	0.1	10	0.1	5.6	0.1	3.2
0.3	17.8	0.3	10	0.3	5.6	0.3	3.2

CAPÍTULO 6:
DESARROLLO DE SENSORES
ÓPTICOS GENERALES

6.- DESARROLLO DE SENSORES ÓPTICOS GENERALES

6.1.- INTRODUCCIÓN

Según la definición general de la IUPAC, un sensor químico es un dispositivo que transforma información química (por ejemplo, variaciones de la concentración de un componente de una muestra específica con respecto al análisis de composición total), en una señal analítica útil. Otras definiciones también consideran un sensor químico como un dispositivo capaz de registrar de forma directa, continua y reversible la concentración de una especie química. Para ello, los sensores químicos deben tener dos unidades funcionales básicas^{121 122}: un sistema de reconocimiento químico (molecular) y un transductor físico-químico. En la primera se produce la interacción entre el analito y el compuesto químico que actúa como receptor, provocando o bien la aparición de un producto o la variación de alguna propiedad del receptor, que origina una señal que puede ser detectada y transformada por el transductor en información analítica.

6.1.1.- El efecto FDIC en sensores ópticos

La pregunta que cabría formularse es: ¿qué puede aportar la metodología FDIC al mundo de los sensores? En la actualidad muchos de los sensores y biosensores ópticos que existen están basados en la medida final de una propiedad absolutamente inespecífica como es el índice de refracción¹²³. Por ejemplo, los sensores basados en el efecto de plasmón superficial, los microanillos resonadores, los interferómetros Mach-Zehnder y otros nano o micro

121 Hulanicki, A.; Geab, S.; Ingman, F.; "Chemical Sensors: Definitions and Classification" *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 1247-1250.

122 Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S.; "Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification" *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 121-131.

123 Kourosh Kalantar-Zadeh, K.; Fry, B.; "Nanotechnology-Enabled Sensors" *Springer*, **2008**, Ch. 6.

transductores no son más que una forma de detectar un cambio de índice de refracción¹²⁴ consecuencia de una reacción inmunológica o una interacción proteína-proteína. Como se ha visto el FDIC es también una forma de traducir un cambio de índice de refracción en un cambio de fluorescencia con la ventaja adicional de que también responde a cambios de otros parámetros físico-químicos. Además este efecto aporta una serie de ventajas en el diseño de sensores generales con respecto a otros sensores, pues al tratarse de un efecto del entorno, ni el analito ni el fluoróforo sufren reacciones ni variaciones permanentes en su estructura y propiedades, lo que proporciona un método directo, reversible y duradero.

La principal dificultad a tener en cuenta en este tipo de sensores es que se necesita un medio estable para conseguir respuestas sensibles y reproducibles. La forma más adecuada de obtener un sistema de reconocimiento químico en un sensor es inmovilizar el reactivo de reconocimiento (en este caso, el fluoróforo) en una matriz sólida que conformará la lámina sensora. Este es el punto clave en el desarrollo de este tipo de sensores, ya que, en función de la estabilidad de la matriz se obtendrán resultados que se ajustarán a los requerimientos que de ellos se esperan. Es por ello que la forma en la que se inmoviliza el reactivo constituye la parte fundamental en el diseño y desarrollo de sensores ópticos. Dependiendo de la química que una el reactivo al soporte sólido, el tiempo de vida, la sensibilidad y el tipo de muestra con el que se pueda trabajar serán distintos. Por tanto, es muy importante elegir con cuidado un método de inmovilización en el que el reactivo quede lo suficientemente retenido y en el que el analito y los posibles productos de reacción pueda difundir libremente. Además tienen que ser un soporte compatible con el medio en el que se encuentre el analito.

124 Passaro, V. M.; Dell'Ollio, F.; Casamassima, B.; De Leonardis, F.; "Guided-Wave Optical Biosensors" *Sensors*, **2007**, 7, 508-536.

6.1.2.- Métodos de inmovilización

Hay diversos métodos generales de inmovilizar reactivos, dependiendo de la fortaleza de la unión entre el fluoróforo y el soporte, que se agrupan en tres categorías: entrapamiento, adsorción y unión covalente (ver figura 6.1.), cada uno de los cuales tiene sus ventajas y sus inconvenientes. En cada uno de ellos hay diferentes variantes que han sido recopiladas en diferentes monografías de las que se pueden destacar las de Cass¹²⁵ ¹²⁶ o la de Eggin¹²⁷.

a) Entrampamiento

El entrapamiento consiste en crear una red polimérica en la que el fluoróforo está embebido, sin ningún tipo de interacción entre el soporte. El tamaño de poro de la red debe permitir que el analito pueda moverse por el polímero pero debe evitar que el fluoróforo lixivie. Algunas variantes del entrapamiento son:

- *Cross-linking*¹²⁸ (entrecruzamiento). En sensores, el término de *cross-linking* se usa tradicionalmente para describir un entrapamiento en el que el receptor se une químicamente a la red polimérica para darle mayor estabilidad al entrapamiento.

125 Cass, A. E. G. (Editor); "Biosensors: A practical Approach" The Practical Approach Series, IRL Press (Oxford University Press), **1990**, Oxford.

126 Cooper, J.M.; Cass, A. E. G. (Editors); "Biosensors" (2nd Edition) The Practical Approach Series, Oxford University Press, **2003**, Oxford.

127 Eggin, B.; "Biosensors: An Introduction" The Practical John Wiley & Sons, **1996**, West Sussex.

128 Estrictamente hablando, un proceso de *cross-linking* define la formación de un polímero en el que cadenas paralelas de polímeros lineales se unen entre sí mediante puentes químicos, dando lugar a la formación de poros.

- Micro-encapsulamiento. En este método el fluoróforo se introduce dentro de un volumen limitado por una membrana inerte, generalmente de diálisis, a través de la cual puede pasar el analito pero no escapar el fluoróforo.

En términos generales, el entrapamiento tiene la ventaja de que no modifica químicamente el fluoróforo inmovilizado, por lo que su reactividad no se altera (o lo hace levemente). A cambio, el analito tiene que difundir a través de la lámina, lo que complica el transporte de materia y hace al sensor dependiente de este proceso. En ocasiones el transporte de materia controla la respuesta del sensor.

Desde el punto de vista de la FDIC, el entrapamiento puede resultar una buena opción ya que no obliga a que el fluoróforo disponga de grupos reactivos que permitan su unión al polímero, evitando así su fluorescencia intrínseca. Los problemas del entrapamiento son, por un lado, que el entorno que crea alrededor del fluoróforo puede anular el efecto del analito y, por tanto, perjudicar su respuesta. Por otro lado, las moléculas de bajo peso molecular se retienen débilmente. En este trabajo se han ensayado diferentes opciones de entrapamiento.

b) Adsorción

La adsorción constituye un método en el que el fluoróforo interacciona de forma débil, mediante interacciones de tipo Van de Waals, enlaces de hidrógeno o iónicas. El adsorbente debe tener alta afinidad por el fluoróforo y no debe adsorber al analito o a los productos de reacción.

En términos generales, la inmovilización por adsorción tampoco modifica químicamente al fluoróforo y, al ser un proceso superficial, simplifica el transporte de materia. El problema radica en la debilidad de la unión, ya que en

muchos casos el fluoróforo se libera de la superficie. En este trabajo se han hecho algunos ensayos con superficies que, *a priori*, podrían proporcionar suficiente estabilidad.

c) Unión covalente

Mediante unión covalente el fluoróforo queda unido de forma permanente al soporte a través de una reacción química, a veces ayudado por una molécula espaciadora. Para poder llevar a cabo este tipo de inmovilización tanto el soporte sólido como el fluoróforo deben poseer grupos reactivos en su estructura que permitan formar el enlace covalente. También hay que tener en cuenta que el grupo por el que el fluoróforo se une al soporte no debe ser el mismo que el usado en el reconocimiento del analito, porque el sensor sufriría un deterioro en su respuesta.

La unión covalente, al ser un proceso superficial, también simplifica el transporte de materia, sin el inconveniente de la debilidad de la unión del fluoróforo al soporte. A cambio, dado que el fluoróforo se une químicamente, su reactividad puede resultar alterada.

Desde el punto de vista del sensor que se quiere construir, este método es complementario al del entrampamiento dado que lo que allí son ventajas en éste son inconvenientes y al revés: el entorno sólido nubla menos las respuestas al analito que el entrampamiento, pero a cambio el fluoróforo debe disponer de grupos reactivos y además sus propiedades de fluorescencia pueden verse afectadas.

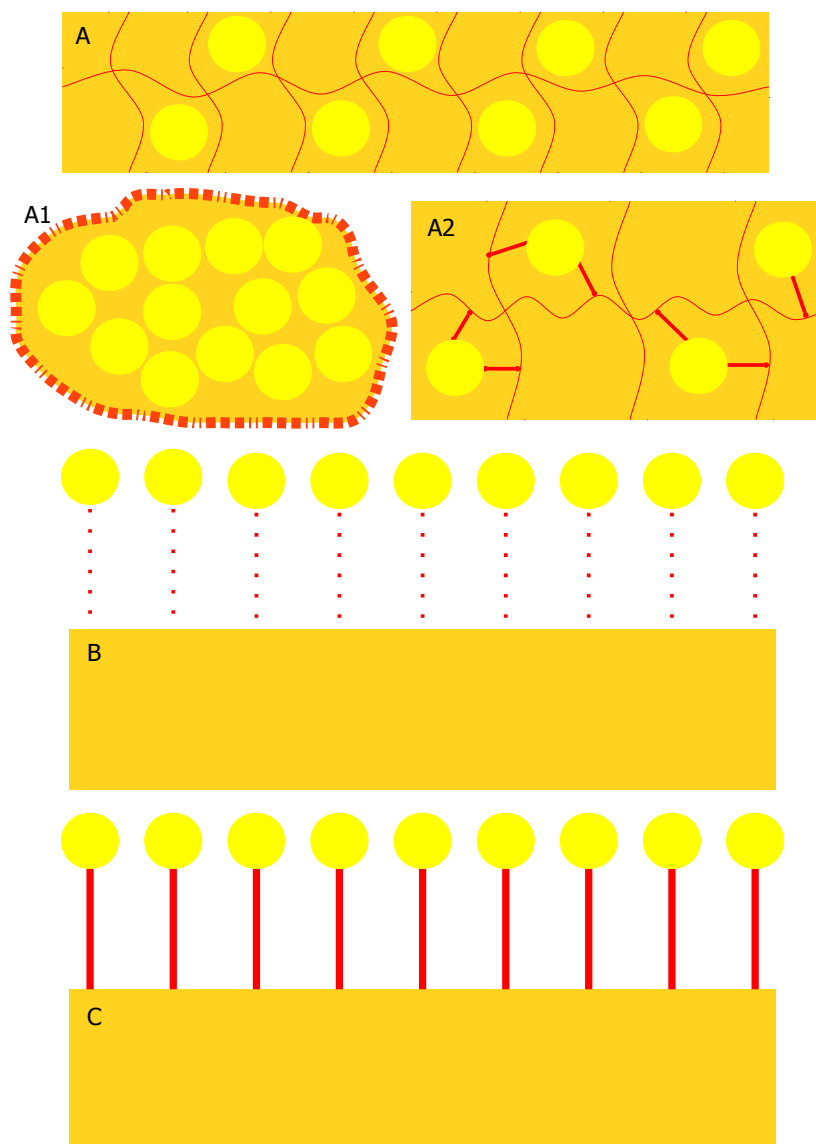


Figura 6.1.- Esquema de las láminas sensoras preparadas con los distintos métodos de inmovilización: (A) entrapamiento: (A1) microencapsulación y (A2) *cross-linking*, (B) adsorción y (C) unión covalente.

6.2.- EXPERIMENTAL

6.2.1.- Reactivos

Se han usado los fluoróforos: cloruro de coralina de Acros Organics, cloruro de berberina, bromuro de etidio, *stains all* y naranja de tiazol de Sigma-Aldrich, berberrubina (sintetizada en el laboratorio), auramina O y fluoresceína sódica de Fluka, merocianina 540 y rodamina B de Merck y albúmina bovina derivatizada con fluoresceína de Sigma. Las estructuras de los fluoróforos se muestran en el anexo A.6.1, al final de este capítulo.

Para la preparación de las láminas sensoras se ha trabajado con distintos tipos de polímeros y láminas comerciales:

- Láminas de poliacrilamida: acrilamida y N,N-bis-acrilamida de Sigma, persulfato de amonio de JIN y ácido acrílico de Fluka.

- Láminas de PVC: cloruro de polivinilo de alto peso molecular de Fluka, bis(2-etilhexilsebacato) (DOS) de Sigma y tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio (TFB) de Fluka.

- Láminas de poliamida: poliamida N200 MVN1 5000 P/6 S-676 (S-677).

- Láminas de silicona: silicona básica de Wacker.

- Láminas comerciales: polietersulfona derivatizada (Ultrabind[®]) de Pall y celulosa derivatizada (APEG[®]) de Rapp-polymere.

- Inmovilización en vidrio: portas de vidrio de Corning[®], 3-isocianatopropiltriethoxisilano de Fluka.

- Inmovilización en *silica gel*: placas para TLC de Merck.

Para la preparación de las láminas se han usado los disolventes: tetrahidrofurano (> 99%) y ácido fórmico (> 96%) de Sigma y cloroformo ($\geq 99\%$) de Sigma-Aldrich y para las medidas en flujo se ha usado agua bidestilada (MilliQ, 18 M Ω) y metanol ($\geq 99.9\%$) de Cromasolv[®] de Sigma-Aldrich.

Los analitos usados han sido disoluciones de β -D-(+)-glucosa , glucosa oxidasa y suero de albúmina bovina de Sigma en medio acuoso, polietilenglicoles de 1420 a 23000 g mol⁻¹ de peso molecular de Sigma en medio acuoso/metanol y con 1-decanol de Fluka en medio metanol.

6.2.2.- Instrumentación

Las medidas se han llevado a cabo colocando la lámina sensora dentro de una celda de flujo situada en el lector de placas de fibra óptica acoplado a un espectrofluorímetro. Los detalles de todo el sistema se señalan a continuación.

a) Medidas de fluorescencia y absorción UV-VIS

Las medidas de fluorescencia se han realizado con un fluorímetro Perkin-Elmer LS50B dotado de una fuente de radiación pulsada consistente en una lámpara de Xenon, dos fotomultiplicadores (referencia y muestra), dos monocromadores, uno de excitación y otro de emisión (las rendijas de entrada y salida se han seleccionado en función de las necesidades de la medida), un compartimento de muestras para una cubeta y un accesorio de lectura de placas con fibra óptica donde se coloca la celda de flujo que contiene a la lámina sensora.

Se han usado cubetas de cuarzo Suprasil de 3500 μL de volumen total, con tape y 1 cm de paso óptico (111-QS) de Hellma.

Las medidas de absorción se han realizado con un espectrofotómetro de Agilent modelo HP8453A *diode-array*.

b) Sistema FIA y condiciones de medida

Para las medidas en flujo se ha usado una bomba peristáltica Gilson (modelo Minipuls 2), una válvula de inyección manual de 6 vías de Omnifit y tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.8 mm de diámetro interno.

Se han usado 2 celdas de flujo distintas según el tipo de láminas que se han usado.

- Celda de flujo de filtro interno mínimo (CFFIM). En esta celda de flujo (figura 6.2) la lámina sensora se sitúa entre el haz de excitación y la disolución que fluye por la celda. La parte principal de la celda (a) es una pieza de acero inoxidable (2x2.5x2 cm) con un orificio (b) (0.5x1.5x0.3 cm). La celda se cierra por medio de una pieza de metacrilato (c) en la que hay una oquedad (d) para alojar la lámina sensora (e) que se fija por medio de una película horadada de Mylar® (f). La pieza de acero inoxidable (a) dispone de dos tubos de acero inoxidable (g y h) para permitir la entrada y la salida de flujo. Las piezas (a) y (c) se unen mediante cuatro tornillos (i) y una junta tórica de silicona (j) para evitar fugas de líquido. La cantidad de muestra que cabe en la celda es de 225 μL .

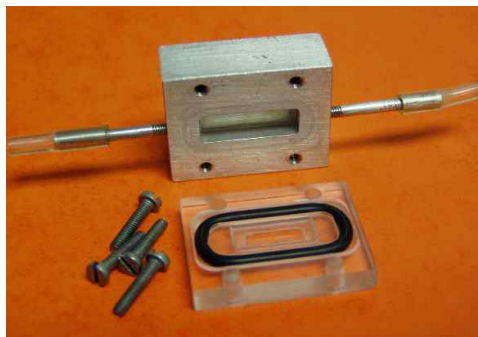
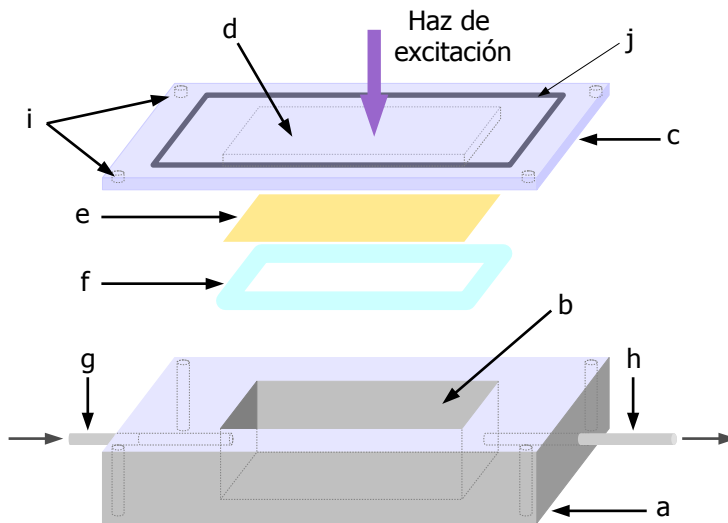


Figura 6.2.- Esquema e imagen de la celda CFFIM.

- Celda de flujo para medio orgánico (CFMO). Esta celda de flujo ha sido desarrollada previamente¹²⁹ y se ha adaptado para las medidas en medio orgánico, ya que no posee piezas de metacrilato y permite la colocación de las láminas de *silica gel*. En la figura 6.3 se muestra la sección transversal de la celda. La parte principal consta de dos piezas metálicas (a) y (b) que definen un orificio cilíndrico de 2 cm de diámetro y 1 mm de espesor. La celda presenta otros dos orificios (c) y (d) de 2 mm de diámetro externo para el flujo de líquido

129 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Direct Glucose Determination in Blood Using a Reagentless Optical Biosensor" *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2876-2883.

dentro de la celda. El orificio central está cubierto con una pieza de vidrio (e) en la parte de arriba y con la pieza de *silica gel* (f) en la parte de abajo, que se sujetan con varias piezas metálicas (g) y (h) para permitir su reemplazamiento. El volumen de la celda es de alrededor de 300 μL . Las piezas (a), (b), (g) y (h) se unen mediante juntas tóricas (i) para evitar las fugas de líquido.

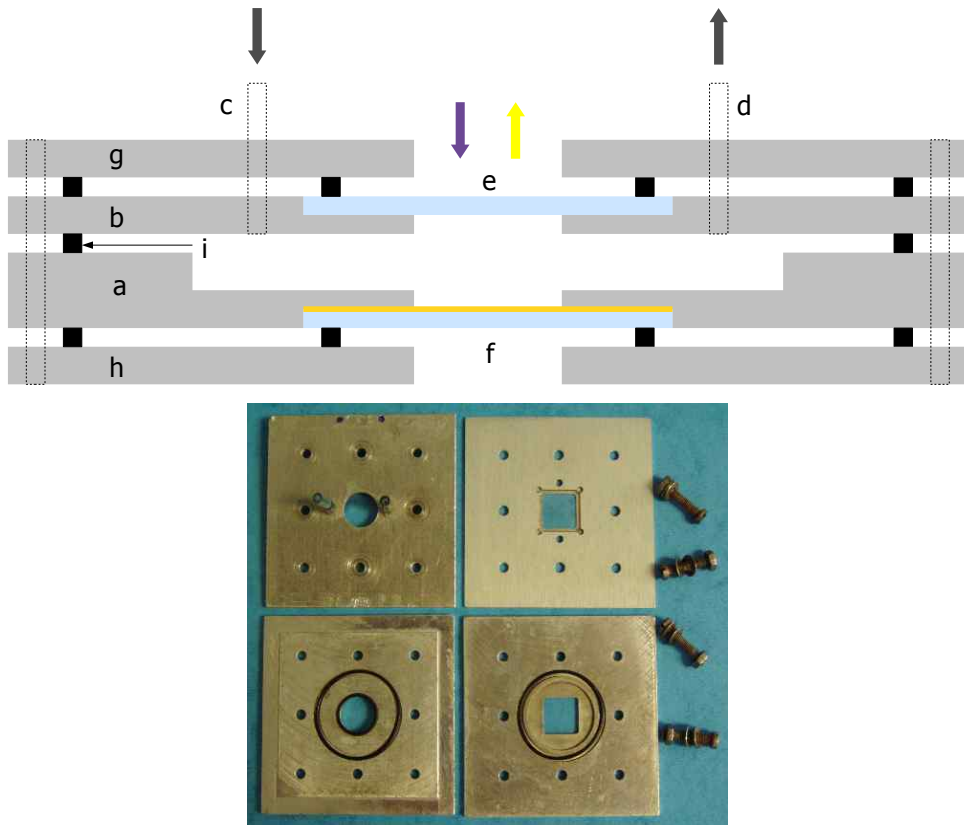


Figura 6.3.- Esquema e imagen de la celda CFMO.

El dispositivo de medida se muestra en la figura 6.4 y consta principalmente de una válvula inyectora, la celda de flujo colocada en el haz de la fibra óptica, un ordenador para registrar los datos y una bomba peristáltica, colocada al final del sistema para evitar en lo posible la entrada de burbujas en la celda.

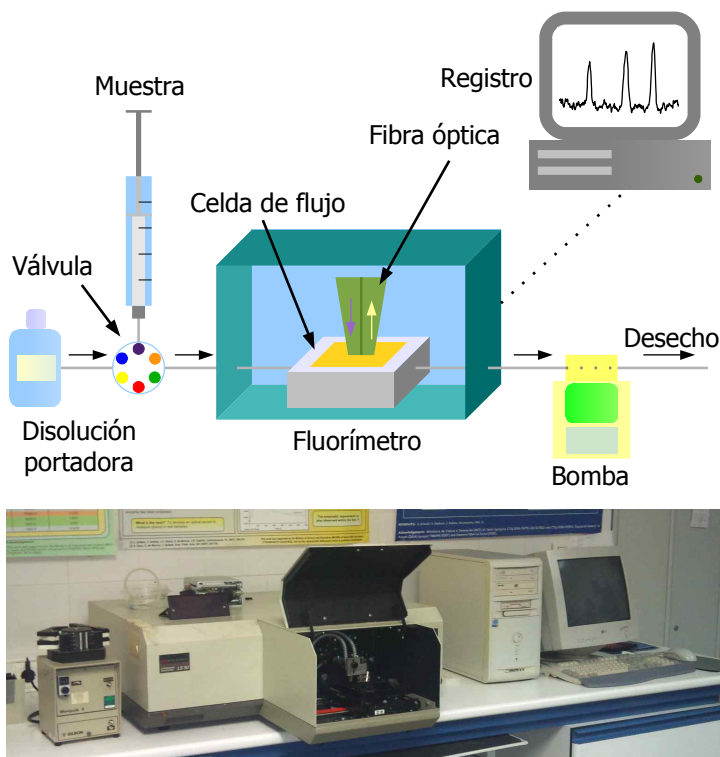


Figura 6.4.- Diagrama e imagen del sistema de medida completo.

En este sistema la disolución portadora fluye a través de la celda de flujo al caudal elegido, entre 0.4 y 0.8 mLmin⁻¹, según las necesidades de la medida. Se empieza a registrar la intensidad de fluorescencia en función del tiempo a las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión de la lámina sensora consiguiendo así establecer la línea de base de la medida. Se inyecta un determinado volumen de disolución de analito entre 300 y 1000 µL. Cuando llega el analito a la celda de flujo y entra en contacto con la lámina se obtiene una señal en forma de pico positivo o negativo con respecto a la línea de base.

Esta señal puede relacionarse con la concentración de analito mediante la altura del pico con respecto a la línea de base o mediante su área. Según el tipo de medida y de la forma de la señal se emplea el método más adecuado.

c) Materiales para la síntesis y caracterización de la berberrubina

La síntesis de berberrubina se ha llevado a cabo a partir de cloruro de berberina para lo que se han usado un microondas CEM Discovery de Vertex y un horno de microbolas B-585 de Büchi acoplado a una bomba de vacío Vacuumbrand RZ-5.

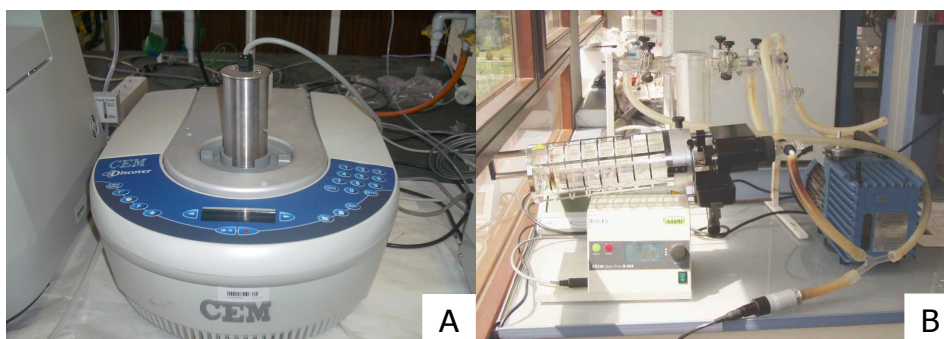


Figura 6.5.- Microondas (A) y sistema térmico tradicional (B).

La caracterización de los productos de reacción se ha hecho mediante espectrometría RMN de ^1H con un espectrómetro Bruker Avance 500 de 500 Mhz en dimetilsulfóxido hexadeuterado (Uvasol[®]) de Merck. Los desplazamientos químicos, δ , se expresan en ppm con respecto a la referencia interna de trimetilsilano ($\delta=0.0000$ ppm).

Se han medido las características espectroscópicas de la berberrubina en metanol (Uvasol[®]; ≥ 99.9) de Merck y en disolución acuosa en medio ácido y básico.

Para las medidas en HPTLC se han inyectado disoluciones de alcanos (n-hexadecano, n-octadecano, n-tetracosano y n-octacosano de Aldrich) en n-heptano ($\geq 99\%$, Chromasolv[®] de Sigma-Aldrich), con un inyector automático Automatic TLC Sampler de Camag, en placas de *silica gel* para HTPLC (10 x 20

cm) de Merck. Tras la aplicación de las muestras se ha procedido al desarrollo cromatográfico usando n-heptano como eluyente en un sistema AMD2 (Automatic Multiple Development) de Camag. Una vez evaporado el disolvente en una cámara de vacío, se ha impregnado las placas con una disolución de berberrubina en metanol con un equipo de impregnación de Camag (Camag Chromatogram Immersion Device III). Las lecturas fluorescencia se han realizado a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 400 nm con un densitómetro TLC Scanner 3 de Camag.

6.2.3.- Procedimientos para la preparación de las láminas

Dada la gran variedad de moléculas y soportes sólidos que se han utilizado (ver tabla 6.1), sólo se van a exponer los procedimientos más importantes y que dan mejores resultados. Los métodos usados han sido obtenidos de la bibliografía¹³⁰ y, en algunos casos, adaptados a las necesidades de las medidas.

a) Entrampamiento en poliacrilamida (PAA)

El grupo de investigación tenía amplia experiencia en la síntesis de este tipo de láminas sensoras, por lo que el procedimiento a usar estaba ya optimizado para la inmovilización de proteínas¹³¹. En el caso de los sensores para FDIC se han hecho algunas modificaciones sobre el procedimiento general para

130 Cass, A. E. G. (Editor); "Biosensors: A practical Approach" The Practical Approach Series, IRL Press (Oxford University Press), **1990**, Oxford. Cooper, J.M.; Cass, A. E. G. (Editors); "Biosensors" (2nd Edition) The Practical Approach Series, Oxford University Press, **2003**, Oxford. Eggins, B.; "Biosensors: An Introduction" The Practical John Wiley & Sons, **1996**, West Sussex.

131 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Fluorometric Sensors Based on Chemically Modified Enzymes: Glucose Determination in Drinks" *Talanta* **2003**, 60, 415-423. Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Hydrogen Peroxide and Peracetic Acid Determination in Waste Water Using Reversible Reagentless Biosensor" *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 332-339. Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "A Blood-Assisted Optical Biosensor for Automatic Glucose Determination" *Talanta* **2009**, 78, 846-851.

adecuarlo a la inmovilización de fluoróforos solos, es decir, sin estar unidos a una proteína o enzima. Como se verá, en este procedimiento el polímero se sintetiza en presencia del fluoróforo.

- Procedimiento básico: se disuelven 20 mg de acrilamida y 4 mg de bisacrilamida en 85 μL de disolución de fluoróforo de concentración adecuada y después se añaden 15 μL de una disolución de persulfato de amonio de 0.4 mgmL^{-1} . La mezcla se agita y cuando está todo disuelto se añaden 100 μL de agua bidestilada. Para eliminar el oxígeno de la mezcla, ya que inhibe el proceso de polimerización, se borbotea N_2 durante 2 minutos. Después se extiende la mezcla en un molde de vidrio de 20x10x0.1 mm y se cubre con un porta de vidrio. El molde se irradia con luz UV a 254 nm durante 1 hora. Una vez formada la lámina se guarda en agua hasta su uso.

- Procedimiento basado en dispersión: es una modificación del procedimiento básico. Después de disolver la acrilamida, la bisacrilamida y el fluoróforo se añaden 100 μL de una disolución de albúmina de concentración apropiada, lo que aumenta la dispersión del fluoróforo en la mezcla. El persulfato se añade a continuación. En este caso, la mezcla se agita cuidadosamente para prevenir la formación de burbujas.

- Procedimiento de perfusión: este procedimiento se ha usado para trabajar con mezclas de agua/metanol. Se prepara una lámina de acrilamida, bisacrilamida y persulfato en agua por el procedimiento básico. Después se introduce la lámina en una disolución de fluoróforo de 1 mgmL^{-1} en metanol durante 1 hora. Tras eliminar el exceso de fluoróforo la lámina se guarda en la mezcla de agua/metanol de la proporción adecuada hasta su uso.

b) Entrampamiento en otros polímeros

Se parte ahora de polímeros ya formados. El procedimiento general es disolver el polímero en una disolución del fluoróforo en el disolvente adecuado, extender la mezcla en una placa de vidrio y esperar a que se evapore el disolvente, obteniendo así una lámina muy fina en la que el fluoróforo queda embebido. En algunos casos hay que añadir otras moléculas a la mezcla para dotar a la lámina de características específicas. Este ha sido el caso de la silicona, la poliamida y el PVC.

Para la silicona se ha usado cloroformo como disolvente y la poliamida se ha disuelto en ácido fórmico. La obtención de láminas de PVC es un poco más laboriosa: se disuelven 120 mg de PVC en 1.5 mL de una disolución de fluoróforo de 1 mg mL^{-1} y una cantidad equimolar de tetrafenilborato en tetrahidrofurano. El tetrafenilborato forma un par iónico con los fluoróforos catiónicos permitiendo su disolución en medios apolares como el PVC y el tetrahidrofurano. Sobre esta mezcla se añaden 260 μL de sebacato para conseguir que la lámina no sólo sea permeable a gases.

c) Unión covalente y adsorción en soportes comerciales derivatizados

Es el caso de la celulosa y la lámina de Ultrabind[®], preparados con grupos aldehído activos, indicados principalmente para la inmovilización de proteínas a través de sus grupos amino terminales. La inmovilización de los fluoróforos en estos soportes se lleva a cabo introduciendo las láminas en disoluciones acuosas del fluoróforo de concentración adecuada durante 5 minutos, eliminando el exceso con agua. Si el fluoróforo tiene grupos amino terminales, como es el caso del bromuro de etidio, se produce el enlace covalente. Por el contrario, si el fluoróforo no tiene la capacidad de reaccionar con los grupos aldehído, simplemente se queda adsorbido en la lámina.

d) Unión covalente en silica gel y vidrio

La unión covalente se produce en este caso a través de los grupos silanol libres tanto de la *silica gel* de las placas de TLC como del vidrio, con fluoróforos con grupos -OH reactivos. En ambos casos, para activar la superficie de las placas, es decir, para generar un número máximo de grupos silanol libres, éstas se calientan en un baño de HNO₃ 1 M a 100 °C durante 1 hora tras lo cual se dejan enfriar y se lavan con agua bidestilada (figura 5.6).

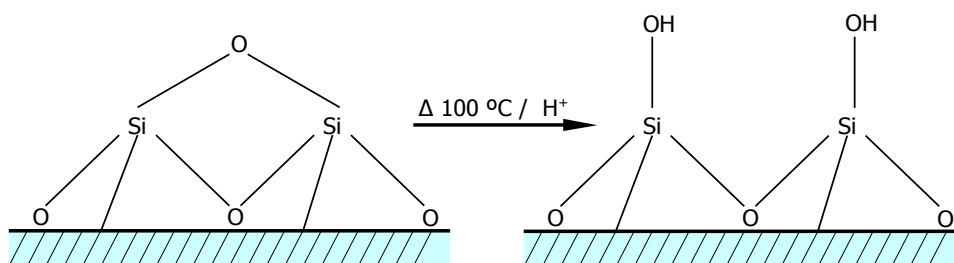


Figura 6.6.- Esquema de la activación de la superficie. Los grupos siloxano se transforman en grupos silanol terminal.

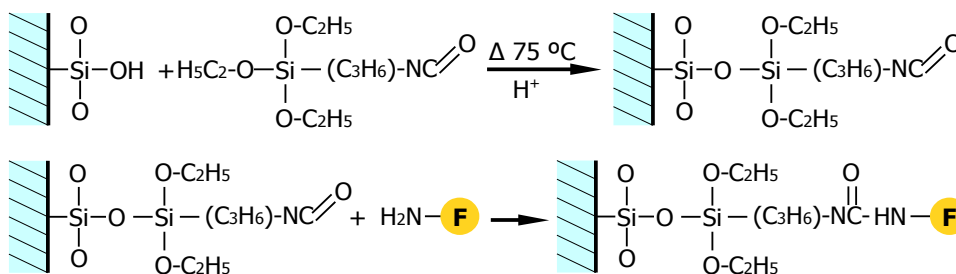


Figura 6.7.- Reacción de derivatización e inmovilización de un fluoróforo con grupo amino terminal.

Tras este proceso se introducen en una disolución del fluoróforo en medio clorhídrico durante otra hora, eliminando después el exceso de fluoróforo con agua bidestilada. Para poder inmovilizar fluoróforos con otros grupos

reactivos, las placas de vidrio se silanizan con derivados del trietoxisilano con distintos grupos terminales. En este caso se ha usado el grupo isotiocianato para conseguir la reacción con grupos amino del bromuro de etidio (figura 6.7).

6.3.- CONSIDERACIONES GENERALES

6.3.1.- Ensayos previos

El diseño completo de sensores generales basados en la influencia de las interacciones débiles del entorno del fluoróforo sobre su intensidad de emisión es un proceso complicado. Al igual que en el sistema de HPLC-GPC (SEC), hay muchos factores que influyen en la señal analítica final. En este caso, además de trabajar en un sistema dinámico, hay que añadir la dificultad de conseguir una lámina sensora estable en la que el fluoróforo quede retenido y que no influya en su fluorescencia nativa ni en la interacción con el analito.

Por ello se han realizado ensayos previos, dirigidos fundamentalmente a hacer una primera selección de aquellos fluoróforos y soportes sólidos más adecuados. El fluoróforo a inmovilizar es de crucial importancia, ya que su fluorescencia debe ser modificada por el analito. Según el modelo propuesto en el capítulo 2, esto puede evaluarse parcialmente a partir de los resultados obtenidos en capítulos anteriores, sin embargo, hay que considerar que en una matriz sólida el entorno químico es muy distinto, especialmente en este caso, que es precisamente el entorno el responsable del cambio de fluorescencia. Por ello se han diseñado y realizado una batería de ensayos previos utilizando varios de los fluoróforos comentados en los capítulos precedentes. Los resultados que se han obtenido en estas pruebas se resumen en la tabla 6.1. Aunque esa tabla recoge sólo los resultados globales obtenidos, en cada caso se han ensayado diferentes condiciones de pH y de concentraciones de reactivos. La enumeración detallada de las condiciones se omite por simplicidad.

Fluoróforo	Soprote	Disolvente	láminaApariencia de la	Resultados
Coralina	Poliacrilamida ^A	Agua	Lámina inhomogénea	Señales con analitos bajas. Pérdida de coralina
		Metanol	Lámina homogénea	Pérdida de coralina. Se observan señales con los analitos
		HCOOH	Lámina homogénea	Pérdida rápida de coralina
		Cloroformo	Lámina inhomogénea	Necesita soporte que suele dar mucha señal de fondo
		Tetrahidrafurano	Lámina homogénea	No se observan señales con los analitos
		Medio acuoso*	Lámina homogénea	Pérdida de coralina
		Medio acuoso	Lámina homogénea	Pérdida de coralina
		Medio ácido	Lámina homogénea	Buenas señales con los analitos pero pérdida de coralina
		activado ^C <i>Silica gel</i>	Agua	No se observa el espectro de fluorescencia
		PVC	Tetrahidrofurano	No se observan señales con los analitos
Berberina		Medio acuoso	Lámina homogénea	Se observa muy mal el espectro de fluorescencia
		Medio acuoso	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
		Medio ácido	Lámina homogénea	berberina Buenas señales con los analitos pero pérdida de
		Medio ácido	Lámina homogénea	Buenas señales con los analitos
		Medio ácido	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
Berberubina		Agua	Lámina inhomogénea ⁽⁺⁾	No se observa el espectro de fluorescencia
		Agua	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
		Agua	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
		Agua	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
Auramina 0 Stains All		Agua	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
		Agua	Lámina inhomogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
		Agua	Lámina inhomogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
Naranja de Tiazol		Agua	Lámina homogénea	No se observan señales con los analitos
		Medio acuoso	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
		Medio acuoso	Lámina homogénea	No se observan señales con los analitos
Fluoresceína-BSA		Agua	Lámina homogénea	No se observan señales con los analitos
		Medio acuoso	Lámina homogénea	No se observa el espectro de fluorescencia
EtidioBromuro de		Medio acuoso	Lámina homogénea	No se observan señales con los analitos
		Agua	Lámina mal formada ⁽⁺⁾	
		Medio acuoso	Lámina inhomogénea	El soporte da mucha señal de fondo

Tabla 6.1.- Fluoróforos y métodos de inmovilización usados. (^A) Entrampamiento, (^B)

Unión covalente, (^C) Adsorción. (*) Tampon de fosfatos pH=7.5. (+) Problemas con APS.

Como se puede ver, en la mayoría de los casos no se ha conseguido obtener un soporte sólido que retenga adecuadamente el fluoróforo o que permita detectar su presencia. El sensor más robusto se ha obtenido por entrapamiento de coralina en PAA. En el apartado 6.4 se detallan los resultados obtenidos con este sensor.

Con el objetivo de conseguir láminas más estables, se han ensayado dos nuevas alternativas:

1.- De la experiencia que se tiene en el entrapamiento en PAA, se sabe que cuando la sustancia a entrapar es de alto peso molecular la retención es más estable. Como los fluoróforos tienen, en general, un peso molecular que no pasa de 500 ó 1000, se ha utilizado también un reactivo comercial consistente en fluoresceína químicamente unida a albúmina (Fluoresceína-BSA en la tabla). Con esto se ha conseguido una retención del fluoróforo adecuada (al usar PAA), pero no se han obtenido respuestas a los diferentes analitos ensayados.

2.- Ninguno de los fluoróforos que se han usado tiene una reactividad química adecuada como para dar enlaces fuertes con los soportes, por lo que la opción del enlace covalente no se ha podido explorar completamente. Se decidió sintetizar un derivado de la berberina que dispusiera de grupos reactivos adecuados y que pudiera formar enlaces covalentes (no entrapamiento) con soportes sólidos. Con este fluoróforo, la berberrubina, se han obtenido láminas sensoras estables por inmovilización sobre *silica gel* activada. En el apartado 6.5, con el nombre de "Sensor de berberrubina", se señalan los resultados obtenidos.

6.3.2.- Modelo matemático de respuesta

a) Simplificación del modelo de fluorescencia en sólidos

En el capítulo 5 se han presentado dos modelos que permiten describir la fluorescencia en medio sólido: las ecuaciones (5.21) se utilizan en ausencia de filtro interno y las ecuaciones (5.25) cuando dicho efecto existe. En este apartado se va a particularizar este modelo para el caso de medidas FDIC realizadas sobre disoluciones que sólo contengan analito, sin interferencias. Además la celda sensora está diseñada para medir la componente de retroceso ("backward"), por tanto, la ecuación que describe la fluorescencia de la lámina será la (5.21b).

$$F_{b,G(\mu)} = I_0 \Phi \left[\frac{[b(2s_{EM}L+1)(a-1)\mu s_{EX} - 2bs_{EM}]Sh(b\mu s_{EX}L)}{2b\mu s_{EX}(s_{EM}L+1)[aSh(b\mu s_{EX}L) + bCh(b\mu s_{EX}L)]} \right. \\ \left. + \frac{[b^2(2s_{EM}L+1)\mu s_{EX} - 2s_{EM}(a-1)]Ch(b\mu s_{EX}L) - [2s_{EM}(a-1) - b^2\mu s_{EX}]}{2b\mu s_{EX}(s_{EM}L+1)[aSh(b\mu s_{EX}L) + bCh(b\mu s_{EX}L)]} \right]$$

Está claro que esta ecuación resulta difícil de manejar y requiere la aplicación de algún tipo de simplificación. En la tabla 6.2 se describe un procedimiento de simplificación utilizado que es válido cuando las láminas son muy finas (como es en este caso). Dicha simplificación transforma la ecuación anterior en la siguiente (6.1), en la que se ha incluido la constante instrumental (K^{ins}) y la forma del espectro de fluorescencia del fluoróforo (S_F) para adecuarla a las condiciones de medida.

$$F_b = \frac{1}{6} K^{ins} \Phi_F S_F L \left(\frac{3 + 2s_{EM}L}{1 + s_{EM}L} \right) \mu k \quad (6.1)$$

En esta ecuación el valor de μ dependerá del tipo de lámina sensora que se tenga, es decir, de si se cumple la ecuación (5.19) o (5.20).

En el primer caso, la ecuación queda:

$$F_b = \frac{1}{6} K^{ins} \Phi_F S_F L \left(\frac{3 + 2S_{EM} L}{1 + S_{EM} L} \right) S_{EX}^{\frac{1}{4}} k^{\frac{3}{4}} \quad (6.2)$$

Dado que la concentración de fluoróforo se encuentra en el coeficiente de absorción (k), la ecuación indica que la intensidad de fluorescencia no varía linealmente con la intensidad de fluoróforo.

En el segundo caso la ecuación (6.1) queda:

$$F_b = \frac{1}{3} K^{ins} \Phi_F S_F L^2 \left(\frac{3 + 2S_{EM} L}{1 + S_{EM} L} \right) S_{EX} k \quad (6.3)$$

que sí muestra linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de fluoróforo. Considerando los resultados mostrados en el capítulo anterior, ésta será la ecuación a utilizar para describir la fluorescencia de los sensores ensayados.

1ª consideración: el valor de $s_{EX} \gg k$. En estas circunstancias los valores de a y b de (5.21b) vendrán dados por:

$$a = 1$$

$$b = 2 \sqrt{\frac{k}{s_{EX}}}$$

2ª consideración: se aplica el desarrollo de Taylor a las funciones Ch y Sh, tomando sólo los dos primeros términos de la serie:

$$\text{Sh}(\mu b s_{EX} L) \approx \mu b s_{EX} L + \frac{1}{6} (\mu b s_{EX} L)^3$$

$$\text{Ch}(\mu b s_{EX} L) \approx 1 + \frac{1}{2} (\mu b s_{EX} L)^2$$

Aplicando ambas consideraciones sobre la ecuación (5.21b), queda:

$$F_b = \frac{1}{24} I_0 \Phi \left(\frac{3 + 2s_{EM} L}{1 + s_{EM} L} \right) \left(\frac{\mu^2 b^2 s_{EX}^2 L^2}{1 + \mu s_{EX} L + \frac{1}{2} (\mu b s_{EX} L)^2 + \frac{1}{6} (\mu s_{EX} L)^3 b^2} \right)$$

3ª consideración: para el caso de láminas sensoras (sólidos) de bajo espesor (< 1 mm), valores de s entre 10-100 y de k entre 0.1-1, se puede demostrar numéricamente que los dos términos del denominador más importantes son los dos primeros, y por tanto

$$1 + \mu s_{EX} L + \frac{1}{2} (\mu b s_{EX} L)^2 + \frac{1}{6} (\mu s_{EX} L)^3 b^2 \approx 1 + \mu s_{EX} L \approx 2 \mu s_{EX} L$$

Bajo esta última consideración, la ecuación para F_b queda finalmente

$$F_b = \frac{1}{6} I_0 \Phi \mu L \left(\frac{3 + 2s_{EM} L}{1 + s_{EM} L} \right) k$$

4ª consideración: hay que tener en cuenta que la medida se realizará en un instrumento con un determinado valor de K^{ins} (en el que se incluye I_0) y que el rendimiento cuántico, Φ , se puede establecer como el producto del rendimiento cuántico global multiplicado por el perfil del espectro: $\Phi_r S_r$, con lo que queda la ecuación (6.3).

Tabla 6.2.- Simplificaciones de la ecuación general.

b) Modelo general para FDIC en sólidos

Como se ha indicado, la única especie absorbente del sensor es el fluoróforo, de aquí que el coeficiente de absorción venga dado por:

$$k = 2.3 \epsilon_F^\lambda C_F \quad (6.4)$$

Cuando este valor se incluye dentro de (6.3) y se considera la definición del rendimiento cuántico de fluorescencia, se obtiene:

$$F_b = K^{\text{sen}} K_F^{\text{ins}} S_F C_F \left(\frac{k^r}{k^r + k^{\text{nr}}} \right) \epsilon_F^\lambda \quad (6.5)$$

donde K^{sen} , definida como

$$K^{\text{sen}} = \frac{2.3}{3} S_{\text{EX}} L^2 \left(\frac{3 + 2 S_{\text{EM}} L}{1 + S_{\text{EM}} L} \right) \quad (6.6)$$

es una constante que agrupa solamente parámetros ópticos que tienen que ver con las características físicas de la lámina sensora (coeficientes de dispersión y espesor), pero no con el fluoróforo que está dentro de ella. Este valor permanecerá constante siempre que el soporte sólido en el que esté basado el sensor no cambie, independientemente del fluoróforo que contenga y del analito que se esté estudiando por FDIC.

Si se compara la ecuación (6.5) con la ecuación (2.8) se observa que, a excepción de K^{sen} , ambas ecuaciones son análogas y, por tanto, todo lo indicado en el capítulo 2 para describir el efecto del entorno en el fluoróforo es válido para la lámina sensora. Operando de la misma forma se podrá obtener la ecuación que describe la señal FDIC en un soporte sólido:

$$F = K^{\text{sen}} K_F^{\text{ins}} \left(\frac{f_{n,M}^4}{n_M f_{n,M}^4 + Y_F e^{P_F f_{\epsilon,M}}} \right) \quad (6.6)$$

que es análoga a la (2.33), sólo que incluye el término K^{sen} . Como es lógico, el medio está constituido por el soporte sólido que conforma el sensor (junto con el disolvente, si se trata de un soporte permeable) y el analito.

Para incluir la concentración del analito en esta ecuación se siguen los mismos pasos que se indicaron en el capítulo 2 y que llevan a la ecuación (2.63) para el modelo lineal

$$F = F_0 + F_0(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A})X_{V,A} \Rightarrow \Delta F = \frac{F - F_0}{F_0} = (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A})X_{V,A} \quad (6.7)$$

o (2.67) para el modelo cuadrático

$$\Delta F = (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A})X_{V,A} - \frac{3}{2}P_F E_{D,A}[(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) + (N_{D,A} - 2E_{D,A}(\epsilon_D + 2))]X_{V,A}^2 \quad (6.8)$$

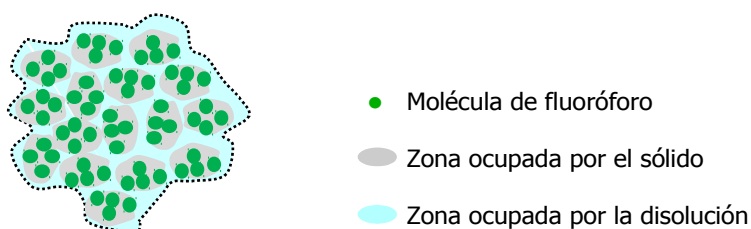
Estas ecuaciones describen el comportamiento analítico de los sensores para ser usados en FDIC. Como se han indicado, son formalmente análogas a las obtenidas para FDIC en disolución.

6.4.- SENSORES BASADOS EN EL ENTRAMPAMIENTO DEL FLUORÓFORO EN POLIACRILAMIDA

6.4.1.- Ideas generales y ensayos previos

Como se ha indicado antes, en las láminas sensoras formadas por entrapamiento el fluoróforo se encuentra rodeado por una matriz sólida que, dependiendo del tipo de polímero, está más o menos hidratada. El índice de refracción y la constante dieléctrica de este polímero condicionará la señal del

fluoróforo atrapado en ella. Cuando la disolución de muestra se pone en contacto con la lámina, el analito podría acceder a su interior (en función de la permeabilidad del soporte sólido hacia él), alterando el entorno del fluoróforo, pero dado que el analito no es capaz de desplazar al polímero, sólo puede interactuar con las moléculas periféricas, por lo que su efecto real sobre la constante dieléctrica y/o el índice de refracción del medio que rodea al fluoróforo será muy limitado en comparación con el que produce el polímero.



Un ejemplo de este comportamiento es la glucosa. En disolución acuosa este compuesto produce un aumento de la fluorescencia de la coralina (figura 6.8). Sin embargo, cuando el fluoróforo se encuentra atrapado en una lámina de poliacrilamida (PAA) la glucosa no provoca cambio alguno de su fluorescencia. Dado que este compuesto es capaz de difundir a través de las membranas de PAA¹³², es el atrapamiento del reactivo el causante de la falta de respuesta.

Es de esperar que este tipo de comportamiento sea general para la mayoría de los compuestos, de aquí que este tipo de láminas tengan un uso muy limitado para actuar como sensoras de cambios de índice de refracción o de constante dieléctrica de analitos de bajo peso molecular, situación que también ocurre con los sensores de plasmón superficial. Sin embargo, si el analito fuera de dimensiones lo suficientemente grandes, sí que podría llegar a competir con el medio por interactuar con el fluoróforo. Con esta hipótesis, se han realizado

132 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "A Blood-Assisted Optical Biosensor for Automatic Glucose Determination" *Talanta*, **2009**, 78, 846-851.

pruebas previas usando moléculas más grandes, en particular proteínas y polímeros, obteniéndose respuestas de la lámina a la concentración de estos analitos. Estos ensayos dan una idea inicial del tipo de sustancias para las que pueden ser adecuados estos sensores.

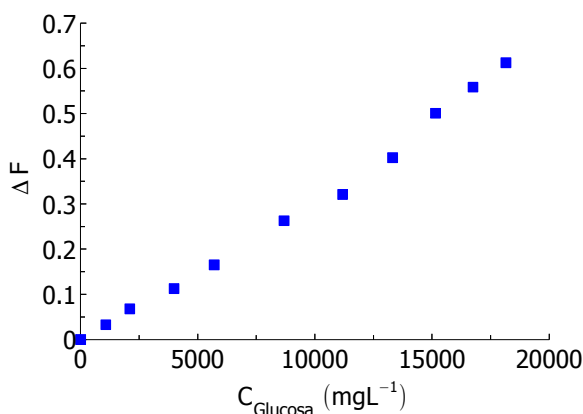


Figura 6.8.- Variación de la intensidad de fluorescencia de una disolución de coralina en agua de 20 mgL⁻¹ tras adiciones de glucosa (Las medidas se han llevado a cabo siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.1.4).

6.4.2.- Mecanismos adicionales de cambio de fluorescencia: modelo matemático para sensores FDIC en geles

Partiendo de la base de que el analito a medir es de elevado peso molecular, además del cambio de fluorescencia provocado por el mecanismo FDIC propuesto a lo largo de la Tesis, es necesario contemplar un segundo mecanismo provocado por el cambio de volumen que sufre la lámina cuando el analito permea en su interior¹³³. Esto puede dar lugar a dos efectos físicos sobre la estructura de la lámina:

133 Aktas, D. K.; Evingur, I. A.; Pekcan, O.; "Study on Swelling of Hydrogels (PAAm) at Various Temperatures by Using Fluorescence Technique" *J. Mater. Sci.* **2007**, 42, 8481-8488.

- Por una parte, debido al cambio de composición, se producirá una alteración en los coeficientes de dispersión (s_{EX} y s_{EM}) lo que producirá un cambio en K^{sen} . Este cambio podrá ser positivo, negativo o incluso no producirse, dependiendo de si los coeficientes de dispersión aumentan, disminuyen o se compensan.

- Por otra, al aumentar el volumen de la lámina sin cambiar la cantidad de fluoróforo se producirá una disminución efectiva de la concentración de fluoróforo. Dado que la señal de fluorescencia es proporcional a la concentración, se producirá una disminución neta de la señal de fluorescencia. Esta pérdida de señal se recuperará una vez que el analito haya abandonado la lámina. En definitiva, se producirá un efecto "acordeón" que se trasladará a la señal de fluorescencia.

Aunque ambos procesos son posibles, en trabajos anteriores se ha visto que los cambios provocados en los coeficientes de dispersión tienen a ser pequeños¹³⁴ por lo que se considera más probable la hipótesis de cambio de concentración. Bajo esta hipótesis la relación entre la concentración de fluoróforo efectiva (C_F) en la lámina y la concentración de analito vendrá dada por:

$$C_F = C_{F,0} (1 - K_{P,A} X_{V,A}) \quad (6.9)$$

donde $C_{F,0}$ es la concentración de fluoróforo que originalmente existe en la lámina, $K_{P,A}$ es la constante de permeabilidad (permeación) del analito en la lámina sensora y $X_{V,A}$ sigue siendo la fracción en volumen del analito en la disolución de muestra en contacto con la lámina.

134 Sanz, V.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Direct Glucose Determination in Blood Using a Reagentless Optical Biosensor" *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2876-2883.

Combinando (6.9) con (6.7) se puede obtener la ecuación global que relaciona la intensidad de fluorescencia leída con la concentración de analito, considerando los dos efectos. Es importante tener en cuenta que la concentración de fluoróforo se encuentra dentro de la constante instrumental que, a su vez, se encuentra englobada dentro de F_0 , por tanto la fluorescencia de la lámina en presencia del analito vendrá dada por:

$$F = F_0(1 - K_{P,A} X_A) + F_0(1 - K_{P,A} X_A)(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) X_{V,A} \quad (6.10)$$

por lo que el cambio de fluorescencia total observado será:

$$\Delta F = \frac{F - F_0}{F_0} = [(N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) - K_{P,A}] X_{V,A} - (N_{D,A} - 3P_F E_{D,A}) K_{P,A} X_A^2 \quad (6.11)$$

La ecuación (6.11) es, en realidad, una aproximación dado que, de origen, se ha considerado un comportamiento lineal entre el cambio de fluorescencia debido al entorno y la concentración de analito, es decir, se ha considerado la expresión (6.7) en lugar de la (6.8). Sin embargo, sí permite ver de forma cualitativa lo siguiente:

1.- Debido estrictamente al efecto del incremento de volumen, la señal del fluoróforo tiende a disminuir. Por tanto es de esperar que el analito genere señales negativas.

2.- Si el mecanismo FDIC produce aumento en la fluorescencia del fluoróforo, este puede quedar parcial o totalmente compensado por el descenso debido al hichamiento del sólido.

Finalmente, trabajando en un sistema en flujo es importante considerar efectos cinéticos. Ya se ha visto en el capítulo 3 que el mecanismo FDIC es rápido. Sin embargo se ha descrito que el proceso de hinchado-deshinchado del polímero es más lento¹³⁵. Esto puede provocar perfiles anómalos en las señales obtenidas en flujo.

6.4.3.- Sensor de coralina en PAA para medio acuoso

a) Preparación de las láminas

Las láminas de coralina preparadas usando el procedimiento básico (apartado 6.2.3) presentan dos problemas: por un lado, no se observan variaciones en la fluorescencia de la lámina incluso en presencia de analitos de gran tamaño como la albúmina y por otro, la coralina se lixivia de la estructura de PAA y se disuelve en el flujo de la disolución portadora acuosa, lo que produce una deriva sustancial de la línea de base. Para resolver el problema de la lixiviación se han ensayado diferentes estrategias.

1.- Cambios en la relación acrilamida/bisacrilamida (AA/BAA). Se sabe que ajustando la relación AA/BAA al preparar la lámina se puede variar el tamaño medio de poro del polímero resultante, ya que se produce un entrecruzamiento distinto para cada relación. De acuerdo con ello, se han usado distintas relaciones de AA/BAA para la polimerización hasta obtener una estructura de poro adecuada para la retención de la coralina. Sin embargo, no se han obtenido resultados positivos.

135 Evingur, I. A.; Karsli, K.; Peckan, O.; "Monitoring Small Molecule Diffusion into Hydrogels at Various Temperatures by Fluorescence Technique" *Int. J. Pharm.* **2006**, 326, 7-12.

2.- Solubilización de la coralina. Una inspección más detallada de estas láminas revela que la coralina precipita durante la preparación, debido a su insolubilidad con el persulfato. Se ha conseguido evitar la precipitación usando dimetilsulfóxido para disolver el fluoróforo, pero una vez obtenida la lámina, tampoco se ha obtenido señal con los analitos.

3.- Cambio en el procedimiento de síntesis de la PAA. Se han obtenido mejores resultados con las láminas sensoras preparadas usando el procedimiento basado en dispersión. Como se ha indicado en el apartado 6.2.3, la principal característica de este procedimiento es la adición de albúmina bovina después de la solubilización de la acrilamida, la bisacrilamida y la coralina, pero antes de la adición del persulfato y previa a la formación de la lámina. Esta dinámica de trabajo evita la precipitación de la coralina causada por el persulfato. No se sabe muy bien cuál es el efecto químico real de la albúmina, pero al tratarse de una proteína de transporte general en el organismo es razonable pensar que actúa de igual manera con la coralina evitando así su precipitación y favoreciendo su dispersión en la lámina. Además, mientras que la reacción de polimerización con el procedimiento básico dura unos 60 minutos, en el procedimiento de dispersión dura 15 minutos. Esto es debido, probablemente, al efecto de entrecruzamiento (*cross-linking*) de la albúmina en la formación de la PAA, lo que ayuda a la formación y estabilidad del polímero. El uso de este tipo de láminas presenta dos ventajas adicionales:

- La presencia de la albúmina en la lámina permite obtener señales con algunos analitos, lo que se atribuye a que la albúmina aumenta la permeabilidad de la lámina.

- Aumento de la estabilidad del sensor. Aunque no se evita la lixiviación final de la coralina, sí se consigue mantenerla durante más tiempo en la lámina.

b) Efecto de la concentración de la albúmina en la lámina

De lo indicado anteriormente, es claro que la cantidad de albúmina es clave en las propiedades del sensor. Para evaluar el efecto de la concentración de la albúmina en la formación de la lámina se han preparado 3 láminas con distintas concentraciones de albúmina: 5, 10 y 20 mgmL^{-1} . Cuanto mayor es la concentración inicial de albúmina, mayor es la homogeneidad de la lámina. Con ellas se ha medido en las mismas condiciones las señales producidas por distintas disoluciones de albúmina, en este caso usada como analito. Hay que destacar que la albúmina usada como dispersante en la polimerización forma parte de la estructura de la lámina y no influye en la señal de albúmina usada como analito. Los resultados pueden verse en la figura 6.9.

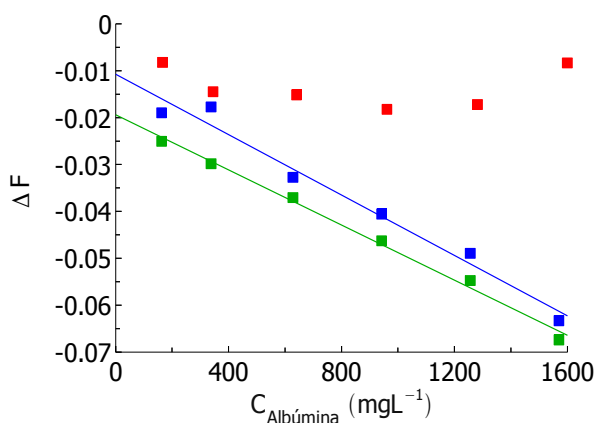


Figura 6.9.- Variación de la señal de fluorescencia Variación de la señal de fluorescencia que provocan distintas disoluciones de albúmina en agua, en función de la albúmina añadida en la preparación de la lámina: (■) 5 mgmL^{-1} , (■) 10 mgmL^{-1} y (■) 20 mgmL^{-1} . (CFFIM, rendijas: 15 nm excitación y emisión, caudal=0.4 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{EX}}=425$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=460$ nm, volumen de muestra=1 mL).

Como puede verse, la lámina preparada con la menor cantidad de albúmina en su estructura muestra un comportamiento adverso dado que no parece haber relación entre la señal fluorescente y la concentración de analito.

c) Ensayos con diferentes analitos

Una vez conseguida la composición óptima de la lámina se ha procedido a la evaluación de las señales que producen distintos analitos, todos ellos sustancias de elevada masa molecular, en orden decreciente: glucosa oxidasa ($M_A=165000 \text{ gmol}^{-1}$), albúmina bovina ($M_A=66000 \text{ gmol}^{-1}$) y polietilenglicol (PEG, $M=23000 \text{ gmol}^{-1}$). La figura 6.10 muestra, de forma comparada, señales obtenidas con cada uno de ellos.

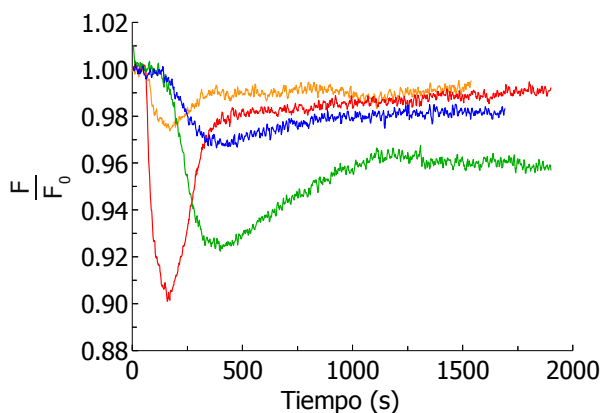


Figura 6.10.- Señales normalizadas de PEG 23000 (1000 mgL^{-1}) (-), albúmina bovina (1000 mgL^{-1}) (-), GOx (2500 mgL^{-1}) (-) y (600 mgL^{-1}) (-), obtenidas con una lámina de poliacrilamida y coralina (20 mgmL^{-1} de albúmina en la estructura). (CFFIM, rendijas 15 nm excitación y emisión, caudal= 0.4 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{EX}}=425 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{EM}}=460 \text{ nm}$, volumen de muestra= 1 mL).

Para los distintos analitos se producen picos negativos con respecto a la línea de base. En el caso de la albúmina, este resultado concuerda con lo que se obtiene en disolución, tal como se observa en la figura 6.11, con lo que el efecto de aumento de volumen que sufre la lámina y el efecto del analito sobre la fluorescencia de la coralina van en la misma dirección.

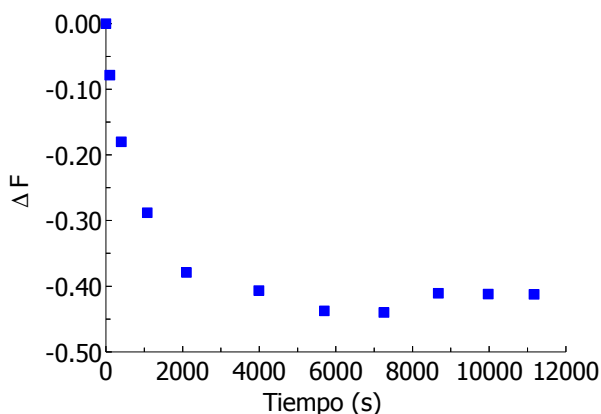


Figura 6.11.- Variación de la intensidad de fluorescencia de una disolución de coralina en agua de 20 mgL^{-1} tras adiciones de albúmina. (Las medidas se han llevado a cabo siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.1.4).

Es muy interesante observar el tiempo de aparición de la señal: las señales de las disoluciones de glucosa oxidasa aparecen a unos 25 s mientras que las de los otros analitos, de menor peso molecular, tardan unos 105 s. En ninguno de los casos se recupera completamente la señal de base, en un tiempo razonable, tras la adición. Estos resultados pueden interpretarse considerando la cinética de hinchamiento, aunque teniendo en cuenta la estructura en poros de la PAA parecen indicar que en la lámina hay cierto efecto de "exclusión": a las moléculas más voluminosas les cuesta menos tiempo atravesar la red de PAA, mientras que las moléculas más pequeñas tardan más tiempo en atravesar la red de los canales y capilares que forma la lámina. Este efecto puede aportar cierta singularidad analítica a este tipo de sensores.

Como muestra de las posibilidades que puede ofrecer este tipo de sensores, la figura 6.12 presenta un registro en el que se aprecia cómo varía la intensidad de fluorescencia de la lámina sensora al inyectar las diferentes concentraciones de albúmina que conforman el estudio de calibración mostrado en la figura 6.11. Aunque la variación de la concentración con respecto a la

intensidad proporcione buena regresión, la deriva de la línea de base, debida a la pérdida de la coralina de la estructura laminar hace que el tiempo de vida del sensor sea muy limitado.

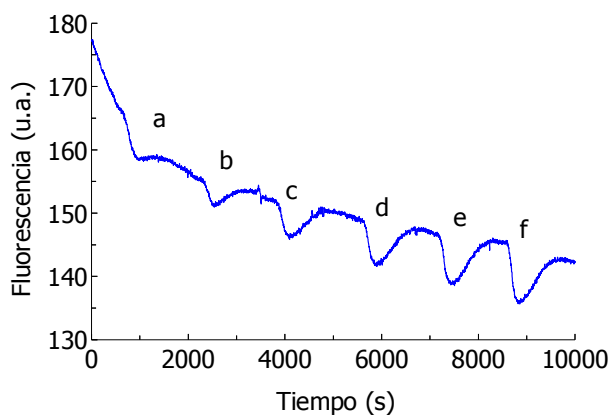


Figura 6.12.- Inyección de disoluciones de albúmina en agua: (a) 160 mgL⁻¹, (b) 340 mgL⁻¹, (c) 630 mgL⁻¹, (d) 961 mgL⁻¹, (e) 1250 mgL⁻¹ y (f) 1570 mgL⁻¹, obtenidas con una lámina de PAA y coralina de 20 mgmL⁻¹ de albúmina en la estructura. (CFFIM, rendijas: 15 nm excitación y emisión, caudal=0.4 mLmin⁻¹, λ_{EX}=425 nm, λ_{EM}=460 nm, volumen de muestra=1 mL).

d) Estudios adicionales

En el contexto del modelo matemático se realizaron una serie de estudios experimentales adicionales que ahora pueden ser utilizados para clarificar algunos de los puntos y conclusiones obtenidos en este capítulo. Dado que esos estudios se realizaron originalmente con otra finalidad, se han incluido en anexos a esta memoria. En el anexo A1 se demuestra que el tipo de señales obtenidas son debidas a fenómenos de difusión en la lámina sensora y no al paso del analito por la celda. En el anexo A2 se demuestra que los fenómenos de hinchamiento provocados por la albúmina en láminas de PAA no se producen cuando dicha lámina contiene retenidas sustancias de mayor peso molecular, lo que apoya la idea del efecto "acordeón" comentado.

6.4.4.- Sensor de coralina en PAA para medio acuoso/metanol

a) Preparación de las láminas

Se ha estudiado la preparación de las láminas sensoras por el procedimiento de perfusión (6.2.3) para detectar polietilenglicoles (PEG) en medio acuoso/metanol.

Aunque las láminas de PAA con coralina se han preparado mediante el procedimiento de perfusión en metanol puro, no es posible hacer medidas cuando se usa este metanol puro como disolvente portador, ya que la lámina se endurece y arruga, disminuyendo su tamaño de poro y haciendo imposible su colocación en la celda de flujo. Además, el metanol puro estropea las tapas de metacrilato de la celda.

El efecto que provoca el metanol en las láminas se ha observado en el laboratorio también en otros disolventes orgánicos, como acetona o acetonitrilo, en láminas de poliacrilamida normales. En términos generales, el tamaño de poro de los geles de poliacrilamida depende de la proporción AA/BAA, pero también de la cantidad de agua que queda en su estructura reticular. Cuando la lámina entra en contacto con otro disolvente, éste desplaza el agua y la lámina se contrae, quedando con un aspecto blanco-opaco, pues la estructura del poro se ve afectada¹³⁶. Este proceso es cuasi reversible: cuando la lámina preparada inicialmente se vuelve a colocar en agua, tras estar en medio orgánico, experimenta una expansión y recupera su aspecto inicial. Este hecho parece confirmar, de alguna manera, la tendencia de las láminas de PAA a alterar su volumen en función del medio que les rodea, lo que apoya la hipótesis sobre el cambio de fluorescencia que se materializa en la ecuación (6.11).

136 García Pérez, H. M.; "Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia" *Univ. Diag.* **2000**, 1, 31-41.

El problema se ha resuelto trabajando con mezclas agua/metanol. La lámina se contrae, pero no tanto como en metanol puro, lo que la hace más manejable y adecuada para su uso. Además, con este disolvente no se observan derivas tan pronunciadas en la línea de base, y, aunque necesita un tiempo de estabilización, la lámina puede usarse unas dos semanas. En este caso, la disminución de poro mitiga la pérdida de coralina de la estructura de PAA.

b) Medida de PEGs

Se han obtenido señales con polietilenglicoles de distinto peso molecular. En la figura 6.13 se muestra la señal obtenida al inyectar distintas concentraciones de PEG de 4250 gmol^{-1} .

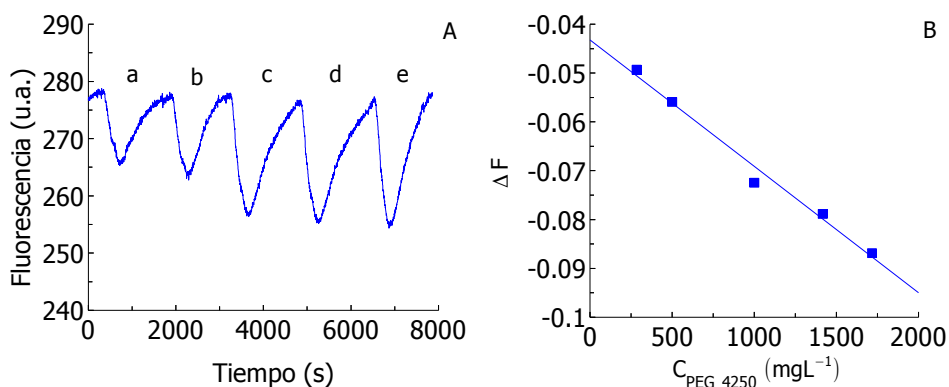


Figura 6.13.- Inyección de PEG 4250: (a) 280 mgL^{-1} , (b) 500 mgL^{-1} , (c) 860 mgL^{-1} , (d) 1000 mgL^{-1} y (e) 1420 mgL^{-1} , con una lámina de PAA y coralina en mezcla de agua/metanol (50% v/v). (A) Espectro y (B) regresión: $\Delta F = 2.6 \cdot 10^{-5} C_{\text{PEG 4250}} + 4.3 \cdot 10^{-2}$; $R^2=0.98$. (CFFIM, rendijas: 15 nm de excitación y emisión, caudal=0.4 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{EX}}=425$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=480$ nm, volumen de muestra=1mL).

Para comprobar qué comportamiento tienen los polietilenglicoles en disolución se han hecho adiciones sobre coralina en agua y en metanol (figura 6.14). Como puede verse los resultados son contrarios a los obtenidos en la

lámina, ya que en disolución se observan aumentos de la señal en los dos medios y, sin embargo, en el sensor sólo se obtiene disminución de fluorescencia. Este hecho también apoya la hipótesis del cambio de volumen que provoca el analito.

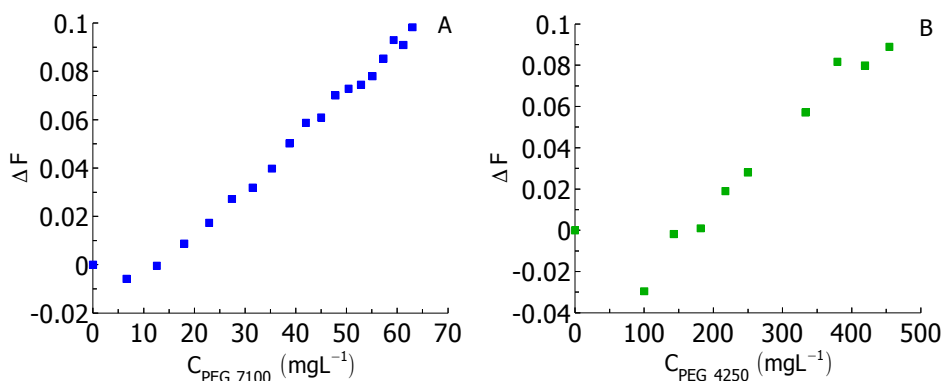


Figura 6.14.- (A) Variación de la intensidad de fluorescencia de la coralina en metanol de 3 mgL^{-1} tras las adiciones de PEG 7100 ($\lambda_{\text{EX}}=423$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=475$ nm). (B) Variación de la intensidad de fluorescencia de la coralina en agua de 3 mgL^{-1} tras las adiciones de PEG 4250 ($\lambda_{\text{EX}}=410$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=470$ nm).

6.5.- SENSOR DE BERBERRUBINA

6.5.1.- Síntesis de la berberrubina

En un trabajo previo, se propuso el catión berberina como sonda para alcanos, basada en las interacciones no específicas^{137 138}. Debido a la falta de derivados comerciales adecuados para su unión a *silica gel* de este fluoróforo, se ha obtenido la berberrubina mediante síntesis partiendo de la propia

137 Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Garriga, R.; Vela, J.; Domingo, M. P.; "Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. An Explanation of this Phenomenon" *Org. Lett.* **2000**, 2, 2311-2313.

138 Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cebolla, V. L.; Fernandes, F.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Garriga, R.; Vela, J.; Guermouche, M. H.; "General Contribution of Nonspecific Interactions to Fluorescence Intensity". *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3699-3705.

berberina.

La obtención de la berberrubina se consigue a través de la desmetilación selectiva del grupo metoxilo de la berberina. Se han desarrollado dos procedimientos originales de síntesis basados en irradiación por microondas y pirólisis en vacío, respectivamente.

a) Irradiación por microondas

Para llevarla a cabo, en un vial apto para microondas se introducen 100 mg (0.287 mmol) de cloruro de berberina y se hace el vacío. El proceso se lleva a cabo mediante la selección de la temperatura máxima, el tiempo y la potencia (tabla 6.3). Se han hecho varias pruebas concluyendo que la mejor opción es la prueba 4 que consta de dos etapas: en una primera se calienta la muestra durante 5 minutos hasta 130°C a 300 W tras la cual se deja enfriar hasta temperatura ambiente y una segunda en la que se vuelve a calentar durante 10 minutos hasta 180°C también a potencia de 300 W, obteniendo así un 100 % de conversión en berberrubina. El rendimiento por este método es del 85.26 %. (En el anexo A.6.2 aparecen los espectros de RMN de las pruebas 3 y 4 citadas en la tabla).

Prueba	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Potencia (W)	Conversión (%)
1	180	20	300	-(*)
2	200	15	300	-(*)
3	130	5/10/5	300	47
4	130/180	5/10	300	100

Tabla 6.3.- Condiciones de las pruebas realizadas para obtener berberrubina mediante irradiación por microondas. (*) No se obtiene el producto deseado.

b) Pirólisis en vacío

En este caso se empieza introduciendo en un matraz 250 mg (0.718 mmol) de cloruro de berberina, se hace el vacío y se empieza a calentar hasta alcanzar la temperatura deseada. También se han realizado varias pruebas (tabla 6.4) consiguiendo una conversión del 100 % en la prueba 7, cuando se deja reaccionar el producto durante 300 minutos a 200°C. Durante el proceso se observa que a partir de 180°C la berberina, un sólido de color amarillo, adquiere un tono naranja-rojizo, característico de la berberrubina. Por este método se consigue un rendimiento del 76%. (Los espectros de RMN de estas pruebas pueden verse en el anexo A.6.2).

Prueba	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Velocidad (rpm)	Conversión (%)
5	150	45	50	8
6	200	210	30	80
7	200	300	30	100

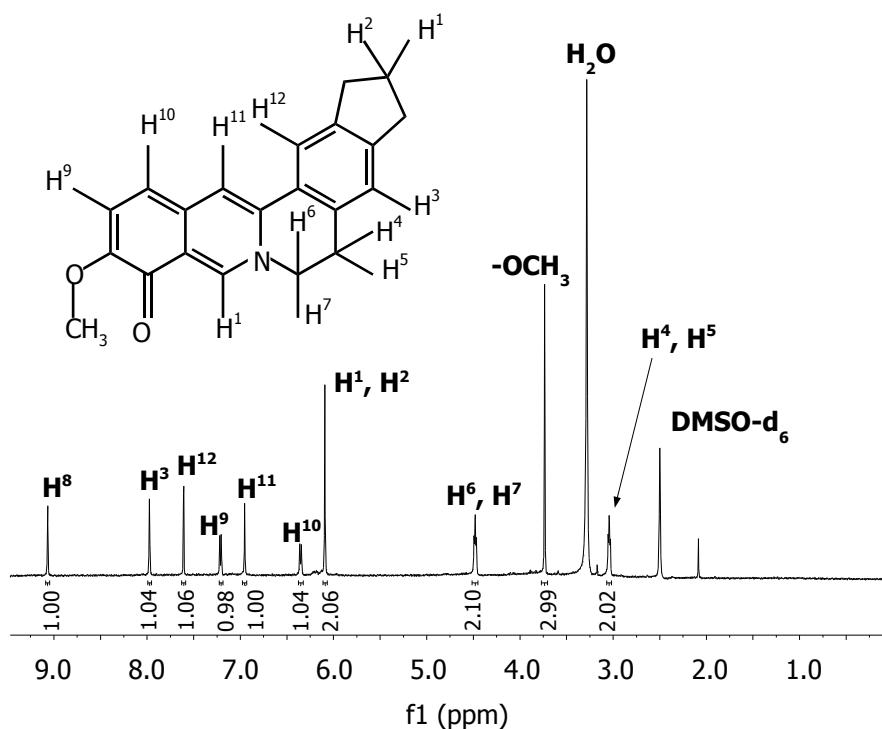
Tabla 6.4.- Condiciones de las pruebas realizadas para obtener berberrubina mediante pirólisis en vacío.

En su caracterización por ¹H-RMN pueden verse todos los protones de la berberrubina, salvo el del grupo hidroxilo, porque la estructura cetónica es la predominante en el dimetilsulfóxido usado para la obtención del espectro (figura 6.15).

6.5.2.- Propiedades de la berberrubina como fluoróforo FDIC

Como se explicó en la primera parte de la Tesis, los incrementos en el rendimiento cuántico de fluorescencia del catión berberina en presencia de alcanos y otras moléculas con cadenas hidrocarbonadas de cierta longitud podrían ser explicados a través del modelo FDIC general. La berberrubina, un fluoróforo dipolar derivado de la berberina, previsiblemente, debería seguir el

modelo general aunque el tiempo de interacción débil dominante será diferente y, por tanto, su respuesta.



^1H -RMN (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 9.07 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.22 (d, $J=7.8$, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.36 (d, $J=7.7$, 1H), 6.10 (s, 2H), 4.48 (t, $J=6.0$, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.10-3.01 (m, 2H).

Figura 6.15.- Forma cetónica de la berberrubina y asignación de señales de ^1H -RMN.

Se ha comprobado experimentalmente que la berberrubina se comporta también como sonda para los alcanos, aunque tiene distintas propiedades que la berberina. Cuando la berberrubina (impregnada en una placa de *silica gel*) está en presencia de alcanos y se excita el sistema a 365 nm también se obtienen señales (adquiriendo la emisión a 400 nm). Sin embargo, a diferencia de la berberina, con la que la respuesta es proporcional al índice de refracción (polarizabilidad) del alcano, la respuesta fluorescente de la berberrubina es casi

constante con el número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada (figura 6.16).

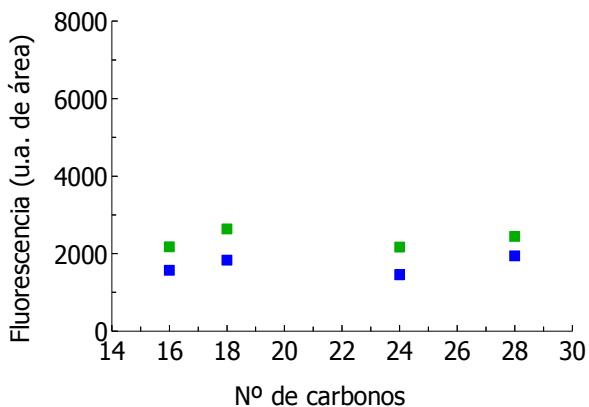


Figura 6.16.- Respuesta cromatográfica de fluorescencia (en áreas) de alkanos con diferentes número de carbonos: (■) sin calentar la placa de *silica-gel* impregnada con berberrubina y (■) calentando la placa a 65° C durante 15 minutos.

De la misma manera, para cada alcano, se obtiene una dependencia lineal de la respuesta con la masa de alcano (figura 6.17). Aunque la berberrubina proporciona un nivel moderado de la señal de fluorescencia con los alkanos (para el tetracosano (C₂₄H₅₀) es un 20% de la respuesta con berberina), el valor absoluto de la señal es medible, repetible y puede usarse en combinación con técnicas cromatográficas como, por ejemplo, HPTLC con densitometría de fluorescencia.

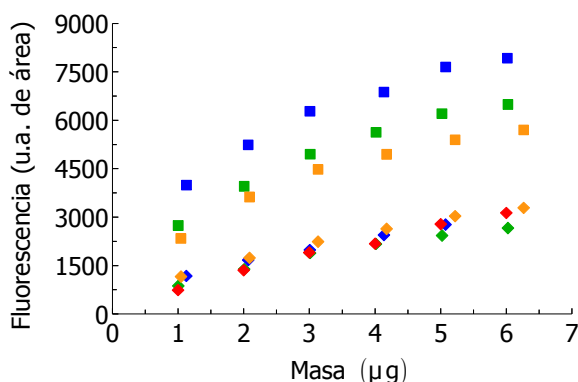


Figura 6.17.- Respuesta cromatográfica de fluorescencia para diferentes muestras de hidrocarburos saturados usando berberina (■) o berberrubina (◆) impregnadas en placas de *silica gel* de HPTLC: (-) n-hexadecano, (+) n-octadecano, (-) n-tetracosano y (-) n-octacosano.

Este hecho hace que la berberrubina pueda utilizarse como detector de masa universal en el análisis de alcanos de diferentes longitudes de cadena, es decir, se pueden analizar muestras desconocidas de diferentes alcanos empleando un patrón de masa de un alcano simple o de una mezcla de alcanos.

Asimismo, puede obtenerse una amplificación de la señal fluorescente de la interacción berberrubina-alcano de dos formas distintas. Como en el caso de la berberina, la sensibilidad de la detección puede incrementarse aumentando la concentración de la berberrubina. Por otro lado, a diferencia de la berberina, la sensibilidad se ha mejorado calentando la placa de *silica gel* usada para la detección.

Como se ha comentado al principio del apartado, el nivel inicial de la señal de fluorescencia de fluoróforos dipolares es bajo. En el caso de la berberrubina, la amplificación está relacionada con sus propiedades espectroscópicas.

Los resultados confirman la formación de un equilibrio ceto-enólico para la berberrubina (en su carbono 7), que depende del pH (figura 6.18).

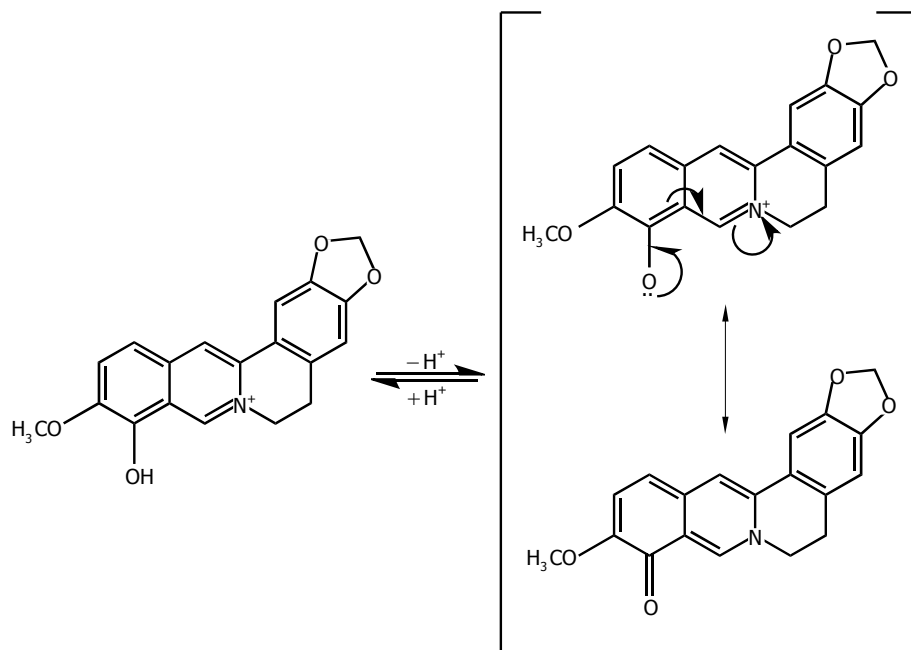


Figura 6.18.- Equilibrio ceto-enólico de la berberrubina.

En un trabajo previo se observó que el espectro UV-VIS de la berberrubina dependía del pH¹³⁹. Como se ve en la figura 6.19, se obtiene la cetona o el enol en medio básico o ácido, respectivamente. También hay diferencias notables en sus espectros de fluorescencia (figura 6.20).

139 Gašparec, Z.; Komorski-Lovrić, Š.; Lovrić, M.; "The Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Berberrubine" *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 970-975.

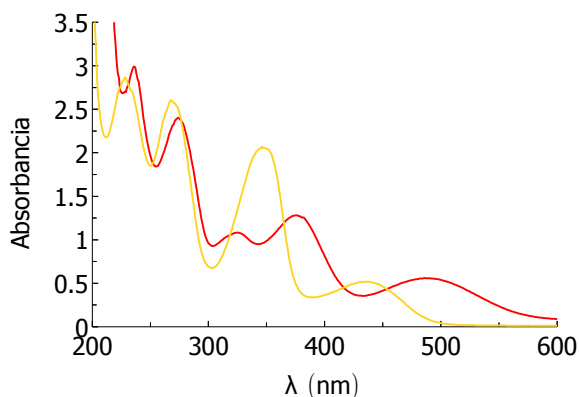


Figura 6.19.- Espectros de absorción UV-VIS de la berberrubina: (-) medio ácido y (-) medio básico. Disolución de 13 mgL^{-1} .

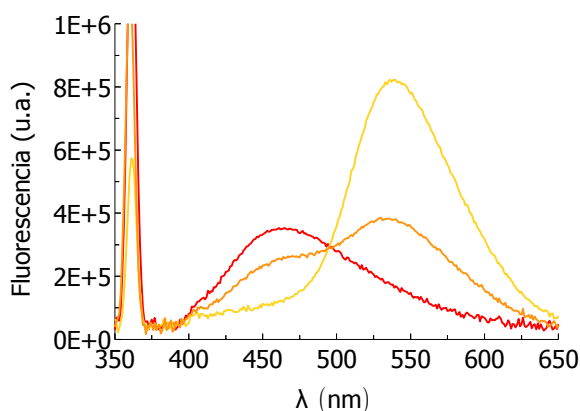


Figura 6.20.- Espectros de emisión de fluorescencia de la berberrubina: (-) medio ácido, (-) medio básico y (-) en metanol. Disolución de 13 mgL^{-1} , rendijas de 5 nm para excitación y emisión, $\lambda_{\text{EX}}=360 \text{ nm}$.

Aunque la berberrubina es fluorescente en ambos medios, su emisión en medio ácido es superior y está desplazada hacia longitudes de onda mayores (de 465 a 540 nm), debido a la mayor aromaticidad del enol. Por otro lado, el espectro de fluorescencia de la berberrubina en metanol presenta dos regiones que corresponden a las dos formas tautoméricas, aunque el máximo de este espectro está en la zona del enol (540 nm). La intensidad de fluorescencia de la

disolución metanólica a esas longitudes de onda es menor que en medio ácido.

Se han obtenido también los espectros de excitación y emisión de la berberrubina medidos directamente en placas de *silica gel* (figura 6.21). Después de la corrección de las señales de fondo, el espectro de emisión muestra un único máximo a 523 nm que sugiere la preponderancia de la forma enólica, a temperatura ambiente, cuando la berberrubina es adsorbida en la *silica gel*. A partir de $\lambda_{EM} > 400$ nm, la forma enólica da mayor fluorescencia que la cetónica.

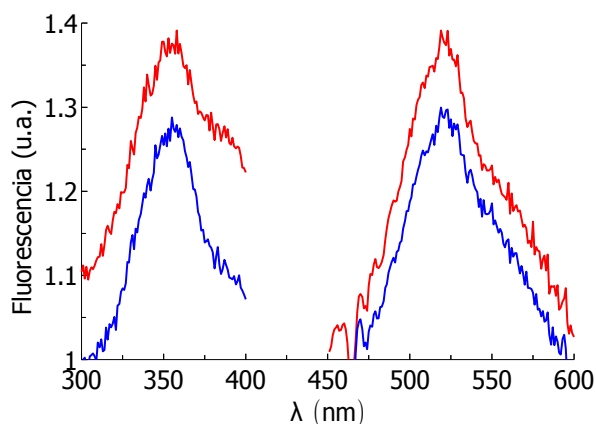


Figura 6.21.- Espectros de fluorescencia corregidos de una placa de silica gel impregnada con berberrubina de 100 mgL^{-1} : (-) a temperatura ambiente y (-) tras calentar a 60°C y dejar enfriar a temperatura ambiente. ($\lambda_{EX}=360 \text{ nm}$, $\lambda_{EM}=530 \text{ nm}$).

La forma enólica implica un incremento de la probabilidad de las interacciones donador-aceptor protónicas con los grupos -OH en la superficie de la *silica gel* lo que dificulta su libertad de orientación a la hora de interactuar con las moléculas de alcano (figura 6.22). Esto puede explicar que la respuesta de fluorescencia de la berberrubina es casi constante con respecto a la longitud de la cadena del alcano, a diferencia de los resultados obtenidos con berberina, y también la baja respuesta de la berberrubina con respecto a la berberina.

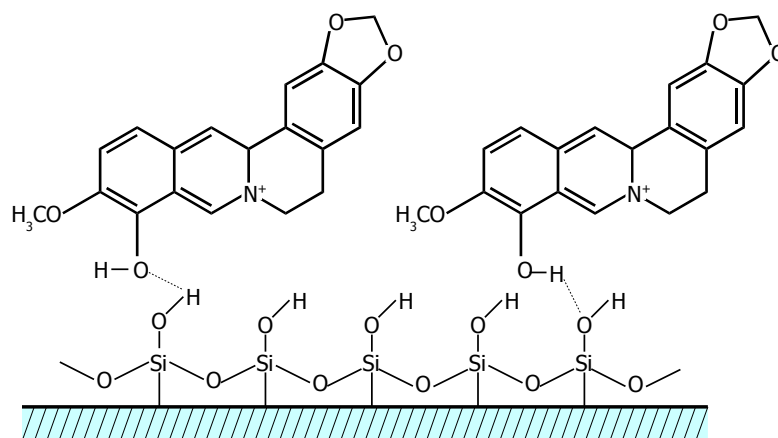


Figura 6.22.- Esquema de la colocación de la molécula de berberina y su interacción con la placa de *silica gel* tras la impregnación.

Los espectros medidos después de calentar y dejar enfriar la placa a temperatura ambiente muestran un aumento de la intensidad de fluorescencia en todo el intervalo de longitudes de onda con respecto a los obtenidos a temperatura ambiente. Estos resultados concuerdan con las áreas de los picos usando el densitómetro. En este caso, la respuesta para el tetracosano ($C_{24}H_{50}$) con la berberrubina aumenta hasta un 40%.

Todos estos factores contribuyen a considerar la berberrubina como un buen fluoróforo FDIC, teniendo en cuenta también nuevas posibilidades debido a la sencillez de su obtención por síntesis, las propiedades tautoméricas y la dependencia con el pH.

6.5.3.- Berberrubina inmovilizada

Una vez sintetizada y caracterizada la berberrubina se ha procedido a su inmovilización en una placa de *silica gel* de 13x13 mm de lado, (ver apartado 6.2.3), usando una disolución en medio clorhídrico de 10 mgL^{-1} , para su posterior colocación en la celda CFMO. Con el fin de comparar la eficacia del método se ha

preparado otra placa similar con berberina impregnada en las condiciones habituales usadas en TLC (disolución de berberina en metanol de 60 mgL^{-1} durante 20 s^{140}). Las señales obtenidas pueden verse en la figura 6.23.

Como se puede ver, la señal con el sensor de berberrubina es completamente estable y la línea de base se recupera tras cada adición, sugiriendo que la unión entre la berberrubina y la *silica gel* de la lámina por este método es estable. Por el contrario, al usar berberina se observa una deriva continua de la línea de base. Hay que señalar que en la figura sólo se muestra la parte final de la medida, ya que se estuvo bombeando disolvente durante 3.5 horas antes de hacer las inyecciones, lo que prueba que la berberina no está unida a la placa y se va diluyendo en el flujo de disolvente.

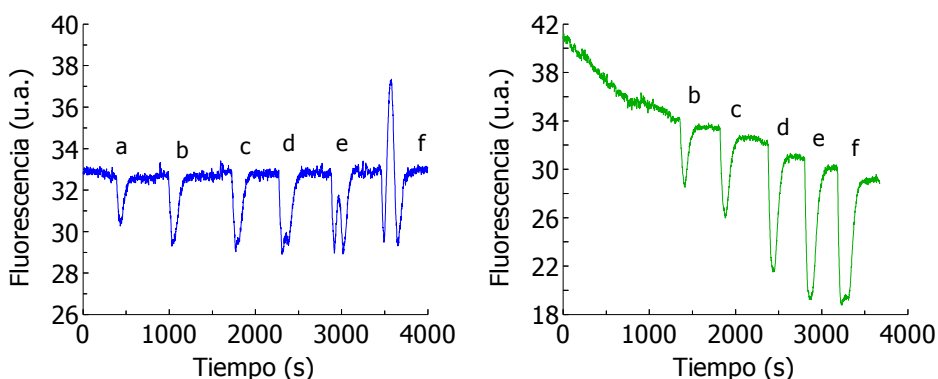


Figura 6.23.- Inyecciones de 1-decanol: (a) 20 %, (b) 30 %, (c) 40 %, (d) 50 %, (e) 60 % y (f) 70 %, a láminas sensoras de berberrubina (-) y berberina (+) en metanol. (CFMO, rendijas: 15 nm de excitación y 20 nm de emisión, caudal= 0.8 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{EX}}=365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=520 \text{ nm}$, volumen de muestra= 0.5 mL).

140 Mateos, E.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Vela, J.; Gálvez, E. M.; Matt, M.; Cossío, F. P.; "Coralyne Cation, a Fluorescent Probe for General Detection in Planar Chromatography" *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1146, 251-257.

Debido a la forma de los picos se ha decidido usar el área en lugar de la variación de intensidad como parámetro de medida para relacionarlo con la concentración del analito (figura 6.24). Aunque la intensidad de las señales es algo menor en el caso de la berberrubina, ya que es menos fluorescente, se obtiene una mejor regresión que con la berberina.

Las figuras muestran que, en ambos casos, se obtienen señales negativas con respecto a la línea de base. Se piensa que esto es, en parte, provocado por el sistema de flujo y la celda. También, si se analiza con detalle el registro, en particular el de la berberrubina, se observa que todas las señales tienen una estructura compleja, ya que en la parte central de la señal tiende a generarse un segundo pico inverso, hacia arriba, que es también proporcional a la concentración de 1-decanol. Es difícil dar una interpretación exacta de este fenómeno. A pesar de que la estructura de la *silica gel* es mucho más rígida que la de la PAA, sí podría considerarse cierto efecto de hinchamiento como consecuencia de la interacción con el analito. Sin embargo, la razón más probable podría ser un comportamiento anómalo de la constante dieléctrica o del índice de refracción en la zona de mezcla entre la disolución portadora y la inyectada, efecto que ya ha sido comentado anteriormente. Justo al llegar a la celda de medida se produce la expansión del portador y la muestra, lo que puede generar el efecto citado. Este hecho sugiere el importante efecto que parece tener la hidrodinámica del sistema, en particular, el diseño de la celda de medida en la señal final.

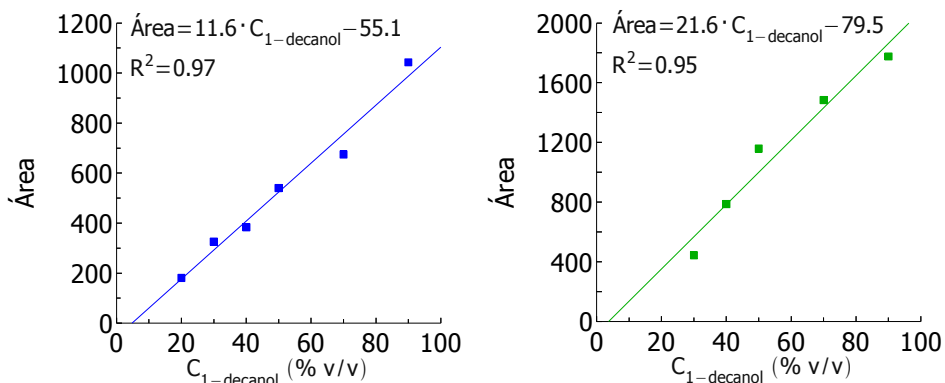


Figura 6.24.- Regresiones de las áreas de los picos en función de la concentración de 1-decanol para las medidas con berberrubina (■) y berberina (■). El área de los picos (d), (e) y (f) de la berberrubina se ha calculado mediante la integración de la señal desde la línea de base sumada a la integración del pico positivo desde su propia base.

Con el fin de demostrar esta hipótesis, recientemente se han hecho ensayos utilizando una celda de medida con un diseño muy diferente a la CFMO en la que se instalaba la misma lámina de *silica gel* con berberrubina inmovilizada. Se trata de una celda de flujo de metacrilato (figura 6.25), de mayor volumen de muestra, y por tanto con una hidrodinámica diferente. Con esta celda, y utilizando el mismo analito (1-decanol) en el mismo portador (metanol) que los correspondientes a la figura 6.23, se han obtenido los resultados que se indican en la figura 6.26.

Como se puede ver, las señales van en la misma línea que las obtenidas anteriormente y muestran los mismos efectos de una manera mucho más clara y acusada. Así, a bajas concentraciones de analito se producen señales negativas, (a) y (b), mientras que para concentraciones mayores se obtienen picos positivos más nítidos y menos distorsionados. Estos resultados demuestran la gran importancia que el diseño de la celda de flujo tiene en medidas FDIC y la necesidad de realizar estudios adicionales que permitan encontrar el sistema más adecuado.

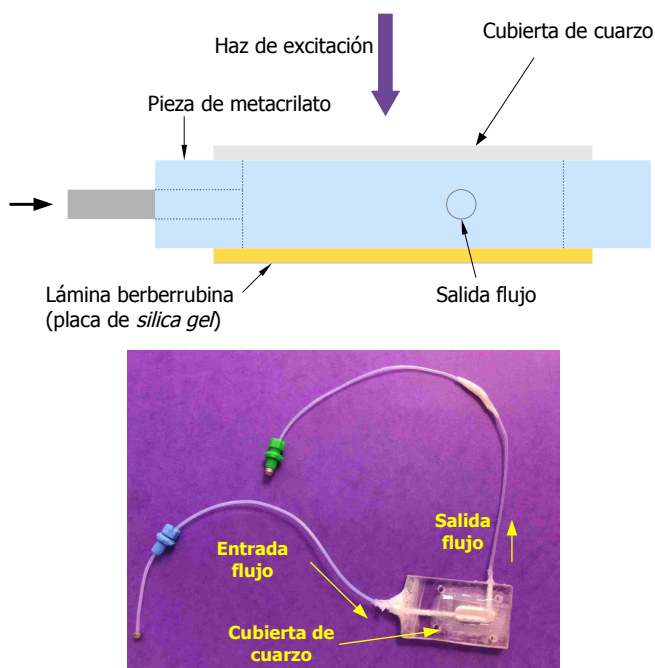


Figura 6.25.- Esquema (vista lateral) e imagen (vista superior) del prototipo de celda de flujo de metacrilato.

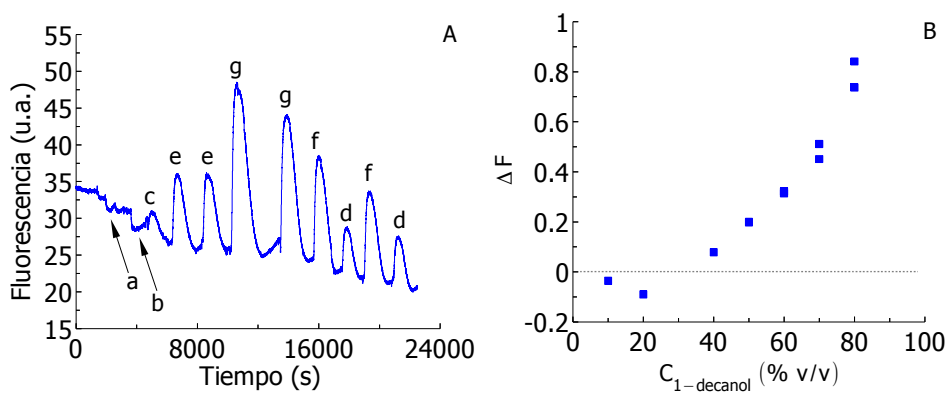


Figura 6.26.- (A) Espectro de fluorescencia de inyecciones de 1-decanol: (a) 10 %, (b) 20 %, (c) 40 %, (d) 50 %, (e) 60 %, (f) 70 % y (g) 80 %, a láminas sensoras de berberubina en metanol. (Celda de metacrilato, rendijas: 15 nm de excitación y 20 nm de emisión, caudal=0.6 mLmin⁻¹, $\lambda_{\text{EX}}=365$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=520$ nm, volumen de muestra=0.5 mL). (B) Representación de la variación de la emisión de fluorescencia en función de la concentración de analito.

6.6.- CONCLUSIONES

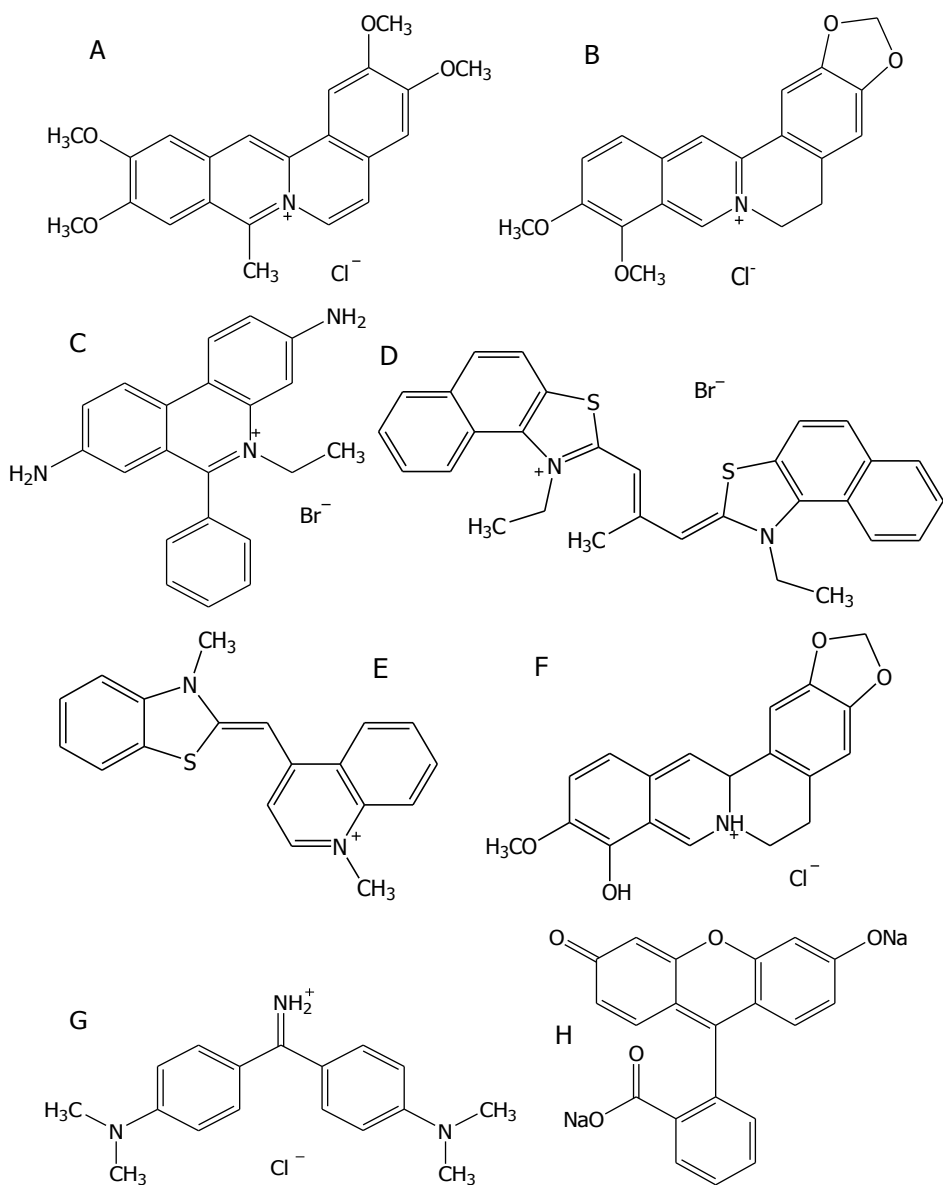
1.- Se ha desarrollado un modelo matemático que justifica la posibilidad de usar FDIC en sensores en flujo. El modelo se basa en el mecanismo general enunciado en el capítulo 2, incorporando efectos adicionales, en particular, el cambio de volumen de la lámina sensora, lo que permite explicar las señales experimentales.

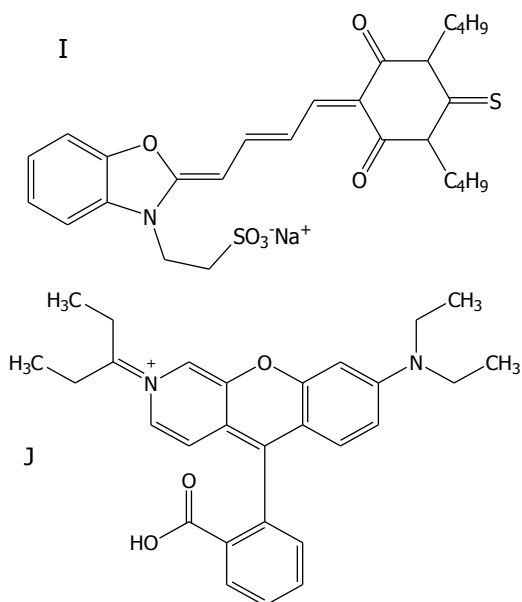
2.- Se ha demostrado la gran importancia que tiene la hidrodinámica del sistema en las medidas obtenidas y en la necesidad de diseñar un sistema que permita obtener respuestas más fiables. La debilidad del efecto FDIC en sensores puede tener su raíz en este problema.

3.- Los resultados obtenidos en este capítulo son sólo iniciales, a pesar de lo cual son muy prometedores, en particular al usar láminas de *silica gel*. Hay que recalcar la gran estabilidad de la línea de base obtenida en la lámina sensora en la que se ha inmovilizado por unión covalente el fluoróforo, en este caso berberrubina, llegando a la conclusión de que es el mejor método para conseguir sensores estables y con respuestas reproducibles. Una tendencia futura sería el uso de fluoróforos químicamente derivatizados o el diseño de procedimientos similares a los descritos para la berberrubina para modificar químicamente los fluoróforos usados.

6.7.- ANEXOS

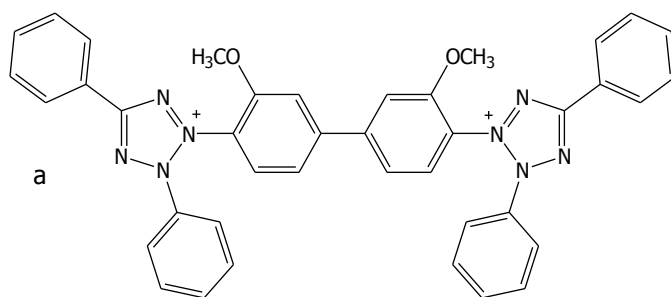
A.6.1.- Estructuras de los fluoróforos usados

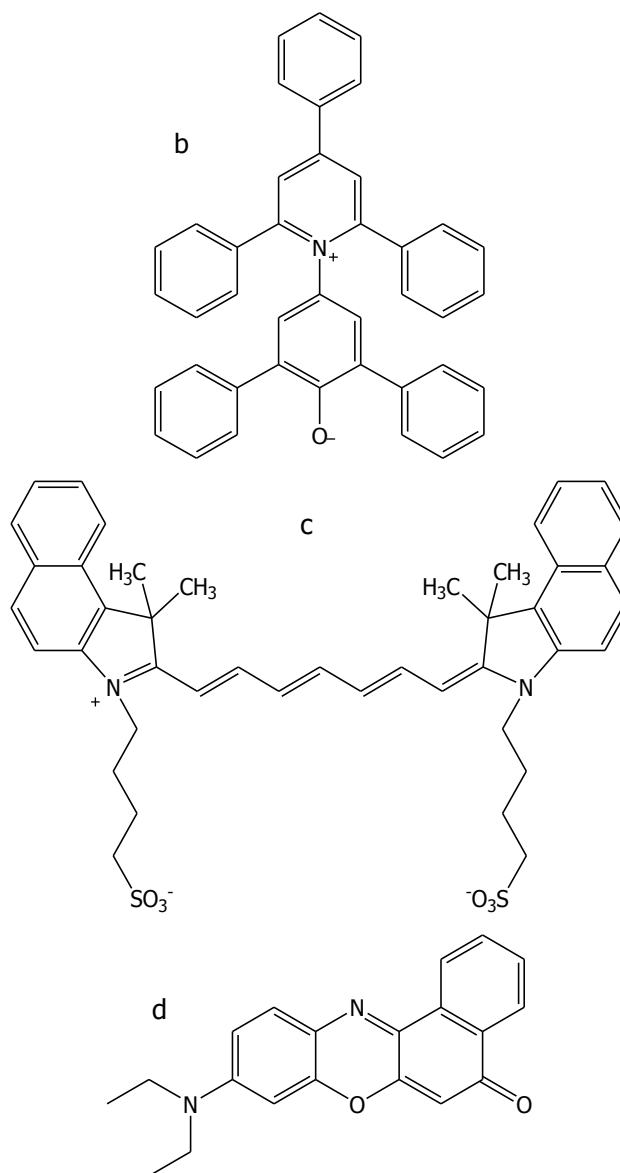




(A) Cloruro de coralina, (B) cloruro de berberina, (C) bromuro de etidio, (D) *stains all*, (E) naranja de tiazol, (F) berberrubina, (G) auramina 0, (H) fluoresceína, (I) merocianina 540 y (J) rodamina B.

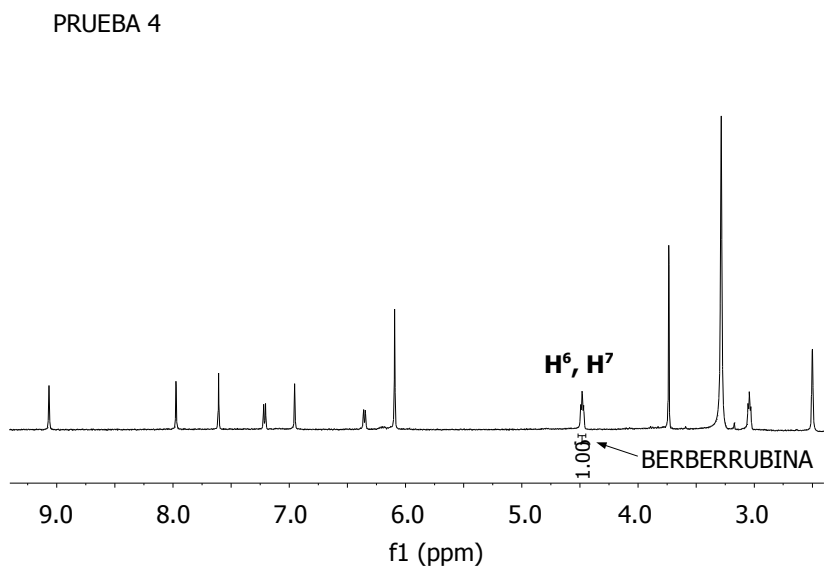
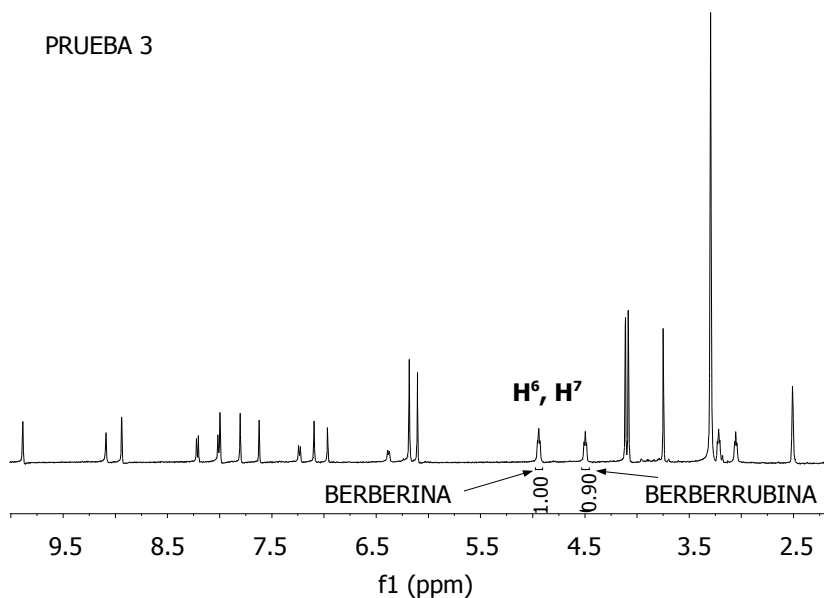
Los siguientes fluoróforos aparecen también en el capítulo 3.



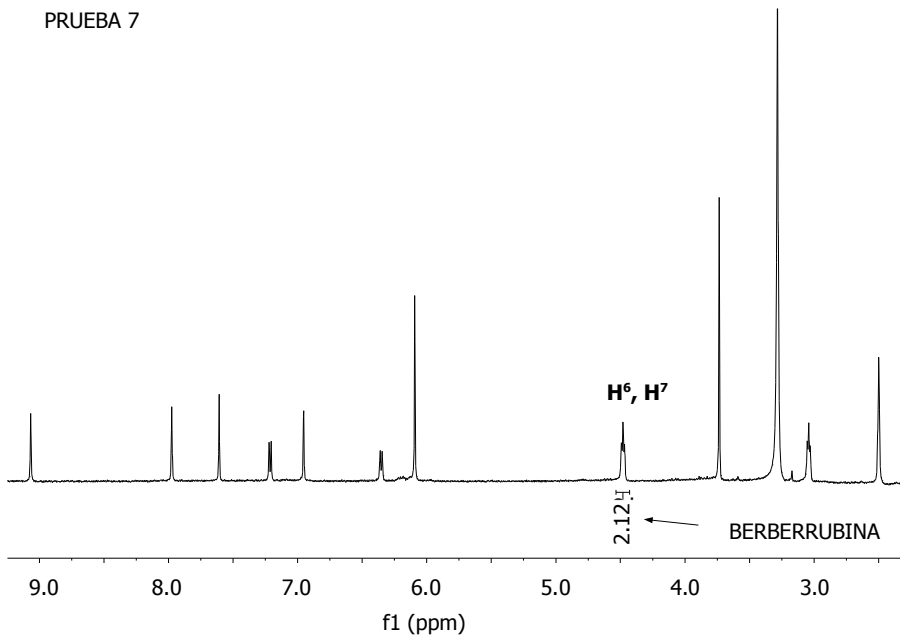
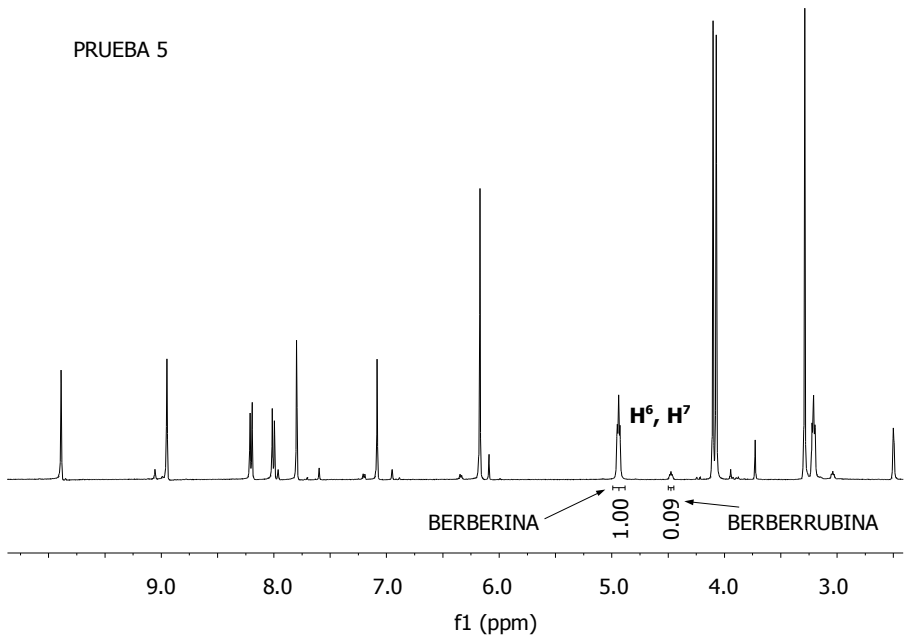


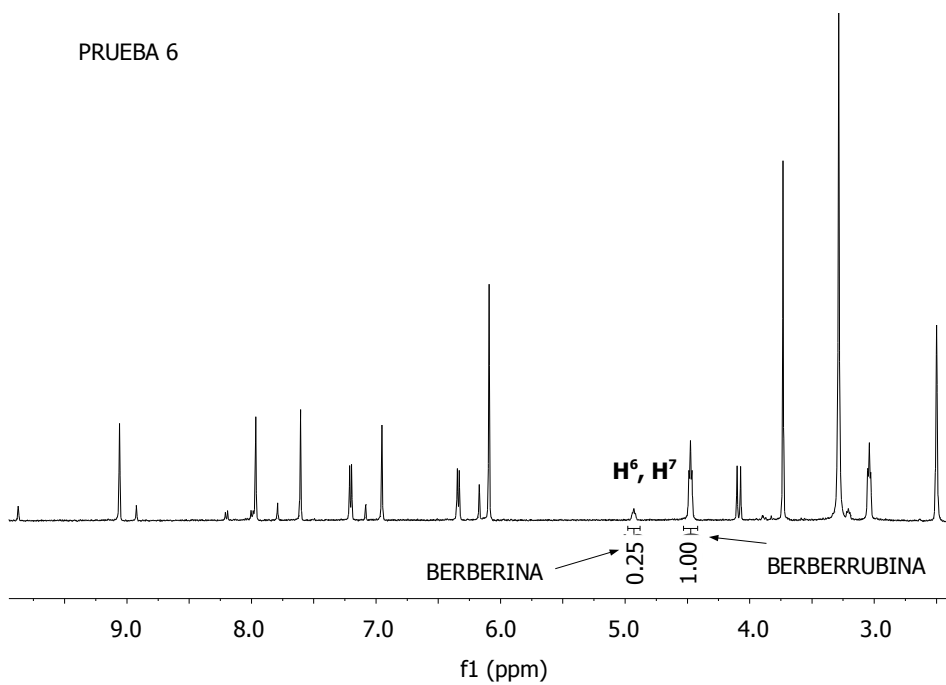
(a) Azul de tetrazolio, (b) betaína de Reichardt, (c) *indocyanine green* y (d) rojo de nilo.

A.6.2.- Espectros de H^1 -RMN de las pruebas de síntesis de la berberrubina



Pruebas 3 y 4.- Espectros RMN de la síntesis por irradiación de microondas.





Pruebas 5, 6 y 7.- Espectros de RMN de la síntesis por pirólisis de vacío.

**CONCLUSIONES
GENERALES
Y ANEXOS**

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

La presente Tesis Doctoral trata sobre el estudio y utilización del efecto del entorno molecular en la intensidad de fluorescencia en medios líquido y sólido, que se refiere a cómo las interacciones débiles no covalentes que sufre un fluoróforo en presencia de un analito y un disolvente o una matriz sólida afectan a su emisión y en la utilización de esos cambios para obtener información analítica del entorno. Las aplicaciones se han focalizado en el uso de fluoróforos tipo FDIC, es decir, aquéllos que muestran una variación en su emisión, producida por un analito en un medio, y que afecta exclusivamente al rendimiento cuántico de fluorescencia.

Las principales conclusiones son las siguientes:

1.- En lo referente a la parte teórica, se ha desarrollado para el medio líquido un modelo matemático que describe el efecto general de las interacciones débiles del entorno que rodea un fluoróforo sobre la intensidad de fluorescencia. El modelo, desarrollado para aplicaciones analíticas cuantitativas, se basa en las siguientes ideas:

a) El entorno influye en los rendimientos cuánticos de fluorescencia a través de la k^{nr} .

b) La k^{nr} puede ser simplificada a k^{cis} .

c) La k^{cis} sigue la ley de salto de energía, por lo que depende de la diferencia de energía entre los estados singlete y triplete.

d) El entorno, debido a la solvatación, cambia la energía de ambos niveles excitados, cambia asimismo las constantes k^{cis} y k^{ci} y, finalmente, la intensidad de fluorescencia.

En este modelo, la fuerza de solvatación del fluoróforo por el disolvente (representado por su índice de refracción, constante dieléctrica y la carga) cambia los saltos de energía singlete (excitado) a estado fundamental y singlete a triplete, las constantes k^{cis} y k^{ci} y, en consecuencia, el rendimiento cuántico de fluorescencia. El modelo final relaciona intensidad de fluorescencia con la constante dieléctrica del disolvente y el índice de refracción. Finalmente, el modelo se ha particularizado para el caso de un medio compuesto de disolvente y soluto (analito), obteniendo una relación entre la intensidad de fluorescencia y concentración de soluto que puede ser utilizada para aplicaciones analíticas.

2.- El modelo ha sido discutido y validado para fluoróforos FDIC (cationes berberina y coralina) y una gama de analitos que no son fluorescentes ni presentan absorción UV en los rangos habituales de trabajo analítico (alcoholes y alcanos de cadena larga).

3.- Se ha propuesto asimismo un modelo matemático para sensores ópticos que describe la señal emitida por fluoróforos inmovilizados en superficies sólidas. Este modelo puede ser aplicable a sensores ópticos de fluorescencia independientemente del fluoróforo utilizado, incluidos los fluoróforos FDIC. El modelo se basa en la teoría de Kubelka-Munk y se han añadido nuevas aportaciones como el paso óptico efectivo, el efecto de filtro interno y la configuración de la celda de flujo en el dispositivo de medida. Se han realizado simulaciones matemáticas de las variables del modelo y se ha llevado a cabo una validación experimental del mismo usando un sensor basado en el entrapamiento en poliacrilamida de glucosa oxidasa químicamente modificada con un derivado de fluoresceína, y disoluciones de naranja de metilo como

agente causante de filtro interno.

4.- En lo que concierne a la utilización práctica, se ha demostrado que la detección FDIC (usando los cationes berberina y coralina) en modo HPLC es plausible en problemas analíticos que involucran compuestos con malas propiedades espectroscópicas. Así, se ha adaptado esta detección a una separación por exclusión molecular (GPC), usando diclorometano como fase móvil e introduciendo el fluoróforo FDIC en metanol, para la caracterización de la distribución de pesos moleculares de polímeros (poliestirenos y policarbonatos). También se han acoplado los fluoróforos FDIC (en metanol) a una separación en fase reversa para la detección de lípidos usando como fase móvil diclorometano/metanol. Las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en la detección FDIC han sido discutidas según el modelo general propuesto para la fluorescencia en medio líquido.

5.- Tras numerosos ensayos de inmovilización de fluoróforos FDIC en matrices sólidas, se han desarrollado dos sensores que demuestran que es posible utilizar estos fluoróforos como base de dispositivos para medidas no selectivas.

a) Uno se basa en el entrapamiento de coralina en poliacrilamida, obtenida por la polimerización de acrilamida y bisacrilamida, utilizando albúmina como agente que evita la precipitación y favorece la dispersión en la lámina sensora. Se han obtenido señales para analitos de alto peso molecular (por ejemplo, PEG) aunque su principal problema radica en la gradual lixiviación de la coralina de la matriz. También se ha tenido en cuenta el posible efecto que tiene el hinchamiento de las láminas poliméricas debido a la difusión del analito en su interior, que influye directamente en la señal final obtenida.

b) El problema de lixiviación se ha paliado mediante un sensor basado en berberrubina inmovilizada covalentemente en *silica gel*. La berberrubina es un derivado de la berberina que puede unirse covalentemente a la *silica gel*. Se ha obtenido a partir de la berberina mediante un método original y rápido de síntesis en microondas, que conduce a un alto rendimiento. Esta molécula se comporta como fluoróforo FDIC y presenta incrementos de emisión en presencia de cadenas hidrocarbonadas. A diferencia de la berberina, la respuesta fluorescente no depende significativamente de la longitud de cadena alquílica. Las propiedades fluorescentes de la berberrubina han podido ser explicadas debido a la existencia de un equilibrio ceto-enol, que depende del pH, con dos formas fluorescentes diferentes en cuanto a longitud de onda de emisión y rendimiento cuántico de fluorescencia. Los espectros de la berberrubina obtenidos directamente en *silica gel* muestran que, en dicho medio, predomina la forma enólica (máximo a 523 nm), más fluorescente. El sensor de berberrubina unido covalentemente a la *silica gel* proporciona una línea de base estable y que se recupera tras cada adición de analito (1-decanol).

Las ventajas y limitaciones de estos sensores han sido discutidas en la Memoria.

ANEXOS

ANEXOS

A1.- ANÁLISIS DE PERFILES SEGÚN LA ETAPA CONTROLANTE

A1.1.- Objetivo del estudio en la Tesis Doctoral

Como se ha visto en este capítulo 6, es importante saber cuál es el perfil de las señales de fluorescencia que se obtienen en un proceso de difusión.

El estudio de estas señales se realizó originalmente para estudiar cómo eran los perfiles de las señales obtenidas en láminas sensoras que contenían una enzima químicamente modificada con un fluoróforo (en este caso, glucosa oxidasa modificada con fluoresceína, GOx-FS) como elemento de reconocimiento-indicador al hacer la reacción con el sustrato (glucosa) y así evaluar la etapa controlante del proceso (difusión o reacción). El funcionamiento de estas láminas sensoras se explica en el siguiente apartado.

En el contexto de la Tesis, la importancia de este estudio radica en que permite elucidar cómo son los perfiles de las señales en tres situaciones diferentes:

- a) La sustancia simplemente pasa por la celda de medida.
- b) La sustancia difunde en la lámina sensora.
- c) La sustancia reacciona con el reactivo presente en la lámina sensora.

A1.2.- Introducción

La fluorescencia intrínseca en el ultravioleta de algunas enzimas cambia durante su correspondiente reacción enzimática y esos cambios pueden ser utilizados como base de métodos para la determinación de sustratos involucrados en esas reacciones. Puede haber varios mecanismos responsables de este cambio, pero el más frecuente es la transferencia de energía entre el cofactor y el triptófano, por lo que este tipo de procesos se observará fundamentalmente en las flavoenzimas (que contienen FAD o FMN como cofactor).

Usando esta metodología en trabajos anteriores se puso a punto un método para la determinación en discontinuo de glucosa empleando glucosa oxidasa (GOx)¹⁴¹. En este método (figura A1.1), la adición de glucosa a una disolución que contiene GOx produce un aumento de intensidad de fluorescencia de la enzima desde un valor F_0 hasta un valor F_1 . La concentración de glucosa no afecta al valor de F_1 pero sí al tiempo (t_a) en el cual se empieza a producir el cambio de intensidad de fluorescencia. Posteriormente, la intensidad de fluorescencia decrece hasta alcanzar el valor inicial F_0 . Teniendo en cuenta que la GOx es una enzima que contiene FAD, estas variaciones de fluorescencia se han asociado a la reducción de FAD a FADH₂ durante la reacción enzimática. Así, F_0 y F_1 son las intensidades de fluorescencia cuando FAD y FADH₂ son las especies mayoritarias de la enzima, respectivamente.

La principal desventaja de este método es que las longitudes de onda de excitación y emisión intrínsecas de la enzima se encuentran en la región ultravioleta del espectro. Se planteó como alternativa unir covalentemente a la enzima fluoróforos cuya fluorescencia cambie durante la reacción enzimática a

141 Sierra, J. F.; Galbán, J.; Castillo, J. R.; "Determination of Glucose in Blood Based on the Intrinsic Fluorescence of Glucose Oxidase" *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1471-1476.

través de algún tipo de mecanismo¹⁴².

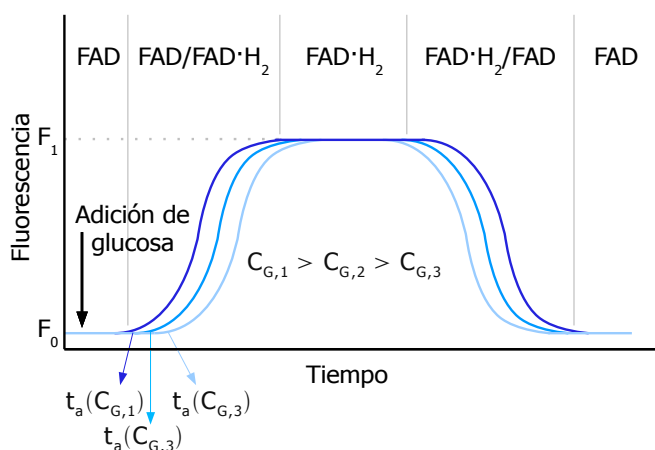


Figura A1.1.- Variación de la intensidad de fluorescencia de la GOx a lo largo de la reacción enzimática.

A este respecto se han encontrado resultados positivos con enzimas tipo oxidasa. El mecanismo del cambio de fluorescencia del fluoróforo se ha ligado a transferencias de energía con la flavina, dado que la fluorescencia del fluoróforo se modifica de igual forma a como lo hace la del triptófano. Los mejores resultados se han obtenido usando un derivado de la fluoresceína (FS, $\lambda_{EX}=490$ nm, $\lambda_{EM}=520$ nm). Esta metodología presenta una serie de ventajas que la hacen idónea para el diseño de sensores:

- Sencillez: sólo se necesita la enzima químicamente modificada como reactivo.

- Reversibilidad: debido a las características de la reacción utilizada para la detección.

142 Sierra, J. F.; Galbán, J.; Castillo, J. R.; "Determination of Glucose in Serum by Fluorimetry Using a Labeled Enzyme" *Anal. Chim. Acta.* **1998**, 414, 33-41.

- Selectividad: propia de las reacciones enzimáticas.

Por estos motivos se seleccionó la reacción descrita para realizar un primer estudio del diseño de láminas sensoras basadas en propiedades ópticas enzimáticas¹⁴³. En la figura A1.2 se muestra cómo cambia la intensidad de fluorescencia de la lámina sensora cuando la celda de flujo se alimenta en modo continuo con disoluciones de glucosa de distinta concentración.

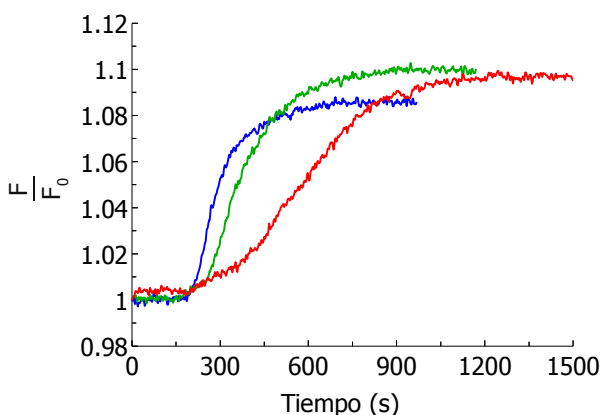


Figura A1.2.- Variación de la intensidad de fluorescencia relativa (F/F_0) de GOx-FS en función de la concentración de glucosa en modo continuo: (-) 250 mgL^{-1} , (-) 300 mgL^{-1} y (-) 350 mgL^{-1} . (Caudal=0.6 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{ex}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$, rendijas 15 nm excitación y 20 emisión).

A medida que aumenta la concentración de glucosa, la velocidad de variación de la intensidad de fluorescencia aumenta pero la intensidad máxima sólo cambia ligeramente. Cuando se trabaja en modo FIA, el perfil de la concentración de glucosa que fluye a través de la celda de flujo va cambiando siguiendo una forma más o menos gaussiana. Si se combina el perfil de esta gaussiana con el perfil de la variación de la señal (figura A1.2) y se obtienen señales transitorias como las indicadas en la figura A1.3. Midiendo la intensidad de fluorescencia a un tiempo dado (F_t), esta sí que depende de la concentración

143 Sanz, V; Galbán, J.; de Marcos, S.; Castillo, J. R.; "Fluorometric Optical Sensors Based on Chemically Modified Enzymes. Glucose Determination in Drinks" *Talanta*, **2003**, 60, 415-423.

de glucosa.

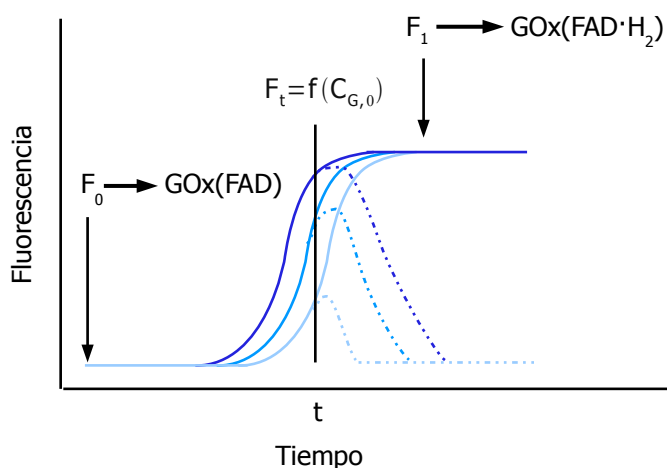


Figura A1.3.- Señal analítica obtenida en modo continuo (línea continua) y en modo FIA (señales en forma de pico).

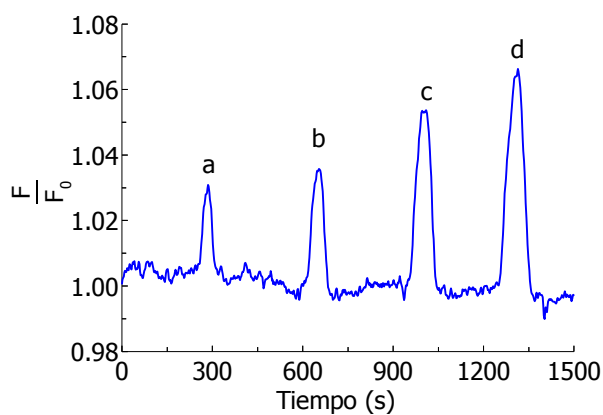


Figura A1.4.- Variación de la intensidad de fluorescencia de GOx-FS en modo FIA en función de la concentración de glucosa: (a) 900 mgL⁻¹, (b) 1000 mgL⁻¹, (c) 1100 mgL⁻¹ y (d) 1200 mgL⁻¹. (Caudal=0.6 mLmin⁻¹, volumen de muestra=0.3 mL, $\lambda_{\text{EX}}=490$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=520$ nm, rendijas 15 nm excitación y 20 nm emisión).

A1.3.- Estudios de desactivación con ácido ascórbico en disolución

Se trató de relacionar las señales obtenidas con una molécula de características similares a la glucosa pero que no reaccionara con la GOx, de forma que se pudiera determinar el efecto que provoca un analito en el sensor. Se eligió el ácido ascórbico por ser una molécula de tamaño muy similar a la glucosa y un desactivante de la fluorescencia.

Antes de trabajar con la lámina se estudió el efecto que este ácido provoca en disolución y así tener unos resultados previos en los que basar las futuras señales en el sensor. Se empezó estudiando el efecto del ascórbico sobre la fluoresceína a pH=6.5, elegido este por ser el pH habitual al que se trabaja con el sensor. En la figura A1.5 se muestran los resultados obtenidos.

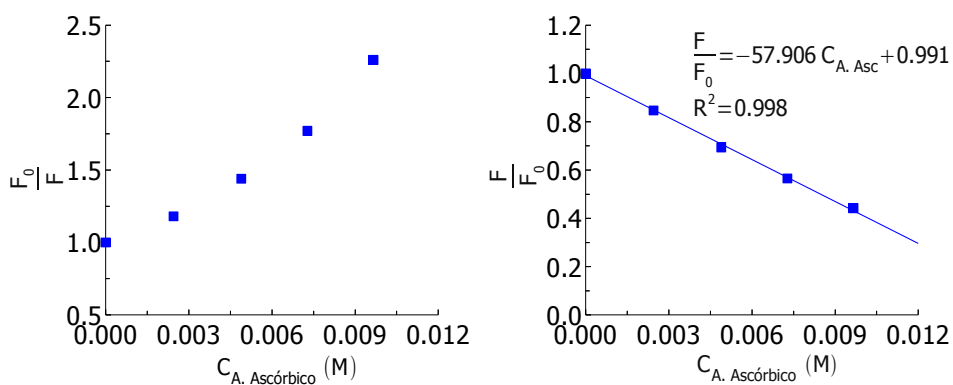


Figura A1.5.- Efecto del ácido ascórbico sobre la fluoresceína (pH=6.5). Adiciones de ácido ascórbico 0.5 M sobre una disolución de fluoresceína de 0.15 mgL^{-1} en tampon de fosfatos 0.1M. (Rendijas=2.5 nm de excitación y emisión, $\lambda_{\text{EX}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=520 \text{ nm}$).

Como se observa, el ascórbico produce desactivación, si bien no responde a la ecuación de Stern-Volmer convencional:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_Q C_Q \quad (\text{A1.1})$$

donde K_Q es la constante de desactivación, sino a una expresión tipo:

$$\frac{F}{F_0} = 1 - K_Q C_Q$$

Este modelo de desactivación no responde a otros modelos conocidos.

En la figura A1.6 se muestra el efecto del ácido ascórbico sobre la fluorescencia de la fluoresceína unida a la glucosa oxidasa (GOx-FS) medida a las longitudes de onda de la fluoresceína. Como puede verse el efecto que produce el ascórbico es muy similar al indicado en la figura A1.5, ya que de nuevo la desactivación no se ajusta al modelo de Stern-Volmer convencional pero sí al modelo inverso. Comparando las ecuaciones de ambas rectas se desprende que el efecto es cuantitativamente similar en ambos casos, lo que permite el uso del ácido ascórbico como agente desactivante en los estudios posteriores.

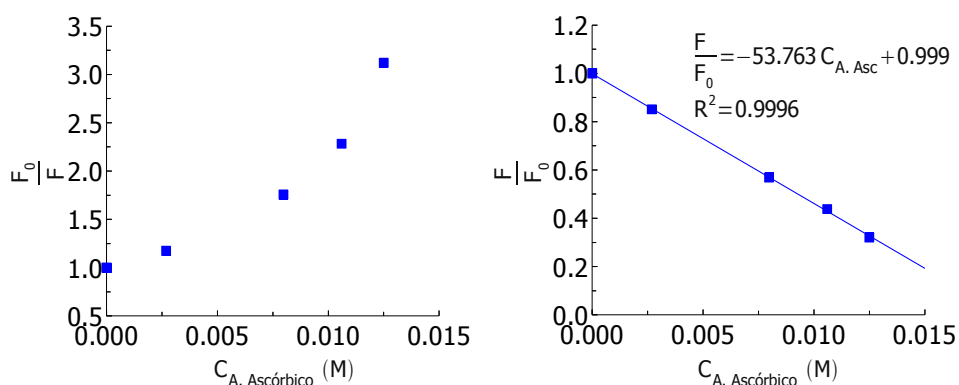


Figura A1.6.- Efecto del ácido ascórbico sobre la fluoresceína de la GOx-FS (pH=6.5). Adiciones de ácido ascórbico 0.5 M sobre una disolución de GOx-FS (de $3.3 \cdot 10^{-7}$ M) en tampón de fosfatos 0.1M. (Rendijas=5 nm de excitación y emisión, $\lambda_{EX}=490$ nm, $\lambda_{EM}=520$ nm).

Por completar el estudio se han hecho también ensayos para observar el efecto del ácido ascórbico sobre la fluorescencia del triptófano tanto en la enzima sola o modificada con fluoresceína (figura A1.7), empleando el mismo pH de trabajo. Los resultados demuestran la presencia de una desactivación más enérgica que en el caso anterior. El ajuste de la gráfica a una expresión de tipo logarítmico sugiere la existencia de un cierto efecto de filtro interno, a pesar de la baja concentración de desactivante utilizado.

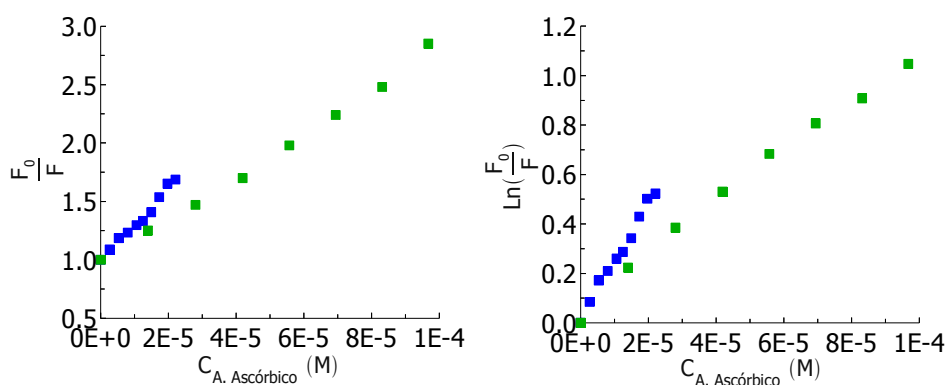


Figura A1.7.- Efecto del ácido ascórbico sobre la fluoresceína del triptófano de la enzima sola y marcada (pH=6.5). Adiciones de ácido ascórbico 0.5 M sobre una disolución de GOx (■) de $4 \cdot 10^{-6}$ M y GOx-FS (■) en tampon de fosfatos 0.1M. (Rendijas=2.5 nm de excitación y emisión, $\lambda_{\text{EXC}}=287$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=335$ nm).

Se realizaron también ensayos a pH=3 con el fin de disponer de un segundo pH de reserva, y ver si los resultados la desactivación se ajustan mejor al modelo de Stern-Volmer convencional dado por la ecuación (A1.1). Las medidas se hicieron usando una disolución amortiguadora de citratos, por lo que previamente se comprobó el posible efecto de desactivación. La figura A1.8 muestra que el citrato provoca sobre la fluorescencia de la fluoresceína una desactivación que se ajusta a una ecuación de tipo logarítmico que implica un proceso de desactivación de esfera de acción de acuerdo con el modelo:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_Q C_Q) e^{K'_Q C_Q}$$

Este modelo considera la desactivación colisional en el estado excitado. El término exponencial es un término que corrige la no linealidad de los coeficientes de difusión.

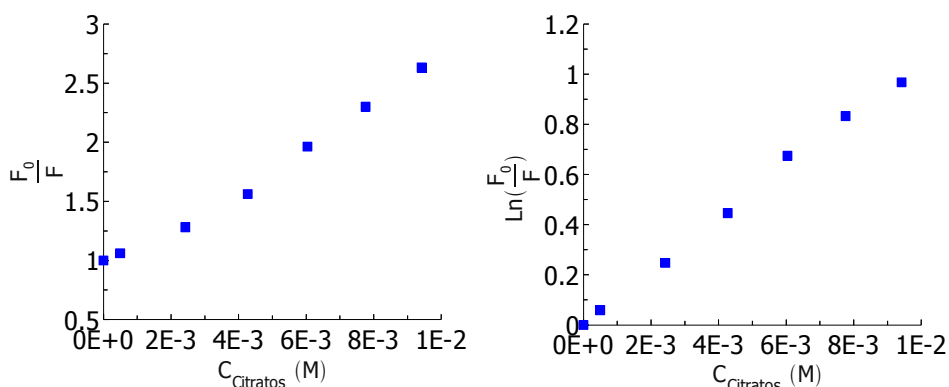


Figura A1.8.- Efecto de los citratos sobre la fluoresceína (pH=6.5). Adiciones de disolución tampon de citratos 0.1M de pH=3 a fluoresceína de 0.17 mgL⁻¹ en tampon de fosfatos a pH=6.5. (Rendijas=2.5 nm de excitación y emisión, λ_{EX} =440 nm, λ_{EM} =508 nm).

A pesar de esta desactivación parcial todavía es posible ver el efecto desactivante del ascórbico sobre la fluoresceína. En la figura A1.9 se muestra el efecto del ácido ascórbico a pH=3 sobre la fluorescencia de la fluoresceína. Como puede verse, el efecto desactivante se ajusta mucho mejor a la ecuación de Stern-Volmer convencional, siendo la ecuación de desactivación:

$$\frac{F_0}{F} = 1.03 + 11.99 \cdot C_{A,ASC} \quad R^2 = 0.998 \quad (A1.2)$$

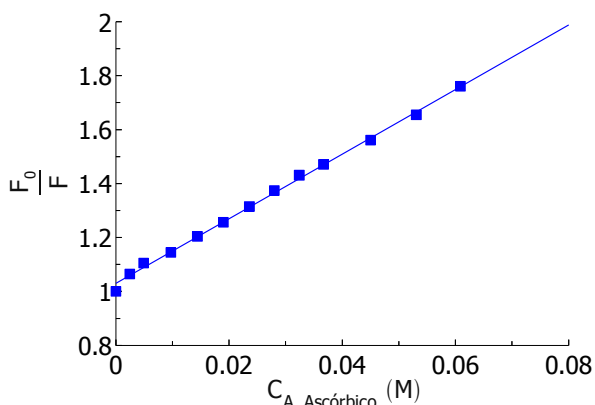


Figura A1.9.- Efecto del ácido ascórbico sobre la fluoresceína (pH=3). Adiciones de ácido ascórbico 0.5 M de pH=3 a fluoresceína de 0.1 mgL⁻¹ en tampon de citratos. (Rendijas=5 nm de excitación y emisión, λ_{EX}=440 nm, λ_{EM}=508 nm).

A falta de comprobación de otros mecanismos es razonable pensar que el ascórbico actuará como un desactivante de tipo colisional, por lo que la constante K_Q de la ecuación de Stern-Volmer para este caso viene dada por:

$$K_Q = K_{SV} = k_{col} \tau_0 = \frac{2RT (R_F + R_Q)^2}{3\eta R_F R_Q} \tau_0$$

donde:

- τ₀ es el tiempo de vida del fluoróforo en el estado excitado en ausencia de desactivación. Para la fluoresceína el valor tabulado promedio es de 4 ns.

- R_F y R_Q son los radios del fluoróforo y del desactivante. Estos radios se pueden estimar considerando que las moléculas son esféricas y que la densidad molecular media es de 1.5 gmL⁻¹. Para el caso de la fluoresceína y del ácido ascórbico son 4.53 y 3.60 Å respectivamente.

- ν es la eficacia del desactivante. Puede oscilar entre 0 y 1. Gases como el O_2 presentan una eficacia próxima a la unidad y los halógenos presentan eficacias de 1, 0.8 y 0.6 (I^- , Br^- , Cl^-). La eficacia del ácido ascórbico no se conoce, pero al tratarse de un desactivante poco frecuente es de esperar que sea baja (< 0.1).

- η es la viscosidad del medio, R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

Sustituyendo los valores de trabajo en la expresión queda:

$$K_{SV} = 235 \nu \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Al comparar con la ecuación (A1.2) se deduce que la eficacia desactivante del ácido ascórbico es efectivamente baja, en torno a 0.05.

El problema de trabajar a $\text{pH}=3$ con el ascórbico es la baja fluorescencia de la fluoresceína a este pH , que obliga a tener que trabajar con rendijas de monocromador mayores. A cambio se controla mucho mejor su efecto sobre la fluoresceína.

Como resultado de todo este estudio se puede decir que el ascórbico puede utilizarse como agente desactivante de la fluorescencia de la fluoresceína.

A1.4.- Estudios de desactivación con ácido ascórbico en lámina

Para comprobar si el mecanismo que regula el funcionamiento del sensor es la cinética de la reacción o la difusión de la glucosa en el interior de la lámina, se utilizó un sistema constituido por la celda de flujo que contiene la lámina sensora de GOx-FS, una disolución portadora que pasa sobre ella y la inyección

en flujo del ácido ascórbico. Las señales que se obtendrán con este dispositivo serán transitorias típicas del sistema FIA. La idea fue comparar la forma de las señales transitorias que se obtienen usando glucosa, que sufre proceso de difusión y reacción, con las que se obtienen usando ácido ascórbico, que sólo sufre difusión. Si el perfil de la señal transitoria que ofrece el ácido ascórbico es similar o más ancho que el de la señal obtenida con glucosa se podría decir que el proceso vendría controlado por difusión. Si por el contrario el perfil del ácido ascórbico es más estrecho que el de la reacción con glucosa, quiere decir que la difusión no controla el tamaño de la señal y que, por tanto, el proceso vendría controlado por la reacción. Además, desde el punto de vista de esta Tesis Doctoral, es importante ver qué diferencia de perfiles hay entre los dos tipos de señales.

La figura A1.10A muestra la forma que tienen las señales obtenidas al hacer pasar distintas disoluciones de fluoresceína por la celda de flujo. Como no hay lámina este tipo de representación sólo tiene en cuenta el paso de la muestra a través de la celda de medida, sin ningún efecto de difusión ni de reacción en la lámina. En la figura A1.10B aparecen las señales obtenidas con las mismas disoluciones de fluoresceína pero hay colocada una lámina de poliacrilamida, pero sin GOx-FS en la celda de flujo. La figura A1.10C representa el perfil obtenido al hacer pasar disoluciones de glucosa de diferente concentración por la celda donde está colocada una lámina con GOx-FS, por lo tanto son los perfiles que se obtienen como consecuencia de la combinación de un proceso de reacción y de difusión. Finalmente, la figura A1.10D muestra los perfiles conseguidos haciendo circular ácido ascórbico a pH=3 por la celda que contiene una lámina con GOx-FS, por lo que son los perfiles debidos al proceso de difusión.

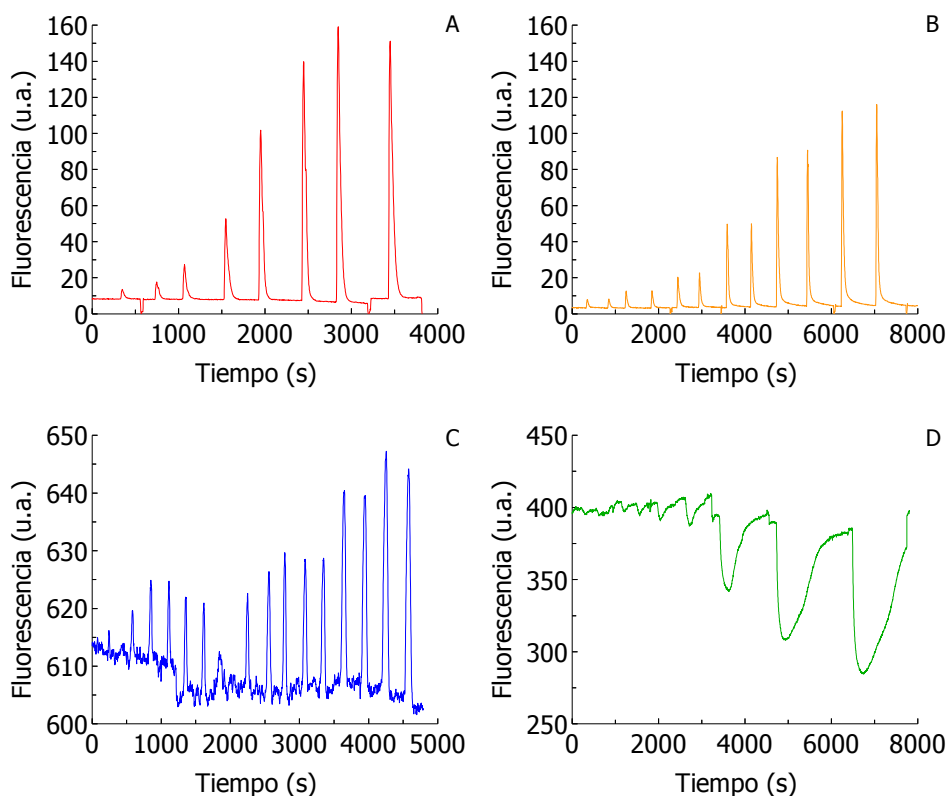


Figura A1.10.- Señales obtenidas en la celda de flujo: (A) inyecciones de fluoresceína sin lámina, (B) inyecciones de fluoresceína con lámina de poliacrilamida, (C) inyecciones de glucosa con lámina de GOx-FS y (D) inyecciones de ácido ascórbico con lámina de GOx-FS. (CFO, Rendijas 15 nm de excitación y 20 nm de emisión, caudal 0.8 mLmin⁻¹, volumen de muestra=300 μL, λ_{EX}=490 nm, λ_{EM}=520 nm).

Resulta muy interesante comparar los perfiles obtenidos en las figuras A1.10A y A1.10B. En la primera no hay lámina, por lo que no puede haber procesos de difusión. En la segunda sí hay lámina, pero al salir los perfiles tan similares a los de la figura A1.10A se desprende que la fluoresceína usada no sufre procesos de difusión en la lámina, por lo que éste es el registro que se debe utilizar a fines comparativos. Las señales obtenidas con el ácido ascórbico son claramente diferentes de las obtenidas con fluoresceína, lo que indica que este compuesto sí que ha difundido en la lámina. Por otro lado, dado que el

ácido ascórbico es un desactivante de la fluorescencia se observa cómo la señal de fluorescencia de la lámina disminuye. Finalmente, las señales obtenidas con glucosa son muy parecidas a las de la fluoresceína. Estas señales están indicando que el analito reacciona conforme va difundiendo en la lámina y no da tiempo a mostrar el perfil de difusión. La comparación con la figura A1.10D apunta a que la reacción enzimática es extraordinariamente rápida.

Para estudiar mejor estas señales se ha dividido el pico FIA en dos partes:

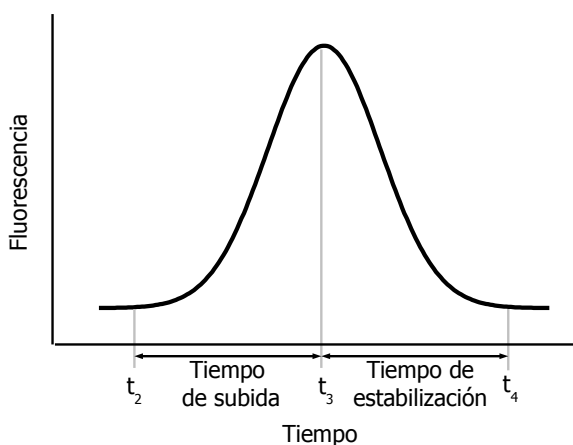


Figura A1.11.- Esquema del pico FIA. El tiempo t_1 corresponde al momento de la inyección.

Se ha utilizado el tiempo de subida (t_3-t_2) para estudiar la forma del incremento de la señal hasta el máximo y el tiempo de estabilización (t_4-t_3) para estudiar el descenso de la señal. Se entiende que el tiempo de subida puede dar una idea bastante exacta de cuál de los dos procesos controla, dado que cuando se inicia la reacción es cuando hay más reactivo disponible y, por lo tanto, cuanto mayor será la velocidad de reacción. Por el contrario, el tiempo de estabilización da una idea más global, del proceso en su conjunto.

En la siguiente figura (A1.12) se indican los valores de tiempo de subida para los ensayos mostrados en las figuras anteriores.

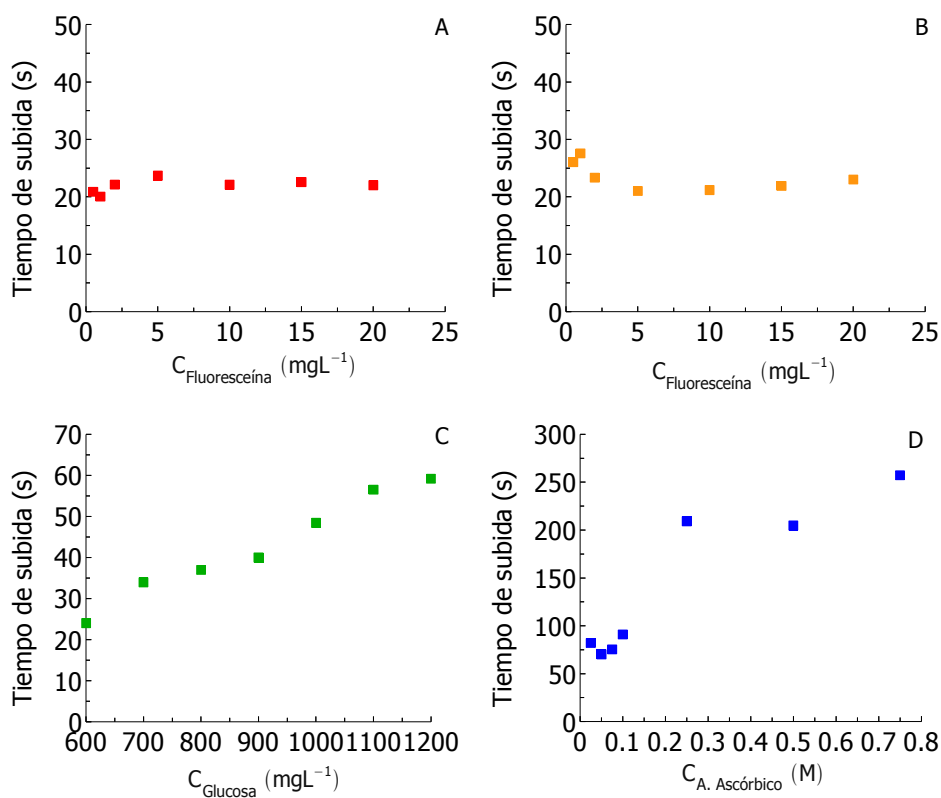


Figura A1.12.- Tiempo de subida (t_3-t_2) en segundos calculado de los picos FIA obtenidos: (A) inyecciones de fluoresceína sin lámina, (B) inyecciones de fluoresceína con lámina de poliacrilamida, (C) inyecciones de glucosa con lámina de GOx-FS y (D) inyecciones de ácido ascórbico con lámina de GOx-FS.

Como se aprecia en el caso de la fluoresceína prácticamente no hay efecto de la concentración en la anchura de la señal, dado que no hay ningún tipo de dispersión ni de reacción. Por el contrario, en el caso de la glucosa y del ácido ascórbico sí se produce un efecto de la concentración en la anchura de la señal, lo que pone de manifiesto que hay un proceso adicional involucrado. Se

han obtenido resultados similares cuando se representan los tiempos de estabilización.

Finalmente hay que indicar que si se representan los valores de $\frac{F_0}{F}$ en función de la concentración de ácido ascórbico utilizada (figura A1.13) se observa que se sigue cumpliendo la ecuación de Stern-Volmer, si bien la constante del proceso es menor como consecuencia del reparto del ácido ascórbico entre la fase acuosa y la lámina.

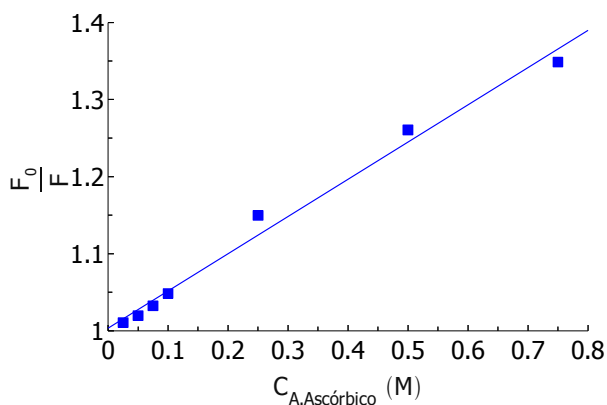


Figura A1.13.- Representación de la ecuación de Stern-Volmer de la desactivación del ácido ascórbico sobre la fluorescencia de una lámina de GOx-FS.

A2.- ESTUDIOS CON ALBÚMINA EN LÁMINAS DE GOx-FS-PAA

A2.1.- Objeto del estudio en la Tesis Doctoral

En el capítulo 6 se ha visto cómo la albúmina es capaz de modificar el tamaño de una lámina sensora de PAA y cómo esto repercute en la fluorescencia de un fluoróforo atrapado en ella. En este apartado se verá el efecto que tiene la albúmina en láminas de PAA que contienen inmovilizada una sustancia de tamaño muy superior como es la glucosa oxidasa (GOx). La albúmina tiene un peso molecular de $6.7 \cdot 10^4$ Da mientras que el peso molecular de la GOx es de unos $1.6 \cdot 10^4$ Da, es decir, unas 2.5 veces superior. Esto parece indicar que la presencia de la albúmina no afecta al tamaño global de la lámina de GOx-PAA.

Este estudio se realizó originalmente para evaluar posibles interferencias en el análisis de glucosa con láminas de GOx-FS por el procedimiento descrito en el anexo anterior (A1), aunque se realizarán comentarios relacionados con la importancia que tiene en los resultados del capítulo 6.

A2.2.- Introducción

Una de las aplicaciones principales del análisis de glucosa es su determinación en sangre y suero sanguíneo humano, dos tipos de muestras que son químicamente muy complejas y con grandes posibilidades de provocar interferencias. El objetivo es evaluar el uso del sensor para este tipo de determinaciones.

Para realizar este estudio se disponía de suero sintético (Accutrol™) cuya concentración de glucosa está en torno a los 1000 mgL^{-1} . Bajo el punto de vista de las posibles interferencias, el Accutrol tiene, entre otros, dos componentes problemáticos: bilirrubina ($\approx 9 \text{ mgL}^{-1}$) y albúmina ($\approx 40000 \text{ mgL}^{-1}$). El primero,

debido a su coloración, puede provocar efecto de filtro interno sobre la medida mientras que el segundo tiene tendencia a quedarse fuertemente adsorbido sobre cualquier superficie y, por tanto, impedir el transporte de la glucosa hacia la lámina. En estudios previos se determinó que la bilirrubina no constituye una interferencia fuerte pero la albúmina, dada su elevada concentración en la muestra, sí daba problemas.

Esto se puede observar en la figura A2.1, en la que se muestran los resultados obtenidos con tres disoluciones: una disolución de glucosa de 750 mgL^{-1} , una disolución Accutrol diluida de forma que la concentración de glucosa es del orden de los 600 mgL^{-1} y otra de Accutrol diluido como el anterior pero fortificada en glucosa (concentración final en torno a 1100 mgL^{-1}). Las medidas se han hecho a $\text{pH}=8$ (fosfatos 0.1M), ya que ese es el pH de la muestra.

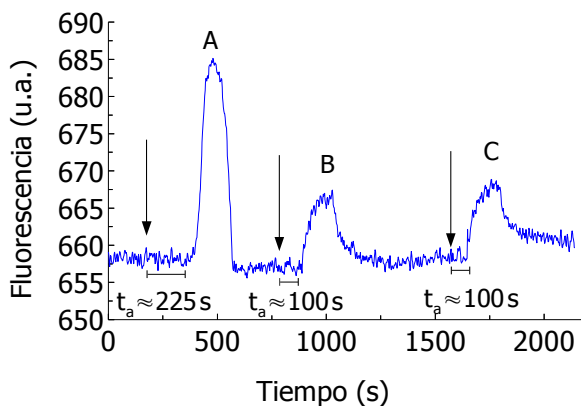


Figura A2.1.- Adiciones de Accutrol: (A) glucosa de 750 mgL^{-1} , (B) Accutrol diluido (glucosa $\approx 600 \text{ mgL}^{-1}$) y (C) Accutrol diluido con glucosa extra (glucosa $\approx 1000 \text{ mgL}^{-1}$). Las flechas indican el punto donde se ha hecho la inyección de la muestra. (CFFIM, rendijas: 15 nm excitación y emisión, caudal= 0.2 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{EX}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=520 \text{ nm}$, $\text{pH}=8$ (fosfatos 0.1M), volumen de muestra= $600 \mu\text{L}$).

Como se ve, las señales debidas al Accutrol aparecen a un tiempo menor del esperado (menos de la mitad) en comparación con el que corresponde a la

señal de la reacción. Además la forma de la señal, relativamente distorsionada, sugiere que son señales debidas a la difusión y no a la reacción.

A partir de este punto se decidió profundizar en los posibles efectos que provocaba la albúmina en el sistema de medida y buscar formas eficaces de solucionarlos. Como se ha indicado, el tipo de interferencia que provoca la albúmina es de adsorción sobre la lámina y no de filtro interno, ya que las longitudes de onda a las que absorbe la albúmina son las debidas al triptófano, es decir, 278 nm y la emisión aparece a 335 nm, que son longitudes de onda bastante alejadas de las que se usan al modificar químicamente la enzima.

A2.3.- Efecto de la concentración de albúmina

Aunque en las muestras de suero la albúmina tiene una concentración de 40000 mgL⁻¹ se buscó la concentración de albúmina límite a la que se ve la señal de glucosa. Para ello se prepararon cuatro disoluciones en las que había 1000 mgL⁻¹ de glucosa y distintas cantidades de albúmina: 1000, 2000, 2500 y 5000 mgL⁻¹. En la figura A2.2 se muestra el registro al inyectar estas disoluciones en el sistema FIA.

La albúmina provoca la casi total desaparición de la señal de la glucosa a unos 3000 mgL⁻¹, una concentración 13 veces menor a la que hay en la muestra de suero. Se observa también que la forma de las señales obtenidas es la que se espera para la reacción, es decir, picos simétricos. Esto corrobora que la señal obtenida en la figura A2.1 pertenece al tipo de señal que daría la difusión. Por tanto, se pensó que la albúmina podía impedir el paso de la glucosa de la disolución a la lámina, haciendo que ésta difundiera más lentamente. Puede resultar paradójico que en estos registros se observe que la señal de la glucosa desaparezca (no hay señal), mientras que en los indicados en la figura A2.1 sí que la hay. Esto puede tener una razón doble:

- La cantidad de glucosa presente es menor (el volumen inyectado ahora es la mitad).

- Ya se ha indicado que las señales en presencia de albúmina de la figura A2.1 no tienen un perfil similar al de las señales de glucosa por lo que pueden tener un componente provocado por la propia albúmina, ya que se ha comprobado que interacciones de tipo inespecífico de la albúmina sobre fluoróforos provocan aumentos de fluorescencia.

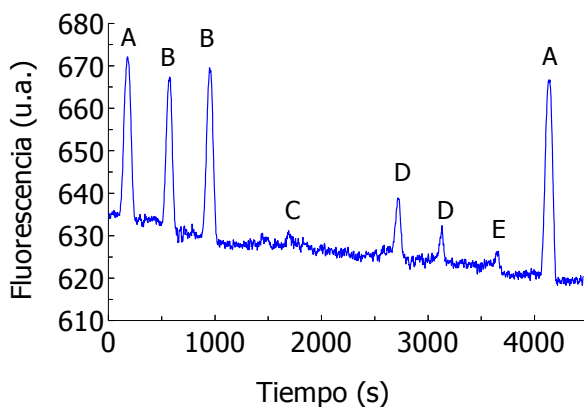


Figura A2.2.- Adiciones de glucosa con albúmina: (A) glucosa 1000 mgL^{-1} , (B) glucosa 1000 mgL^{-1} + albúmina 1000 mgL^{-1} , (C) glucosa 1000 mgL^{-1} + albúmina 5000 mgL^{-1} , (D) glucosa 1000 mgL^{-1} + albúmina 2000 mgL^{-1} y (E) glucosa 1000 mgL^{-1} + albúmina 2500 mgL^{-1} . (CFFIM, rendijas 15 nm de excitación y 20 nm de emisión, caudal= 0.4 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{EX}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=520 \text{ nm}$, $\text{pH}=6.5$ (fosfatos 0.1M), volumen de muestra= $300 \mu\text{L}$).

Desde el punto de vista de esta Tesis Doctoral se observa cómo la albúmina, por sí sola, no provoca una señal de fluorescencia, por lo que no altera las propiedades de la lámina.

A2.4.- Estudios de reducción de la interferencia

Aunque la interferencia de la albúmina es reducible por dilución (figura A2.2), se ensayaron varias alternativas para intentar evitar o minimizar esta interferencia sobre concentraciones altas de albúmina:

a) Cambiar el pH. El punto isoeléctrico de la albúmina es 4.7¹⁴⁴ y, por tanto, al pH de trabajo (generalmente 8) estará cargada muy negativamente, por lo que su capacidad de interactuar con la lámina a través de interacciones de tipo iónico es elevada. Sería posible minimizar la interferencia de la albúmina rebajando su carga eléctrica por control del pH. Se estudiaron tres valores de pH (5, 6.5 y 8) pero los resultados fueron negativos.

b) Tratar la muestra con CaCl₂. El Ca(II) puede interactuar con la albúmina y, de alguna forma, neutralizar esa carga negativa. La concentración ensayada fue relativamente alta (en torno a 400 mgL⁻¹), sin embargo no se obtuvieron mejoras significativas (la señal se retarda algo menos que trabajando en ausencia de Ca(II)).

c) Cambiar la composición de la lámina. Otra forma de evitar la adsorción de la albúmina sobre la lámina es alterar la tendencia de la propia lámina, modificando su composición. Para ello se idearon una serie de pruebas sustituyendo la acrilamida por ácido acrílico, que genera un polímero más inerte químicamente. Los resultados se pueden resumir de la siguiente forma:

- La sustitución de acrilamida por ácido acrílico no alteró la capacidad de formar las láminas. Sin embargo, no se observó reacción alguna en la lámina (en ausencia de albúmina).

144 Peng, Z. G.; Hidajat, K.; Uddin, M. S.; "Absorption of Bovine Serum Albumin on Nanosized Magnetic Particles" *J. Coll. Int. Sci.* **2004**, 271, 277-283.

- Se ensayó con mezclas de acrilamida/ácido acrílico (junto con bisacrilamida). Estas láminas se formaron bien, pero se observaron problemas al incorporar la GOx-FS (se detectó un reparto inhomogéneo de la enzima).

- Finalmente se decidió ensayar una lámina doble: la primera capa con acrilamida y GOx-FS y la segunda con ácido acrílico y sin enzima. De esta manera la lámina de acrílico actuaba de lámina protectora de la lámina de acrilamida. Tampoco resultó.

A2.5.- La parte positiva de la albúmina

Para completar el estudio de la influencia de la albúmina en las medidas se realizaron dos pruebas, en las que se ponía de manifiesto hasta qué punto es posible usar una interferencia en beneficio de la medida.

En el apartado A2.3 se demostró que la concentración de albúmina que limitaba la aparición de la señal estaba en torno a 3000 mgL^{-1} , por lo que no había problema en trabajar a esta concentración, pero se quería saber qué ocurría si se utilizaba esta disolución como portadora y se inyectaba disolución de glucosa sin albúmina como analito. Las pruebas se hicieron utilizando una disolución de albúmina a $\text{pH}=6.5$ como portadora. En este caso se trataba de inyectar glucosa en el flujo de la albúmina para comprobar hasta qué punto se observaba la señal. El registro obtenido se muestra en la figura A2.3.

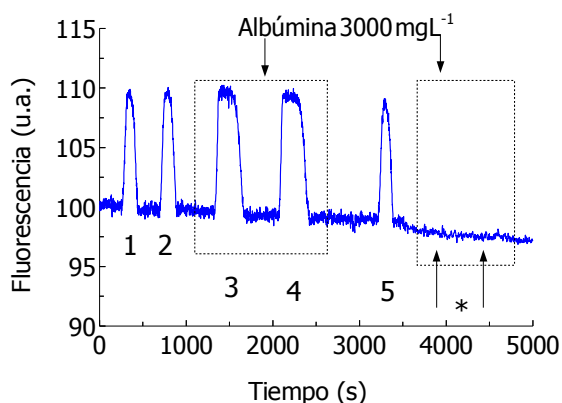


Figura A2.3.- Adiciones de glucosa de 1000 mgL⁻¹ con disolución portadora de albúmina de 3000 mgL⁻¹ en tampon de pH=6.5 (fosfatos 0.1M). (*) Inyección de disolución de glucosa de 1000 mgL⁻¹ y albúmina de 40000 mgL⁻¹. (CFFIM, rendijas de 15 nm de excitación y 20 nm de emisión, caudal=0.4 mLmin⁻¹, λ_{EX}=490 nm, λ_{EM}=520 nm, volumen de muestra=300 μL).

Cabe destacar que los tiempos de aparición de las señales con disolución portadora de albúmina fueron mucho menores que para los otros casos. Se muestran en la tabla A2.1.

Muestra	Tiempo de aparición (s)
1	75.7
2	76.3
3	29.7
4	29.3
5	71.1

Tabla A2.1.- Tiempos de aparición de las señales de glucosa de 1000 mgL⁻¹.

Parece como si la albúmina activara la lámina. Tras este efecto se pensó que así podrían obtenerse señales con concentraciones de glucosa mucho menores que las vistas hasta ahora. Se midió entonces con disolución portadora de albúmina de 40000 mgL⁻¹, para ver el efecto de la concentración de la albúmina. Se obtuvo el registro mostrado en la figura A2.4.

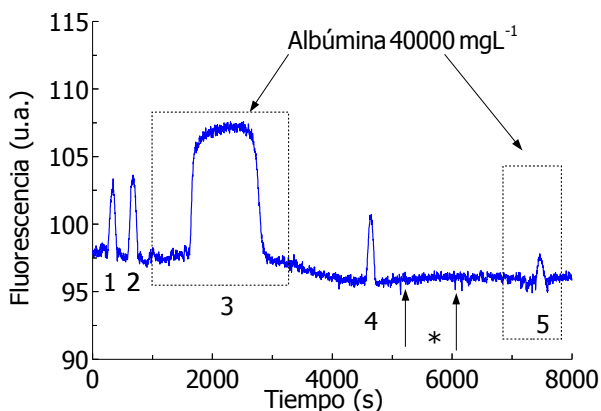


Figura A2.4.- Adiciones de glucosa de 1000 mgL^{-1} con disolución portadora de albúmina de 40000 mgL^{-1} en tampon de $\text{pH}=6.5$ (fosfatos 0.1M). (*) Inyección de disolución de glucosa de 1000 mgL^{-1} + albúmina de 40000 mgL^{-1} . (CFFIM, rendijas de 15 nm de excitación y 20 nm de emisión, caudal= 0.4 mLmin^{-1} , $\lambda_{\text{EX}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=520 \text{ nm}$, volumen de muestra= $300 \mu\text{L}$).

Se repite la señal saturada con la disolución portadora de albúmina, en este caso incluso más ancha que las de la figura A2.3. La señal 5 se debe a una disolución de glucosa de 100 mgL^{-1} . Aquí tampoco se ven las señales de la mezcla de glucosa y albúmina. Los tiempos de aparición también resultan menores cuando hay paso de albúmina (tabla A2.2).

Muestra	Tiempo de aparición (s)
1	91.2
2	88.0
3	34.9
4	72.1
5	80.5

Tabla A2.2.- Tiempos de aparición de las señales de glucosa de 1000 mgL^{-1} .

A2.6.- Conclusiones

Como conclusión general, la albúmina afecta a la determinación de glucosa a través de su reacción con la GOx-FS inmovilizada ya que se adsorbe sobre la superficie de la lámina como hacía la disolución. Esto, a parte de ser un problema cuando se quiere determinar la glucosa en muestras con alta concentración de albúmina (o por extensión, de otras proteínas), podría ser usado en estudios futuros como método para aumentar la sensibilidad del método dado, que favorece la reacción completa de la glucosa. En este sentido podría ser interesante estudiar si es posible el uso del método para concentraciones de glucosa más bajas. No obstante, es necesario elucidar cuál es el mecanismo real del aumento de fluorescencia y descartar posibles artefactos creados por la propia albúmina. Además, en todo caso, la albúmina provoca una interferencia fuerte si se encuentra en muestras reales, por lo que habría que eliminarla antes de hacer las medidas.

Considerando los objetivos de la Tesis Doctoral, se ve que en las láminas que contienen GOx, la albúmina no provoca cambios adicionales en el tamaño.

A3.- ABREVIATURAS Y GLOSARIO

Acrónimos

AA:	acrilamida
BAA:	bisacrilamida
BCI:	cloruro de berberina
BSA:	albúmina bovina
CFFIM:	celda de flujo de filtro interno mínimo
CFMO:	celda de flujo para medio orgánico
CFO:	celda de flujo original
CMC:	concentración micelar crítica
DER:	desviación estándar relativa
DOS:	bis(2-etilhexilsebacato)
DMF:	dimetilformamida
ELSD:	detector evaporativo de dispersión de luz
FDIC:	detección de fluorescencia por cambios de intensidad
FAD:	flavín adenín dinucleótido
FIA:	análisis por inyección en flujo
FMN:	flavín mononucleótido
GOx-FS:	glucosa oxidasa derivatizada con fluoresceína
GPC:	cromatografía de permeación en gel
HPLC:	cromatografía líquida de alta eficacia
HPTLC:	cromatografía en capa fina de alta eficacia
PAA:	poliacrilamida
PEG:	polietilenglicol
PVC:	cloruro de polivinilo
RMN:	resonancia magnética nuclear
RPG:	respuesta por gramo
SAR:	sensor autoindicador reversible

SDS:	dodecilsulfato de sodio
SEC:	cromatografía de exclusión
SIPV:	variación del camino inducida por dispersión
TLC:	cromatografía en capa fina
TTR:	Teoría del Transporte Radiativo
UV-VIS:	ultravioleta-visible

Subíndices y superíndices

0:	estado fundamental
A:	analito
abs:	absorción
b:	hacia atrás (<i>backward</i>)
CI:	conversión interna
CIS:	cruce intersistemas
D:	disolvente
EM:	emisión
EX:	excitación
ϵ :	constante dieléctrica
f:	hacia adelante (<i>forward</i>)
F:	fluoróforo
G:	Goldman, glucosa
ins:	instrumental
iny:	inyección
KM:	Kubelka-Munk
λ :	longitud de onda
M:	medio
n:	índice de refracción
nr:	no radiativo
Q:	desactivante, <i>quencher</i>

r:	radiativo
S:	estado singlete
sol:	solvatación
T:	estado triplete
V:	vacío
v:	volumen
ZW:	Zweidinger Winefordner

Parámetros

A :	absorbancia
A:	área del pico cromatográfico
a,b,A,B:	relaciones entre el coeficiente de absorción y de dispersión
c:	velocidad de la luz
C:	concentración
E:	energía
$E_{D,A}$:	relación de constantes dieléctricas
F:	intensidad de fluorescencia
$f_{\epsilon,M}$:	parámetro que depende de la constante dieléctrica y del medio
$f_{n,M}$:	corrección de campo local
g_F :	factor de correlación de Kirkwood-Fröhlich
g_0, g_1	multiplicidades de los estados electrónicos
I:	intensidad de radiación
k:	constante de desactivación, coeficiente de absorción
k_B :	constante de Boltzmann
K_{HPLC} :	constante instrumental en HPLC
K^{ins} :	constante instrumental
K_P :	constante de permeabilidad
K^{PS} :	constante de solvatación preferencial
K_Q :	constante de desactivación

K_{Rh} :	constante de Rayleigh
K^{sen} :	constante del sensor
l :	paso óptico
L :	espesor del sólido
L_F :	parámetro relacionado con la forma del fluoróforo
m :	masa
M :	peso molecular
N :	número de moléculas por unidad de volumen
N_A :	número de Avogadro
$N_{D,A}$:	relación de índices de refracción
P :	parámetro que depende del fluoróforo
r :	radio, distancia media intermolecular
R :	reflectancia
s :	coeficiente de dispersión
S_F :	perfil normalizado del espectro de emisión
T :	temperatura, transmitancia
x :	distancia
X :	fracción molar en volumen
Z :	carga
α :	polarizabilidad, parámetro que depende del tipo de iluminación
ϵ :	absortividad molar
ϵ :	constante dieléctrica
Φ :	rendimiento cuántico
Y_F :	relación de constantes de desexcitación
η :	parte anisótropa del momento cuadrupolar, viscosidad
λ :	longitud de onda
μ :	momento dipolar, variación del camino inducido por dispersión
ρ :	densidad
ν :	frecuencia
u :	eficacia del desactivante

A4.- PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Artículos

- Delgado-Camón, A.; Domínguez, A.; Sanz, I.; Cebolla, V. L.; Mateos, E.; Membrado, L.; Galbán, J.; de Marcos, S.; "Fluorescence detection by intensity changes as a detection system in HPLC" (Enviado a *Chromatografía*).

- Cebolla, V. L.; Jarne, C.; Delgado-Camón, A.; Cossío, F. P.; Domínguez, A.; Membrado, L.; Galbán, J.; Garriga, R.; Gálvez, E. M.; "Berberrubine: a Facile Synthesis, a Practical Application as a Fluorescent Chemosensor for Alkanes via Dipole-Induced Dipole Interactions, and Signal Amplification Derived from a Keto-Enol Tautomerism". (Enviado a *ChemSusChem*).

- Cebolla, V. L.; Mateos, E.; Garriga, R.; Jarne, C.; Membrado, L.; Cossío, F. P.; Gálvez, E. M.; Matt, M.; Delgado-Camón, A.; "Changes in Fluorescent Emission Due to Non-covalent Interactions as a General Detection Procedure for Thin-Layer Chromatography". *Chem. Phys. Chem.* **2012**, 13, 291-299.

- Galbán, J.; Delgado-Camón, A.; Cebolla, V. L.; de Marcos, S.; Polo, V.; Mateos, E.; "Fluorescence Detection by Intensity Change Based Sensors: A Theoretical Model". *J. Fluoresc.* **2012**, 22, 381-389.

- Cebolla, V. L.; Jarne, C.; Domingo, P.; Domínguez, A.; Delgado-Camón, A.; Garriga, R.; Galbán, J.; Membrado, L.; Gálvez, E. M.; Cossío, F. P.; "Fluorescence Detection by Intensity Changes for High-Performance Thin-Layer Chromatography Separation of Lipids Using Automated Multiple Development". *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 2668-2675.

- Delgado-Camón, A.; Garriga, R.; Mateos, E.; Cebolla, V. L.; Galbán, J.; Membrado, L.; de Marcos, S.; Gálvez, E. M.; "Changes in Fluorescent Emission of Cationic Fluorophores in the Presence of *n*-Alkanes and Alcohols in Solvents". *Chem. Phys. Lett.* **2011**, 501, 547-553.

- Delgado-Camón, A.; Domínguez, A.; Mateos, E.; Sanz, V.; de Marcos, S.; Cebolla, V. L.; Sanz-Vicente, I.; Galbán, J.; "A Simplified Analytical Model for Explaining the Environment Effect on the Fluorescence Intensity in Solution" *Luminescence* **2010**, 25, 218-287.

- Aginagalde, M.; Vara, Y.; Arrieta, A.; Zangi, R.; Cebolla, V.; Delgado-Camón, A.; Cossío, F.; "Tandem [8+2] Cycloaddition- [2+6+2] Dehydrogenation Reaction Involving Imidazo[1, 2-a]pyridines and Imidazo [1, 2-a] Pyrimidines". *J. Org. Chem. Featured Article*, **2010**, 75, 2776-2784.

- Galbán, J.; Mateos, E.; Cebolla, V.; Dominguez, A.; Delgado-Camón, A.; de Marcos, S.; Sanz-Vicente, I.; Sanz, V.; "The Environmental Effect on the Fluorescence Intensity in Solution. An Analytical Model". *Analyst*, **2009**, 134, 2286-2292.

- Cebolla, V.; Mateos, E.; Delgado-Camón, A.; Galbán, J.; Garriga, R.; Membrado, L.; "Changes in Emission by Non-Covalent Analyte-Fluorophore Interactions in Different Media as a General Detection Procedure". *Luminescence* **2008**, 23(4), 191-280.

- Delgado-Camón, A.; Mateos, E.; Cebolla, V. L.; de Marcos, S.; Galbán, J.; "Preparation and Performance of a FIDC-Based Sensor System for General Analyte Detection". *Luminescence* **2008**, 23(4), 191-280.

- Cebolla, V. L.; Gálvez, E. M.; Mateos, E.; Delgado, A.; Matt, M.; Membrado, L.; Galbán, J.; Vela, J.; "Chromatographic Responses of Fossil-Fuel Related, Non-Fluorescent Analytes in Planar Chromatography and HPLC-GPC Using Fluorescence Detection by Intensity Changes". *Prep. Pap-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.* **2008**, 53(1), 398-399.

- Galbán, J.; Sanz, V.; Mateos, E.; Sanz-Vicente, I.; Delgado-Camón, A.; de Marcos, S.; "Reagentless Optical Biosensors for Organic Compounds Based on Autoindicating Proteins". *Protein and Pept. Lett.* **2008**, 15(8), 772-778(7).

- Galbán, J.; Delgado-Camón, A.; Sanz, V.; Sanz-Vicente, I.; de Marcos, S.; "A Theoretical Approach for Designing Fluorescent Reagentless Biosensors: The Optical Model". *Anal. Chim. Acta* **2008**, 615 (2), 148-157.

Participación en congresos

- Póster: A. Delgado-Camón, A. Domínguez, E. Mateos, V. Sanz, S. de Marcos, V. Cebolla, I. Sanz-Vicente, J. Galbán. "A Simplified Analytical Model for Explaining the Environment Effect on the Fluorescence Intensity in Solution". *XIV International Symposium on Luminescence Spectrometry* **2010**, Prague (República Checa).

- Póster: A. Delgado-Camón; S. de Marcos; J. Galbán; E. Romero; V. Cebolla. "Diseño de un sensor óptico de vida larga para la medida de pH basado en rojo congo inmovilizado". *XV Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica* **2009**, San Sebastián (España).

- Comunicación oral: V. L. Cebolla; E. Mateos; A. Delgado-Camón; J. Galbán; R. Garriga; L. Membrado. "Changes in Emission by Non-covalent Analyte-Fluorophore Interactions in Different Media as a General Detection Procedure". *XIII International Symposium on Luminescence Spectrometry* **2008**, Bolonia (Italia).

- Póster: A. Delgado-Camón; E. Mateos; V. L. Cebolla; S. de Marcos; J. Galbán. "Preparation and Performance of a FDIC-based Sensor System for General Analyte Detection". *XIII International Symposium on Luminescence Spectrometry* **2008**, Bolonia (Italia).

- Comunicación oral: V.L. Cebolla, E. Mateos; R. Garriga; L. Membrado; F. P. Cossío; E. M. Gálvez; M. Matt; A. Delgado; J. Vela. "Changes in Emission Induced by Non-covalent Analyte-Fluorophore Interactions in Silica Gel as a General Detection Procedure for Thin-Layer Chromatography". *International Symposium for Thin Layer Chromatography, HPTLC* **2008**, Helsinki (Finlandia).

- Póster: V. L. Cebolla, E. M. Gálvez, E. Mateos, A. Delgado, M. Matt, L. Membrado, J. Galbán, J. Vela. "Responses of Fossil-fuel Related Non-fluorescent Analytes in Planar Chromatography and HPLC-GPC using Fluorescence Detection by Intensity Changes". *Advances in Analytical Characterization for Fuel Science. Division of fuel Chemistry (Spring 2008 ACS National Meeting & Exposition)* **2008**, Nueva Orleans (EE.UU.).

- Póster: V. Cebolla, A. Delgado, A. Domínguez, E. Mateos, I. Sanz-Vicente, S. de Marcos, L. Membrado, J. Galbán. "Aplicaciones analíticas del efecto de las interacciones débiles del entorno sobre el rendimiento cuántico de fluorescencia. Aplicaciones en HPLC y reactivos inmovilizados". *XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica* **2007**, Mallorca (España).

- Póster: A. Delgado, V. Sanz, J. Galbán, S. de Marcos and J. R. Castillo, "Mathematical Model for Sensor Films Based on Chemically Modified Enzymes". *Seventh European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. EUROPTRODE VII 2004*, Madrid (España).

