



Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes

Belén Reija Otero



Grupo de Fotoquímica y Fotofísica Molecular
Departamento de Química Física
Universidad de Santiago de Compostela



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

Estudio estructural y dinámico
de sistemas organizados
mediante sondas fluorescentes

Belén Reija Otero
Lugo, Julio de 2007



DÑA. MARÍA DE LA MERCED NOVO RODRÍGUEZ Y D. WAJIH AL-SOUFI,
PROFESORES TITULARES DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, con el título “ESTUDIO ESTRUCTURAL Y DINÁMICO DE SISTEMAS ORGANIZADOS MEDIANTE SONDAS FLUORESCENTES”, que presenta la Graduada en Ciencias Químicas Dña. Belén Reija Otero, para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela en la Facultad de Ciencias de Lugo.

Y, para que así conste, firmamos la presente en Lugo, a 3 de Julio de 2007.

Fdo. M. de la Merced Novo Rodríguez

Fdo. Wajih Al-Soufi



D. JESÚS RODRÍGUEZ OTERO, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICA:

Que la Graduada en Ciencias Químicas por la Universidad de Santiago de Compostela, Dña. Belén Reija Otero, ha realizado en este Departamento, bajo la dirección de Dña. M^a de la Merced Novo Rodríguez y de D. Wajih Al-Soufi, el trabajo descrito en la presente memoria "ESTUDIO ESTRUCTURAL Y DINÁMICO DE SISTEMAS ORGANIZADOS MEDIANTE SONDAS FLUORESCENTES", que presenta para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 3 de Julio de 2007.

Fdo. Jesús Rodríguez Otero

Agradecimientos

Esta Tesis fue realizada en el Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela bajo la dirección de la Prof. Dra. M. de la Merced Novo Rodríguez y del Prof. Dr. Wajih Al-Soufi. A ellos quisiera agradecer todo lo que me han enseñado, su inolvidable ayuda para resolver los problemas surgidos durante el desarrollo de este trabajo, su apoyo personal, su gran paciencia diaria y sobre todo sus ánimos en mis momentos de “poca fe”.

Agradezco también al Prof. Dr. Manuel Mosquera González y la Prof. Dra. M. Flor Rodríguez Prieto su gran ayuda, sobre todo por su buen trabajo en la parte de transferencia protónica.

Quisiera agradecer también al Prof. Dr. Claus A. M. Seidel de la Universidad *Heinrich Heine* de Düsseldorf el permitirme trabajar en su grupo de investigación, su tiempo, su contagiosa ilusión por el trabajo y sobre todo su ayuda personal cuando era realmente necesaria.

Mercido es mi agradecimiento a los profesores del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias, así como al Prof. Dr. Julio A. Seijas Vázquez y la Prof. Dra. M. Pilar Vázquez Tato, por su apoyo en todo momento.

Quiero dar las gracias a los estudiantes que durante este tiempo realizaron en nuestro grupo su Proyecto Fin de Carrera, especialmente al ya licenciado Jorge Bordello por su trabajo con las pironinas. Quisiera hacer extensivo este agradecimiento a todas las personas que a lo largo de estos años han formado parte del Grupo de Fotoquímica y Fotofísica Molecular, cuyo trabajo nos permite avanzar más rápido a los que nos incorporamos más tarde. He de agradecer también a los miembros de este grupo que trabajan en Santiago su grata compañía durante mis visitas. También doy las gracias por la ayuda prestada a las personas que durante mi estancia formaban parte del grupo de investigación del Prof. C. A. M. Seidel.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias (en especial Raquel, Merce, Bea V., Cris, Bea, Ángeles, Laura, Manuela, Chus, Luisana, Sandra, José, Javi, Álvaro, Víctor, Santi, Juan, Carlos y Alexander) debo muy buenos ratos y que el ambiente de trabajo fuese realmente agradable. Gracias a todo el personal de la Facultad de Ciencias por su amabilidad y ayuda a lo largo de estos años.

Es justo mencionar al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca FPU, sin la cual no hubiese podido dedicarme por completo a la realización de esta tesis. No me olvido de la ayuda para la estancia breve en Düsseldorf de este mismo Ministerio así como de las ayudas para asistencia a congresos, tanto de la Xunta de Galicia como de la Universidad de Santiago de Compostela, que permitieron ampliar mi formación.

Por último, aunque no por ello menos importante, doy las gracias a mi familia (en especial a mis padres, mi hermano, mis tíos Teresa y Pepe y mi prima Marta), a mis amigos (sobre todo Ana, Noelia, María y Rosa) y a mis compañeras de piso por quererme, cuidarme y entender que los quiero a pesar de que no paso demasiado tiempo con ellos.

Índice general

1	Objetivos	13
2	Introducción	17
2.1	Fluorescencia y procesos en estados excitados	17
2.1.1	Aspectos generales de la fluorescencia	17
2.1.2	Transferencia protónica fotoinducida	24
2.1.3	Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)	27
2.2	Sondas fluorescentes	35
2.2.1	Pironinas	35
2.2.2	7-Hidroxycumarina	40
2.3	Sistemas microheterogéneos objeto de estudio	46
2.3.1	Ciclodextrinas	47
2.3.2	Sistemas micelares	50
2.4	Asociación sustrato-ligando: equilibrio y dinámica	56
3	Parte experimental	61
3.1	Reactivos	61
3.2	Preparación de disoluciones	63
3.3	Aparatos de medida utilizados	67
4	Análisis de datos	75
4.1	Tipos de datos	75
4.1.1	Series de espectros de absorción	75
4.1.2	Series de espectros de fluorescencia	76

4.1.3	Decaimientos de fluorescencia	78
4.1.4	Curvas de correlación de fluorescencia	79
4.2	Análisis de componentes principales	80
4.3	Análisis global	86
4.3.1	Estimación de errores en los parámetros de ajustes globales	87
5	Comportamiento fotofísico y complejación con ciclodextrinas de las pironinas Y y B	89
5.1	Complejación de pironinas Y y B con β -ciclodextrina	89
5.1.1	Resultados	89
5.1.2	Discusión	96
5.2	Complejación de pironinas Y y B con γ -ciclodextrina	116
5.2.1	Resultados	116
5.2.2	Discusión	121
5.3	Comportamiento fotofísico de las pironinas Y y B en diferentes disolventes	146
5.3.1	Resultados	146
5.3.2	Discusión	151
6	Dinámica de los complejos de inclusión entre pironinas y ciclodextrinas	163
6.1	Complejación de pironinas Y y B con β -ciclodextrina	163
6.1.1	Resultados	163
6.1.2	Función general de correlación para un equilibrio químico.	165
6.1.3	Discusión	171
6.2	Complejación de pironinas Y y B con γ -ciclodextrina	177
6.2.1	Resultados	177
6.2.2	Discusión	178
6.3	Comparación de la complejación de las pironinas con β -CD y γ -CD	181
7	Comportamiento fotofísico de la 7-hidroxycumarina en disolventes próticos	189
7.1	Comportamiento fotofísico de la 7-Hidroxycumarina en disolución acuosa	189
7.1.1	Resultados	189
7.1.2	Discusión	198

7.2	Comportamiento fotofísico de la 7-Hidroxicumarina en etanol	215
7.2.1	Resultados	215
7.2.2	Discusión	222
8	Comportamiento fotofísico de la 7-hidroxicumarina en tensioactivos	239
8.1	Tensioactivos aniónicos	239
8.1.1	Resultados	239
8.1.2	Discusión	248
8.2	Tensioactivos catiónicos	272
8.2.1	Resultados	272
8.2.2	Discusión	279
8.3	Tensioactivos no iónicos	292
8.3.1	Resultados	292
8.3.2	Discusión	297
8.4	Comparación de la interacción de la 7-HC con las micelas de los distintos tensioactivos	305
9	Conclusiones	311
	Apéndices	315
	Apéndice 1: Factores preexponenciales de decaimientos de especies ligadas mediante un equilibrio de complejación	315
	Apéndice 2: Ajuste de un decaimiento biexponencial con un modelo monoexponencial aparente	320
	Apéndice 3: Obtención de modelos	323
	Índice del contenido del CD adjunto	325
	Abreviaturas	331
	Bibliografía	335

Capítulo 1

Objetivos

Es bien sabido que el avance de muchos campos dentro de la Biología o de la Medicina está sujeto al mejor conocimiento de los sistemas biológicos a nivel molecular. Aspectos claves en el comportamiento de estos sistemas, como son la autoasociación o el reconocimiento molecular, están lejos de ser comprendidos, aunque son objetivo de numerosos estudios. Dada la gran complejidad que presentan los sistemas biológicos se recurre en muchos casos a la utilización de sistemas modelo, con un comportamiento más sencillo pero que ilustra los aspectos objeto de estudio. En general, estos sistemas modelo presentan la organización estructural y la microheterogeneidad características de los sistemas biológicos, pero tienen una composición bien definida y propiedades ópticas ventajosas. El estudio estructural y dinámico de estos sistemas organizados modelo mediante sondas fluorescentes altamente sensibles al medio, será el objetivo de este trabajo. En la figura 1.1 se representa esquemáticamente el proceso de asociación de una molécula huésped con un ligando. El estudio estructural del sistema se basará en el análisis de las interacciones huésped-ligando, que aportarán información acerca de propiedades como la polaridad o la rigidez de la cavidad. El estudio dinámico se refiere tanto a la determinación de las velocidades de los procesos de asociación y de disociación (mostrados en la figura 1.1) como a la dinámica difusional de los complejos formados.

Los sistemas modelo objeto de estudio serán ciclodextrinas (CDs), que constituyen cavidades semirígidas cuyo comportamiento mimetiza los procesos de reconocimiento molecular en los sistemas enzima-sustrato, y micelas, que son sistemas organizados flexibles y dinámicos que sirven como modelos de membranas biológicas y permiten estudiar los procesos de transferencia de materia a través de éstas [Turro 05]. En el caso de las ciclodextrinas se analizará la fortaleza de las interacciones con las moléculas huésped y la naturaleza de las mismas. Además, se estudiará la dinámica difusional de los complejos formados y la dinámica

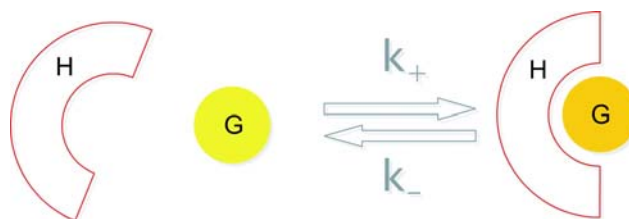


Figura 1.1: Representación esquemática de un sistema supramolecular con una molécula de huésped (G) que puede interactuar con un ligando (H).

de los procesos de asociación y disociación. Estos estudios permitirán obtener información acerca de los aspectos estructurales que determinan las velocidades de entrada y de salida de materia en este tipo de cavidades y, por tanto, la estabilidad del complejo. Los sistemas micelares se estudiarán desde un punto de vista estructural, observando los cambios que sufre una sonda fluorescente con transferencia protónica fotoinducida al asociarse con micelas de diferentes tipos. Con estos estudios se pretenderá demostrar el potencial de este tipo de sondas para obtener información acerca de la polaridad y de la presencia de agua en el interior de las micelas.

Como fluoróforos se usarán, en el estudio de la complejación con ciclodextrinas y de su dinámica, pironinas, cuyo interés radica en su elevada estabilidad fotoquímica y en que absorben a longitudes de onda del orden de 500 nm, por lo que son adecuadas para la realización de estudios de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia con un equipo utilizado en el marco de una colaboración con el Prof. Dr. Claus A. M. Seidel, de la Universidad *Heinrich Heine* de Düsseldorf. Para el estudio estructural de sistemas micelares se usarán cumarinas, algunas de las cuales dan lugar a procesos de transferencia protónica fotoinducida a través del disolvente, ya que el medio juega un papel fundamental en la eficiencia de dichos procesos para estas moléculas. Además, dado que el agua puede actuar como base o como ácido, estos procesos son muy sensibles a la presencia de agua y a su disposición dentro de las estructuras organizadas. Los estudios concretos a realizar con estos dos tipos de moléculas son los siguientes:

a) Con las pironinas Y (PY) y B (PB) se estudiará la interacción con dos ciclodextrinas, β -CD y γ -CD, que se diferencian fundamentalmente en el tamaño de su cavidad. El equilibrio de complejación de las pironinas con estas ciclodextrinas se estudiará mediante espectroscopia de absorción y espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo. Los resultados de estos estudios son necesarios para analizar e interpretar los datos obtenidos mediante “Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia” (FCS), que aportan información acerca de la dinámica de asociación/disociación en estos sistemas. También se estudiará el comportamiento de las pironinas PY y PB en diferentes disolventes con el fin de compararlo con el que presentan en el interior de las ciclodextrinas.

b) La 7-hidroxicumarina (7-HC), cuyos procesos de transferencia protónica fotoinducida son muy sensibles al medio, es una sonda interesante para el estudio estructural de sistemas organizados. Con esta cumarina se estudiarán sistemas micelares biomiméticos formados por tensioactivos de diferentes tipos. Para poder interpretar los resultados obtenidos en esos medios, se realizará en primer lugar un estudio exhaustivo del comportamiento de la 7-HC en disolución acuosa y en etanol, analizando la influencia del pH en el mismo. Los procesos de transferencia protónica de la 7-HC en micelas de diferentes tensioactivos se estudiarán mediante espectroscopias de absorción y de fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo.

Capítulo 2

Introducción

2.1 Fluorescencia y procesos en estados excitados

2.1.1 Aspectos generales de la fluorescencia

Tras los pioneros trabajos de Kasha, Vavilov, Perrin, Jablonski, Weber, Stokes, Förster, y otros, la espectroscopia de fluorescencia se convirtió en una técnica instrumental ampliamente usada en muchos campos de la ciencia. Dadas las múltiples aplicaciones prácticas de la fluorescencia en el análisis de alimentos, de productos farmacéuticos, de productos naturales y en análisis clínicos hay muchos libros que describen la teoría de la espectroscopia de fluorescencia y sus aplicaciones, como por ejemplo las revisiones de Lakowicz [Lakowicz 91, Lakowicz 99, Lakowicz 06] y de otros autores [Turro 91, Valeur 02, Wolfbeis 93]. Por ello nos limitaremos a exponer unos conceptos básicos sobre este fenómeno. Para ello nos basaremos en el conocido diagrama de Jablonski (figura 2.1), en el que las líneas rectas representan procesos radiantes y las líneas onduladas procesos no radiantes. Debido a la absorción (Abs) de un cuanto de luz por parte de la molécula ésta pasa del estado fundamental singlete (con dos electrones con espines apareados), S_0 , a un estado singlete electrónicamente excitado, S_1 u otros superiores. Una vez en el estado excitado una parte de la energía que la molécula tiene en exceso se pierde en picosegundos debido a los choques con moléculas de disolvente circundante y la molécula se relaja al nivel vibracional más bajo del estado excitado en un proceso conocido como relajación vibracional (R). Posteriormente puede producirse el regreso a un nivel de vibración del estado fundamental en nanosegundos mediante emisión de radiación electromagnética. Este proceso se llama fluorescencia (F) y la molécula correspondiente fluoróforo. La fluorescencia se produce compitiendo con otros posibles procesos de desactivación no radiantes: conversión

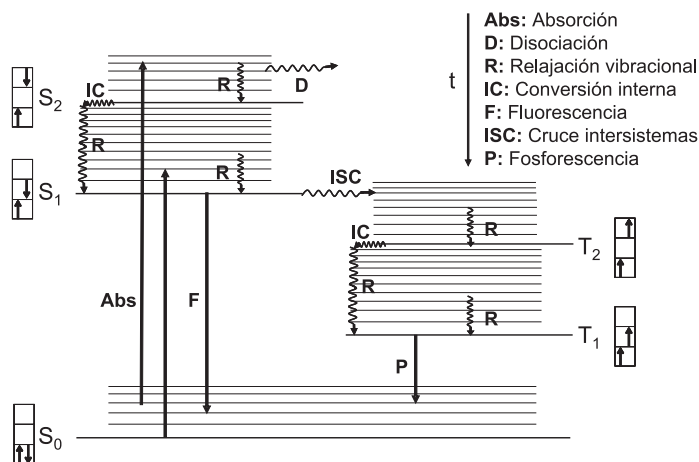


Figura 2.1: Diagrama de Jablonski: Representación esquemática de los estados de energía electrónica de un colorante. S_0 representa el estado singlete fundamental, S_1 el primer estado excitado singlete, S_2 el segundo estado excitado singlete, T_1 el primer estado excitado triplete y T_2 el segundo estado excitado triplete. Además, se representan los procesos posibles entre estos niveles de energía.

interna (IC), transición al estado triplete mediante cruce intersistemas (ISC) y transferencia de energía a un desactivador.

Sobre la base de este diagrama se puede explicar el hecho de que el espectro de fluorescencia de un fluoróforo se sitúe normalmente a longitudes de onda mayores que su espectro de absorción. Esto es debido a que en el estado fundamental el fluoróforo se encuentra prácticamente en el estado vibracional más bajo y tras la absorción de luz pasa a un nivel vibracional excitado del estado excitado. Por el contrario, la fluorescencia se produce desde el nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado a un estado vibracional excitado del estado fundamental. Por tanto, la energía implicada en la absorción de luz es mayor que la implicada en la fluorescencia por lo que el espectro de fluorescencia se produce a menores energías, es decir, a mayores longitudes de onda que el de absorción.

La detección de la intensidad de fluorescencia emitida por un fluoróforo a una cierta longitud de onda en función de la longitud de onda de excitación permite obtener lo que se denomina un espectro de excitación. Dicho espectro coincide con el espectro de absorción del fluoróforo siempre que no se produzcan procesos de transformación en el estado excitado. Por tanto, los espectros de excitación son de gran utilidad para conocer los procesos que sufre el fluoróforo en el estado excitado.

Los espectros de fluorescencia que se obtienen experimentalmente, tanto de excitación como de emisión, dependen de las características instrumentales específicas del aparato utilizado, concretamente, de las propiedades espectrales de los monocromadores de excitación

y de emisión, de la distribución energética de la fuente de excitación en función de la longitud de onda y de la diferente sensibilidad del fotomultiplicador según la longitud de onda. Todo esto lleva a que la forma de los espectros se vea distorsionada, denominándose por ello espectros no corregidos, que son perfectamente válidos para aplicaciones en que sólo interesan los valores relativos de intensidad a una determinada longitud de onda. Sin embargo, hay aplicaciones en las que la forma de los espectros es importante, como por ejemplo en el cálculo de rendimientos cuánticos o para establecer comparaciones de los mismos con los obtenidos en otros equipos, y por tanto es necesario corregir los espectros.

Además de las características instrumentales del aparato utilizado cabe destacar la influencia de varios factores en la intensidad de fluorescencia:

-*Presencia de oxígeno disuelto*: La presencia de oxígeno disuelto a menudo reduce la intensidad de fluorescencia de una disolución, de ahí que a veces sea necesaria la degasificación de la muestra antes de realizar la medida. Este efecto puede deberse a una oxidación de las especies fluorescentes inducida fotoquímicamente o, más frecuentemente, a la desactivación (“quenching”) de fluorescencia como resultado de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, el cual provoca cruce intersistemas y conversiones de las moléculas excitadas al estado triplete. Otras especies paramagnéticas también tienden a atenuar la fluorescencia.

- *Efecto de la concentración*: La intensidad de la radiación fluorescente es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema. Se cumple por tanto:

$$F = K'(I_0 - I) \quad (2.1)$$

En esta ecuación I_0 es la potencia del haz incidente sobre la disolución e I su potencia después de atravesar una longitud l de medio. La constante K' depende del rendimiento cuántico del proceso de fluorescencia.

La conocida ley de Lambert-Beer explica la disminución de intensidad que tiene lugar cuando la radiación atraviesa una disolución de una sustancia de concentración molar C :

$$I = I_0 10^{-\epsilon l C} \quad (2.2)$$

donde ϵ es una propiedad característica de la molécula denominada coeficiente de absorptividad molar, que depende de la longitud de onda de la radiación y l es el espesor de la cubeta de medición.

Sustituyendo la ecuación (2.2) en la ecuación (2.1) se obtiene:

$$F = K' I_0 (1 - 10^{-\epsilon l C}) \quad (2.3)$$

Según esta expresión, para que la intensidad de fluorescencia sea proporcional a la concentración se necesita que $\epsilon l C \ll 1$, ya que en este caso se cumple $(1 - 10^{-\epsilon l C}) \approx \epsilon l C$. Por

tanto, la intensidad de fluorescencia en disoluciones diluidas (con absorbancia $\mathcal{A} = \epsilon l C < 0.1$) es directamente proporcional a la concentración.

- *Temperatura*: La eficiencia de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación por conversión interna.

- *Disolvente*: Una disminución de la viscosidad del disolvente aumenta la probabilidad de conversión interna disminuyendo la intensidad de fluorescencia. La polaridad del disolvente también tiene influencia en la fluorescencia debido al efecto hipsocrómico (desplazamiento de una banda espectral hacia menores longitudes de onda o desplazamiento hacia el azul) y batocrómico (desplazamiento hacia mayores longitudes de onda o hacia el rojo) que el disolvente ejerce sobre el compuesto. Este efecto se estudiará con más detalle.

- *pH*: La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH debido a las diferentes especies químicas que pueden existir en función del pH.

Rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos, por lo que se corresponde con la relación entre la constante de velocidad de desactivación radiante (k_r) y la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos de desactivación, radiantes y no radiantes (k_{nr}):

$$\phi = \frac{\text{Número de fotones emitidos}}{\text{Número de fotones absorbidos}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.4)$$

El rendimiento cuántico respecto a una sustancia de referencia puede calcularse según la siguiente ecuación a partir de los espectros de absorción y de los espectros de emisión corregidos de disoluciones diluidas [Demas 71]:

$$\phi_x = \phi_r \frac{\mathcal{A}_r(\lambda_r) I(\lambda_r) n_x^2 D_x}{\mathcal{A}_x(\lambda_x) I(\lambda_x) n_r^2 D_r} \quad (2.5)$$

donde:

ϕ : rendimiento cuántico de fluorescencia.

x: disolución de rendimiento cuántico desconocido.

r: disolución de referencia de rendimiento cuántico conocido.

$\mathcal{A}(\lambda)$: absorbancia de la disolución a la longitud de onda de excitación λ .

$I(\lambda)$: intensidad relativa de la luz excitatriz a la longitud de onda de excitación λ .

n : índice de refracción.

D : área integrada bajo el espectro de emisión corregido por la diferente sensibilidad del sistema de detección a las distintas longitudes de onda de emisión.

Tiempo de vida de fluorescencia

Otro parámetro importante que sirve para caracterizar un fluoróforo es el tiempo de vida medio del estado singlete excitado. El tiempo de vida de una entidad molecular que decae siguiendo un proceso de primer orden es el tiempo necesario para que la concentración de la entidad disminuya hasta $1/e$ de su valor inicial. Estadísticamente representa la esperanza de vida de la molécula. Es igual al inverso de la suma de las constantes de velocidad (pseudo) unimoleculares de todos los procesos que causan la desactivación de la molécula. La forma más habitual de designar el **tiempo de vida de fluorescencia** del fluoróforo es τ :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2.6)$$

El tiempo de vida que proporciona esta ecuación es distinto del llamado **tiempo de vida de fluorescencia radiante** o tiempo de vida de fluorescencia intrínseco, τ_F , que sólo tiene en cuenta los procesos de desactivación radiante:

$$\tau_F = 1/k_r \quad (2.7)$$

Tanto ϕ como τ pueden proporcionar información detallada sobre el microentorno del fluoróforo, ya que todos los mecanismos de desactivación que compiten con la fluorescencia están muy influenciados por el medio circundante. De las ecuaciones (2.4) y (2.6) se obtiene la relación existente entre τ y ϕ :

$$\phi = k_r \tau \quad (2.8)$$

En un experimento de medida de tiempos de vida de fluorescencia, el fluoróforo se excita con un corto pulso de luz de excitación a un tiempo cero y luego disminuye la intensidad de fluorescencia observada con un decaimiento monoexponencial:

$$\frac{dF(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau}F(t) \Rightarrow F(t) = F(t=0)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.9)$$

En esta ecuación, $F(t=0)$ es la intensidad de fluorescencia tras un pulso de excitación, conocida como factor preexponencial o amplitud. El tiempo de vida de fluorescencia τ es el tiempo en el que la intensidad de fluorescencia se reduce a $1/e$ del valor inicial. En el caso de una mezcla de fluoróforos con distintos tiempos de vida de fluorescencia o un fluoróforo con tiempos de vida de fluorescencia diferentes según su microentorno, el decaimiento no es

monoexponencial y puede describirse como una suma de decaimientos monoexponenciales individuales:

$$F(t) = \sum_i F_i(t=0)e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.10)$$

Constantes de velocidad de desactivación

La **constante de velocidad de desactivación** puede calcularse teóricamente a partir de los espectros de absorción y de emisión utilizando la ecuación de Förster [Ferrante 93]:

$$k_r^F = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \int \frac{\varepsilon(\tilde{\nu})(2\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^3}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (2.11)$$

o bien mediante la ecuación de Strickler-Berg [Strickler 62]:

$$k_r^{SB} = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \tilde{\nu}_F^{-3} \rangle_{AV}^{-1} \int \frac{\varepsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (2.12)$$

$$\langle \tilde{\nu}_F^{-3} \rangle_{AV}^{-1} = \frac{\int I(\tilde{\nu}_F) d\tilde{\nu}_F}{\int \tilde{\nu}_F^{-3} I(\tilde{\nu}_F) d\tilde{\nu}_F}$$

En estas ecuaciones aparecen los siguientes parámetros y variables:

n : índice de refracción del disolvente.

$\varepsilon(\tilde{\nu})$: coeficiente de absorción molar en el número de onda $\tilde{\nu}$.

$\tilde{\nu}$: números de onda a los que se registra el espectro de absorción.

$\tilde{\nu}_0$: número de onda de la transición electrónica entre niveles vibracionales fundamentales (transición $0 \rightarrow 0$), que se aproxima tomando el número de onda al que se produce la intersección entre el espectro de absorción y el de emisión corregido una vez normalizados.

$I(\tilde{\nu}_F)$: intensidad de emisión corregida en el número de onda de emisión $\tilde{\nu}_F$.

$\tilde{\nu}_F$: números de onda a los que se registra el espectro de emisión.

Con cualquiera de estas dos ecuaciones se obtiene la constante de velocidad de desactivación radiante en s^{-1} si el coeficiente de absorción molar está en $M^{-1}cm^{-1}$ y los números de onda en cm^{-1} . Para estos cálculos tanto los espectros de absorción como los de emisión han de transformarse a la escala de números de onda. Para los espectros de emisión la transformación consiste en multiplicar los valores de intensidad por el cuadrado de la longitud de onda.

A partir de la constante de velocidad de desactivación radiante k_r , calculada por el método de Förster o de Strickler-Berg, o de su inverso (tiempo de vida de fluorescencia radiante, ecuación (2.7)) y del tiempo de vida de fluorescencia obtenido experimentalmente

puede calcularse la **constante de velocidad de desactivación no radiante**. Según las ecuaciones (2.6) y (2.7) se obtiene:

$$k_{nr} = 1/\tau - 1/\tau_F \quad (2.13)$$

Sin embargo, lo más habitual es obtener los valores de las constantes de desactivación radiante y no radiante a partir de los valores experimentales del tiempo de vida y del rendimiento cuántico de fluorescencia, utilizando las ecuaciones (2.4) y (2.6).

Efecto del disolvente en el comportamiento fotofísico de las moléculas

La polaridad del disolvente y el microentorno del fluoróforo tienen efectos muy importantes en el comportamiento fotofísico de fluoróforos polares. Las modificaciones que se producen en los espectros de absorción y de excitación y emisión de fluorescencia para ciertas moléculas orgánicas dependiendo de las características de polaridad del entorno se conocen con el nombre de efecto solvatocrómico. Estas modificaciones están relacionadas con procesos de transferencia de carga, de protón, o con la formación de especies en estado excitado de distintas características químicas o de polaridad a las del estado fundamental. En general, las sondas fluorescentes que exhiben una marcada sensibilidad en su fluorescencia a la polaridad del disolvente contienen sustituyentes donores y aceptores de electrones en un anillo poliaromático. Estos grupos polares contribuyen al momento dipolar molecular y pueden involucrarse en interacciones dipolo-dipolo con la esfera circundante de disolvente [Glushko 81].

Un uso común de los efectos del disolvente es determinar la polaridad del sitio de unión del fluoróforo a una macromolécula (proteína, membrana, ácido nucleico, ...). Esto se realiza comparando los espectros de emisión y/o los rendimientos cuánticos del fluoróforo cuando se une a la macromolécula y cuando se disuelve en disolventes de diferente polaridad. El efecto del disolvente desplaza la emisión de fluorescencia hacia menores energías debido a la estabilización del estado excitado por las moléculas de disolventes polares. Habitualmente el fluoróforo tiene mayor momento dipolar en el estado excitado que en el fundamental. Tras la excitación los dipolos del disolvente pueden reorientarse según el momento dipolar del estado excitado. Al aumentar la polaridad del disolvente, aumenta este efecto y la emisión se produce a mayores longitudes de onda. En general, sólo los fluoróforos polares muestran una gran sensibilidad a la polaridad del disolvente y las moléculas apolares son mucho menos sensibles a ésta. Estas interacciones de carácter general entre el disolvente y el fluoróforo afectan a la diferencia de energía entre el estado fundamental y el excitado.

Algunos parámetros que reflejan la polaridad del disolvente aparecen en la tabla 2.1 [Reichardt 88]. La polaridad del disolvente se describe de forma cuantitativa mediante constantes físicas individuales como la constante dieléctrica, el momento dipolar, etc.

	ϵ_r^{25}	$\mu / 10^{-30} \text{ C m}$	$E_T(30) / \text{kcal mol}^{-1}$
Agua	78.39	5.9	63.1
Etanol	24.55	5.8	51.9
Acetonitrilo	37.5 (20°C)	11.8	46.0
Acetona	20.70	9.0	42.2
1,4-Dioxano	2.21	1.5	36.0

Tabla 2.1: Constantes físicas de los disolventes empleados en este trabajo, ordenados por orden decreciente de $E_T(30)$. ϵ_r^{25} es la constante dieléctrica para el líquido puro a 25°C, excepto en el caso indicado. μ es el momento dipolar en Culombios por metro (1 Debye equivale a $3.336 \cdot 10^{-30} \text{ C m}$). Datos reproducidos de la bibliografía [Reichardt 88].

Sin embargo, la constante dieléctrica macroscópica no es una medida apropiada de las interacciones moleculares microscópicas. Al fallar la constante dieléctrica del disolvente para representar las interacciones soluto/disolvente se ha definido la polaridad en términos de parámetros empíricos. Uno de ellos, empleado en medidas espectroscópicas, es el parámetro $E_T(30)$, que en general, exhibe una correlación buena, casi lineal, con un gran número de otros procesos tales como la absorción de luz, velocidades de reacción y equilibrios químicos. Este parámetro para la polaridad del disolvente propuesto por Dimroth y Reichardt se basa en la energía de transición de la banda de absorción solvatocrómica de mayor longitud de onda del colorante piridinio-N-fenóxido de betaína. El valor de $E_T(30)$ para un disolvente se define simplemente como la energía de transición del colorante betaína disuelto en ese disolvente medido en kcal/mol. Debido al desplazamiento solvatocrómico extraordinariamente grande de la banda de absorción de la betaína, los valores de $E_T(30)$ proporcionan una caracterización muy sensible a la polaridad de los disolventes y altos valores de este parámetro corresponden a altos valores de la polaridad del disolvente [Reichardt 88].

2.1.2 Transferencia protónica fotoinducida

Cuando una molécula se encuentra en el estado electrónico excitado puede sufrir diferentes procesos que le lleven a un nuevo estado electrónico o a la formación de una especie química diferente. Estos procesos pueden ser intramoleculares, los que ocurren entre grupos de la misma molécula, o intermoleculares, que tienen lugar entre una molécula excitada y otra en el estado fundamental o una molécula de disolvente. Los procesos más importantes que pueden ocurrir en el estado excitado son la transferencia de carga, la transferencia de energía, la transferencia protónica y la formación de excímeros. Nuestro interés se centra en los procesos de transferencia protónica fotoinducida, por lo que nos referiremos específicamente a este proceso.

Las reacciones de transferencia de un ión hidrógeno o protón en el estado excitado, a pesar de su importancia fotoquímica, son mucho menos conocidas que las que tienen lugar en el estado fundamental. El estudio de las propiedades ácido-base en los estados excitados fue iniciado por Förster tras una primera observación de Weber de fluorescencia “anormal” en las disoluciones de 4-sulfonato de 1-naftilamina, cuya emisión era azul-violeta en medio neutro y verde en disoluciones fuertemente alcalinas, aún cuando el espectro de absorción no sufría variación alguna en ese rango de acidez. Ese efecto fue interpretado por Förster, quien demostró la existencia de procesos de disociación en el estado excitado en dicha molécula y en otras similares. El trabajo iniciado por Förster fue desarrollado posteriormente por Weller, realizando numerosos estudios para diversos ácidos aromáticos cuyas propiedades ácido-base sufren cambios importantes con la excitación [Weller 60].

Son varias las revisiones bibliográficas sobre el tema [Weller 60, Ireland 76, Arnaut 93, Formosinho 93, Ormson 94]. Entre ellas destaca la de Kasha [Kasha 86] que distingue cuatro tipos diferentes de transferencia protónica atendiendo al mecanismo molecular del proceso de fototautomerización:

1- Transferencia protónica intramolecular intrínseca, que se produce a través del enlace hidrógeno interno de la molécula, por lo que es extraordinariamente rápida. El ejemplo clásico es el ácido salicílico.

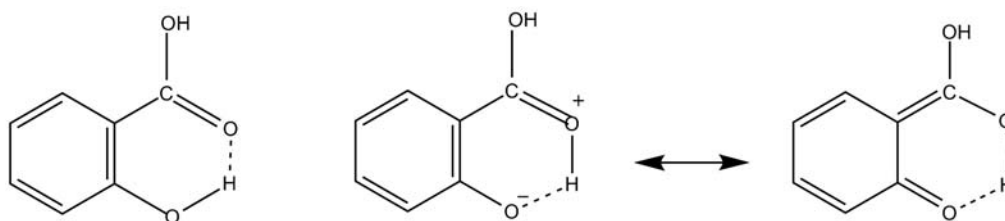


Figura 2.2: Estructuras del ácido salicílico y su tautómero.

2- Transferencia biprotónica concertada, que tiene lugar a través de un complejo cíclico, siendo doble y cooperativa. Este mecanismo permite explicar, por ejemplo, la fototautomerización que tiene lugar en el dímero del 7-azaindol (figura 2.3).

3- Transferencia protónica con catálisis estática o dinámica, en la cual la reacción es catalizada por una especie capaz de formar un complejo mediante enlaces de hidrógeno con la sustancia reactiva. En el caso de que se forme un complejo cíclico, como ocurre entre el lumicromo y el ácido acético, se trata de una catálisis estática de mecanismo idéntico al tipo 2. Sin embargo, se ha observado catálisis dinámica en sistemas como el lumicromo en presencia de piridina, existiendo un complejo con un único enlace hidrógeno entre ambas especies que sufre un reordenamiento tras la excitación (figura 2.4).

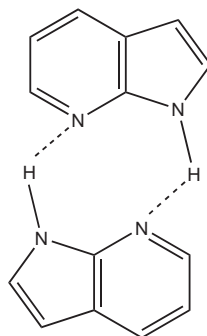


Figura 2.3: Estructura del dímero del 7-azaindol.

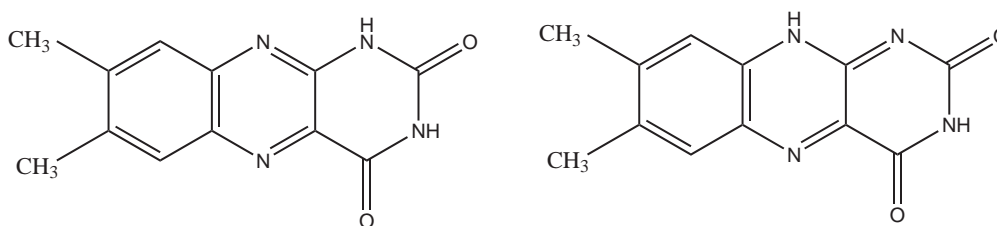


Figura 2.4: Estructuras del lumicromo, o 7,8-dimetilaloxacina, y su tautómero.

4- Transferencia multiprotónica concertada, donde el disolvente actúa como unión entre los grupos dador y aceptor del protón formando una cadena de moléculas unidas mediante enlaces de hidrógeno, la transferencia protónica se produce a través de esa cadena de forma concertada. Este es el mecanismo atribuido, por ejemplo al proceso de tautomerización de la 7-hidroxiquinolina en presencia de alcoholes.

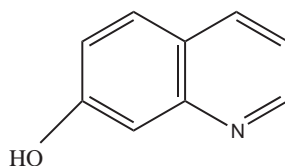


Figura 2.5: Estructura de la 7-hidroxiquinolina.

Hasta la actualidad, desde la primera publicación en la que se estudiaron las reacciones de transferencia protónica en micelas en 1959 [Duyntee 59], son muchos los artículos que versan sobre este tema, ya sea en micelas normales o micelas inversas.

La presencia de micelas no sólo afecta a las propiedades ácido-base de un colorante en el estado fundamental (por ejemplo, la constante de disociación de un colorante se ve afectada

porque las micelas con carga negativa estabilizan la especie catiónica, forma ácida, mientras que las micelas de surfactantes catiónicos desestabilizan dicha especie, en ambos casos debido a interacciones electrostáticas) sino también a las del estado excitado. Así, un efecto electrostático similar se considera que tiene lugar en el estado excitado, ya que las micelas aniónicas, como las de SDS, estabilizan la forma catiónica excitada de un colorante (que presenta mayor intensidad de fluorescencia) y esta especie estabilizada presenta un tiempo de vida mayor con respecto al que presenta en disolución acuosa [Pina 01]. La asociación de un colorante con micelas afecta a los procesos de transferencia protónica y no sólo a los parámetros termodinámicos, sino también a los cinéticos [Roque 99]. Recientemente se ha publicado que la movilidad de los protones en la superficie de las micelas se reduce respecto a la que presentan en agua [Freitas 06].

Ya se ha observado hace años que la presencia de micelas inversas también afecta a los procesos de transferencia protónica. Así, la velocidad de protonación/desprotonación en el estado excitado de un colorante que se encuentra en el interior de una micela inversa es distinta respecto a la observada en disolución acuosa, lo que indica que el agua presente en el interior de las micelas inversas tiene propiedades distintas a la de las disoluciones acuosas [Bardez 84].

2.1.3 Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)

La técnica de FCS (“Fluorescence Correlation Spectroscopy”) es una técnica experimental en la que se registran y analizan las fluctuaciones temporales de la intensidad de fluorescencia con el objetivo de determinar parámetros físicos o químicos característicos de una molécula fluorescente y descifrar sucesos de dinámica molecular como la difusión o las fluctuaciones conformacionales de biomoléculas.

En FCS, a diferencia de otras técnicas de fluorescencia, no se mide la intensidad media de emisión sino las fluctuaciones espontáneas de la intensidad de fluorescencia provocadas por procesos moleculares de sistemas en equilibrio termodinámico sin necesidad de distorsiones externas. En concreto, FCS mide las fluctuaciones temporales de intensidad de luz fluorescente emitida por un pequeño número de moléculas fluorescentes que difunden entrando y saliendo de un pequeño volumen de observación. Si el sistema se encuentra en equilibrio, las variaciones en la señal de fluorescencia reflejan fluctuaciones espontáneas en la concentración local de la especie fluorescente en el volumen de observación. Las fluctuaciones de la señal se cuantifican en intensidad y en duración autocorrelacionando temporalmente la señal de fluorescencia registrada, procedimiento matemático que dio a la técnica su nombre. De esta forma se obtiene la función de autocorrelación temporal $G(\tau_C)$. Mientras la amplitud de $G(\tau_C)$ se relaciona con la densidad de moléculas de las diferentes especies fluorescentes que cruzan el volumen de observación, la forma y el tiempo de decaimiento característico de la

función de autocorrelación son una medida de la duración temporal media de una fluctuación de fluorescencia. En principio, cualquier parámetro físico que pueda causar fluctuaciones en la señal de fluorescencia es susceptible de ser estudiado con esta técnica.

Esta técnica fue introducida por Magde para medir la difusión y unión del bromuro de etidio a dobles hélices de ADN [Magde 74]. FCS fue desarrollada en los años setenta como un caso especial del análisis de relajación de sistemas en equilibrio. Los métodos de relajación clásicos introducen ciertas perturbaciones externas como variaciones de presión o temperatura a un sistema de reacción obteniendo información sobre los parámetros cinéticos implicados en el camino en el que el sistema retorna al equilibrio. FCS supone una innovación con respecto a estas técnicas en cuanto a que tiene la ventaja de usar fluctuaciones espontáneas de parámetros físicos que se reflejan en la emisión de fluorescencia de las moléculas. Esta técnica cobró un renovado interés a principios de los años 90 con la implementación de microscopía confocal [Thompson 91, Rigler 93, Pawley 95]. Combinando FCS con la detección confocal se consiguió enfocar una luz láser por un objetivo de alta apertura numérica en unos femtolitros, de manera que sólo se excitan unas pocas moléculas de fluoróforo en la región iluminada. Para limitar el volumen de detección también en la dirección axial se introduce un agujero puntual (*"pinhole"*) que bloquea toda luz que no procede de la región focal. En la figura 2.6 se muestra la configuración típica que presenta el microscopio óptico adaptado para FCS. Se consiguió un avance significativo en la técnica al usar colorantes fluorescentes eficientes para marcar las moléculas de interés, fuentes de luz intensas y estables como láseres y detectores ultrasensibles como los fotodiodos de avalancha con sensibilidad de fotones individuales. Estas mejoras de la técnica aumentaron la sensibilidad de la misma a nivel de moléculas individuales [Kühnemuth 01, Rigler 01, Felekyan 05].

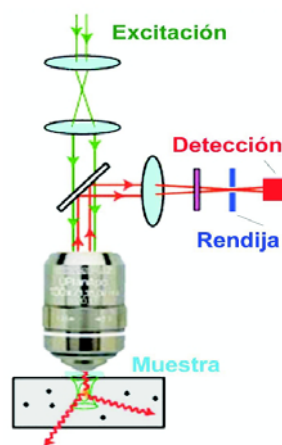


Figura 2.6: Representación esquemática de un microscopio óptico confocal adaptado para medidas de FCS.

La técnica de FCS ha experimentado un rápido desarrollo en los últimos años, principalmente para aplicaciones bioquímicas tanto al nivel molecular como celular [Widengren 98, Widengren 01, Hess 02, Bacia 03]. La capacidad de FCS para monitorizar procesos cinéticos bioquímicos rápidos ha sido mostrada por Widengren y colaboradores [Widengren 97]. Además, se han desarrollado en los últimos años otras técnicas de moléculas individuales de enorme potencial. Así, la detección multiparamétrica fluorescente de moléculas individuales (MFD) involucra la adquisición simultánea e independiente de varios parámetros de la fluorescencia (intensidad, tiempo de vida, anisotropía y dos o incluso tres rangos espectrales), que pueden usarse para clasificar moléculas en subpoblaciones diferentes que componen un conjunto y para caracterizar su tamaño, identidad, tiempos de difusión, o entorno local [Kühnemuth 01, Eggeling 01, Rothwell 03].

Principio básico. Como ya se ha indicado, la técnica de FCS mide las fluctuaciones temporales de intensidad de luz fluorescente emitida por un número reducido de moléculas fluorescentes. En equilibrio, las fluctuaciones de la señal de fluorescencia indican variaciones espontáneas en la concentración local de una especie fluorescente en el volumen de observación. Esta fluctuación de la señal se analiza en términos de la función de autocorrelación $G(\tau_C)$.

El principio básico de FCS consiste en hacer el número de moléculas observadas lo suficientemente pequeño para que cada una de ellas contribuya sustancialmente a la señal medida. En la figura 2.7 a se encuentra un elevado número de fluoróforos en el volumen de observación, de forma que la intensidad total de fluorescencia es alta. La variación en este número debido a la entrada y salida por difusión en el volumen de muestreo no influye significativamente en la intensidad total de fluorescencia, puesto que cada molécula aporta relativamente poco a esta señal total siendo la fluctuación relativa muy pequeña. Sin embargo, cuando el número de moléculas fluorescentes es pequeño (figura 2.7 b), se observa que la entrada o salida de una molécula en este volumen provoca una fluctuación relativa importante ya que cada molécula influye sustancialmente en la intensidad total de fluorescencia. Por tanto, FCS solo funciona adecuadamente si se consiguen reducir las concentraciones y los volúmenes de observación de modo que se detecten simultáneamente sólo unas pocas moléculas, y al mismo tiempo incrementar el rendimiento de fluorescencia por molécula. Las concentraciones con las que se suele trabajar en FCS son en torno a 1 nM mientras que los volúmenes son de aproximadamente 1 femtolitro. Con ello se consigue que el número de moléculas presentes en el volumen de observación se encuentre entre 1 y 10.

Función de autocorrelación de fluorescencia. El método de correlación analiza la intensidad de fluorescencia medida $F(t)$ autocorrelacionando las fluctuaciones alrededor del valor medio de fluorescencia $\langle F(t) \rangle$ en un período finito de tiempo. La función de autocorrelación relaciona la intensidad de fluorescencia $F(t)$ a tiempo t con la intensidad de

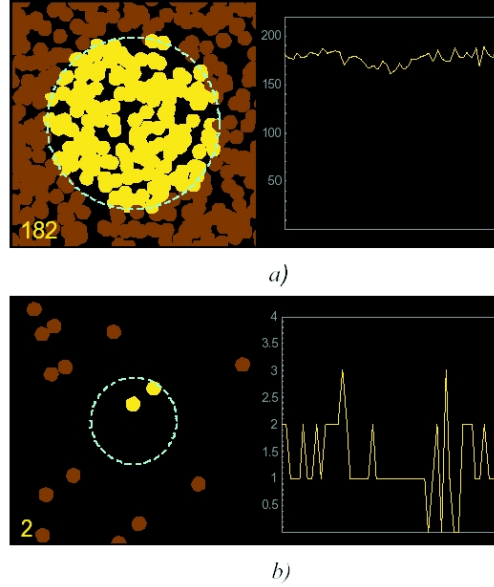


Figura 2.7: Representación esquemática de la influencia del número de moléculas fluorescentes presentes en el volumen de observación sobre la fluctuación de la intensidad de fluorescencia observada. En la primera figura (a) hay un elevado número de fluoróforos en el volumen de observación, originando una alta intensidad de fluorescencia y pequeñas variaciones en la intensidad de fluorescencia debidas a la difusión de los fluoróforos. En la segunda figura (b) se observan pocos fluoróforos por lo que la difusión de sólo una molécula en el volumen de observación provoca variaciones importantes en la intensidad de fluorescencia relativa.

fluorescencia $F(t + \tau_C)$ a tiempo $t + \tau_C$, es decir, con una separación temporal τ_C , denominada tiempo de correlación. La representación gráfica situada a la izquierda en la figura 2.8 muestra las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia alrededor del valor medio, de forma que a partir de ésta se obtiene la curva de autocorrelación mostrada a la derecha en la misma figura.

La función de autocorrelación nos da la probabilidad de detectar un fotón a tiempo $t + \tau_C$ si se detectó un fotón a tiempo t .

Matemáticamente, la función de autocorrelación normalizada puede escribirse como:

$$G(\tau_C) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau_C) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2.14)$$

En la ecuación (2.14) $\langle \rangle$ indica promedio temporal y la fluctuación de la señal de fluorescencia δF es la diferencia entre la intensidad de fluorescencia a cada instante y la media: $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$. La función de autocorrelación decae con el tiempo de correlación

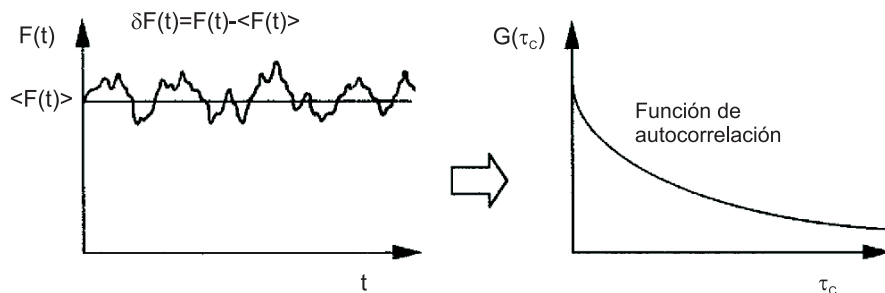


Figura 2.8: Representación esquemática de la obtención de la curva de autocorrelación a partir de la intensidad de fluorescencia [Valeur 02].

τ_C dado que las fluctuaciones están menos correlacionadas al aumentar la separación temporal. La velocidad y la forma del decaimiento temporal de $G(\tau_C)$ depende del transporte y/o de los procesos cinéticos responsables de las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia. A separación temporal infinita ($\tau_C \rightarrow \infty$) la función de autocorrelación alcanza el valor límite de cero. Las variaciones de $G(\tau_C)$ son una medida directa del tiempo característico de las fluctuaciones en la señal de fluorescencia. Además, la fluctuación de la señal, δF , es mayor a concentraciones de moléculas más bajas. Así, la amplitud de la fluctuación está inversamente relacionada con el número medio de moléculas que atraviesan el volumen de observación. De acuerdo con la ecuación (2.14), la función de autocorrelación a tiempo de correlación cero $G_0 = G(\tau_C \rightarrow 0)$ es una medida directa de la magnitud (al cuadrado) de la señal fluctuante. Matemáticamente G_0 es la varianza normalizada de $F(t)$ y es inversamente proporcional al número medio de moléculas fluorescentes que se encuentran en el volumen de muestreo.

Para una disolución homogénea infinitamente diluida de fluoróforos que no interaccionan G_0 está dada por:

$$G_0 = \frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \quad (2.15)$$

En esta ecuación $\langle N \rangle$ es el número promedio de moléculas fluorescentes en el volumen de observación y la constante γ se determina por el perfil de intensidad espacial de la luz de excitación.

La proporcionalidad inversa entre G_0 y $\langle N \rangle$ indica que la sensibilidad de la técnica aumenta al disminuir la concentración de fluoróforo.

En una curva de autocorrelación observada con un sistema de correlación rápido se pueden distinguir las siguientes regiones [Fries 98, Rigler 01, Valeur 02, Koenig 06]:

- Emisión de un fotón en el punto $\tau_C=0$ (no se representa en la figura).

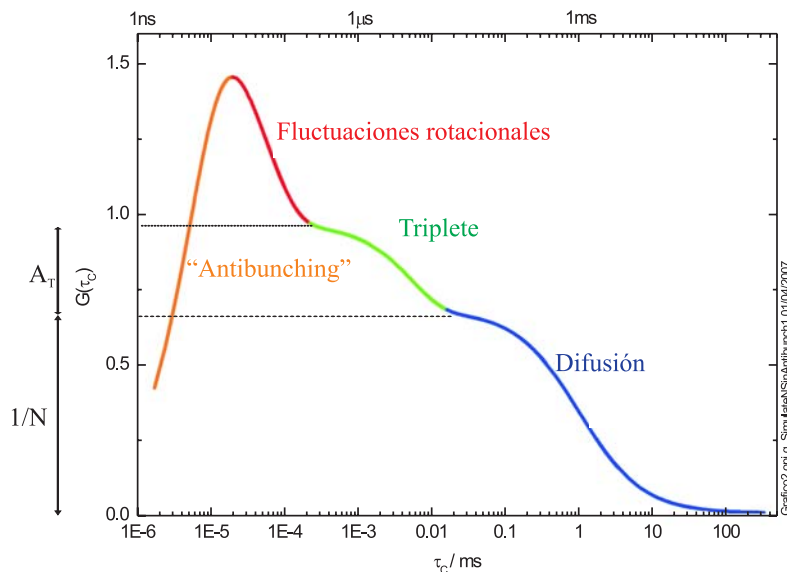


Figura 2.9: Esquema de una curva de correlación típica con diferentes términos que representan procesos dinámicos del sistema estudiado, tal como se indica en el texto. N es el número medio de moléculas fluorescentes en el volumen de observación. A_T representa la amplitud del triplete.

- “Antibunching”: Es un fenómeno que se debe a que una molécula para poder emitir un fotón debe pasar del estado fundamental al estado excitado. Por tanto, hay un tiempo muerto desde que se emite un fotón en el cual la probabilidad de emitir otro fotón es muy baja. El tiempo de vida del estado excitado determina el intervalo de tiempo mínimo que debe transcurrir entre la emisión de dos fotones consecutivos de la misma molécula.

- Rotación difusional: La absorción y la emisión de luz sólo pueden producirse cuando un componente del vector de campo eléctrico es paralelo al momento dipolar de transición de un fluoróforo. La probabilidad de excitar con luz un colorante depende del ángulo entre su momento dipolar de excitación y el vector de polarización de la luz excitatriz (figura 2.10 a). Así, si un colorante rota libremente, su velocidad de excitación y por tanto de emisión fluctúan dando lugar a un descenso en la función de correlación con un tiempo de correlación de rotación característico que cae en la región de tiempos de correlación de nanosegundos. En la mayoría de las aplicaciones es difícil de detectar este término.

- Triplete: Un fluoróforo puede pasar al estado triplete en el que no emite fluorescencia originando fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia. La amplitud A_T refleja la porción de moléculas que se encuentran en el estado triplete. Este término es característico de tiempos de correlación de microsegundos.

- Difusión traslacional: Los fluoróforos entran y salen del volumen de muestreo debido

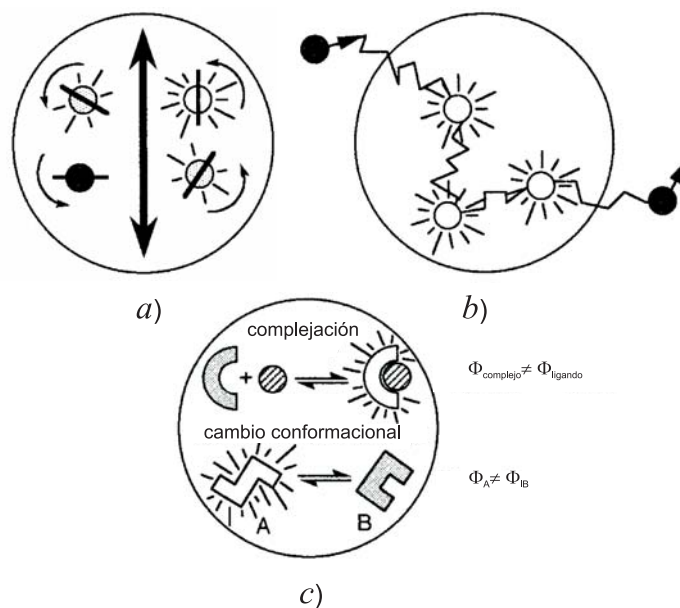


Figura 2.10: Ilustración representativa de los procesos que originan las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia. Cada una de ellas representa una región en una curva de correlación característica. a) Rotación difusional de las moléculas. b) Difusión traslacional de las moléculas. c) Reacción, cambio conformacional o asociación entre moléculas [Valeur 02].

a la difusión traslacional (figura 2.10 b) dando lugar a variaciones en el número de fotones detectados. Este proceso representa el límite temporal máximo de las cinéticas que pueden ser investigadas con FCS. El empleo de volúmenes de observación grandes y de moléculas grandes llevan a tiempos de correlación para la difusión de hasta segundos. Con moléculas de tamaños pequeños o medios se observan tiempos de correlación de difusión del orden de milisegundos.

- Reacción: Una reacción o asociación entre el fluoróforo y otra u otras moléculas pueden variar la intensidad de fluorescencia emitida (figura 2.10 c). Por tanto, estos procesos pueden dar lugar a un tiempo de correlación de reacción que está relacionado con las velocidades de reacción de los procesos directo e inverso. Este caso es el de mayor interés en este trabajo y se presentará con mayor detalle en el apartado 6.1.2.

A continuación procederemos a explicar el análisis cuantitativo de estas curvas de correlación.

Si las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia se deben sólo a la difusión traslacional, la parte dependiente del tiempo de la función de correlación, definida en la ecuación (2.14), está dada por [Elson 74, Rigler 93, Krichevsky 02]:

$$G_D(\tau_C) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau_C}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau_C}{\tau_D}\right]^{-\frac{1}{2}} \quad (2.16)$$

En esta expresión se ha asumido que la fluorescencia detectada sigue una distribución gaussiana en las tres dimensiones. N representa el número medio de moléculas fluorescentes en el volumen de observación, τ_D es el tiempo de difusión traslacional de las moléculas a través del volumen de observación, y w_{xy} y w_z son los radios del foco en las direcciones radiales xy y axial z . Se observa que el valor de G_D a $\tau_C = 0$ es el inverso del número de moléculas fluorescentes, $G_D(0) = 1/N$.

El coeficiente de difusión traslacional D se relaciona con el tiempo de difusión traslacional (τ_D) según la siguiente ecuación:

$$D = \frac{w_{xy}^2}{4\tau_D} \quad (2.17)$$

En el extremo rápido de la curva de FCS la velocidad con que dos fotones sucesivos de la misma molécula pueden detectarse está limitado por las velocidades de excitación y emisión de fluorescencia. Este tiempo mínimo entre dos fotones introduce el término de “antibunching” en la función de correlación, $G_F(\tau_C)$, con un tiempo de “antibunching” característico $\tau_F = (k_{01} + k_{10})^{-1}$, determinado por la inversa de la suma de la constante de velocidad de excitación k_{01} y de decaimiento k_{10} , y una amplitud A_F [Kask 85, Mets 01]. Bajo las condiciones de irradiancia de este estudio siempre se cumple que $k_{01} < k_{10}$ y el tiempo de “antibunching” viene definido por el tiempo de vida de fluorescencia de la molécula.

$$G_F(\tau_C) = (1 - A_F e^{-\tau_C/\tau_F}), \quad A_F = 1 \quad (2.18)$$

La población del estado triplete conlleva a un término adicional $G_T(\tau_C)$, donde τ_T es el tiempo de vida del triplete y T la fracción del triplete.

$$G_T(\tau_C) = (1 + A_T e^{-\tau_C/\tau_T}), \quad A_T = \frac{T}{1 - T} \quad (2.19)$$

Finalmente, bajo la condición $\tau_D \gg \tau_T \gg \tau_F$, la función de correlación completa vendrá determinada por el producto de las tres funciones individuales de las ecuaciones (2.16), (2.18) y (2.19):

$$G(\tau_C) = G_F(\tau_C)G_T(\tau_C)G_D(\tau_C) \quad (2.20)$$

2.2 Sondas fluorescentes

2.2.1 Pironinas

Las pironinas empleadas son el cloruro de 3,6-bis(dimetilamino) xantilo o pironina Y (J, G ó ZH) y el cloruro de 3,6-bis(dietilamino) xantilo o pironina B, cuya estructura se muestra en la figura 2.11. En adelante, estas pironinas se representarán como PY y PB, respectivamente.

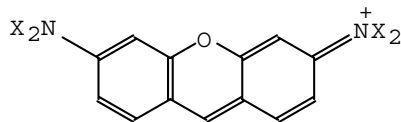


Figura 2.11: Estructura molecular de las pironinas Y (X=Me) y B (X=Et).

Las pironinas son colorantes de tipo xanténico, dentro del cual se encuadran en el grupo de los fluorenos, al igual que las rodaminas. De éstas se diferencian en la ausencia del grupo parafenil, por lo que tienen una estructura más simple que hace que se utilicen como modelos en estudios cuyo fin es explicar los resultados de las rodaminas.

Las pironinas tienen varias aplicaciones, entre las que destaca aquella en que las pironinas Y y B se usan con otro colorante (el verde de metilo) para marcar el ARN (rojo) en contraste con el ADN (verde) en la tinción de Unna Pappenheim, también conocida como tinción II de Pappenheim. Esta técnica de tinción se usa mayoritariamente para identificar células del plasma, cuyo citoplasma está teñido de rojo debido al alto contenido en ARN y para detectar ARN y ADN en secciones de tejidos [Bo 02]. Aunque su aplicación en este campo se realiza desde hace ya más de 100 años todavía hoy se realizan estudios respecto al tiempo de tinción, las velocidades de difusión [Prento 03], los mecanismos de complejación con el ADN, la comparación con otros colorantes como el bromuro de etidio [Kruglova 01], etc.

La agregación es una característica común de las pironinas en agua, al igual que el resto de los colorantes xanténicos, que tienden a agregarse en disoluciones acuosas y en sistemas matriciales al aumentar la concentración de colorante [Arik 03]. La agregación depende de la estructura del monómero, del disolvente, de la temperatura, y de la presencia de electrólitos. En general, la agregación es mayor en agua que en disolventes orgánicos, y aun más en disoluciones con alta fuerza iónica. Es por ello que la presencia de sales como el NaCl es utilizada para favorecer este fenómeno [Schiller 87b], mientras que la adición de alcohol o glicerol previene la formación de agregados. Lo más habitual es que la agregación se produzca en forma de dímeros, los cuales presentan diferencias significativas respecto al monómero en sus espectros de absorción y de emisión. Esta agregación es incluso fuente de distintas aplicaciones en tecnología fotográfica, láseres sintonizables, sistemas de diagnóstico de despolarización de fluorescencia, o fotomedicina.

La dimerización provoca cambios en la intensidad de fluorescencia, debido a que los dímeros generalmente no emiten o tienen rendimientos cuánticos muy bajos. Estas variaciones en la fluorescencia y las observadas en absorción a causa de la agregación se explican en la bibliografía mediante la teoría del excitón (“*exciton theory*”) [McRae 64, Kasha 65], tanto para las pironinas [Arik 03] como para otros colorantes xanténicos como las rodaminas [Valdés-Aguilera 89, Martínez Martínez 04, Martínez Martínez 05]. La teoría del excitón se basa en las interacciones dipolo-dipolo entre los monómeros, y pronostica que el estado excitado del monómero se divide en dos al dimerizar, uno de mayor y otro de menor energía que el original. La preferencia por uno u otro al excitar la molécula depende de la geometría del dímero. Para dímeros en los que los monómeros constituyentes se agregan paralelamente (tipo H), y por tanto sus momentos dipolares se encuentran alineados y en planos paralelos, el estado excitado preferido sería el de mayor energía, por lo que la banda de absorción se desplazaría hacia el azul del espectro respecto a la del monómero libre. En cambio, para dímeros en los que los monómeros se disponen a continuación el uno del otro (tipo J), donde los momentos dipolares son coplanares, la situación sería la contraria existiendo un desplazamiento respecto del espectro del monómero libre hacia el rojo. En la figura 2.12 se representan estos dos tipos de dímeros de forma esquemática. Entre estas dos geometrías extremas de los dímeros se puede dar cualquiera de las intermedias, dependiendo de la naturaleza de las moléculas y del disolvente, por lo que ambas transiciones estarían parcialmente permitidas, siendo esto lo más habitual. En estos casos, donde se encuentran los colorantes xanténicos, el espectro de un agregado presentará dos bandas.



Figura 2.12: Representación esquemática de los dos tipos de dímeros.

Dado que la formación de agregados modifica el espectro de absorción y las propiedades fotofísicas de un colorante, la agregación afecta a su capacidad de emitir a una cierta longitud de onda o de actuar como fotosensibilizador. En muchos colorantes, como las rodaminas, las variaciones en los espectros de absorción y de fluorescencia se estudiaron y analizaron mediante distintos métodos matemáticos, a partir de los cuales se obtuvieron resultados bastante concordantes en lo que respecta a las constantes de dimerización, pero discrepantes en cuanto al espectro puro obtenido para el dímero.

Según Arik y Onganer [Arik 03] para la PB se observa una desviación de la ley de Beer a concentraciones mayores de $2.0 \cdot 10^{-5}$ M y la agregación ya es significativa a concentraciones de pironina mayores de 10^{-4} M [Baraka 92]. Cálculos mecanocuánticos semiempíricos indican que la estructura de la PY es mucho más conveniente para la agregación que la de la PB [Arik 03]. Se ha estudiado la dimerización de las pironinas PY [Schiller 86] y PB [Fujiji 62] en disoluciones acuosas de elevada concentración de pironina obteniéndose la constante de dimerización.

El espectro de absorción del dímero, tanto para la PY como para la PB, se encuentra desplazado hacia menores longitudes de onda respecto al monómero, lo cual implica la aparición de un marcado hombro en los espectros cuando se sobrepasan determinados valores de la concentración de pironina [Arik 03, Gianneschi 77, Gianneschi 74].

Para las constantes de dimerización se han publicado valores de 1.1 mM^{-1} [Schiller 87b] ó 1.2 mM^{-1} [Gianneschi 74] para la PY, y 4 mM^{-1} para la PB [Schiller 86], aunque éstos dependen mucho de las condiciones de análisis. En disoluciones coloidales de SiO_2 se han dado valores de la constante de dimerización de 471 y 121 mM^{-1} para la PB y la PY, respectivamente [Arik 03].

Los tiempos de vida de estos colorantes están poco claros en la bibliografía, mencionándose tiempos de 2-3 ns para estas dos pironinas en agua [El Baraka 91] frente al valor de 1.58 ns para la PB en agua a 25°C dado por Onganer y colaboradores [Onganer 92].

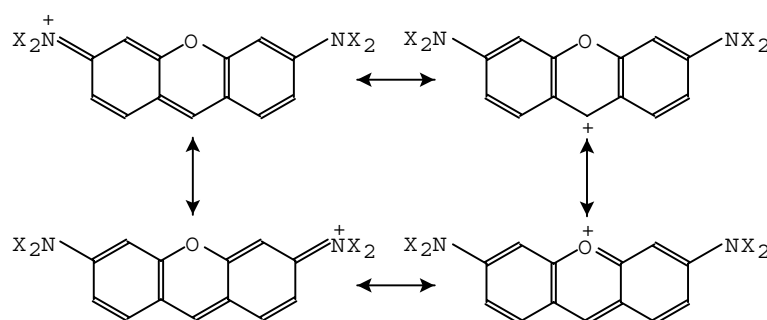


Figura 2.13: Estructuras resonantes de las pironinas.

Estas dos pironinas son colorantes de tipo catiónico, es decir, son moléculas cargadas positivamente. Sin embargo esta carga se encuentra deslocalizada, tal como indican las diferentes estructuras resonantes que se muestran en la figura 2.13. Debido a la densidad de carga positiva en el carbono 9, estas pironinas se hidrolizan en agua y se convierten en 9H-xantenos (9-ol-3, 6-bisdimetilamino y 9-ol-3, 6-bisdietilamino, para la PY y PB, respectivamente), cuya estructura se muestra en la figura 2.14 [El Baraka 91, Fujiji 62]. El modelo reversible usado para la hidratación de los cationes pironina R^+ a xantohidroles ROH es el mostrado en la ecuación siguiente:



donde la constante K_{R^+} vendría dada por la expresión siguiente:

$$K_{R^+} = \frac{[ROH]}{[R^+][OH^-]} \quad (2.22)$$

Las especies covalentes ROH son estables en disoluciones básicas y en disolventes poco estabilizadores de iones; la reacción de la pironina (R^+) con el hidroxilo es lenta en soluciones neutras y la mayoría de las pironinas existen como R^+ en agua, pero cuando el medio se hace más apolar, por ejemplo en presencia de octanol, el equilibrio se desplaza hacia la forma ROH [El Baraka 91]. La molécula de ROH se oxida con el oxígeno del aire a xantona RO en disolventes apróticos no polares, tal como se indica en la figura siguiente:

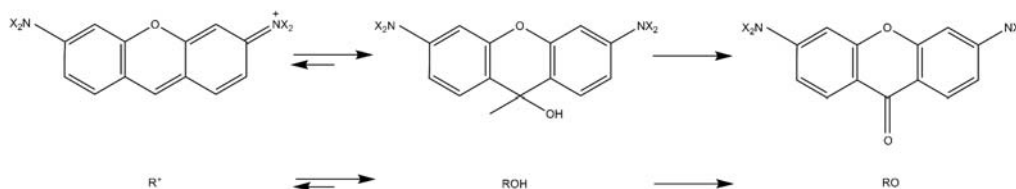


Figura 2.14: Proceso de hidratación seguido por oxidación de las pironinas.

Este proceso de hidratación se puede evitar manteniendo las disoluciones de pironina en su pH natural (en torno a 3) y guardando las disoluciones madre un máximo de 3 días, protegidas de la luz y a bajas temperaturas. En estas condiciones la hidratación es muy lenta y las disoluciones son, por tanto, estables. Este proceso de hidratación hace posible usar las pironinas como indicadores de pH debido a que en disoluciones neutras son rojas (absorbancia máxima a 547 nm para la PY y a 553 nm para la PB) mientras que sus disoluciones alcalinas son incoloras (banda ancha con absorbancia máxima a 390 nm) produciéndose un cambio parcialmente reversible en la absorción debido a la variación en el pH. Este gran desplazamiento espectral es debido a la pérdida de conjugación del catión pironina por formación del carbinol [Fujiji 62]. El cambio de color que se produce debido a la hidratación de las pironinas hace que sean buenos candidatos para estudios ácido-base en el estado excitado y prototipos simples de los mecanismos de tautomerización que tienen lugar entre las especies ionizadas y desionizadas de los colorantes xanténicos en función del pH [Baraka 92]. Sin embargo, hay que señalar que la 7-HC no se comporta como un indicador ácido-base general, ya que el cambio producido no es totalmente reversible.

Los cambios en la fluorescencia de una disolución acuosa básica de PB en función del tiempo fueron estudiados por Baraka y colaboradores midiendo su espectro de emisión durante varias horas. Observaron que conforme pasa el tiempo aumenta la banda debida al xantohidrol ROH, con máximo a 467 nm, y disminuye la del catión R^+ [El Baraka 91]. El análisis cinético de los espectros de fluorescencia de la PY y de la PB en disoluciones acuosas básicas permite el estudio del equilibrio reversible entre los cationes R^+ (con un máximo de emisión a 566 nm para la PY y 570 nm para la PB) y los xantohidrols incoloros (fluorescencia máxima a 463 nm para la PY y a 467 nm para la PB), formados mediante reacciones de par iónico con el nucleófilo hidroxilo. Estos estudios muestran también que el xantohidrol

tiene su máximo de fluorescencia desplazado unos 75 nm respecto al máximo de absorción mientras que en la disolución neutra éste está desplazado sólo unos 20 nm y los espectros de absorción y fluorescencia están muy solapados.

La capacidad de estas dos pironinas de formar complejos de inclusión con las ciclodextrinas ha sido estudiada por Schiller y colaboradores, analizando las variaciones de los espectros de absorción de las pironinas con la concentración de ciclodextrina [Schiller 86, Schiller 87b, Schiller 87a]. Este autor no detectó formación de complejos con la α -CD, mientras que para la β -CD y la γ -CD sí que se forman complejos de inclusión, para los que plantea varias estequiometrías: 1:1, 1:2 (sólo β -CD con PY), 2:1 (a partir del 1:1, sólo γ -CD) y 2:2 (sólo γ -CD con PY). Estos resultados concuerdan con los diferentes tamaños de las cavidades en las CDs, ya que en la α -CD no cabría el colorante; en la β -CD sí lo haría pero sólo monoméricamente; mientras que en la γ -CD entrarían dímeros. Estos dímeros, tal como los considera el autor, serían de disposición totalmente paralela lo cual conlleva un máximo volumen a la hora de penetrar en la cavidad.

Aún cuando la variación en el espectro de absorción debido a la inclusión de la pironina en la β -CD es muy pequeña, se emplearon estos espectros para determinar las constantes de equilibrio de asociación correspondientes. Según Schiller la variación de estos espectros con la concentración de β -CD para la PB se interpreta mediante la formación de complejos 1:1 con una constante de complejación de $4000 M^{-1}$ [Schiller 86]. Sin embargo, las variaciones del espectro de absorción de disoluciones acuosas de PY con distintas concentraciones de β -CD se atribuyen a la formación de dos complejos de la pironina con la β -CD: un complejo 1:1 y uno 1:2 con dos moléculas de CD por cada una de pironina [Schiller 87b]. Según este artículo, en estos espectros se observan dos puntos isobésticos (a 511 y 547 nm) aunque estos no se ven en las gráficas allí indicadas. Se obtuvieron constantes de equilibrio de 5200 y $170 M^{-1}$ para la primera y la segunda complejación, respectivamente.

Las variaciones observadas en el espectro de absorción de la PB en presencia de γ -CD se interpretaron asumiendo que el anillo de esta ciclodextrina es suficientemente grande como para acomodar a dos moléculas de PB con una constante de complejación de $430 M^{-1}$ para la formación del complejo de estequiometría 1:1 y de $1.28 \cdot 10^5 M^{-1}$ para la constante de dimerización [Schiller 86]. Para la PY se interpretaron las variaciones en los espectros de absorción con una constante de formación del complejo 1:1 de $110 M^{-1}$ y una constante de dimerización de $5.3 \cdot 10^5 M^{-1}$. Sin embargo, estos valores han de ser tomados con cautela, ya que hay que tener en cuenta las condiciones de los experimentos: pH=6, por lo que podrían existir problemas de hidratación; y disoluciones acuosas con 1 M de NaCl para mantener una elevada fuerza iónica, lo cual facilita la formación de dímeros. Además, estos autores hicieron importantes aproximaciones en el análisis de datos, como el hecho de considerar el espectro del complejo 1:1 igual al de la pironina libre.

2.2.2 7-Hidroxicumarina

Las cumarinas son productos naturales que poseen la estructura indicada en la figura 2.15. Pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consistentes en un anillo bencénico unido a una pirona (un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos sp^2). Más concretamente son benzo- α -pironas, a diferencia de los otros miembros más importantes del grupo de las benzopironas (los flavonoides), que contienen un grupo γ -pirona.

En los seres humanos el principal metabolito tipo cumarina es la 7-hidroxicumarina (7-HC), que se encuentra en el plasma como el glucurónido principalmente. La 7-HC se llama también umbeliferona por haber sido aislada por primera vez a partir de resinas de umbelíferas, que son una gran familia de plantas herbáceas. Este producto natural se encuentra en plantas muy conocidas de esta familia como la zanahoria o la belladona.

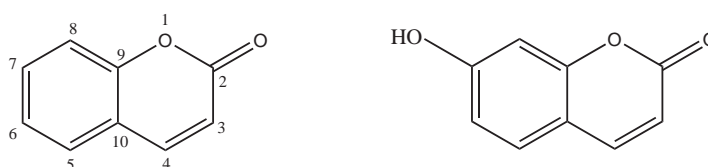


Figura 2.15: Estructura de la cumarina (izquierda) y de su derivado, la 7-HC (derecha).

La 7-HC es una sustancia cristalina sólida blanco-amarillenta que tiene baja solubilidad en agua pero alta solubilidad en etanol. El hecho de que absorba luz ultravioleta que se disipa como luz de fluorescencia en el visible hace que se use para absorber rayos ultravioleta en cremas o lociones solares y para dar brillo óptico a tejidos, así como en aplicaciones de carácter técnico como láseres de colorante. Esta cumarina y otros compuestos relacionados presentan actividades biológicas de importancia terapéutica, entre las cuales destaca su capacidad para reducir el tamaño de tumores, por lo que se usa en fármacos anticáncer [Maucher 94]. Las acciones biológicas y clínicas de la cumarina y de la 7-HC aparecen ampliamente descritas en la bibliografía [O'Kennedy 97]. Dadas sus múltiples aplicaciones, a pesar de poder ser extraída de plantas, se han desarrollado diversos procedimientos de síntesis química, descritos en el libro mencionado anteriormente. Además es el producto de partida para la obtención de un gran número de productos naturales como la 7-metoxicumarina o la β -D-glucopiranosilumbeliferona.

La fluorescencia de las cumarinas es muy sensible a la posición y naturaleza de los sustituyentes sobre el anillo de benzopirano. Así, la cumarina presenta una fluorescencia muy débil, la 3-hidroxicumarina y la 4-hidroxicumarina fluorescen en la región ultravioleta, mientras que las 5-, 6- y 7-hidroxicumarinas presentan elevada fluorescencia en el visible. La fluorescencia de todos los derivados de cumarinas es muy sensible a los cambios en la

polaridad del entorno (disolventes) y al pH, modificándose notablemente tanto la posición de los máximos de absorción y de emisión como la intensidad de fluorescencia. Muchos compuestos que, como la 7-HC, poseen en su estructura un grupo hidroxilo conjugado con un grupo cetona tienen distinta estructura en el estado fundamental que en el estado excitado [Romero Ale 02].

En los estudios publicados hasta ahora para la 7-HC se concluye, por lo general, que en función de las propiedades físicas del disolvente y del pH del medio, existen cuatro especies fluorescentes en el estado excitado que han sido identificadas como las especies neutra (N^*), aniónica (A^*), tautomérica (T^*) y catiónica (C^*). Las estructuras de estas especies se muestran en la figura 2.16.

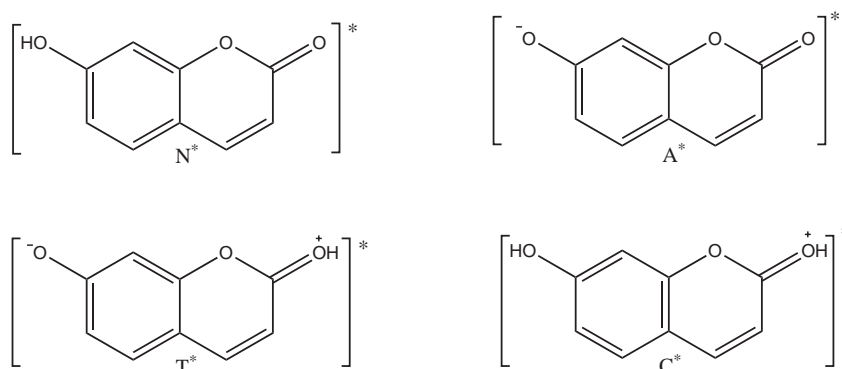


Figura 2.16: Especies existentes para la 7-HC en el estado excitado: neutra (N^*), aniónica (A^*), tautomérica (T^*) y catiónica (C^*).

Se han propuesto numerosos mecanismos para explicar los espectros de fluorescencia de la 7-HC, cuyo complicado comportamiento ha atraído la atención de muchos científicos desde el punto de vista espectroscópico. Existen opiniones contradictorias sobre los mecanismos de generación de las distintas especies en el estado excitado, sobre todo en lo que se refiere a la generación del tautómero.

El primer estudio publicado de la fluorescencia de la 7-HC se remonta a 1930, donde se observó que la disoluciones básicas de 7-HC fluorescían mientras que disoluciones ácidas no presentaban esta propiedad [Robl 26].

Posteriormente Fink y sus colaboradores profundizaron en el estudio de los efectos del pH en la fluorescencia de la 7-HC en disolución acuosa [Fink 70]. Se observó la existencia de dos bandas de absorción a 325 y 367 nm, que fueron asignadas a las especies neutra y aniónica respectivamente, y una única banda de fluorescencia a 460 nm que se identificó como la transición desde el primer estado excitado singlete del anión de la 7-HC. En un intervalo de pH comprendido entre 2 y 11 la excitación a 330 y 370 nm conducía al mismo

espectro de fluorescencia, por lo que se supuso que existía un rápido equilibrio ácido-base en el estado excitado durante el tiempo de vida del mismo. A pH inferior a 2 se producía un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda de la banda de emisión. Atribuyeron esta fluorescencia a la emisión de especies protonadas que no llegaron a identificar, dando lugar a un pK_a en el estado excitado de 1-2, muy diferente al del estado fundamental.

En general, la banda a altas longitudes de onda se asigna al tautómero formado en el estado excitado, si bien inicialmente había discrepancias en cuanto a la especie que origina esta banda, y consecuentemente en los procesos que se producen en el estado excitado [Zinsli 75, Grzywacz 78].

De las interpretaciones dadas por los distintos autores al comportamiento experimental observado para la 7-HC en disoluciones acuosas cabe destacar la de Moriya [Moriya 83]. Estudiando los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en función de la acidez entre pH -5 y 11 identificó cuatro bandas de emisión, que asignó en orden creciente de longitud de onda a N^* , C^* , A^* y T^* , basándose en la similitud del comportamiento fluorescente de la 7-HC y los quinolinos y en cálculos de orbitales moleculares del tautómero. Moriya planteó el mecanismo general mostrado en la figura 2.17, que difiere de los precedentes en que incluye al catión C^* . Se indicó que la eficiencia relativa de la fluorescencia del catión excitado comienza a ser importante por debajo de pH 0. Se consideró también la posibilidad de generación de T^* directamente a partir de N^* (y de N^* a partir de T^*) como un proceso de transferencia protónica concertado bifuncional mediante moléculas de agua (como se indica en la figura 2.18), cuando en estudios anteriores sólo se consideraba la posibilidad de formación del tautómero a partir del anión mediante un proceso de protonación. Esto está de acuerdo con la tendencia general observada de que el grupo hidroxilo como sustituyente de un compuesto aromático o heteroaromático adquiere características más ácidas en el estado excitado, mientras que el grupo carbonilo se vuelve más básico en el estado excitado [Ireland 76]. Esto hace que la transferencia de un protón del grupo hidroxilo al carbonilo de la 7-HC sea muy favorable en el estado excitado. Debido a la capacidad del agua para formar cadenas de enlaces hidrógeno y la migración del protón a lo largo de estas

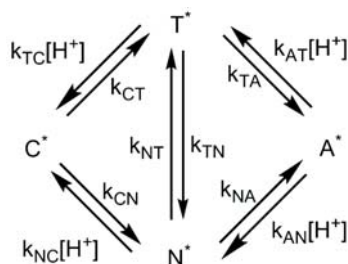


Figura 2.17: Esquema de reacción general para las especies excitadas de la 7-HC [Moriya 83].

cadena, la transferencia protónica entre estos dos átomos de una molécula puede realizarse de forma cooperativa y la conversión de la forma neutra al tautómero puede producirse sin liberar ningún protón al exterior de la región molecular hidratada con las moléculas de agua que participan en el proceso. Debido a que esta transferencia protónica intramolecular se considera que tiene lugar a una velocidad muy alta en comparación con otras velocidades de reacción, no aparecen especies intermedias en la ecuación de velocidad de este proceso.

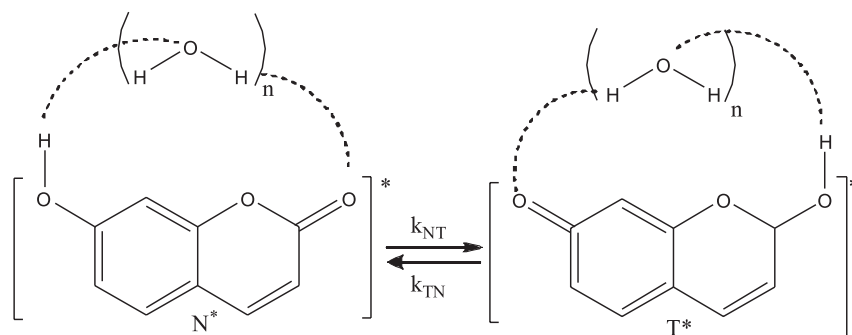


Figura 2.18: Mecanismo concertado propuesto por Moriya para la tautomerización de la 7-HC en el estado excitado.

Este mecanismo también es de esperar en alcoholes de cadena corta, si bien este efecto será más débil porque el enlace de hidrógeno es mucho más débil que en agua y la transferencia protónica está más restringida. El hecho de que en una disolución de 7-HC en etanol, al aumentar la cantidad de agua, la banda de emisión del tautómero aumente más que la de la neutra fue atribuido a la mayor efectividad de la formación de T^* directamente a partir de N^* [Moriya 83]. En este artículo se considera que la transformación de la molécula neutra al tautómero en el estado fundamental no es posible, lo que hace que tampoco sea posible la excitación directa del tautómero mediante absorción de luz. También se concluye que en mezclas de etanol y agua a pH neutro (cuando se excita N) no se produce la reacción de protonación de A^* para dar T^* , ni tampoco la protonación de A^* para dar N^* , aunque se considera la formación de A^* a partir de N^* y T^* , así como la formación de T^* a partir de N^* y de N^* a partir de T^* como se indica en la figura 2.19. Se midieron también los tiempos de vida y se calcularon las constantes cinéticas según este modelo. En los espectros de fluorescencia de dichas mezclas de etanol y agua, cuando se excita sólo el anión a valores de pH altos, se observó que la emisión se debía únicamente a la fluorescencia de A^* .

Se determinó la constante de disociación ácida de la 7-HC en mezclas de etanol y agua en distinta proporción observándose que a mayor proporción de etanol aumenta el valor de pK_a . Concretamente, a 25°C el valor de pK_a pasa de 7.86 cuando la proporción de etanol es del 25 % a ser 8.78 cuando es del 90 % [Arora 82].

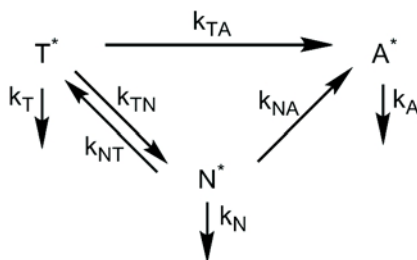


Figura 2.19: Esquema de reacción para las especies excitadas de la 7-HC en una mezcla de etanol y agua a pH neutro tras la excitación de N según Moriya [Moriya 83].

Se han realizado diversos estudios sobre la influencia del pH en los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de la 7-HC en disoluciones de etanol con distinto contenido de agua. Los espectros de absorción no muestran mucho cambio cuando el contenido de agua varía del 0 al 90%. Por el contrario, los espectros de fluorescencia varían mucho con el contenido en agua. Al aumentar el contenido en agua del 0 al 10% aumenta la banda a 485 nm y disminuye la banda a 405 nm, siendo esta banda a 485 nm la predominante por encima de un 3% de agua [Grzywacz 78].

Moriya estudió posteriormente la influencia del disolvente en los espectros de absorción y fluorescencia de la 7-HC [Moriya 88]. Utilizó para ello disolventes orgánicos y disoluciones acuosas en condiciones ácidas y básicas. Se observó un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda (desplazamiento batocrómico o hacia el rojo) de los máximos de absorción al disminuir la constante dieléctrica en disolventes hidroxílicos. Los máximos de fluorescencia no sufren modificación salvo el de la especie T^* , que se desplaza a menor longitud de onda (desplazamiento hipsocrómico o hacia el azul) al aumentar la polaridad del disolvente. El orden de aparición de las bandas es el mismo que en agua. Por el contrario, en disolventes no hidroxílicos no se produjo apenas desplazamiento del máximo de absorción ni del máximo de emisión de la forma neutra de un disolvente a otro, por lo que se propuso que las especies neutras tienen estructuras no polares en los estados fundamental y excitado en estos disolventes. No se obtuvo en ningún caso la banda de emisión correspondiente a la especie T^* , que siempre acompañaba a la de N^* , por lo que se supuso que sólo sería posible la tautomerización en disolventes con suficiente poder de ionización y capacidad de formación de enlace hidrógeno, como en agua y alcoholes. Se comprobó que al añadir una pequeña proporción de agua sí tenía lugar la emisión de T^* . En este artículo también se detectó la solubilización de la 7-HC en el interior de las micelas de SDS en disolución acuosa, debido al drástico cambio que se observa en los espectros de fluorescencia y se señala la posibilidad de usar la 7-HC como sonda para el estudio del microentorno. Se compararon las variaciones observadas en el espectro de emisión de fluorescencia de la 7-HC en el interior de las micelas al aumentar la concentración de surfactante con las observadas para las mezclas de agua y

etanol al aumentar la proporción de etanol. Ambas variaciones se explican como debidas al descenso en la micropolaridad del entorno del fluoróforo como consecuencia de la menor polaridad del etanol o del interior hidrofóbico de la micela respecto al agua [Moriya 88].

En 1977 se publicó el uso como indicador de pH de un derivado de la 7-HC con una larga cadena parafínica en la posición 4 ($-C_{11}H_{23}$) en micelas neutras, aniónicas y catiónicas. Se compara el valor de pK_a obtenido en agua (7.75) con el valor aparente para esta sonda en distintas micelas y se obtiene que este valor aumenta en micelas de SDS a concentración de surfactante 24 mM (11.15) y de Triton X-100 5 mM (8.85), pero disminuye en CTAB 24 mM (6.35). Así, queda reflejado el efecto de las micelas en el equilibrio ácido-base de colorantes en el estado fundamental [Fernández 77].

Otra molécula que ha sido muy ampliamente estudiada y que presenta gran similitud con la 7-HC es la 7-hidroxi-4-metilcumarina. Su comportamiento fotofísico es análogo al de la 7-HC y presenta las mismas especies en el estado electrónico excitado [Moriya 83]. En 1993 se publicó la resolución de la cinética del estado excitado de esta molécula en disoluciones acuosas con un 20 % de dioxano usando medidas de decaimientos de fluorescencia a distintos pH. Se obtuvieron las nueve constantes de velocidad representadas en la figura 2.20, que permitieron reproducir correctamente los datos de fluorescencia de estado estacionario.

Más recientemente, Cohen y colaboradores estudiaron el comportamiento de la 7-hidroxi-4-metilcumarina en alcoholes y mezclas de alcohol y agua, asignando la banda de fluorescencia a 485 nm al catión C^* y no al tautómero T^* en contra de la asignación mayoritariamente extendida en la bibliografía. Esto afecta a la interpretación de los tiempos de vida obtenidos experimentalmente [Cohen 01].

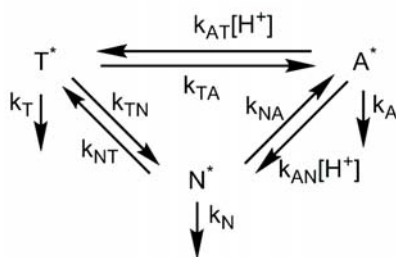


Figura 2.20: Esquema de reacción para las especies excitadas de la 7-hidroxi-4-metilcumarina tras la excitación de N [Seixas de Melo 93].

2.3 Sistemas microheterogéneos objeto de estudio

Se llaman sistemas microheterogéneos a los sistemas que son heterogéneos a nivel microscópico pero homogéneos a nivel macroscópico. Se pueden clasificar en dos grandes grupos: sistemas poliméricos con soportes orgánicos e inorgánicos y agregados moleculares compuestos por tensioactivos o por lípidos.

En estos sistemas la distribución de soluto puede ser no homogénea a través de todo el volumen de la disolución, ya que es posible que existan cavidades hidrofóbicas o hidrofílicas que secuestren o eliminen solutos. Además, pueden tener superficies cargadas donde los efectos electrostáticos juegan un papel dominante al influenciar la distribución de soluto y sus reacciones. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de estos sistemas proporcionan disoluciones ópticamente transparentes (no turbias) por lo que son válidos para investigaciones espectroscópicas [Kalyanasundaram 87]. Además de los métodos clásicos, como dispersión de luz o RMN, se han usado varias técnicas fluorescentes basadas en procesos de transferencia de electrones, de protones o de energía para explorar muchos aspectos importantes de estos sistemas. En las tres últimas décadas se ha estudiado la utilización de sistemas organizados, como monocapas, micelas, micelas inversas, microemulsiones o bicapas (vesículas, liposomas), como catalizadores y para promover características deseables de las reacciones fotoquímicas. Los componentes más importantes de estos sistemas son las moléculas tensioactivas o surfactantes, que actúan como una barrera entre las fases lipídica y acuosa y sirven para mimetizar agregados biológicos dado su capacidad de compartimentalizar el sustrato. La fluorescencia es una técnica importante para descubrir muchas características estructurales complejas de sistemas organizados. Este estudio ayuda a determinar los puntos de localización de varios sustratos en los sistemas organizados [Behera 99].

Actualmente existe un gran interés por el estudio de la organización y la dinámica de los sistemas micelares, dado que los principios generales para la formación de micelas son comunes a otros sistemas supramoleculares como bicapas, liposomas y membranas biológicas. La química supramolecular se ocupa de la estructura y dinámica de una pequeña molécula (huésped o sustrato) que se une no covalentemente a una molécula mayor (hospedador o ligando) formando complejos huésped-hospedador o sustrato-ligando [Turro 05].

En muchos sistemas supramoleculares las moléculas de agua están confinadas en un volumen pequeño. Es interesante entender cómo las moléculas de agua confinadas controlan la estructura, reactividad, reconocimiento molecular y dinámica en un sistema biológico. Así, un descubrimiento importante es que la dinámica de solvatación en muchos sistemas supramoleculares es mucho más lenta que en disolución acuosa, con una diferencia de 2 a 4 órdenes de magnitud [Bhattacharyya 03].

2.3.1 Ciclodextrinas

Durante 25 años, entre 1911 y 1935 en Alemania, Pringsheim fue el investigador más destacado en el campo de las ciclodextrinas y demostró que estos azúcares forman complejos estables con muchas sustancias químicas. A mediados de los años 70, cada ciclodextrina natural fue identificada química y estructuralmente y se estudiaron muchos complejos. Son muchos los libros en que se puede obtener todo tipo de información sobre las ciclodextrinas, si bien aquí se destacan algunos aspectos importantes [Bender 78, Bortolus 96, Szejtli 96, Saenger 96].

Las ciclodextrinas (CDs) son moléculas cíclicas formadas por distinto número de residuos de D(+)-glucopiranosos unidos mediante enlaces $\alpha(1,4)$. Las ciclodextrinas naturales son tres: α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) y γ -ciclodextrina (γ -CD). Se diferencian porque están formadas por 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosos, respectivamente. En la figura 2.21 se muestra la estructura de la segunda de estas CDs y su representación en tres dimensiones. Se obtienen del almidón por la acción de una enzima producida por varios microorganismos, siendo el *Bacillus macerans* la fuente más primitiva. Las configuraciones moleculares tridimensionales más estables para estos oligosacáridos cíclicos no reductores tienen forma de cono truncado con una apertura grande y otra pequeña, que presentan grupos hidroxilos primarios y secundarios hacia la parte que está en contacto con el disolvente. Estos grupos le confieren solubilidad a estas moléculas en agua.

El tamaño de la cavidad hidrofóbica aumenta desde la α -CD hasta la γ -CD, tal como se muestra en la figura 2.22. Sin embargo, no se observan cambios importantes en la estructura o en las propiedades generales de las tres ciclodextrinas debido al aumento de tamaño.

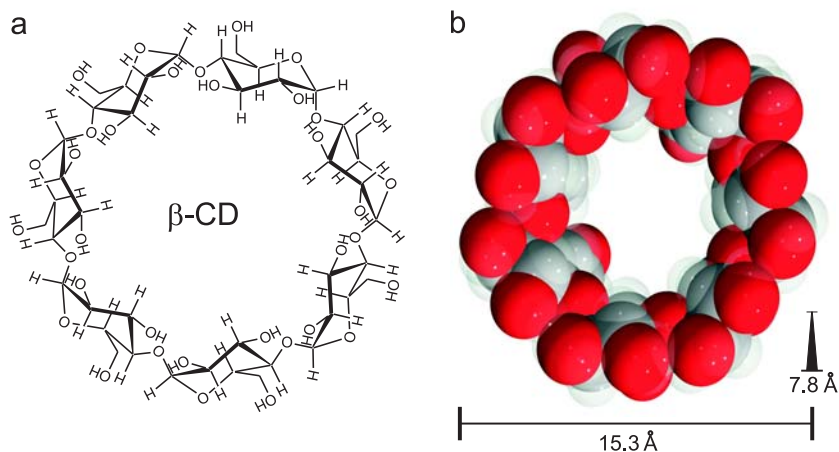


Figura 2.21: (a) Estructura de la β -ciclodextrina. (b) Representación tridimensional de ésta.

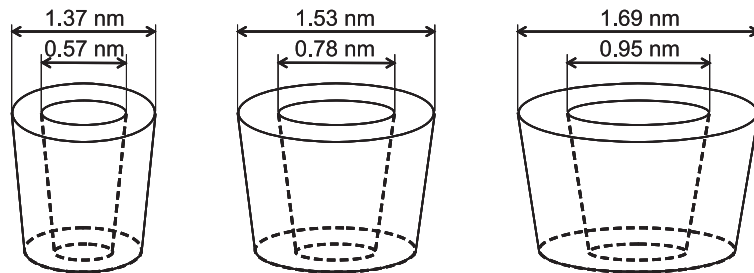


Figura 2.22: Dimensiones moleculares de las ciclodextrinas naturales en el orden: α -CD, β -CD y γ -CD.

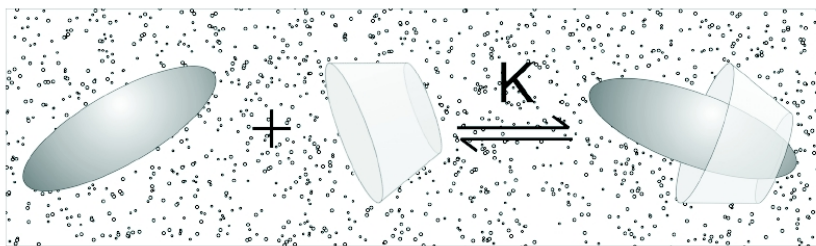


Figura 2.23: Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión de un sustrato con una ciclodextrina.

La β -CD es la que más se utiliza, debido a su tamaño de cavidad intermedio y a su mayor disponibilidad, aunque tiene la desventaja de que es la ciclodextrina natural de menor solubilidad en agua. El interior del toroide es hidrofóbico y presenta un entorno rico en electrones, debido a los átomos de oxígeno glicosídicos. A pesar de que son hidrosolubles, el interior de la cavidad de las ciclodextrinas es apolar, por lo que son capaces de formar complejos de inclusión con distintos tipos de moléculas de carácter hidrofóbico que se alojan en su interior, tal y como se representa en la figura 2.23.

Los complejos de inclusión resultan de interacciones no covalentes entre las ciclodextrinas y las moléculas huésped, siendo por tanto modelos para el estudio de fenómenos de reconocimiento molecular, de gran importancia en los sistemas biológicos sustrato-ligando [Szejtli 98, Breslow 98, Steed 00]. El proceso de formación de complejos de inclusión con las ciclodextrinas se ha estudiado mucho debido a la amplia gama de aplicaciones que tienen estos compuestos en farmacología, biotecnología, tecnología de alimentos, cosmética, química analítica, tecnología medioambiental, etc. La habilidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión en los que las propiedades de las moléculas huésped cambian respecto a las moléculas libres ha llevado a su amplio uso en diferentes campos y aplicaciones en

la química verde [Loftsson 96, Szejtli 98, Hirayama 99, Breslow 00, Lezcano 02, Ritter 02]. Además, las ciclodextrinas muchas veces aparecen como reactivos de partida para la formación de sistemas supramoleculares [Lehn 95, Harada 93, Nepogodiev 98, Álvarez-Parrilla 00].

Las fuerzas intermoleculares que hacen posible que se forme un complejo de inclusión son muy variadas, comprendiendo desde fuerzas de Coulomb, fuerzas de van der Waals y fuerzas de London, hasta el establecimiento de enlaces de hidrógeno. Además, pueden existir interacciones específicas entre ciertos grupos de la molécula huésped y los átomos del interior de la cavidad de la ciclodextrina que sean responsables de la formación del complejo. En general, las moléculas incluidas se orientan de forma que se alcance la máxima concordancia entre las características estructurales y de polaridad de ciclodextrina, huésped y disolvente (máximo contacto entre la parte hidrofóbica del huésped y la cavidad apolar de la ciclodextrina). La estabilidad y estructura de los complejos formados depende fundamentalmente de factores geométricos y de polaridad.

La estequiometría más frecuente de los complejos de inclusión de ciclodextrinas es la 1:1 (sustrato:CD), aunque son posibles muchas otras estequiometrías, dependiendo del tamaño y propiedades del sustrato y del tamaño de la cavidad de la ciclodextrina. Así, por ejemplo, las moléculas de forma alargada que poseen dos anillos aromáticos suelen dar lugar a complejos de estequiometría sustrato:CD 1:2.

El comportamiento fotofísico y fotoquímico de moléculas complejadas con ciclodextrinas es generalmente diferente de su comportamiento en disolución, lo que permite su estudio mediante técnicas espectroscópicas. Las primeras observaciones en este campo fueron cualitativas y estaban relacionadas con el incremento de la estabilización de moléculas lábiles contra la fotodegradación cuando se complejan con las ciclodextrinas naturales, si bien los trabajos actuales son más cuantitativos.

Algunas sondas fluorescentes habituales en el estudio de sistemas biológicos han sido también utilizadas como moléculas huésped en el estudio de complejos de inclusión con ciclodextrinas. Entre estas sondas fluorescentes el anión 6-(p-toluidin)naftalen2-sulfonato (TNS) es probablemente el más popular y se ha usado como modelo de molécula huésped en muchas publicaciones para comparar la capacidad de complejación de diferentes derivados de las ciclodextrinas. En un reciente trabajo se estudió detalladamente la complejación del TNS con β -CD con el fin de esclarecer las estructuras de los complejos de inclusión formados y determinar con precisión las constantes de equilibrio de formación de los mismos, aspectos que estaban totalmente confusos en la bibliografía [Álvarez-Parrilla 01]. Mediante estudios de fluorescencia de estado estacionario y con resolución temporal y de RMN, se dedujo que el TNS forma dos complejos de inclusión de estequiometría 1:1 con la β -CD, uno en el que se compleja el anillo toluidínico (C11T) y otro resultante de la inclusión del grupo naftalensulfonato (C11N), y un complejo de estequiometría 1:2 en el que cada uno de los dos grupos aromáticos se compleja con una molécula de β -CD (C12). El análisis de los espectros

de fluorescencia de estado estacionario del TNS en función de la concentración de β -CD permitió obtener las constantes de complejación macroscópicas (K_1 y K_2) y los espectros de los complejos de las dos estequiometrías.

Otro colorante muy utilizado en el estudio de la capacidad complejante de las ciclodextrinas es el naranja de metilo, cuyo comportamiento se puede seguir mediante espectroscopia de absorción UV-Visible. Dependiendo del pH, el naranja de metilo se encuentra en forma protonada *zwitteriónica* o en forma desprotonada aniónica, y se ha encontrado que las dos formas presentan comportamientos muy diferentes en cuanto a su complejación con β -CD [Carrazana 04]. Así, las formas protonadas *zwitteriónicas* forman complejos de estequiometría 1:1 con la β -CD con baja constante de estabilidad, mientras que la forma desprotonada aniónica forma complejos de estequiometrías 1:1 y 1:2 con constantes de estabilidad mayores. Esta molécula es un ejemplo de la importancia de factores estructurales y de polaridad del sustrato en la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas.

2.3.2 Sistemas micelares

Un tensioactivo o surfactante es una molécula anfipática que tiene dos zonas con polaridades muy diferentes. La zona hidrofílica es altamente soluble en agua, mientras que la porción lipofílica de la molécula es soluble en medios orgánicos y es altamente hidrofóbica. Debido a este comportamiento dual se dice que son moléculas anfipáticas. Los tensioactivos se distribuyen en la superficie de un medio acuoso orientados de forma que los grupos hidrofílicos se encuentran en el agua debidamente solvatados, mientras que los hidrofóbicos quedan expuestos al aire. Esto provoca una disminución en la tensión superficial del agua, a lo que hace alusión el nombre de estas sustancias. Son varias las monografías que tratan con profundidad la estructura y propiedades de los surfactantes [Attwood 83, Zana 87].

Desde el punto de vista comercial los surfactantes se clasifican según su aplicación. Sin embargo se observa que muchos surfactantes son susceptibles de ser utilizados en aplicaciones diferentes, lo que provoca confusiones. Por tanto, se prefiere, clasificarlos de acuerdo a la estructura de su molécula, o más exactamente según la forma de disociación en el agua. Por tanto, se distinguen tres tipos de surfactantes según su funcionalidad hidrofílica: catiónicos, aniónicos y no iónicos.

La producción de los surfactantes aniónicos representa alrededor del 55 % de los surfactantes producidos anualmente en el mundo, dado que la inmensa mayoría de los productos de limpieza se basan en la acción limpiadora de estos tensioactivos.

Los surfactantes no iónicos están en el segundo puesto por orden de importancia con un poco menos del 40 % del total. Suelen tener bajo punto de fusión o ser líquidos por lo que son ideales para formulaciones líquidas.

La fabricación de surfactantes catiónicos es mucho más cara que la de los anteriores y es por esta razón que no se utilizan salvo en caso de aplicación particular, como cuando se hace uso de sus propiedades antisépticas y bactericidas o de su facilidad de adsorción sobre sustratos biológicos o inertes que poseen una carga negativa.

Los surfactantes tienden a acumularse en la interfase y orientarse para minimizar las interacciones desfavorables. A medida que aumenta la concentración de surfactante las moléculas tienden a colocarse en forma de monocapas, originando una fuerte disminución de la tensión superficial. Por encima de una determinada concentración de surfactante, llamada concentración micelar crítica (CMC), se forman agregados denominados micelas. En disoluciones acuosas las micelas se forman cuando todas las regiones lipofílicas de las moléculas se orientan hacia un centro común, mientras las regiones hidrofílicas se orientan hacia el exterior. En la figura 2.24 se representa la disposición de un tensioactivo en forma de monocapa y en forma de micela normal. En disolventes orgánicos de baja polaridad, estos compuestos se agrupan de manera contraria a la descrita anteriormente, formando lo que se conoce como micelas inversas. En ambos casos, la viscosidad y polaridad del interior de la micela difiere claramente con respecto al exterior, permitiendo que moléculas insolubles en agua se solubilicen en presencia de surfactantes, al alojarse en el interior de sus micelas. Son varios los trabajos que tratan el tema de la formación de micelas en profundidad [Tanford 74, Jones 94].

La CMC, que es la concentración a la que aparecen las primeras micelas, no es en realidad un valor exacto, sino un cierto intervalo de concentración, que puede ser relativamente amplio si el surfactante es una mezcla de especies químicas notablemente diferentes entre sí. La concentración micelar crítica se determina como la concentración a la que dispersiones anfífilas muestran un cambio brusco en sus propiedades fisicoquímicas. Esta variación es debida a las diferencias entre monómeros y micelas en propiedades tales como la conductividad eléctrica (para sustancias tensioactivas iónicas), tensión superficial, presión osmótica, presión de vapor, punto de congelación, densidad, dispersión de luz, absorción espectral de cromóforos, velocidad del sonido, etc [De Vendittis 81, Prieu 02].

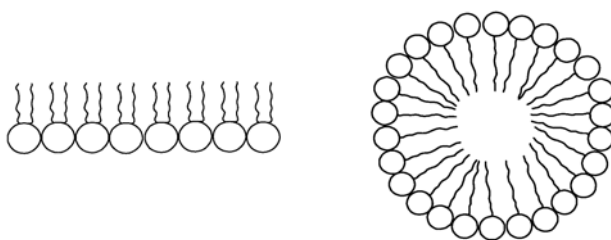


Figura 2.24: Tensioactivo ordenado en forma de monocapa (izquierda) y en forma de micela normal (derecha).

En cada micela no hay exactamente el mismo número de moléculas de surfactante, por lo que se trabaja con el número medio de moléculas de surfactante por micela, denominado número de agregación (N_{ag}). Cerca de la CMC las micelas son generalmente esféricas, y la concentración de moléculas de surfactante no agregado es igual a la CMC. Por tanto, la concentración de micelas de una disolución ($[M]$) puede obtenerse a partir de la concentración total de surfactante ($[S]$) total mediante la siguiente ecuación:

$$[M] = \frac{[S] - CMC}{N_{ag}} \quad (2.23)$$

Generalmente existen discrepancias en los valores dados para el número de agregación en la bibliografía, debidas a las diferentes técnicas usadas para su determinación, al aumento del número de agregación con la concentración de tensioactivo y a los cambios que se producen en la estructura y forma de las micelas a concentraciones de tensioactivo muy superiores a la CMC [Bales 98].

En general, los fluoróforos ven incrementada considerablemente su emisión al incorporarse al interior de una micela, debido a que ésta les aísla de los desactivadores presentes en la disolución. Las medidas de fluorescencia con sondas muy apolares y moléculas desactivadoras de la fluorescencia permiten determinar parámetros característicos de las micelas, como su CMC o su número de agregación [Kalyanasundaram 87].

A continuación, se describen la estructura y propiedades de los surfactantes utilizados en este trabajo:

El dodecilsulfato sódico, SDS, es un tensioactivo aniónico que a temperatura ambiente tiene una concentración micelar crítica de 8.0 mM, número de agregación de 62 (usaremos estos dos valores para calcular la concentración de micelas a partir de la concentración de surfactante según la ecuación (2.23)) y la estructura indicada en la figura 2.25 [Kalyanasundaram 87]. Según la bibliografía se produce un aumento del número de agregación de las micelas de SDS con la concentración de tensioactivo: a 30°C aumenta de 55 a 71 al elevar la concentración de 20 a 80 mM de SDS y a 25°C pasa de 57 a 89 en el intervalo de concentraciones de 25 a 200 mM de SDS [Quina 95, Behera 99]. Su masa molecular es de 288.38 g/mol.

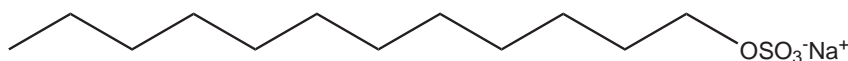


Figura 2.25: Estructura molecular del dodecilsulfato sódico (SDS).

Otro tensioactivo aniónico utilizado en este trabajo es el decilsulfato sódico, SDeS, que a temperatura ambiente tiene una CMC de 33 mM, número de agregación medio de 50 y la estructura similar a la del SDS, pero con una longitud de la cadena hidrocarbonada más

corta, ya que posee 10 átomos de carbono en vez de 12 [Kalyanasundaram 87]. Su masa molecular es de 260.32 g/mol.

El bromuro de dodeciltrimetilamonio, DTAB, es un tensioactivo catiónico, cuya estructura aparece en la figura 2.26, que a temperatura ambiente tiene una concentración micelar crítica de 15.30 mM y número de agregación medio de 50 [Hiemenz 97]. Su masa molecular es 308.35 g/mol.

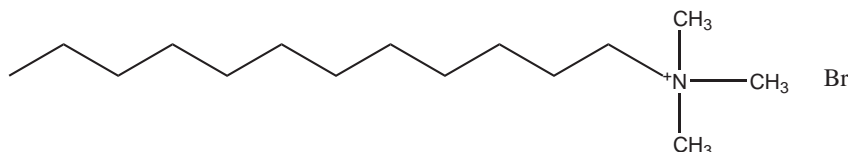


Figura 2.26: Estructura molecular del bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB).

El bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB, es un tensioactivo catiónico, que a temperatura ambiente tiene una concentración micelar crítica de 0.92 mM y número de agregación medio de 60. La estructura de esta molécula es similar a la del DTAB pero a diferencia de éste posee una cadena hidrocarbonada más larga, concretamente de 16 átomos de carbono en vez de 12 [Kalyanasundaram 87]. Su masa molecular es 364.46 g/mol.

Dentro de los tensioactivos no iónicos cabe señalar los tensioactivos tipo Brij, que son éteres formados por cadenas lineales alquilo como parte hidrofóbica y cadenas de óxido de polietileno como parte hidrofílica.

El Brij 35 es el nombre comercial del tricosaetilenglicol dodecil éter, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$, un detergente comúnmente usado en aplicaciones de HPLC. El número 35 se refiere a la suma de la longitud de la cadena alquílica y del grupo óxido de etileno [Toth 06]. Su masa molecular es de 1198 g/mol.

El Triton X-100 es un preparado comercial de p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxipolioxi-etilenglicoles que contiene una media de 10 unidades de óxido de etileno por molécula (figura 2.27). La temperatura (de 5 a 25°C) influye mucho en la CMC y número de agregación de las micelas de este surfactante [Rharbi 01]. Su masa molecular es de 646.85 g/mol.

Los datos publicados de CMC y número de agregación de estos surfactantes neutros son muy dispares, como puede verse en las siguientes tablas. Las discrepancias en los valores de CMC pueden ser debidas a la utilización de diferentes técnicas en los diversos estudios, junto con la dificultad de determinación de valores de CMC tan pequeños. En el caso del número de agregación la falta de concordancia puede ser atribuida a las variaciones significativas en el número de agregación de estos dos tensioactivos con la concentración y la temperatura como indican los trabajos de Phillies [Phillies 93, Phillies 95, Phillies 96] y de

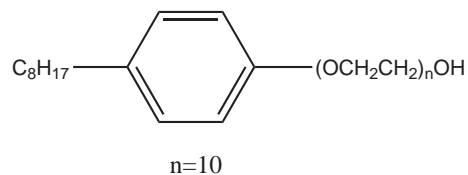


Figura 2.27: Estructura molecular del Triton X-100 (TX-100).

otros autores [Preu 99, Tomsic 04]. Los datos de CMC y número de agregación empleados en este trabajo para estos dos surfactantes se indican con un asterisco. Estos valores se han elegido teniendo en cuenta la calidad de los datos referenciados y su coincidencia los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación mediante estudios de fluorescencia.

CMC / μM	Método	Artículo
60	Temperatura ambiente	[Kalyanasundaram 87]
150 ± 16	Sistema de inyección en flujo, 25°C	[Brooks 88]
48-170	Literatura, 25°C	[Brooks 88]
42-167	Literatura, 25°C	[Phillies 95]
50.7	Literatura, 25°C	[Preu 99]
80*	Fluorescencia	[Wong 99]
30	Tensión superficial, 22°C	[Patist 00]
50.7	25°C	[Preu 99]
68	Micelización de colorante, 22°C	[Patist 00]
90		[Chakrabarty 04]
33-83	Literatura	[Toth 06]

Tabla 2.2: Datos publicados para la CMC del Brij 35.

N_{ag}	Método	Artículo
40*	Temperatura ambiente	[Kalyanasundaram 87]
41	Dispersión de luz, 25°C	[Phillies 95]
42	"Index matching"	[Preu 99]
41-49	Literatura, dispersión de neutrones, 1-150 g/L, 25°C	[Toth 06]
34-64	Literatura, 5-200 g/L, $20-60^\circ\text{C}$	[Toth 06]
37-47	Literatura, 2-100 g/L, $10-40^\circ\text{C}$	[Toth 06]
40	Literatura	[Toth 06]

Tabla 2.3: Datos publicados para el número de agregación del Brij 35.

CMC / μM	Método	Artículo
260*	Temperatura ambiente	[Kalyanasundaram 87]
310 \pm 33	Sistema de inyección de flujo, 25°C	[Brooks 88]
160-330	Literatura, 25°C	[Brooks 88]
330 \pm 10	Razón I ₁ /I ₃ pireno, salto en la gráfica, 25°C	[Carnero Ruiz 94]
928	Literatura	[Streletzky 95]
250	Literatura	[Alargova 98]
600 \pm 100	APL como sonda	[Behera 99]
160 (CMC ₁), 380 (CMC ₂)	Razón I ₁ /I ₃ pireno, 25°C	[Regev 99]
250-270	Literatura, 25°C	[Regev 99]
150		[Rharbi 99]
80	Tensión superficial, 22°C	[Patist 00]
200	Micelización de colorante, 22°C	[Patist 00]
340	Tensión superficial, 19.6°C	[Rharbi 01]
320	Velocidad del sonido, 25°C	[Priv 02]

Tabla 2.4: Datos publicados para la CMC del Triton X-100.

N_{ag}	Método	Artículo
140	Literatura, dispersión de luz, temperatura ambiente	[Robson 77]
111	Literatura, dispersión de luz, 25°C	[Robson 77]
135	Literatura, dispersión de luz, 25°C	[Robson 77]
100	Literatura, ultracentrifugación, 25°C	[Robson 77]
143*	Temperatura ambiente	[Kalyanasundaram 87]
\approx 100	Dispersión de luz, 25°C	[Phillies 93]
97	Dispersión de luz, 25°C	[Streletzky 95]
100	Literatura, 25°C	[Streletzky 95]
105	Literatura, 25°C	[Streletzky 95]
76	Dispersión de luz, 25°C	[Phillies 96]
69.5	Desactivación de fluorescencia estática, 25°C	[Alargova 98]
106	Literatura, TRFQ, 25°C	[Alargova 98]
136	Literatura, 298 K	[Behera 99]
134	Literatura, 298 K	[Behera 99]
105	Dispersión de luz, 25°C	[Rharbi 99]
106	TRFQ, 25°C	[Regev 99]
104	TRFQ, otro desactivador, 25°C	[Regev 99]
120	Literatura, desactivación de decaimientos de fluorescencia 24.6°C	[Rharbi 01]

Tabla 2.5: Datos publicados para el número de agregación del Triton X-100.

2.4 Asociación sustrato-ligando: equilibrio y dinámica

Los sistemas supramoleculares están unidos mediante interacciones intermoleculares donde la reversibilidad es un aspecto clave. Esto es consecuencia de interacciones más lábiles, variadas y complejas que las de los enlaces covalentes intramoleculares que confiere a estos sistemas propiedades y funciones características. Así, el transporte de solutos entre diferentes medios requiere uniones específicas del soluto en un medio y su rápida liberación en otro medio. La unión muy fuerte e irreversible no permitiría el transporte. El desarrollo de nuevas estructuras supramoleculares se guía por el deseo de conseguir que cumplan funciones complejas como el reconocimiento selectivo de iones, el transporte de sustratos, la catálisis, la replicación y la producción de trabajo eléctrico o mecánico. Paralelamente, muchos sistemas se sintetizan para entender los conceptos fundamentales que hay detrás de la química supramolecular, como son reconocimiento molecular, pre-organización, cooperatividad, multivalencia, reversibilidad y autoensamblaje.

Desde sus comienzos, hace unas cuatro décadas, el campo de la química supramolecular se ha centrado en la modificación estructural. El estudio de cambios sistemáticos en la estructura ha permitido obtener mucha información aplicable al diseño de sistemas más complejos. Por otra parte, también se han realizado numerosos estudios termodinámicos de los procesos de asociación en sistemas supramoleculares, dirigidos sobre todo a la determinación de las constantes de equilibrio de estabilidad de los complejos y su relación con las características estructurales del sustrato y del ligando. En cambio, mucho menos desarrollado se encuentra el estudio de la dinámica de los procesos de asociación, es decir, de las velocidades de los procesos de entrada/salida del sustrato dentro/fuera del ligando. Es decir el estudio de los cambios con el tiempo de una o más de las características estructurales. La estructura, la termodinámica y la dinámica están fuertemente interrelacionadas. La dinámica proporciona información de cómo evoluciona el sistema a lo largo del tiempo. La información cinética no puede determinarse a partir de estudios estructurales o termodinámicos. Así, la magnitud de una constante de equilibrio no incluye información de la velocidad a la que se forma o se disocia un complejo. Por el contrario, el conocimiento de las constantes de velocidad puede usarse para derivar parámetros termodinámicos. La comprensión de la dinámica supramolecular es por tanto fundamental para el diseño y control de sistemas supramoleculares funcionales [Lehn 95, Bohne 00, Dyck 03].

Para determinar la estequiometría de los complejos de inclusión y las correspondientes constantes de estabilidad podrían utilizarse una gran variedad de técnicas o métodos experimentales. En función de su naturaleza pueden agruparse en cuatro grupos [Tsukube 96]: métodos espectroscópicos (resonancia magnética nuclear, espectroscopia Vis-UV, espectroscopia de fluorescencia y/o fosforescencia y dicroísmo circular), métodos electroquímicos (potenciometría o polarografía: requieren algún tipo de carga en el derivado de ciclodextrina o bien en el sustrato), métodos termodinámicos (calorimetría, solubilidad, presiones parciales

y tensión superficial) y métodos específicos (que suelen ser de tipo competitivo o de tipo cinético). Los métodos espectroscópicos, y particularmente la espectroscopia de fluorescencia, son los más poderosos, ya que las técnicas y los equipos disponibles hoy en día permiten la determinación de variaciones extremadamente pequeñas de las propiedades espectroscópicas de los sistemas, aún a concentraciones muy bajas de reactivos y con volúmenes de muestra muy pequeños.

El equilibrio de formación de un complejo de inclusión puede expresarse mediante la siguiente ecuación:



Existen varios métodos para determinar la estequiometría de los complejos de inclusión (dada por la relación n:m) destacando entre todos ellos el denominado método de las variaciones continuas o método de Job [Tsukube 96]. Este método se realiza normalmente mediante medidas discontinuas, mezclando alícuotas de dos disoluciones equimolares de sustrato (en nuestro caso sería el fluoróforo) y ligando hasta un volumen determinado. De este modo la concentración total suma de la de sustrato y ligando se mantiene siempre constante y varían las fracciones molares de sustrato y ligando (omitiendo el número de moles del disolvente). La representación de una propiedad química que varíe con la complejación (absorbancia, intensidad de fluorescencia, etc.) en función de la fracción molar de ligando se denomina gráfica de Job. Estas gráficas presentan un máximo (o un mínimo) en la posición que indica la relación de la estequiometría de complejación sustrato:ligando. Así, si el máximo se sitúa a una fracción molar de 0.5 indica una complejación de tipo 1:1, mientras que máximos situados a 0.67 y 0.75 indican complejaciones 2:1 y 3:1, respectivamente.

Los diferentes métodos para la determinación de las constantes de estabilidad, pueden clasificarse en métodos de ajuste lineal y de ajuste no lineal [Tsukube 96]. Dentro de los métodos de ajuste lineal destaca el método de Benesi-Hildebrand [Benesi 49] y la representación de Scatchard [Cantor 80], que presentan por ejemplo la limitación de trabajar en condiciones en las que la concentración de ligando sea mucho mayor que la de ciclodextrina. Se han propuesto otras metodologías que siguen sin resolver satisfactoriamente estas limitaciones salvo para sistemas concretos. Frente a las metodologías que se basan en la linealización de los datos, es posible hacer un tratamiento de datos no lineal que, a diferencia de los métodos de ajuste lineal, permiten la estimación de las constantes de equilibrio con gran exactitud, además de no imponer restricciones respecto a las concentraciones de reactivos.

Mientras que las propiedades termodinámicas y estructurales de los complejos con ciclodextrinas se han estudiado ampliamente la dinámica de complejación se ha estudiado en menor extensión. La dinámica de complejos de asociación y disociación, sin embargo, no sólo es de interés fundamental para una mejor comprensión mecanística del proceso de complejación en sí, una tarea aún no concluida, sino que también es clave para comprender y controlar una enorme variedad de funciones de los ligandos. Así, sustratos con constantes

de equilibrio de asociación similares pueden presentar constantes de velocidad de asociación y/o disociación muy diferentes. Las constantes de equilibrio de complejación de las moléculas orgánicas con ciclodextrinas varía en un amplio rango desde valores inferiores a 10 a varios miles en unidades de M^{-1} . El origen de las diferencias en las constantes de complejación puede ser investigado determinando las constantes cinéticas de los pasos individuales de asociación y disociación.

Es importante discutir porqué el conocimiento de la dinámica supramolecular se ha desarrollado menos que el diseño de nuevas estructuras supramoleculares, teniendo en cuenta el papel esencial que la dinámica y la reversibilidad juegan en la química supramolecular [Bohne 06]. El campo de la química supramolecular se inició con la investigación de pequeños sistemas sustrato-ligando. En este contexto es útil discutir la relación entre las escalas de longitud y de tiempo para estos sistemas que implican dos o más componentes. La dimensión típica de las cavidades de ligandos sencillos como ciclodextrinas o calixarenos es del orden de 1 nm. Por otra parte, cualquier suceso bimolecular en disolución está limitado por la difusión. Por tanto, se puede estimar que el tiempo empleado por una molécula pequeña como la glucosa en agua a temperatura ambiente para difundir una distancia de 1 nm es de unos 3 ns. Sistemas supramoleculares más grandes pueden tener dimensiones de cientos de nanómetros. Incluso para longitudes más grandes los tiempos de difusión son más cortos que milisegundos (por ejemplo, le lleva 0.8 ms el que la glucosa difunda una distancia de 500 nm). Este análisis sencillo muestra que la dinámica de estos sistemas no era accesible al dominio temporal de las técnicas cinéticas habituales como flujo detenido. Las constantes de velocidad de asociación entre ciclodextrinas y diferentes colorantes varía dramáticamente entre 1 y $10^8 M^{-1} s^{-1}$ y las de disociación entre 10 y más de $10^5 s^{-1}$ [Bohne 00, Cramer 67]. Así, la carencia de información cinética acerca de los sistemas supramoleculares se debe a la falta de técnicas y metodología apropiadas. La medida de estos procesos rápidos necesita de técnicas cinéticas rápidas.

La cinética de los sistemas supramoleculares puede medirse en tiempo real cuando el sistema se separa del equilibrio mediante una perturbación que sea más rápida que el retorno mediante un proceso de relajación para alcanzar un nuevo equilibrio. Para el estudio de dinámicas bastante lentas algunos autores usaron experimentos de flujo detenido [Dyck 03, Yoshida 90, Yoshida 94]. El método convencional más rápido de mezclar disoluciones de componentes de concentraciones diferentes es aproximadamente 1 milisegundo usando experimentos de flujo detenido, lo que impide el uso de esta técnica para el estudio de cinéticas rápidas. Las dinámicas de complejación rápidas entre pequeñas moléculas sustrato y ciclodextrinas requiere técnicas cinéticas con alta resolución temporal. Cramer y colaboradores usaron medidas de salto de temperatura para determinar directamente constantes de velocidad tanto de procesos de asociación como de disociación de una serie de colorantes azo con α -CD. Propusieron un mecanismo de seis pasos para la formación del complejo de inclusión y señalaron la importancia de la rotura y la reconstitución de la estructura acuosa alrededor de la molécula huésped [Cramer 67]. Sin embargo, el rápido salto de temperatura

requerido por esta técnica para separar el sistema del equilibrio limita la resolución temporal y complica el análisis [Ballew 96]. Actualmente, los métodos más ampliamente empleados implican el uso de láseres para crear una perturbación de un sistema en equilibrio. Los láseres son útiles porque pueden proporcionar fotones de energías específicas en cortos períodos de tiempo. Por ejemplo, los experimentos de salto de temperatura con láser (LTJ) hacen que sea posible el calentamiento de una disolución en períodos de tiempo tan cortos como los picosegundos. También la relajación ultrasónica es una técnica donde oscilaciones periódicas de temperatura y presión se usan para obtener información cinética, y esta técnica se ha usado para estudiar procesos rápidos en sistemas supramoleculares, como por ejemplo la cinética de complejación de iones con ciclodextrinas [Rohrbach 77].

La ventaja de usar sondas fotoquímicas se debe a que permite investigar los procesos dinámicos rápidos que tienen lugar en el rango de nanosegundos a microsegundos [Kleinman 97]. La excitación de ligandos o de sustratos origina, tras la absorción de luz, la aparición de nuevas especies (estados excitados o reactivos intermedios), cuya cinética de relajación puede medirse usando experimentos de fotólisis de destello láser (LFP). Bohne y colaboradores midieron directamente cinéticas de formación de complejos entre β -CD y xantenos en su estado triplete excitado [Kleinman 97, Bohne 00]. La metodología del desactivador de triplete también presentada por Bohne y colaboradores es un logro más general para seguir la dinámica del estado excitado, pero es necesario añadir una molécula de desactivador a la fase acuosa [Kleinman 97, Bohne 00]. Nau y colaboradores midieron los tiempos de vida de fluorescencia muy largos (≈ 730 ns) del 2,3-diazabicyclo[2,2,2]oct-2-eno cuando se desactiva por complejación con la β -CD. Esto puede usarse para determinar la constante de velocidad de asociación (pero no la de disociación) de la complejación del estado singlete excitado de este compuesto con β -CD [Zhang 02]. Los métodos anteriores conducen a valores precisos para las constantes de velocidad pero están limitados a los casos muy especiales presentados.

Los procesos de intercambio que se producen en las micelas pueden ser tan rápidos que no sea posible estudiarlos mediante los métodos cinéticos convencionales, que consisten en mezclar reactivos y monitorizar la formación de los productos. De hecho, los aparatos de mezcla rápida normalmente tienen un tiempo muerto de 1-10 ms y, por tanto, no permiten estudiar la cinética de reacciones con un tiempo medio de reacción menor que este límite. Este hecho llevó a usar métodos de relajación química (que se desarrollaron en la década de los 50) en los primeros estudios cinéticos en micelas. En estos métodos se parte de una mezcla de reactivos y productos en un estado de equilibrio termodinámico y se perturba este equilibrio de forma muy rápida cambiando uno de los parámetros externos: presión (salto de presión) o temperatura (salto de temperatura), por ejemplo. El sistema responde a la perturbación desplazándose hacia un nuevo estado de equilibrio, determinado por el nuevo valor del parámetro externo modificado. La evolución del sistema con el tiempo es una (o varias) constante de tiempo, el tiempo de relajación, que caracteriza la capacidad del sistema para responder a la perturbación. El tiempo de relajación depende de la constante de velocidad de la reacción investigada. Durante la década de los 70 se realizaron estudios

cinéticos en micelas con otros métodos como la desactivación de luminiscencia (fluorescencia o fosforescencia) resuelta en el tiempo, RMN, resonancia de espín electrónico (ESR) y reología [Zana 05].

La necesidad de perturbaciones externas, moléculas de desactivador o estados intermedios de larga vida puede superarse mediante la técnica de FCS. Este es un método de correlación de fluctuaciones que mide la dinámica de procesos moleculares basándose en pequeños cambios en la concentración molecular que se deben a fluctuaciones espontáneas alrededor del equilibrio. Esta técnica ofrece en una única medida un rango dinámico extremadamente amplio [Thompson 91, Eigen 94, Rigler 01, Zander 02]. Recientemente, la posibilidad de la detección de fotones individuales resuelta en el tiempo sin tiempo muerto junto con el desarrollo de algoritmos de correlación rápidos son las bases para registrar curvas de correlación en un intervalo temporal enorme, que va desde picosegundos a segundos [Felekyan 05]. El uso de la excitación láser en un dispositivo confocal permite trabajar con muy pequeños volúmenes de muestra y hace posible la medida de procesos dinámicos en disoluciones de concentraciones cada vez más pequeñas, hasta el límite de moléculas individuales. Nuestro grupo ha sido pionero en la utilización de esta técnica al estudio de la dinámica de asociación/disociación de sistemas supramoleculares, aplicándola en primer lugar a la dinámica de asociación con ciclodextrinas [Al-Soufi 05] y, más recientemente, a la dinámica de asociación con micelas [Novo 07]. Esta técnica permite el estudio de procesos dinámicos en el estado fundamental en un amplio intervalo temporal; en el extremo rápido sólo está limitada por la velocidad de excitación-desactivación del fluoróforo (aproximadamente 10^9 s^{-1}), y en el extremo lento, su límite está dado por el tiempo de difusión de la molécula en el volumen de muestra, que se encuentra en el intervalo temporal de los milisegundos.

Capítulo 3

Parte experimental

3.1 Reactivos

Los reactivos y disolventes empleados se citan a continuación:

- Pironina Y (51 %, *Sigma*).
- Pironina B (57 %, *Aldrich*).
- 7-Hidroxycumarina (99 %, *Aldrich*).
- Rodamina B (> 99 %, *Across Organics*).
- Rodamina 6G (*Fluka*).
- Hidróxido sódico (98 %, *Panreac*).
- Ácido perclórico, $\rho=1670$ g/L (70 %, para análisis, *Panreac*).
- Dihidrógeno fosfato sódico anhidro (≥ 99.0 %, para análisis *Fluka*).
- Monohidrógeno fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 99 %, para análisis, *Panreac*).
- β -ciclodextrina (*Roquette*, y *Fluka* ≥ 99 %, HPLC)
- γ -ciclodextrina (≥ 98 %, HPLC, *Fluka*; y *Cavamax*).
- Dodecilsulfato sódico (99+ %, *Sigma-Aldrich*).
- Decilsulfato sódico (≥ 99 %, purísimo para análisis de tensioactivos, *Fluka*).

- Bromuro de dodeciltrimetilamonio ($\approx 99\%$, *Sigma*).
- Bromuro de cetiltrimetilamonio (95%, *Aldrich*).
- Polietilenglicol dodeciléter, Brij 35 (*Fluka*).
- Preparado comercial de p-(1,1,3,3- tetrametilbutil)fenoxipolioxietilenglicoles conocido como Triton X-100, $\rho=1065$ g/L (*Fluka*).
- Agua desionizada filtrada con filtros *milli-Q* de *Millipore* (siempre que preparemos disoluciones en agua nos referimos a este tipo de agua).
- Etanol absoluto, $\rho=790$ g/L (99.9%, PAI, *Panreac*).
- Acetonitrilo, $\rho=781$ g/L (99.9%, PAI, *Panreac*).
- Acetona, $\rho=789$ g/L (99.8%, PAI, *Panreac*).
- 1,4-Dioxano seco, máximo de agua 0.01%, estabilizado con aproximadamente 2 ppm de BHT (hidroxitolueno butilado), $\rho=1033$ g/L (99.5%, PAI, *Panreac*).
- Ácido nítrico para la limpieza del material (65%, *Panreac*).

Estos reactivos se utilizaron tal y como se comercializan salvo en el caso de las pironinas (véase el apartado siguiente de preparación de disoluciones) y en la β -CD de *Roquete*. Esta ciclodextrina fue recrystalizada dos veces con agua destilada y secada en una estufa a vacío [Álvarez-Parrilla 01].

3.2 Preparación de disoluciones

En general, las disoluciones utilizadas para las medidas fueron preparadas por dilución de una disolución madre del fluoróforo y adición de los demás componentes (ácido, tensioactivo, ciclodextrina, etc.). En todos los casos se pesaron las cantidades de las disoluciones añadidas para mejorar la precisión de las concentraciones. En las series de medidas donde la concentración de fluoróforo debe mantenerse constante, se corrigieron las fluctuaciones en dicha concentración utilizando los datos de las masas.

Para la preparación de disoluciones de diferentes valores de pH, se adicionaron las cantidades adecuadas de ácido perclórico (disolución comercial o disoluciones preparadas por dilución de la misma) o de hidróxido sódico en disolución acuosa. El pH de las disoluciones acuosas se obtuvo por medida directa mediante un medidor de pH (*Crison*, modelo GLP 21, con electrodo *Crison* combinado, pH: 0-14, 0-100°C), salvo aquellas de pH inferior a 1, para las que el valor de pH fue calculado a partir del volumen de ácido añadido. En el caso de las disoluciones alcohólicas, el pH fue calculado a partir del volumen de ácido añadido.

La preparación de las disoluciones de 7-HC no presenta dificultad, pero es conveniente exponer algunos detalles a tener en cuenta para preparar disoluciones de pironinas.

Las disoluciones madre de pironinas se prepararon inicialmente disolviendo las pironinas en etanol purificado con HPLC. Entonces se observó que la intensidad de los espectros de emisión de disoluciones acuosas preparadas por dilución de dichas disoluciones madre no era reproducible. Los resultados obtenidos indicaban que en las disoluciones de pironina estaba presente otra especie fluorescente con emisión en torno a 430 nm y con un tiempo de vida de unos 5 ns. Ésta fue atribuida a la especie formada por un proceso análogo a la hidratación de la pironina, pero en este caso debido a la reacción con el alcohol. Esta reacción se trató de evitar empleando medio ácido pero tampoco así se consiguió que la intensidad de emisión fuera reproducible. Para la PB (para la que la hidratación es más efectiva) se observó que al diluir con etanol la disolución madre de pironina se producía un aumento sistemático de la banda de emisión de fluorescencia a 430 nm con el tiempo (figura 3.1), llegando incluso a superponerse con la banda de emisión de la pironina. Mientras que la banda de emisión de la PB apenas disminuía, la del producto de reacción aumentaba conforme transcurría el tiempo tras la preparación de la disolución. Esto es debido a que a la longitud de onda de excitación empleada (350 nm) absorbe mayoritariamente el producto de reacción y apenas absorbe la PB, por lo que se ve claramente la formación de una pequeña cantidad de producto sin que disminuya apenas la concentración de PB.

Dado que la reacción de hidratación de las pironinas implica un ataque nucleófilo, se comprendió que éste es más rápido en etanol que en agua por el mayor carácter nucleófilo de su base conjugada (EtO^-). Por tanto, se dedujo que el etanol no era un buen disolvente para la preparación de las disoluciones madre de pironinas.

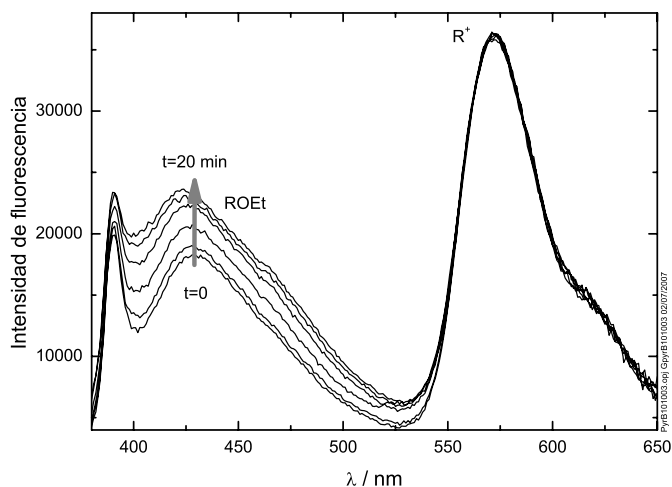


Figura 3.1: Variación de la intensidad de fluorescencia de la PB (R^+) y de su producto de reacción con etanol (ROEt) con el tiempo transcurrido tras la preparación de la disolución en etanol. Longitud de onda de excitación de 350 nm.

Se procedió entonces a preparar disoluciones madre de las pironinas en agua. Como las sustancias de partida tienen un elevado porcentaje de impurezas, se buscaron posibles métodos de purificación en la bibliografía. Schiller *et al.* [Schiller 87b] partieron de PY comercial con una pureza del 60%. Los intentos de purificación de este colorante por recristalización, cromatografía y extracción no tuvieron éxito. Sin embargo, se observó que esta pironina tiene como principal impureza un material insoluble en agua. Así, cuando las disoluciones acuosas de PY se filtran a través de un microfiltro se eliminan todas las impurezas insolubles detectables, consiguiéndose medidas reproducibles en condiciones de pH ácido. Por ello, se procedió a la preparación de las disoluciones madre partiendo del producto comercial sólido siguiendo los siguientes pasos:

- Se disuelve una pequeña cantidad de colorante sólido en unos 5 mL de agua en un vaso de precipitados.
- Se filtra la disolución con un filtro de nailon de microporo $0.45 \mu\text{m}$ con el fin de eliminar los posibles restos sólidos no disueltos y las impurezas insolubles en agua.
- Se guarda la disolución madre protegida de la luz, a baja temperatura ($3-4^\circ\text{C}$) durante un máximo de cinco días tras su preparación. Como se observa que la hidratación de la PB es más rápida que la de la PY, para esta pironina conviene preparar la disolución madre el mismo día de su utilización.

La pureza de estas disoluciones fue comprobada, para disoluciones preparadas realizando una dilución adecuada de la disolución madre, mediante comparación de los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión y de excitación, respectivamente. Se comprobó que los espectros de emisión coincidían perfectamente entre sí y con los espectros publicados para las pironinas en disolución acuosa. Los espectros de excitación eran independientes de la longitud de onda de emisión y coincidían satisfactoriamente con los espectros de absorción a concentraciones bajas de pironina.

Se observó que la PB en agua a pH bastante ácido (1.74) no es estable y precipita. Se comprobó entonces que el pH, que se modificó añadiendo a la disolución de pironina microgotas de HClO_4 o de NaOH , afecta al espectro de absorción de la pironina. Tal como se muestra en la figura 3.2, para una cierta concentración de pironina, la absorbancia es constante con el pH y con el tiempo a valores de pH entre 3 y 5, disminuyendo la absorbancia a valores de pH más ácidos, debido a la precipitación, y más básicos, debido a la hidratación y consecuente desaparición de una parte de la pironina. En la figura 3.2 los valores de pH a los que hay más de un valor de absorbancia se corresponden a la absorbancia de la misma disolución obtenida a diferentes tiempos tras su preparación. Cabe señalar que, mientras que en medios ácidos las variaciones de absorbancia con el tiempo no son sistemáticas, en medios básicos disminuye la absorbancia de la disolución conforme transcurre el tiempo debido a la hidratación. Para la PY también se estudió su estabilidad en función del pH y con el tiempo, comprobándose que la absorbancia se mantiene constante a valores de pH entre 2 y 5. El pH natural de las disoluciones madre de estas pironinas está dentro del intervalo de pH en que son estables y ha de tenerse la precaución de no salir de este intervalo al realizar diluciones. Para ello se utilizan disoluciones de ácido perclórico de pH 3.5-4 en lugar de agua para la dilución.

Para conocer la concentración de pironina se registra el espectro de absorción de una disolución preparada por dilución de la disolución madre, tal que su absorbancia no sea mayor de 1. A partir de la absorbancia, del coeficiente de absorción molar indicado en la bibliografía y teniendo en cuenta la dilución empleada, es posible obtener la concentración de pironina de la disolución madre. A pH neutro el coeficiente de absorción molar es $1.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tanto para la PY [El Baraka 91] como para la PB [Schiller 86] en sus respectivos máximos de absorción. Valores algo diferentes han sido publicados dependiendo del método de purificación utilizado [El Baraka 91, Schiller 87b]. Conviene indicar que la imprecisión de este valor no tiene influencia en los resultados de este trabajo, salvo en lo que respecta a los valores numéricos de las constantes de equilibrio de dimerización de las pironinas.

En las medidas de fluorescencia se observó que la intensidad del espectro de emisión de la PB sin CD no era totalmente reproducible (es decir, se obtenían espectros de diferente intensidad según las condiciones de preparación de la muestra), mientras que en presencia de CD sí lo era. Esto se achaca a la adsorción de esta pironina sobre las superficies de

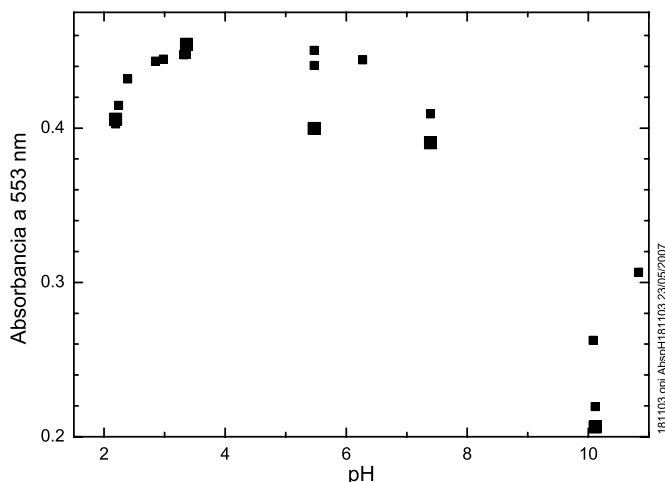


Figura 3.2: Variación de la absorbancia con el pH y con el tiempo (puntos más grandes a tiempos mayores) para la PB en el máximo del espectro de absorción.

vidrio [Schiller 86]. Para minimizar el problema de la adsorción se añadió una pequeña cantidad de β -CD ó de γ -CD a la disolución madre de PB utilizada para preparar las disoluciones para emisión y se enjuagaron los matraces y las cubetas varias veces con la disolución de pironina. Las pironinas, como la mayoría de los colorantes xanténicos, presentan un importante problema experimental consistente en la fuerte adsorción sobre las superficies de vidrio. Dicha adsorción se ve significativamente disminuida en superficies de cuarzo y también en presencia de pequeñas concentraciones de ciclodextrinas. Por ello, algunas de las disoluciones madre (especialmente las utilizadas en medidas de FCS), se prepararon adicionando una pequeña cantidad de CD. Además, el material de vidrio utilizado en la preparación de las disoluciones y las cubetas de medida fueron enjuagados varias veces con las disoluciones de pironinas para evitar cambios de concentración de pironina no deseados.

Las disoluciones acuosas de pironinas para las medidas de FCS se prepararon a partir de disoluciones madre mediante dilución en dos pasos. Primero, las disoluciones madre se diluyeron con una disolución acuosa de HClO_4 de $\text{pH} = 4.0 \pm 0.2$ hasta concentraciones 10 veces más altas que la concentración final. Las disoluciones para FCS de concentración de CD variable se prepararon a partir de estas disoluciones 10 veces más concentradas diluyendo un volumen constante de estas disoluciones de pironina con diferentes volúmenes de una disolución madre de CD y disolución de HClO_4 de $\text{pH} = 4$ como disolvente.

3.3 Aparatos de medida utilizados

Salvo que se indique lo contrario, todas las medidas de absorción, de emisión de fluorescencia y de los decaimientos de fluorescencia, se realizaron termostatazando las disoluciones a 20°C.

Espectrofotómetro Visible-Ultravioleta. Los espectros de absorción se midieron con un espectrofotómetro Vis-UV de doble haz *Cary 300* de *Varian*. Se usaron dos cubetas (la de la muestra y la de referencia) de cuarzo prismáticas. La temperatura se mantuvo constante mediante un termostato *Heto Denmark*.

Tras encender el aparato se esperan unos 10 minutos y se hace la línea base introduciendo disolvente en las dos cubetas, repitiéndose la línea base cada vez que varía el disolvente de la disolución de la que queremos medir la absorbancia. A continuación, se comprueba que la absorbancia del disolvente es cero. Una vez comprobado que la corrección es buena, se procede a la medida del espectro de absorción de la disolución, introduciéndola en la cubeta de la muestra. En las medidas con absorbancias elevadas se realizó una doble línea base, calibrando el 0 % y el 100 % de transmitancia.

En los espectros de disoluciones con ciclodextrina o surfactantes se corrigió el efecto óptico de estos introduciendo en la cubeta de referencia una disolución de la misma concentración que la de la muestra.

El espectro de absorción permite determinar la concentración de colorante adecuada de la disolución empleada para registrar el espectro de emisión de fluorescencia, ya que la muestra debe estar suficientemente diluida como para que su absorbancia sea menor de 0.1. En estas condiciones se puede asumir una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de colorante.

Espectrofluorímetro con resolución temporal. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro de *Edinburgh Analytical Instruments*, modelo *F900*, en cubetas prismáticas de fluorescencia. La temperatura se mantuvo constante con un termostato-criostato *Haake*. El espectrofluorímetro *F900* es un aparato modular que permite la medida de espectros de fluorescencia de estado estacionario, tanto de excitación como de emisión, con una sensibilidad muy elevada, así como la medida de tiempos de vida de fluorescencia con una resolución de nanosegundos, utilizando para ello la técnica de TCSPC. En la figura 3.3 se muestra el esquema óptico del aparato con sus componentes más importantes.

Para las medidas de fluorescencia de estado estacionario se utiliza una lámpara de Xenon de 450 W como fuente de excitación. El rango espectral de esta lámpara es de 200 a 2600 nm pero éste está restringido por el rango espectral del monocromador de excitación, que

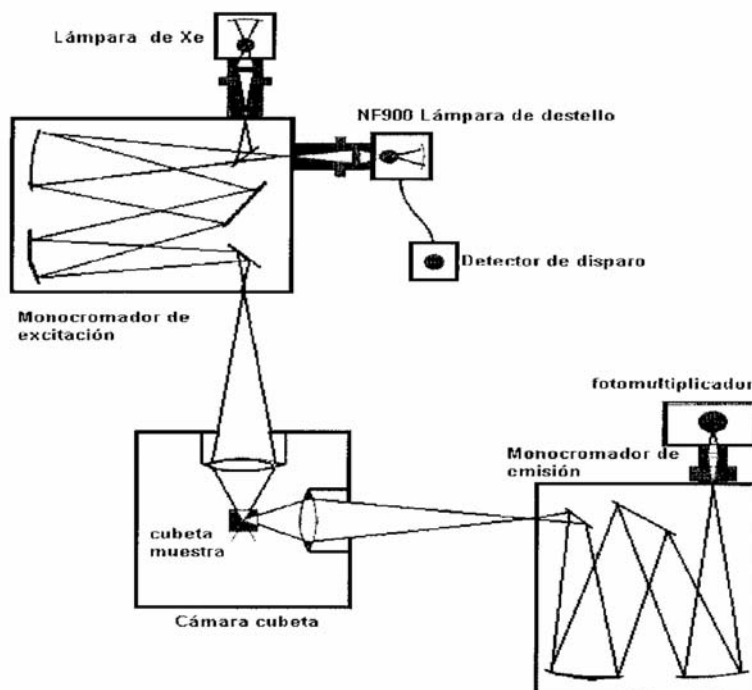


Figura 3.3: Esquema óptico del espectrofluorímetro de *Edinburgh Analytical Instruments*, modelo F900.

va de 200 a 900 nm. Los monocromadores de excitación y de emisión (*Czery-Turner*, red de difracción 1800 g/mm) poseen rendijas variables de forma continua entre 10 μm y 10 mm, que se ajustan manualmente. En cada experimento se eligieron las anchuras de rendijas adecuadas según la intensidad de fluorescencia de la muestra, evitando sobrepasar un número de cuentas máximo de 80000 cuentas por segundo y se mantuvieron constantes durante las medidas. Para evitar la reabsorción se emplearon disoluciones suficientemente diluidas.

En las medidas de los decaimientos de fluorescencia no se desoxigenaron las muestras debido al corto tiempo de vida de los colorantes objeto de estudio. Dado que los tiempos de vida de fluorescencia de las moléculas orgánicas son del orden de nanosegundos o picosegundos, es necesario utilizar técnicas especiales de gran resolución temporal para seguir la evolución de la emisión fluorescente con el tiempo, siendo la técnica de TCSPC (que usa este fluorímetro) quizás la más sensible de las existentes, ya que permite la medida de tiempos cortos y de decaimientos multiexponenciales con gran precisión, así como la obtención de espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo (TRES). En la figura 3.4 se muestra un diagrama esquemático de un instrumento convencional de TCSPC, sobre la base del cual se dará

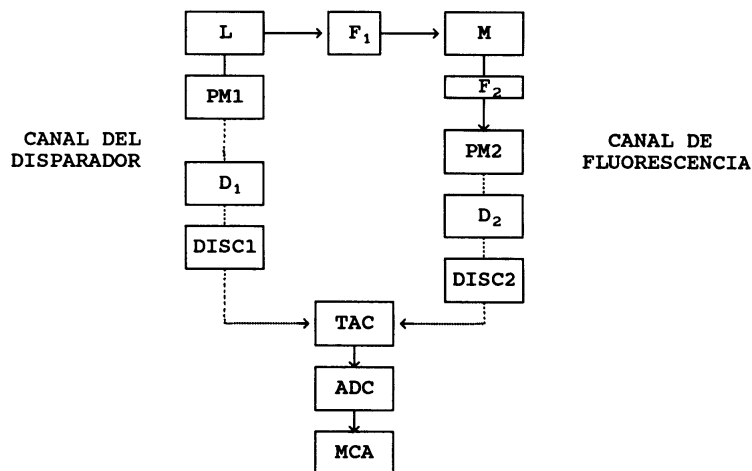


Figura 3.4: Diagrama de bloques convencional de TCSPC. (-) Señales ópticas; (---) Señales electrónicas; L: Fuente de excitación; PM1: Fotomultiplicador de disparo; PM2: Fotomultiplicador de fluorescencia; D1, D2: Líneas de retardo; DISC1: Discriminador para la señal del disparador; DISC2: Discriminador para la señal de fluorescencia; TAC: Convertidor tiempo-amplitud; ADC: Convertidor analógico-digital; MCA: Analizador multicanal.

una idea general del desarrollo del experimento, aunque se omitirán los detalles de la técnica que aparecen recogidos en diversas monografías sobre el tema [O'Connor 84, Ware 73].

Los componentes fundamentales de este equipo son: una lámpara de destello de pulsos de nanosegundos (L), un fotomultiplicador de disparo o de excitación (PM1), uno de parada o de fluorescencia (PM2), un convertidor tiempo-amplitud (TAC) y un analizador multicanal (MCA). Para las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo la fuente de excitación es, junto con el sistema de detección, factor determinante de la resolución temporal de un aparato de TCSPC.

La fuente de excitación utilizada es una lámpara de destello llena de gas H_2 a 0.4 bar, que presenta un pulso típico de unos 1.6 ns de ancho a la mitad de la altura. La estabilidad de la fuente de excitación es crucial para la validez de la integral de convolución usada en el procedimiento de análisis de datos. Se debe cuidar la limpieza de la lámpara, la estabilidad y la presión del gas si las medidas se realizan durante muchas horas o días. Las lámparas de pulsos deben tener electrodos limpios y desengrasados, situados en el centro de la cámara de la lámpara. Se recomienda que la lámpara opere en las condiciones de medida durante al menos media hora antes de medir, lo que permite estabilizar la descarga. Las condiciones utilizadas son: gas hidrógeno libre de oxígeno, presión de 0.3-0.4 bar, distancia entre los electrodos de 0.95 mm, voltaje de la lámpara de 7.0 kV y velocidad de repetición de 40.0 kHz.

La cámara que contiene la muestra permite alojar 3 cubetas. Tiene un motor que mueve las cubetas entre tres posiciones, cada una de las cuales sitúa ante el haz de luz una de las cubetas. La temperatura de las cubetas puede controlarse con un fluido (por ejemplo agua) de un baño termostatzado. Un sensor de temperaturas registra la temperatura del portacubetas, que se almacena con los datos de las medidas.

La luz que sale por la ventana frontal de la lámpara pasa por un iris atenuador y se dirige al monocromador de excitación, en el cuál se selecciona la longitud de onda y el ancho de banda de excitación. Esta luz excita la muestra, que entonces emite fluorescencia. El iris puede ajustarse de manera que la intensidad incidente en la muestra sea pequeña, ya que la base estadística de la técnica de TCSPC sólo es válida si la relación entre el número medio de cuentas por segundo que llega al detector y la frecuencia de excitación (40 kHz) es pequeña. Sólo bajo estas condiciones la distribución de probabilidad medida coincide con la evolución temporal de la fluorescencia de la muestra. Por ello, las medidas de TCSPC se realizaron manteniendo dicha relación por debajo de un valor límite de 0.05 (es decir, el número medio de cuentas que llegan al detector por segundo es menor de 2000).

El primer fotomultiplicador (PM1 o disparador) genera un pulso eléctrico a un tiempo exactamente correlacionado con el tiempo al que se excita la muestra. El pulso del disparador es conducido a través de un discriminador para poner en marcha el convertidor tiempo-amplitud (TAC), que comienza a cargar un condensador. Por el otro canal el pulso óptico excita la muestra y ésta emite fluorescencia, detectándose en el segundo fotomultiplicador (PM2) los fotones emitidos. En el momento en que llega el primer fotón al PM2, éste envía una señal de parada al TAC, que finaliza el proceso de carga del condensador y lanza un pulso cuya amplitud es proporcional a la carga del condensador y, por tanto, al intervalo de tiempo entre los dos pulsos (el procedente del PM1 y el del PM2). Este pulso en el convertidor analógico-digital (ADC) se convierte en un número, almacenándose una cuenta más en el canal del analizador multicanal (MCA) correspondiente a ese número. Tras muchos pulsos, el MCA presenta un histograma que indica la probabilidad de emisión de un único fotón en función del tiempo transcurrido tras la excitación. Se puede demostrar que la forma del histograma representa la dependencia temporal de la fluorescencia de la muestra. Dado que es una técnica de recuento se conoce exactamente la varianza de cada punto, que sigue una estadística de Poisson, por lo que el ruido es proporcional a la raíz cuadrada del número de cuentas.

Aparato de medida de correlación de fluorescencia. Las medidas de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia (FCS) se realizaron en un aparato desarrollado por el grupo del Profesor Claus Seidel, de la Universidad *Heinrich-Heine* de Düsseldorf. Los elementos más importantes del aparato (cuyo esquema se muestra en la figura 3.5) son: un láser de excitación, un microscopio invertido, un agujero puntual (“pinhole”), un sistema de detección de fotones individuales y tarjetas electrónicas de recuento de fotones. Las muestras fluores-

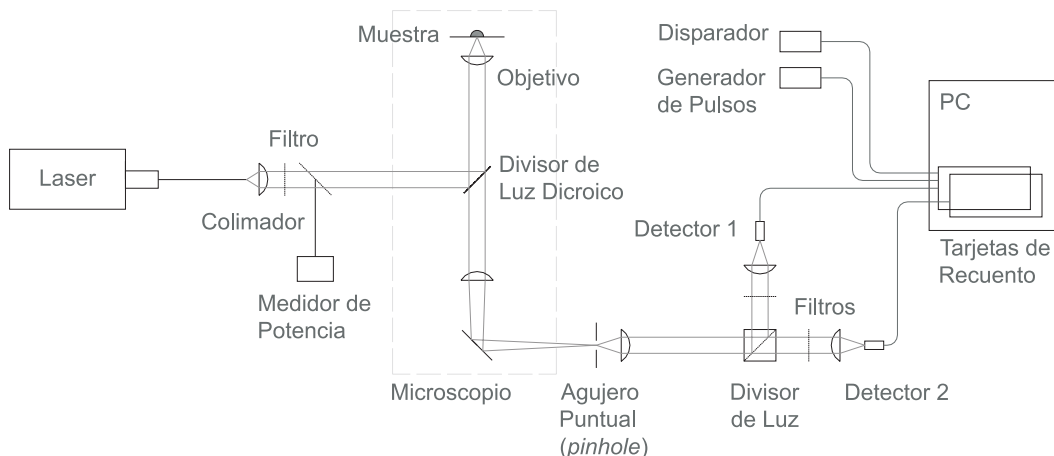


Figura 3.5: Diagrama de bloques del aparato desarrollado por el grupo del Profesor Claus Seidel de la Universidad *Heinrich-Heine* de Düsseldorf en el que se realizaron las medidas de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia.

centes se excitan con un láser de ión argón, en nuestro caso a la longitud de onda de 515 nm. Después de pasar por un divisor de luz dicroico, el haz láser se enfoca sobre la muestra con un objetivo de microscopio de gran apertura. La fluorescencia emitida por la muestra atraviesa el mismo objetivo y es reenfocada sobre un agujero puntual situado en el plano imagen. Dicha luz de fluorescencia se separa en dos haces mediante un divisor de luz y se detectan individualmente los fotones de los dos haces con fotodiodos de avalancha. Filtros de banda ancha situados delante de los detectores permiten discriminar la fluorescencia de la luz dispersa del láser a la longitud de onda de excitación y la luz Raman de moléculas de disolvente. Las dos señales resultantes se procesan y almacenan usando tarjetas de recuento de fotones TCSPC modificadas. Las curvas de correlación se calculan con una rutina rápida programada específicamente con el *software* LabVIEW® [Felekyan 05]. En las medidas presentadas en este trabajo, típicamente se recogieron 40 millones de fotones para cada curva de correlación con velocidades de recuento entre 50 y 350 kHz. Todas las medidas de FCS se realizaron a temperatura ambiente termostatazada a 21°C. La potencia de excitación del haz de luz se midió bajo el objetivo del microscopio con un medidor de potencia (*Coherent*). La potencia de excitación en el volumen de muestra fue típicamente de 290 μW , correspondiente a una irradiancia media de $I_0/2 \approx 25 \text{ kW/cm}^2$ [Eggeling 98].

El área focal y el volumen de detección en las condiciones experimentales de medida se obtuvieron usando un colorante de coeficiente de difusión conocido. Se usan para esto datos de medidas de correlación de la rodamina 6G en disoluciones acuosas medidas bajo las mismas condiciones que las otras muestras. Se ha encontrado el mismo valor de $(2.9 \pm 0.7) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para el coeficiente de difusión de la rodamina 6G en la biblio-

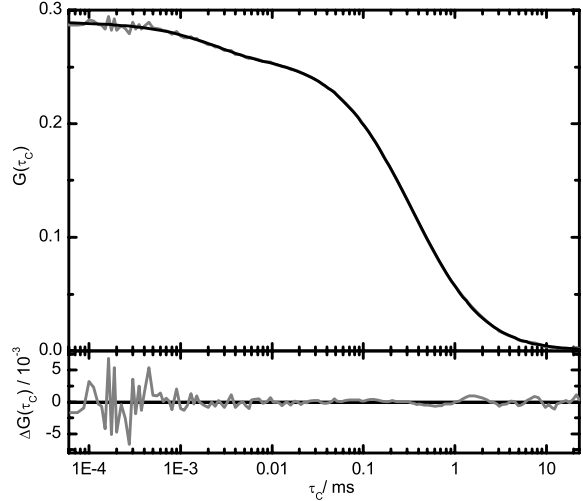


Figura 3.6: Ajuste de una curva de correlación del término de difusión de la rodamina 6G en agua medida en las mismas condiciones que las demás muestras.

grafía determinado por dos técnicas diferentes, FCS [Magde 74] y RMN [Gell 01], ambos a 25°C . El valor muestra una incertidumbre muy grande, del 25 %, pero coinciden en su valor medio. Todos los intervalos de error dados para los coeficientes de difusión de las moléculas en estudio, determinados en base a este coeficiente de difusión de la rodamina 6G, indican sólo su error estadístico (precisión) y no indican su exactitud, que está limitada fundamentalmente por la incertidumbre en este valor de referencia. La precisión se usa para comparaciones entre valores medidos respecto al mismo valor de referencia, mientras que la exactitud tiene que incluirse cuando se comparan estos valores con otros medidos con una técnica diferente.

Por tanto, para realizar la calibración con rodamina 6G se mide la curva de correlación de fluorescencia de esta rodamina (en las mismas condiciones que la serie de curvas de correlación) y se ajusta esta curva (véase la figura 3.6) con la función de correlación que incluye el término de difusión, dada por la ecuación (2.16). Como resultado de este ajuste se obtiene el tiempo de difusión de la rodamina 6G (0.359 ± 0.008 ms) y el factor geométrico del volumen de observación ($w = w_z/w_{xy} = 2.4 \pm 0.2$). De este tiempo de difusión y usando el valor conocido del coeficiente de difusión, de $(2.9 \pm 0.7) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, con la ecuación (2.17) se puede calcular el valor del radio del volumen de observación (w_{xy} ($0.64 \pm 0.01 \mu\text{m}$ para este ejemplo), definido como la distancia radial desde el eje óptico en la cual la intensidad disminuye a $1/e^2$ de su valor máximo. Por tanto, el radio $w_z = w \cdot w_{xy}$ del volumen de observación es para este ejemplo $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$. Todos los tiempos de difusión, tanto de la referencia como de las muestras, se midieron a la misma temperatura. De esta forma los efectos de temperatura y viscosidad se cancelan durante la calibración y todos los coeficien-

p34

p34

tes de difusión determinados se refieren a la temperatura a la que se da el valor de referencia de la rodamina 6G ($25^{\circ}C$).

En las medidas realizadas se intentaron evitar algunos factores experimentales, que fueron recientemente identificados como responsables de errores significativos en la determinación de coeficientes de difusión absolutos [Hess 02, Enderlein 04, Krouglova 04]:

1- Los efectos de saturación y fotoblanqueo durante las medidas de calibración con la rodamina 6G, que se evitaron reduciendo la irradiación por debajo de la saturación hasta que no se observó cambio en los tiempos de difusión y en la geometría deducida de la muestra

2- Las aberraciones se minimizaron al no enfocar el haz del láser hasta el límite de difracción. De esta forma las propiedades de difusión de las dos pironinas obtenidas de las curvas de correlación eran independientes de la irradiación.

Capítulo 4

Análisis de datos

Las modernas técnicas espectroscópicas suministran una gran cantidad de datos que hacen que sean necesarias técnicas matemáticas y estadísticas para extraer de ellos la máxima información posible.

4.1 Tipos de datos

4.1.1 Series de espectros de absorción

El sistema que nos ocupa es una disolución de un colorante que puede ver modificada una propiedad, en este caso la absorbancia, en función de varias variables: longitud de onda, pH, concentración de ligando, etc. La dependencia de una propiedad con dos variables puede visualizarse en un espacio tridimensional. Sin embargo, para estudiar la dependencia de una propiedad en función de tres variables necesitaríamos poder visualizar un espacio de cuatro dimensiones. Por ello, se estudia la variación simultánea de parejas de variables dejando fija la tercera. Concretamente, se estudia la variación de los espectros de absorción (variación con la longitud de onda) en función de una variable externa, por ejemplo la concentración. Es lo que llamamos series de espectros de absorción.

Estos datos obedecen a un modelo teórico que debe poder modificarse. Se requiere un análisis de datos adecuado que use toda la información de la que disponemos, es decir que se usen todos los datos de los espectros a todas las longitudes de onda registradas. Es lo que llamamos un ajuste global, en vez de los típicos ajustes individuales a una sola longitud de onda. La principal ventaja del ajuste global radica en la mejor optimización de los parámetros del modelo, pues la cantidad de información de que se dispone es mucho mayor

que si se analiza cada longitud de onda independientemente. Por otra parte, se reduce en gran medida la correlación entre parámetros que aparece en el análisis individual. Existen muchos programas comerciales que realizan ajustes no lineales, pero pocos son capaces de realizar el ajuste de forma global a varias curvas simultáneamente. Uno de ellos es el programa Origin[®], que aún realizando ajustes globales, éstos resultan demasiado lentos y se requieren un alto conocimiento del programa por parte del usuario.

Para plantear el modelo teórico es de gran ayuda conocer el número de componentes implicados en una serie de datos, lo que es posible con el análisis de componentes principales (PCA). Existen programas comerciales que realizan análisis de PCA, pero no están diseñados para tener en cuenta las particularidades de estos datos.

La necesidad de establecer criterios objetivos para la interpretación de datos espectroscópicos y de aprovechar las ventajas de realizar un ajuste global llevaron a nuestro grupo de investigación a desarrollar en Mathematica[®] un método denominado PCGA, que combina el análisis de componentes principales (PCA) con el análisis global no lineal (GA) para el análisis de series de espectros estáticos de absorción y de emisión en función de una variable externa (pH, tiempo, concentración, etc.) [Al-Soufi 01].

4.1.2 Series de espectros de fluorescencia

La intensidad de fluorescencia de una disolución de un fluoróforo, obtenida con medidas estáticas, puede modificarse en función de varias variables. Concretamente, se estudia la variación de los espectros de fluorescencia (variación con la longitud de onda de emisión) en función de una variable externa, por ejemplo la concentración de un ligando o la concentración de protones. Es lo que llamamos series de espectros de emisión de fluorescencia. Por las mismas razones expuestas anteriormente para el análisis de espectros de absorción, estos datos se analizarán con el análisis de PCGA programado en Mathematica[®] [Al-Soufi 01].

Conviene señalar aquí que el núcleo del programa de análisis es el mismo que el usado para el análisis de espectros de absorción, pero el pretratamiento de datos, por las características de los espectros de fluorescencia, es ligeramente diferente. Así, estos espectros deben ser corregidos por la no linealidad del detector y por las variaciones observadas en la intensidad de la lámpara.

La no linealidad del detector se debe a que, después de cada fotón registrado, el detector tiene un tiempo muerto en el cual no detecta los siguientes fotones incidentes con lo cual disminuye la sensibilidad de detección a altas intensidades de fluorescencia. La corrección por la no linealidad es más importante cuando la intensidad de fluorescencia de la muestra es alta. La intensidad de fluorescencia corregida por la no linealidad del detector, $F_{C_1}(\lambda)$

será:

$$F_C(\lambda) = \frac{F_{exp}(\lambda)}{1 - F_{exp}(\lambda)t_d} \quad (4.1)$$

donde:

$F_{exp}(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia experimental en cuentas por segundo.

t_d es el tiempo muerto de detección. Concretamente, el tiempo muerto de detección obtenido experimentalmente para el fotomultiplicador usado fue de $2.04 \cdot 10^{-6}$ s.

Las variaciones en la intensidad de la lámpara de excitación pueden corregirse si la intensidad de la lámpara se registra simultáneamente. Sin embargo, el programa comercial usado simplemente corrige por la intensidad de referencia medida durante un tiempo corto justo antes de cada espectro. Se comprobó que la corrección por la referencia medida durante un tiempo (10 s) antes de cada espectro no es suficiente debido a las variaciones en la intensidad de la lámpara durante el propio tiempo de medida del espectro. Para una mejor corrección se registran simultáneamente las variaciones en la intensidad de la lámpara midiendo, al mismo tiempo que el espectro de la muestra, un espectro de referencia en el segundo detector de que dispone el equipo. La corrección de la intensidad de fluorescencia por la intensidad de excitación se realiza entonces como se indica en la ecuación siguiente:

$$F_{C_2}(\lambda) = \frac{F_{C_1}(\lambda)F_{ref}^m(\lambda)}{F_{ref}(\lambda)} \quad (4.2)$$

donde:

$F_{C_2}(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia en cuentas por segundo una vez corregida por la no linealidad del detector y por la variación de intensidad de la lámpara.

$F_{ref}(\lambda)$ es la intensidad del espectro de referencia registrado al mismo tiempo que el espectro de fluorescencia de la muestra. La finalidad de este espectro es corregir las variaciones en la intensidad de la lámpara de excitación.

$F_{ref}^m(\lambda)$ es un número, que es el valor de la intensidad media de todos los espectros de referencia.

Esta segunda corrección no pudo ser llevada a cabo para todos los datos de este trabajo, ya que en los primeros años no se dispuso del sistema para registrar la intensidad de la lámpara simultáneamente.

Finalmente, para comparar los espectros de emisión de fluorescencia con los medidos en otro equipo y para la determinación de rendimientos cuánticos, es necesario corregir los espectros de emisión por la diferente sensibilidad del sistema de detección con la longitud de onda, utilizando para ello los factores de corrección del equipo. En este trabajo, se hablará de

espectros de emisión corregidos o no corregidos según se haya aplicado o no esta corrección, sin aludir con ello a las correcciones anteriormente descritas. Por el contrario, todos los espectros de excitación que se presentan en este trabajo han sido corregidos, por lo que para estos espectros ya no se indicará en cada caso que se trata de espectros corregidos.

4.1.3 Decaimientos de fluorescencia

La intensidad de fluorescencia de una disolución de un fluoróforo, obtenida con medidas resueltas en el tiempo, puede modificarse en función de varias variables. Concretamente, se estudia la variación de los decaimientos de fluorescencia (variación con el tiempo transcurrido tras la excitación de la muestra) en función de una variable externa, la concentración o la longitud de onda de emisión. De esta forma se genera una serie de datos de decaimientos de fluorescencia, que en el caso de la variable externa sea la longitud de onda recibe el nombre de espectros resueltos en el tiempo (*“Time resolved emission spectra”* o TRES).

A continuación presentamos los distintos métodos de análisis aplicados a estos decaimientos:

- Los análisis de los decaimientos individuales presentados en este trabajo se realizaron con el *software* de análisis de datos suministrado por *Edinburgh Analytical Instruments* con el algoritmo de Marquardt-Levenberg. Este análisis individual permite ajustar un modelo de cuatro exponenciales como máximo a un decaimiento experimental, aplicando una deconvolución con el pulso de excitación. De este análisis se obtienen los tiempos de vida, las amplitudes, el *“shift”* (desplazamiento temporal de los decaimientos) y la línea base con sus desviaciones estándar, siendo posible fijar cada uno de esos parámetros a valores conocidos. Como indicativos de la calidad del ajuste se obtiene la representación gráfica de la curva ajustada al decaimiento, de los residuos y del χ^2 .

- El análisis global de varios decaimientos simultáneamente que presenta el programa suministrado por *Edinburgh Analytical Instruments* es muy limitado, no tiene en cuenta algunas correcciones importantes y sólo permite su aplicación a datos tipo TRES. Debido a las deficiencias del *software* anteriormente descrito el análisis de datos tipo TRES con PCGA se implementó en Matlab®. El análisis de los TRES con PCGA permite distinguir especies emisoras no identificadas en los espectros estáticos con la condición de que presenten tiempos de vida diferentes. Por otra parte, el método de análisis global desarrollado permite corregir algunas distorsiones experimentales que no es posible su corrección con los análisis globales comerciales. En el caso de los datos de decaimientos de fluorescencia, este método permite realizar la deconvolución de cada uno de los decaimientos con el pulso de excitación correspondiente, de forma que es posible tener en cuenta la variación del pulso de excitación a lo largo del tiempo de medida de la serie de decaimientos. También se introduce la corrección del desplazamiento temporal o *“shift”* de los decaimientos respecto al pulso

de excitación a lo largo del tiempo de medida de la serie de decaimientos. Además permite el análisis global de datos obtenidos a distintos tiempos tras la excitación (decaimientos de fluorescencia) a distintas concentraciones: decaimientos de fluorescencia obtenidos a una longitud de onda de emisión fija para disoluciones con diferentes concentraciones. Los detalles ya fueron presentados en el trabajo de tesina de licenciatura [Reija 03].

4.1.4 Curvas de correlación de fluorescencia

Para el registro y el cálculo de las curvas de correlación con la resolución temporal de picosegundos necesaria para los sistemas bajo estudio se ha seguido el procedimiento desarrollado por el grupo del Prof. C.A.M. Seidel [Felekyan 05]. Con el fin de aumentar la resolución temporal se registran los fotones emitidos por la muestra simultáneamente mediante dos canales de detección independientes pero perfectamente sincronizados. De esta forma se evita la limitación temporal impuesta por el tiempo muerto de un solo canal de detección. Para cada uno de los fotones registrados se almacena su tiempo de llegada con resolución de picosegundos y el número del canal correspondiente. Al finalizar la medida se calcula la función de correlación cruzada entre los fotones registrados en los dos canales mediante un programa de LabVIEW[®] escrito por el mismo grupo.

Se han aplicado dos tipos de análisis para este tipo de datos:

1- Las curvas de correlación individuales se ajustaron usando el algoritmo de Levenberg-Marquardt programado en Labview[®] en el grupo del Prof. Claus A. M. Seidel [Felekyan 05].

2- Las series de curvas de correlación medidas a diferentes concentraciones de ligando se analizaron usando un análisis global dirigido programado en Origin[®]. Sin embargo, estos ajustes resultan muy lentos y se requiere un alto conocimiento del programa por parte del usuario. Por ello se ha desarrollado en nuestro grupo un programa en Matlab[®] que realiza estos ajustes de forma rápida y sin la necesidad de un alto grado de conocimiento del mismo [Granadero Rey 06].

4.2 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) reduce el número de variables experimentales usando nuevas variables (los componentes principales) que son combinaciones lineales de las variables originales. El primer componente principal está dirigido en la dirección de máxima variabilidad de los datos, el segundo componente principal es ortogonal al primer componente principal y está dirigido en la segunda dirección de máxima variación de los datos, y así sucesivamente. La idea fundamental del análisis de componentes principales en su aplicación a datos espectroscópicos es reducir una matriz de datos experimentales al menor número posible de componentes abstractos cuya combinación lineal permita reproducir toda la variación sistemática que hay en los datos experimentales. Este número mínimo de componentes abstractos proporciona el número mínimo de componentes espectrales presentes en la muestra.

PCA puede aplicarse a cualquier serie de espectros o de decaimientos, obtenidos al modificar una variable externa, que sea combinación lineal de un grupo fijo de espectros o de decaimientos puros. Este es el caso de casi todos los estudios de fluorescencia molecular o de absorción electrónica de sistemas químicos o bioquímicos, tales como equilibrios ácido-base, reacciones de transferencia de carga o de energía, equilibrios de agregación o complejación, etc. Una variable externa (pH, longitud de onda, concentración de un ligando o de un reactivo, temperatura, etc.) se modifica sistemáticamente para variar la concentración relativa de los componentes y, por tanto, su contribución relativa a los espectros o decaimientos resultantes. Las series de espectros o de decaimientos son sumas de los espectros o de los decaimientos de los componentes presentes en las muestras multiplicados por sus contribuciones al espectro o al decaimiento total, que dependen de las concentraciones de los componentes.

El espectro experimental para un valor i del parámetro externo, vector fila \mathbf{y}_i , es la suma de n_c espectros, vectores fila \mathbf{e}_j , por las contribuciones $d_{i,j}$ más el ruido experimental σ_i , como se indica en la ecuación siguiente:

$$\mathbf{y}_i = d_{i,1}\mathbf{e}_1 + d_{i,2}\mathbf{e}_2 + \dots + d_{i,n_c}\mathbf{e}_{n_c} + \sigma_i = \hat{\mathbf{y}}_i + \sigma_i \quad (4.3)$$

El decaimiento experimental para un valor j del parámetro externo (longitud de onda o concentración de ligando), vector columna \mathbf{y}_j , es la suma de n_c decaimientos, vectores columna \mathbf{d}_j , por las contribuciones $e_{i,j}$ más el ruido experimental σ_j , como se indica en la ecuación siguiente:

$$\mathbf{y}_j = e_{j,1}\mathbf{d}_1 + e_{j,2}\mathbf{d}_2 + \dots + e_{j,n_c}\mathbf{d}_{n_c} + \sigma_j = \hat{\mathbf{y}}_j + \sigma_j \quad (4.4)$$

El número de componentes observados se denota por n_c . Tanto n_s (número de filas de la matriz de datos \mathbf{Y}) como n_w (número de columnas) deben ser números mayores que n_c . Según

el tipo de datos, n_s puede ser mayor o menor que n_w . Así, en una serie de espectros estáticos a diferentes concentraciones de ligando suele ser mayor el número de longitudes de onda registradas (n_w) que el número de muestras con diferente concentración de ligando ($n_w > n_s$). Por el contrario, en el caso de decaimientos (datos tipo TRES o decaimientos obtenidos a diferentes concentraciones de ligando) suelen registrarse mayor número de tiempos ($n_w < n_s$).

Los espectros o decaimientos teóricos ($\hat{\mathbf{y}}_i, \hat{\mathbf{y}}_j$) son combinaciones lineales de los espectros o decaimientos de los componentes individuales en ausencia de ruido y reproducen la variación sistemática de los datos experimentales debida al cambio en el valor del parámetro externo. Usando la notación matricial los espectros teóricos $\hat{\mathbf{Y}}$ ($n_s \times n_w$) son el producto vectorial de dos matrices: la matriz \mathbf{D} ($n_s \times n_c$) por la matriz \mathbf{E} ($n_c \times n_w$).

$$\hat{\mathbf{Y}} = \mathbf{D} \times \mathbf{E} = \begin{pmatrix} d_{1,1} & d_{1,2} & \dots & \dots & d_{1,n_c} \\ d_{2,1} & d_{2,2} & \dots & \dots & d_{2,n_c} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ d_{n_s,1} & d_{n_s,2} & \dots & \dots & d_{n_s,n_c} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} e_{1,1} & e_{1,2} & \dots & \dots & e_{1,n_w} \\ e_{2,1} & e_{2,2} & \dots & \dots & e_{2,n_w} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ e_{n_c,1} & e_{n_c,2} & \dots & \dots & e_{n_c,n_w} \end{pmatrix} \quad (4.5)$$

Si una de estas matrices fuera conocida, sería fácil determinar la otra a partir de la ecuación (4.5). Pero en general no se conocen ni \mathbf{D} , ni \mathbf{E} , ni el número de componentes n_c . Según el álgebra lineal, si una serie de datos $\hat{\mathbf{Y}}$ es una combinación lineal de n_c espectros o decaimientos linealmente independientes, se necesitan como mínimo n_c componentes para reproducir la variación sistemática de $\hat{\mathbf{Y}}$ (siendo n_c el rango de $\hat{\mathbf{Y}}$). Así, si los espectros o los decaimientos de los componentes se sustituyesen por otros componentes abstractos, se necesitarían como mínimo n_c de estos componentes. El menor número de componentes abstractos \mathbf{v}_j necesario para reproducir la variación sistemática de $\hat{\mathbf{Y}}$ en las series de datos experimentales nos da directamente el número mínimo de componentes n_c . Así, la matriz teórica $\hat{\mathbf{Y}}$ ($n_s \times n_w$) también puede escribirse, como ya se ha visto en la ecuación (4.8), en función de unos componentes abstractos $\tilde{\mathbf{V}}$ ($n_c \times n_w$), mediante unos coeficientes $\tilde{\mathbf{Z}}$ ($n_s \times n_c$) que relacionan $\hat{\mathbf{Y}}$ y $\tilde{\mathbf{V}}$:

$$\hat{\mathbf{Y}} = \tilde{\mathbf{Z}} \times \tilde{\mathbf{V}} \quad (4.6)$$

Aunque los espectros \mathbf{E} sean desconocidos, al menos siempre se pueden encontrar unos espectros abstractos $\tilde{\mathbf{V}}$ que reproducen \mathbf{Y} de forma aproximada y permiten conocer el número de componentes diferentes presentes en la muestra, n_c . Estos espectros abstractos se calculan como los autovectores o vectores propios de la matriz de datos experimentales \mathbf{Y} .

Si se analiza una matriz de datos \mathbf{Y} $n_s \times n_w$ con $n_w < n_s$ se obtienen n_w componentes principales. Se puede expresar la matriz de datos \mathbf{Y} como el producto de la matriz de autovalores (\mathbf{Z}) por la matriz de los autovectores (\mathbf{V}) de \mathbf{Y} :

$$\mathbf{Y} = \mathbf{Z} \times \mathbf{V} \quad (4.7)$$

$n_s \times n_w \quad n_s \times n_w \quad n_w \times n_w$

Como generalmente se emplea un número de componentes principales (n_c) menor que el número de variables se truncan las matrices \mathbf{Z} y \mathbf{V} a n_c columnas y filas respectivamente por lo que la matriz de datos obtenida al incluir n_c componentes contiene un cierto error \mathbf{S} :

$$\underset{n_s \times n_w}{\mathbf{Y}} = \underset{n_s \times n_c}{\tilde{\mathbf{Z}}} \times \underset{n_c \times n_w}{\tilde{\mathbf{V}}} + \underset{n_s \times n_w}{\mathbf{S}} \quad (4.8)$$

La mayoría de los procedimientos propuestos para discernir entre componentes que reproducen variaciones sistemáticas en los datos (componentes estructurales) y los que reproducen el ruido presente en los datos experimentales (componentes residuales) consisten en realizar un análisis estadístico de los datos experimentales [Bevington 03, Kotz 82]. Sin embargo, estos métodos casi nunca son válidos en el caso de datos espectroscópicos. Para distinguir entre componentes estructurales y residuales combinamos los criterios estadísticos con una inspección visual de la dependencia de los residuos [Straume 92]. En este trabajo combinaremos gráficos de los autovectores, autovalores, de los valores del error medio residual y del valor del test estadístico de Durbin Watson con el análisis visual de los residuos calculados con un número creciente de componentes incluidos [Al-Soufi 01]:

a- Diagrama de autovectores: este gráfico de los primeros autovectores frente a la longitud de onda, la concentración de ligando o el tiempo permite ver cuál es el número de autovectores sistemáticos. El número de autovectores sistemáticos indica el número mínimo de componentes presentes en la muestra. Para una matriz de datos, obtenida con dos variables, son posibles dos representaciones de los autovectores, una frente a cada una de las variables.

b- Diagrama logarítmico de autovalores: los autovalores son una medida de la varianza de los correspondientes componentes principales abstractos por lo que su magnitud relativa indica cuántos componentes principales tienen una varianza significativamente distinta del ruido experimental inherente a las mediciones experimentales. Por tanto, el número de componentes principales con un autovalor por encima de este nivel de varianza corresponde al número mínimo de componentes estructurales. Este gráfico de los primeros autovalores λ_l frente al número del autovalor l muestra que los últimos autovalores tienen un valor prácticamente constante y se corresponden con componentes principales residuales de varianza casi constante, ya que reproducen el ruido aleatorio en los espectros y definen el nivel de varianza del ruido.

c- Diagrama de los errores medios residuales: este tipo de diagrama logarítmico refleja el error medio residual $\sigma_m(k)$, calculado incluyendo los k primeros componentes principales, frente a k . El error medio residual (o desviación media residual estándar) es una estimación de la desviación estándar entre los espectros experimentales \mathbf{Y} y los teóricos $\hat{\mathbf{Y}}(\mathbf{k})$ con sólo k componentes incluidos. Dividiendo este error entre el número de medidas o, mejor aún, entre el número de grados de libertad $(n_s - k)(n_w - k)$, puede estimarse el error medio de las medidas individuales. El error medio residual depende del número de componentes

principales incluidos en los espectros teóricos, pero debería alcanzar un valor constante una vez que se ha explicado cualquier variación sistemática. El error medio residual para k componentes incluidos se define como la raíz cuadrada de las diferencias entre el espectro experimental \mathbf{Y} y el teórico $\hat{\mathbf{Y}}$, dividido por el número de grados de libertad que quedan después de determinar los k componentes:

$$\sigma_m(k) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_s} \sum_{j=1}^{n_w} (y_{i,j} - \hat{y}_{i,j}(k))^2}{(n_s - k)(n_w - k)}} \quad (4.9)$$

Los valores de los errores medios residuales para distinto número de componentes incluidos pueden calcularse a partir de los autovalores de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\sigma_m(k) = \sqrt{\frac{\sum_{l=k+1}^{n_s} \lambda_l}{(n_s - k)(n_w - k)}} \quad (4.10)$$

El diagrama de errores medios residuales permite juzgar de un modo más cuantitativo la diferencia existente entre los datos experimentales y el dado por los primeros n_c componentes principales. Con pocos componentes principales la matriz teórica reproduce bastante mal los datos experimentales y conduce a valores elevados de los errores residuales. Si aumentamos el número de componentes incluidos para la estimación de los espectros experimentales \mathbf{Y} el error cometido disminuye mucho. Si sobrepasamos el valor n_c , los componentes principales que añadimos sólo añaden ruido a los datos teóricos sin variar el error medio estimado. Esto se debe a que cada uno de estos componentes principales representan aproximadamente la n_s -ésima parte del ruido total. Aunque al incluir más componentes (mayor n_c) en la ecuación (4.10) el numerador, varianza residual, disminuye también disminuye el denominador (número de grados de libertad) por lo que el error medio apenas disminuye al sobrepasar un número de componentes. Por tanto, el número de componentes presentes en la muestra es aquél que hay que incluir en el modelo para obtener un error medio residual prácticamente constante.

d- Gráfica de los valores del test de Durbin Watson: representa el valor de este parámetro para un número creciente de componentes incluidos. Una vez que todo el error sistemático de los espectros experimentales es reproducido por los primeros n_c componentes principales, los residuos entre los espectros teóricos, $\hat{y}_{i,j}(k)$, y los experimentales, $y_{i,j}$, deberían mostrar sólo ruido, es decir, variaciones aleatorias no correlacionadas entre sí, $r_{i,j}(k) = y_{i,j} - \hat{y}_{i,j}(k)$. El valor del Durbin Watson (DW) para el vector fila residual i -ésimo y para k componentes incluidos ($dw_i(k)$) es la suma de cuadrados de las diferencias entre los sucesivos valores de los residuos $r_{i,j-1}(k)$ y los $r_{i,j}(k)$, normalizados a la suma de cuadrados total de los vectores fila residuales:

$$dw_i(k) = \frac{\sum_{j=2}^{n_w} (r_{i,j}(k) - r_{i,j-1}(k))^2}{\sum_{j=1}^{n_w} (r_{i,j}(k))^2} \quad (4.11)$$

Si se incluyen pocos componentes (menos de los existentes en la muestra) los residuos $r_{i,j}(k)$ muestran una estructura sistemática con valores sucesivos similares correlacionados. Por ello las diferencias $(r_{i,j}(k) - r_{i,j-1}(k))^2$ suelen ser valores pequeños. Sin embargo, para residuos no correlacionados el valor de un residuo, $r_{i,j}(k)$, no depende de su predecesor, $r_{i,j-1}(k)$, y las diferencias al cuadrado son aleatorias y mayores que para residuos sistemáticos, oscilan en torno a un valor positivo que depende principalmente de la varianza de $r_{i,j}(k)$. El valor del Durbin Watson relaciona las diferencias entre residuos sucesivos con la varianza y es un valor constante que depende fundamentalmente de los grados de libertad del problema y del tipo de correlación. Para datos típicos, de 2 a 5 componentes, el valor crítico de $dw_i(k)$ está en torno a 1.5 ó 1.7 de forma que valores por debajo de este intervalo indican residuos correlacionados y valores superiores corresponden a residuos no correlacionados. Más que una aplicación meramente estadística con un valor límite exacto, analizaremos cuándo se produce el salto a un valor constante en la representación gráfica del valor medio del Durbin Watson $\overline{dw}(k)$, calculado como se indica en la ecuación siguiente frente al número de componentes incluidos k :

$$\overline{dw}(k) = \frac{\sum_{i=1}^{n_s} dw_i(k)}{n_s} \quad (4.12)$$

Además de este Durbin Watson, calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de la variable representada en las diferentes filas de la matriz (con n_s posibles valores), se puede calcular este parámetro como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de la variable cuya variación se produce al pasar de una columna a otra de la matriz de datos (con n_w posibles valores).

$$dw_j(k) = \frac{\sum_{i=2}^{n_s} (r_{i,j}(k) - r_{i-1,j}(k))^2}{\sum_{i=1}^{n_s} (r_{i,j}(k))^2} \quad (4.13)$$

$$(\overline{dw}(k))^* = \frac{\sum_{j=1}^{n_w} dw_j(k)}{n_w} \quad (4.14)$$

e- Análisis visual de los residuos. Los test mencionados hasta el momento determinan n_c como el número de componentes que reproducen variaciones mayores que las causadas por el ruido y, por tanto, sólo determinan un número mínimo de componentes estructurales. En estos métodos estadísticos sólo se analiza un promedio sobre todos los valores de las dos variables de la matriz de datos, lo cual puede dificultar la detección de componentes que sólo aparecen a determinados valores de estas variables. Por tanto, una inspección crítica de los residuos para un número creciente de componentes incluidos nos ayudará a obtener el número de componentes en una muestra. Los residuos de una matriz experimental pueden representarse en función de cualquiera de las dos variables que la definen.

Es importante señalar que la detección de n_c componentes no limita que el número de especies químicas sea n_c sino que puede haber especies que no absorben o fluorescen en esas condiciones experimentales o especies con la misma dependencia respecto a las variables estudiadas.

4.3 Análisis global

El análisis global de los datos de una matriz \mathbf{Y} comprende tres pasos:

a- Postulado del modelo para definir la matriz de dependencia de la absorbancia o de la intensidad de fluorescencia en función de los parámetros y de la variable externa.

b- Minimización de las diferencias entre la matriz de datos experimentales \mathbf{Y} y la matriz de valores estimados con los parámetros iniciales del modelo empleado o los procedentes de la iteración anterior $\hat{\mathbf{Y}} = \hat{\mathbf{D}} \times \hat{\mathbf{E}}$. La minimización combina el método de Levenberg-Marquardt para el ajuste de los parámetros no lineales y la regresión lineal ponderada para el ajuste de los parámetros lineales en una relación de retroalimentación ($\hat{\mathbf{E}} = \hat{\mathbf{D}}^+ \times \mathbf{Y}$, siendo $\hat{\mathbf{D}}^+$ la matriz pseudoinversa de $\hat{\mathbf{D}}$). Así, se consigue que el método sea más eficiente ya que la regresión lineal es mucho más rápida que el método de Marquardt. Con esto se permite el análisis global de un mayor número de longitudes de onda. La matriz de parámetros lineales estimados ($\hat{\mathbf{E}}$) es proporcionada por la regresión lineal. El método de ajuste consiste en minimizar el estadístico χ^2 cuya expresión es:

$$\chi^2 = \sum \sum (\mathbf{Y} - \hat{\mathbf{Y}})^2 \quad (4.15)$$

c- Comprobación de la validez del modelo usado, basándose en la bondad del ajuste, que se analiza fundamentalmente a través de las representaciones de residuos.

El análisis global se ha programado en nuestro grupo y usado para el tratamiento de series de espectros electrónicos (de absorción y emisión de fluorescencia) obtenidos en función de una variable externa, dando resultados muy satisfactorios [Al-Soufi 01]. Asimismo, el análisis global ha sido utilizado para ajustar decaimientos de fluorescencia medidos a diferentes longitudes de onda de emisión (TRES) [Reija 03]. Se ha programado también el análisis global para el ajuste de curvas de correlación de fluorescencia. Las particularidades de este ajuste se han descrito con detalle en un proyecto fin de carrera [Granadero Rey 06].

Según el tipo de datos a analizar, se obtienen los siguientes resultados a partir del análisis global:

a- El análisis global de espectros de absorción o de emisión de fluorescencia obtenidos a distintas concentraciones de alguna especie (protones, ligando, etc.), fijando un modelo para \mathbf{D} que describe la variación de la concentración de cada uno de los componentes en función de la concentración de dicha especie, permite obtener las constantes del modelo empleado y los espectros de cada uno de los componentes (espectros puros).

b- El análisis global de los datos tipo TRES permite obtener, fijando un modelo de decaimiento monoexponencial para cada uno de los componentes (\mathbf{D}), los tiempos de vida de los componentes que aparecen en dicho modelo y los espectros de cada uno de los componentes (espectros puros).

c- El análisis global de decaimientos (n_s tiempos registrados) obtenidos a distintas concentraciones de alguna especie (n_w) permite obtener los tiempos de vida del modelo mono-exponencial fijado para cada uno de los componentes de la muestra, y las contribuciones de cada uno de los decaimientos (\mathbf{E}). En este caso, y a diferencia de los dos anteriores, \mathbf{E} no toma cualquier valor sino que sigue un modelo que describe la dependencia de la matriz de contribuciones con la concentración de dicha especie (protones, ligando, etc.). Es lo que se conoce como análisis dirigido [Beechem 86, Beechem 92, Reija 05].

d- El análisis global dirigido de las curvas de correlación de fluorescencia a distintas concentraciones de ligando y potencia de excitación constante ha permitido obtener los valores de los tiempos de difusión de un fluoróforo libre y dentro del ligando (CD o micelas), y la constante cinética de salida del fluoróforo del ligando [Al-Soufi 05, Novo 07].

4.3.1 Estimación de errores en los parámetros de ajustes globales

El análisis global programado consiste en el ajuste de una función teórica (basada en un modelo) a la serie completa de datos experimentales usando mínimos cuadrados, de forma que algunos de los parámetros optimizables son comunes a todos los datos de una serie (parámetros globales). Como hemos dicho, el objetivo de un ajuste por mínimos cuadrados es la minimización de la suma de los cuadrados de los residuos, convenientemente ponderados (usando un peso w_i para cada dato i), según una serie de parámetros ajustables [Tellinghuisen 05]. Los residuos se definen como la diferencia entre los valores experimentales (y_i) y los estimados a partir del ajuste (\hat{y}_i):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4.16)$$

El error de los parámetros resultantes del ajuste es la varianza $\sigma_{a_j}^2$ de un parámetro ajustado a_j . Ésta se estima de los elementos de la diagonal de la matriz de varianza-covarianza \mathbf{V} ($v_{j,j}$). Esta matriz es la inversa de la matriz de curvatura de la superficie de χ^2 en el mínimo (α).

$$\mathbf{V} = \alpha^{-1} \quad (4.17)$$

Cuanto mayor es la curvatura de la superficie de χ^2 cerca del mínimo al variar el parámetro a_j , más pequeña es la incertidumbre en la determinación del valor de este parámetro.

Los elementos de la matriz α se calculan según la ecuación siguiente en la que σ_i^2 es la varianza del valor $y(x_i)$.

$$\alpha_{j,k} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_i^2} \frac{\partial \hat{y}_i}{\partial a_j} \cdot \frac{\partial \hat{y}_i}{\partial a_k} \quad (4.18)$$

El análisis global de los datos con los programas mencionados anteriormente permite estimar los parámetros del modelo propuesto: constantes (típicamente la constante de complejación)

del modelo que describe la variación de la concentración de cada uno de los componentes en función de su concentración (a y c), tiempos de vida (b y c), tiempos de difusión y constantes cinéticas (d). Los errores de estos parámetros se calculan con estos programas usando la teoría lineal de errores, dada en la ecuación (4.17) [Bevington 03]. El número de grados de libertad si el análisis no fuese global sería $n_s \cdot n_w - n_p$, es decir el número de datos de la serie ($n_s \cdot n_w$) menos el número de parámetros ajustados (libres).

En el caso de ajustes globales de una serie de espectros esta teoría lineal subestima el error debido a que supone que los datos de estos ajustes son estadísticamente independientes. Esto no es cierto en general porque por ejemplo los n_w intensidades de un espectro de emisión se obtienen a partir de la misma disolución con un error en la concentración común. El error calculado con la teoría lineal tampoco tiene en cuenta la correlación entre parámetros. Por tanto, la teoría lineal de errores es limitada para el caso del análisis global. Habría que repetir muchas veces el experimento para tener idea de la incertidumbre de los parámetros resultantes del ajuste. Otra posibilidad es estimar los errores de los parámetros mediante simulaciones de Monte Carlo para estimar los intervalos de confianza de los parámetros resultantes del ajuste global. Sin embargo, se requeriría realizar una simulación de Monte Carlo para cada experimento [López Hortas 06].

Para evitar realizar estas simulaciones, los errores presentados en este trabajo para el caso (a) son errores calculados con la teoría lineal multiplicados por la raíz cuadrada de n_w , si bien cabe destacar que el error real en los parámetros estimados no sería tan grande. Para los restantes casos (b, c y d) los errores presentados son los que resultan de la teoría lineal de errores ya que en estos casos esta teoría lineal es perfectamente válida.

Capítulo 5

Comportamiento fotofísico y complejación con ciclodextrinas de las pironinas Y y B

5.1 Complejación de pironinas Y y B con β -ciclodextrina

5.1.1 Resultados

Pironina Y

Se obtuvieron los espectros de excitación de una disolución acuosa de PY (a pH 4.9) de concentración tal que su absorbancia a cualquier longitud de onda fuese menor de 0.1 para evitar distorsiones en el espectro debidas a la reabsorción. Los espectros de excitación obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión, una vez normalizados, son prácticamente idénticos entre sí (véase figura 5.1) y coinciden bien con el espectro de absorción.

Se midieron varios espectros de absorción de disoluciones acuosas de concentración constante de PY en presencia de diferentes concentraciones de β -CD a pH 4.2. La adición de β -CD a una disolución acuosa de PY produce cambios sistemáticos en los espectros de absorción (figura 5.2): una disminución en la absorción y un desplazamiento de la banda de absorción hacia mayores longitudes de onda. Los espectros de absorción muestran un punto isobéstico a 553 nm.

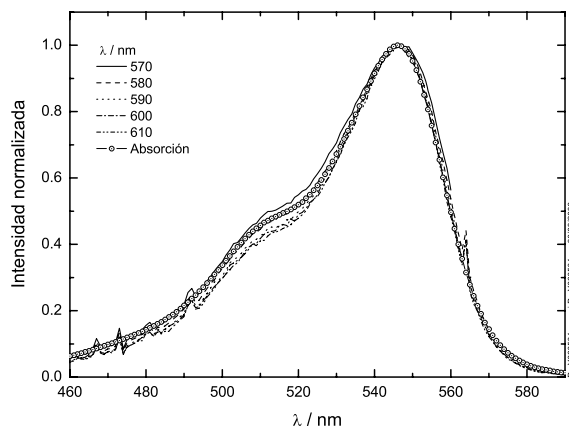


Figura 5.1: Espectros de excitación corregidos y normalizados en el máximo de la PY ($7.61 \cdot 10^{-7}$ M) en disolución acuosa a pH 4.9 obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión comparados con el espectro de absorción.

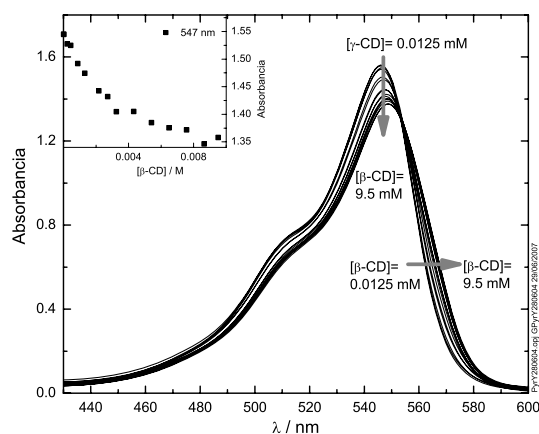


Figura 5.2: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de PY a pH 4.2 en presencia de diferentes concentraciones de β -CD para una concentración de PY de $1.23 \cdot 10^{-5}$ M. En la gráfica insertada se representa la variación de la absorbancia a 547 nm con la concentración total de β -CD.

Los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de PY (de concentración $7.90 \cdot 10^{-7}$ M) en presencia de diferentes concentraciones de β -CD a pH 3.4 se muestran en la figura 5.3. Se produce una disminución en la intensidad de fluorescencia al aumentar la

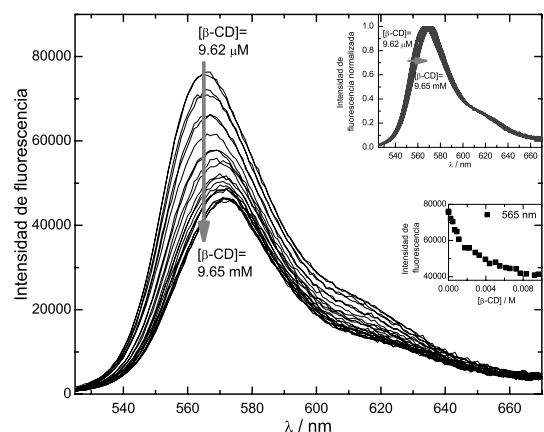


Figura 5.3: Espectros de emisión de fluorescencia corregidos de disoluciones acuosas de PY ($7.90 \cdot 10^{-7}$ M) a pH 3.4 en presencia de diferentes concentraciones de β -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm. La gráfica insertada superior muestra estos espectros normalizados en el máximo. En la gráfica insertada inferior se representa la variación de la intensidad de fluorescencia a 565 nm con la concentración de β -CD.

concentración de β -CD, que es más acusada que la observada en los espectros de absorción. Se observa que la adición de β -CD produce un desplazamiento sistemático de los espectros de emisión de fluorescencia hacia mayores longitudes de onda.

Utilizando rodamina B en etanol básico como referencia (con un rendimiento cuántico de 0.70, según López Arbeloa et al. [López Arbeloa 91]), se determinó el rendimiento cuántico de la PY en disolución acuosa, obteniéndose un valor de 0.47.

También se registraron los decaimientos de fluorescencia de la PY en presencia de diferentes concentraciones de β -CD. El ajuste individual de un modelo monoexponencial al decaimiento de fluorescencia registrado a 570 nm de una disolución acuosa de PY (a pH 3.8), que se muestra en la figura 5.4, conduce a unos residuos aleatorios que indican que el modelo es válido. El tiempo de vida de la PY en disolución acuosa así obtenido es 1.758 ± 0.004 ns.

Se midieron varios decaimientos de fluorescencia a 570 nm de disoluciones acuosas con la misma concentración de PY a pH 3.8 y distintas concentraciones de β -CD (ver tabla 5.1). En presencia de β -CD no es posible obtener buenos ajustes con un modelo monoexponencial por lo que estos se ajustaron de forma individual con un modelo biexponencial utilizando el propio programa de ajuste del aparato de medida.

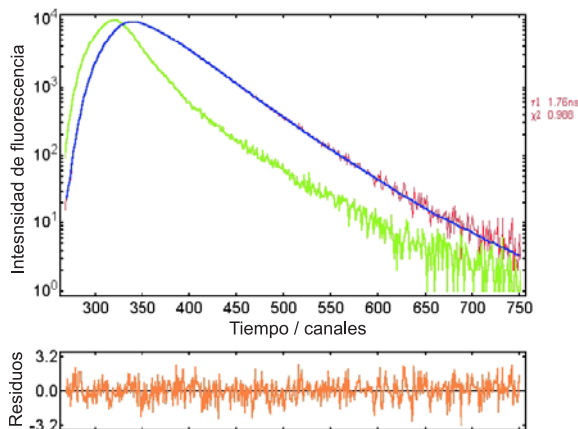


Figura 5.4: Decaimiento de fluorescencia a 570 nm de la PY en disolución acuosa sin β -CD, junto con el perfil del pulso de excitación correspondiente y la curva resultante del ajuste de un modelo monoexponencial. La longitud de onda de excitación usada fue 310 nm. En la gráfica inferior se muestran los residuos del ajuste.

En presencia de β -CD, además del tiempo de vida correspondiente a la PY en disolución acuosa, se observa un segundo componente de tiempo de vida más corto, en torno a 1 ns. La contribución a la emisión del componente con tiempo de vida más corto, dada por $E_{n,1}$, aumenta al aumentar la concentración de β -CD, mientras que la contribución a la emisión del tiempo de vida del tiempo de vida más largo, dada por $E_{n,2}$, disminuye al aumentar la concentración de β -CD.

Cabe señalar que los tiempos de vida de los dos componentes de estas muestras están en el límite de resolución del aparato utilizado debido a que, los fotones emitidos por la muestra caen mayoritariamente en la misma región temporal en la que se registran los fotones procedentes del pulso de la lámpara. Para optimizar los resultados en todos los casos se deconvolucionaron los decaimientos con el pulso de la lámpara medido directamente después de la medida del decaimiento.

Pironina B

Los espectros de excitación de una disolución acuosa de PB a pH 4.3 obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión, una vez normalizados, son prácticamente idénticos entre sí (figura 5.5) y concuerdan bastante bien con el espectro de absorción, aunque el hombro en torno a 515 nm presenta mayor intensidad en los primeros.

$[\beta\text{-CD}] / \text{mM}$	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
0	-	1.758 ± 0.004	-	100	0.988
0.541	0.7 ± 0.2	1.77 ± 0.02	16	84	0.971
1.08	1.0 ± 0.2	1.78 ± 0.04	30	70	1.06
2.17	1.0 ± 0.1	1.74 ± 0.04	38	62	1.07
5.42	1.11 ± 0.02	1.76 (f)	64	36	1.12
9.75	0.92 ± 0.03	1.76 (f)	52	48	1.38

Tabla 5.1: Tiempos de vida (τ_i) de disoluciones acuosas de PY (pH 3.8) con distintas concentraciones de β -CD obtenidos mediante análisis individuales de los decaimientos de fluorescencia registrados a 570 nm con un número fijo de cuentas en el máximo. La longitud de onda de excitación usada fue 310 nm. $E_{n,i}$ indica la contribución a la fluorescencia de cada una de las exponenciales. El parámetro estadístico χ^2 indica la calidad del ajuste. Los parámetros que se mantuvieron fijos en el ajuste se indican como (f).

Los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia registrados para disoluciones acuosas de PB en presencia de diferentes concentraciones de β -CD a pH constante se muestran en las figuras 5.6 y 5.7, respectivamente. La concentración empleada para los espectros de absorción fue de $1.26 \cdot 10^{-5}$ M y de $2.40 \cdot 10^{-6}$ M en los de emisión. La adición de β -CD produce cambios sistemáticos en los espectros de absorción y de emisión. Al igual que ocurría con la PY, al aumentar la concentración de β -CD se produce disminución de la absorbancia y de la intensidad de emisión de fluorescencia y los espectros, tanto de absorción como de emisión, se desplazan ligeramente hacia mayores longitudes de onda. Los espectros de absorción presentan un punto isobéptico a 559 nm.

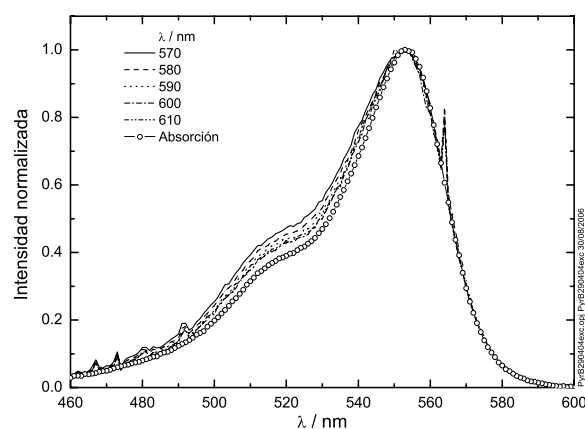


Figura 5.5: Espectros de excitación corregidos de una disolución acuosa de pH 4.3 de PB ($2.69 \cdot 10^{-6}$ M) registrados a diferentes longitudes de onda de emisión comparados con el espectro de absorción. Los espectros han sido normalizados en el máximo para facilitar la comparación.

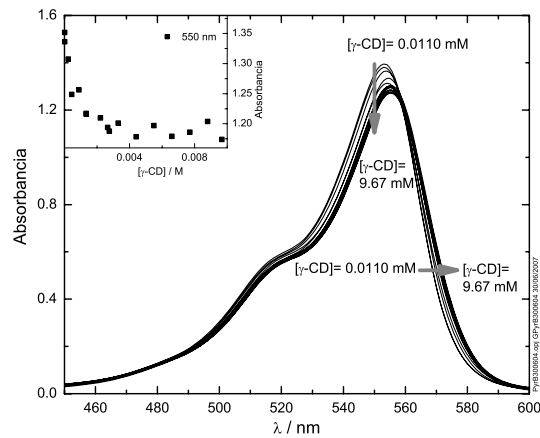


Figura 5.6: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de PB ($1.26 \cdot 10^{-5}$ M) a pH 3.4 en presencia de diferentes concentraciones de β -CD. En la gráfica insertada se representa la variación de la absorbancia a 550 nm con la concentración de β -CD.

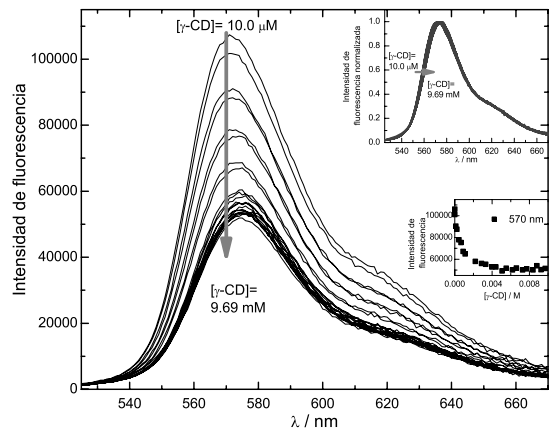


Figura 5.7: Espectros de emisión de fluorescencia corregidos de disoluciones acuosas de PB ($2.40 \cdot 10^{-6}$ M) a pH 3.9 en presencia de diferentes concentraciones de β -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm. La gráfica insertada superior muestra los espectros normalizados en el máximo. En la gráfica insertada inferior se representa la variación de la intensidad de fluorescencia a 570 nm con la concentración de β -CD.

$[\beta\text{-CD}] / \text{mM}$	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
0	1.17 ± 0.01	2.5 ± 0.5	98	2	1.16
0.0201	1.02 ± 0.01	2.4 ± 0.3	99	1	1.22
0.570	0.77 ± 0.02	1.58 ± 0.06	84	16	1.24
1.12	0.76 ± 0.01	2.05 ± 0.08	95	5	1.31
5.52	0.44 ± 0.01	1.81 ± 0.04	93	7	1.39

Tabla 5.2: Tiempos de vida (τ_i) de disoluciones acuosas de PB a pH 3.9 a distintas concentraciones de β -CD obtenidos mediante ajuste de un modelo biexponencial a los decaimientos registrados a 570 nm con un número fijo de cuentas en el máximo. La longitud de onda de excitación usada fue 310 nm. $E_{n,i}$ indica la contribución a la fluorescencia de cada uno de los componentes.

Utilizando rodamina B en etanol básico como referencia (con un rendimiento cuántico de 0.70, según López Arbeloa et al. [López Arbeloa 91]), se determinó el rendimiento cuántico de la PB en disolución acuosa, obteniéndose un valor de 0.36.

También se registraron los decaimientos de fluorescencia de la PB en presencia de diferentes concentraciones de β -CD. Los resultados de los ajustes individuales con un modelo biexponencial de los decaimientos obtenidos a 570 nm para disoluciones acuosas de PB a pH 3.9 con diferentes concentraciones de β -CD se muestran en la tabla 5.2. Los ajustes con este modelo biexponencial son, en general, satisfactorios. Sin embargo, se observa que existe un tiempo corto mayoritario (τ_1) cuyo valor disminuye al aumentar la concentración de β -CD, y un tiempo de vida minoritario (τ_2) algo mayor, cuyo valor y contribución varían sin una tendencia clara.

El hecho de que esos tiempos varíen con la concentración de β -CD, especialmente el tiempo τ_1 que disminuye sistemáticamente, lleva a pensar que los tiempos obtenidos en el ajuste biexponencial son tiempos de vida promedio de los tiempos de vida reales de las especies implicadas. Por ello se realizaron los ajustes con un modelo triexponencial de estos decaimientos de PB con β -CD, obteniéndose así tiempos de vida que no varían con la concentración de β -CD, tal como se muestra en la tabla 5.3. En ausencia de β -CD, el ajuste sigue siendo biexponencial, con un tiempo de vida mayoritario de 1.17 ns, y un tiempo algo más largo de muy pequeña contribución. Ese tiempo de vida mayoritario aparece también en presencia de β -CD, pero su contribución disminuye a medida que se incrementa la concentración de β -CD. Aparece, además, un tiempo de vida muy corto, de unos 0.5 ns, cuya contribución aumenta con la concentración de β -CD. En todos los casos la contribución al decaimiento de fluorescencia del tiempo de vida más largo ($\tau_3 \simeq 2.5$ ns), $E_{n,3}$, es muy pequeña.

$[\beta\text{-CD}] / \text{mM}$	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	$E_{n,3}$	χ^2
0	-	1.17 ± 0.01	2.5 ± 0.5	-	98	2	1.16
0.0201	0.55 (f)	1.381 ± 0.008	-	21	79	-	1.08
0.570	0.40 ± 0.09	1.23 ± 0.07	3.0 ± 0.8	51	49	1	1.21
1.12	0.35 ± 0.09	1.10 ± 0.07	2.7 ± 0.5	55	45	1	1.08
2.22	0.44 ± 0.03	1.15(f)	2.5 ± 0.4	73	27	1.0	1.17
5.52	0.45 ± 0.06	1.1 ± 0.1	3.5 ± 0.5	77	23	1.0	1.23

Tabla 5.3: Tiempos de vida de disoluciones acuosas de PB a pH 3.9 a distintas concentraciones de β -CD obtenidos en los ajustes triexponenciales individuales (salvo el primero) de los decaimientos registrados a 570 nm con un número fijo de cuentas en el máximo. La longitud de onda de excitación usada fue 310 nm. Los parámetros que se mantuvieron fijos en el ajuste se indican como (f). $E_{n,i}$ indica la contribución a la fluorescencia de cada uno de los componentes.

5.1.2 Discusión

Pironina Y

La coincidencia entre los espectros de excitación de la PY normalizados en el máximo registrados a distintas longitudes de onda de emisión y de éstos con el espectro de absorción (figura 5.1) indica que la fluorescencia de las disoluciones acuosas de esta pironina proviene de una única especie presente en el estado fundamental.

p90

La variación sistemática del espectro de absorción de la PY con la concentración de β -CD y el punto isobéptico observado (figura 5.2) sugieren la presencia de dos especies químicas en equilibrio.

p90

Con el fin de conocer el número de especies implicadas en las variaciones espectrales observadas se analizaron con PCA las series de espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de PY a diferentes concentraciones de β -CD mostradas en las figuras 5.2 y 5.3. Los resultados de estos análisis se muestran en las figuras 5.8 y 5.9, respectivamente. Las representaciones de los autovectores frente a la longitud de onda y frente a la concentración de β -CD (figuras 5.8 y 5.9, **a** y **b**) indican dos componentes, ya que los dos primeros autovectores reproducen variaciones sistemáticas mientras que los restantes son aleatorios, salvo la representación de los autovectores de la serie de espectros de absorción frente a la longitud de onda en la que los cuatro primeros autovectores presentan variaciones sistemáticas. Este efecto es típico de los espectros de absorción que se ven afectados por artefactos inherentes a la técnica de medida [Al-Soufi 01]. Parámetros instrumentales como la línea base varían inevitablemente de una medida a otra y producen cambios sistemáticos en los espectros que no son reproducidos por los componentes principales estructurales. Por tanto, la región de ruido aleatorio se alcanza lentamente, tras la inclusión de un elevado número de componentes.

p90

p91

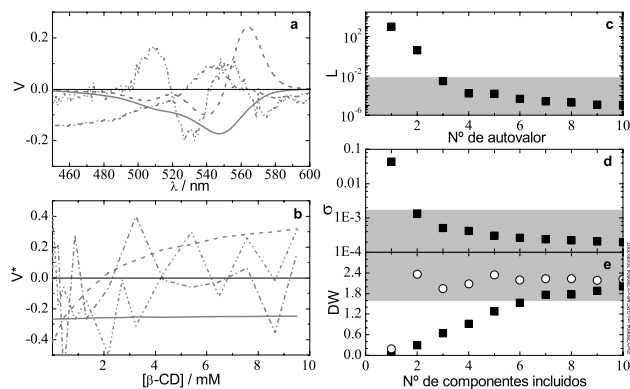


Figura 5.8: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de PY en presencia de diferentes concentraciones de β -CD a pH 4.2 (figura 5.2). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de β -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (-·-) y cuarto (··-); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de β -CD (círculos).

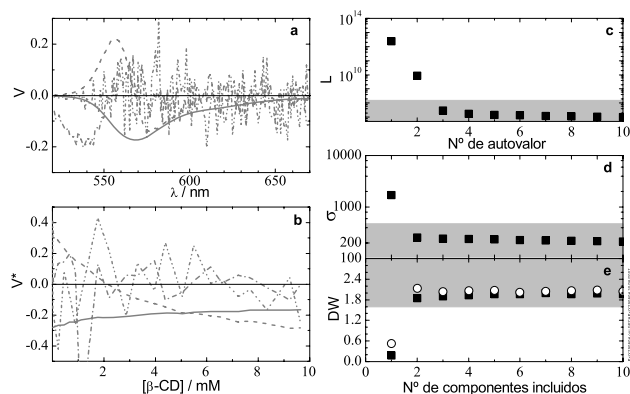


Figura 5.9: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia corregidos de disoluciones acuosas de PY en presencia de diferentes concentraciones de β -CD a pH 3.4 (datos de la figura 5.3). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de β -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (-·-) y cuarto (··-); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de β -CD (círculos).

En los diagramas logarítmicos de los autovalores (figuras 5.8 y 5.9, **c**) de la serie de espectros de absorción y emisión se observa que los dos primeros autovalores son mucho mayores que los restantes. Según este criterio el número de componentes estructurales en estas series sería de dos, ya que la varianza explicada por los dos primeros componentes es mucho mayor que la varianza residual. Esta diferencia entre varianza estructural y residual se ve de forma menos clara en la serie de espectros de absorción que en los de emisión por el problema mencionado anteriormente.

Los diagramas de los errores medios residuales (figuras 5.8 y 5.9, **d**) indican que el nivel del error medio correspondiente al ruido se alcanza al incluir dos componentes. Este criterio limita el número de componentes estructurales a dos. Al igual que en el diagrama logarítmico de los autovalores, los dos componentes se ven de forma más clara en los resultados de PCA de la serie de espectros de emisión.

Las gráficas de Durbin Watson (figuras 5.8 y 5.9, **e**) indican que con dos componentes el valor del estadístico de Durbin Watson alcanza un valor similar al obtenido al incluir más componentes. La única excepción es el estadístico de Durbin Watson de la serie de espectros de absorción calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes longitudes de onda, donde este parámetro no alcanza un valor constante sino que aumenta de forma progresiva al aumentar el número de componentes. De nuevo, los artefactos instrumentales presentes en los espectros de absorción hacen fallar los criterios basados en las variaciones espectrales para este tipo de datos.

Por tanto, el análisis de PCA indica que las variaciones del espectro de absorción y del espectro de emisión de la PY con la concentración de β -CD pueden explicarse con dos componentes espectrales que corresponderían a un mínimo de dos especies químicas diferentes.

Las dos especies químicas indicadas por PCA deben asignarse sobre la base de un modelo químico adecuado. El modelo más simple a considerar (figura 5.10) es la existencia de un equilibrio entre la PY libre y el complejo de estequiometría 1:1 entre la PY y la β -CD (PY: β -CD). Los procesos de interconversión en el estado fundamental dan lugar a una constante de equilibrio de complejación K característica del proceso. En el estado excitado, teniendo en cuenta los cortos tiempos de vida de estas especies, no es de esperar procesos de asociación/disociación. Según esto, tanto los espectros de absorción como los de emisión a cualquier concentración de β -CD son combinaciones lineales de los espectros de absorción y de emisión característicos de las dos especies presentes, la PY libre y el complejo PY: β -CD, con mayor o menor contribución según las concentraciones de equilibrio de estas especies.

Con la definición de la constante de equilibrio de complejación que se deriva del mecanismo indicado en la figura 5.10:

$$K = \frac{[P : CD]}{[P][CD]} \quad (5.1)$$

y el balance de materia aplicado al fluoróforo, donde $[P]_0$ es la concentración inicial de fluoróforo que, en presencia de CD, está libre o complejoado:

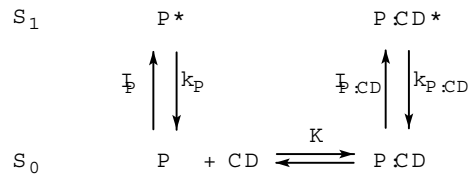


Figura 5.10: Mecanismo propuesto para explicar el comportamiento de un fluoróforo (P) que forma un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 con una CD (P:CD) en su estado singlete fundamental (S_0). Se indican con un asterisco las moléculas en el estado singlete excitado (S_1).

$$[P]_0 = [P] + [P : CD] \quad (5.2)$$

se obtienen expresiones para las concentraciones de equilibrio de P y complejo P:CD en el estado fundamental en función de las concentraciones iniciales y la constante de equilibrio:

$$[P] = \frac{[P]_0}{1 + K[CD]} \approx \frac{[P]_0}{1 + K[CD]_0} \quad (5.3)$$

$$[P : CD] = \frac{K[CD][P]_0}{1 + K[CD]} \approx \frac{K[CD]_0[P]_0}{1 + K[CD]_0} \quad (5.4)$$

En estas ecuaciones se ha utilizado la aproximación de que la concentración de CD de equilibrio $[CD]$ coincide con la total $[CD]_0$ al ser mucho mayor que la concentración inicial de fluoróforo.

La absorbancia de una muestra a una longitud de onda λ , $\mathcal{A}(\lambda)$, es la suma de las absorbancias de los componentes de la muestra: el fluoróforo libre y el complejo de inclusión formado entre el fluoróforo y la ciclodextrina (la CD no absorbe ni emite fluorescencia). Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer:

$$\mathcal{A}(\lambda) = \mathcal{A}_P(\lambda) + \mathcal{A}_{P:CD}(\lambda) = \varepsilon_P(\lambda)l[P] + \varepsilon_{P:CD}(\lambda)l[P : CD] \quad (5.5)$$

donde $\varepsilon_P(\lambda)$ y $\varepsilon_{P:CD}(\lambda)$ son los coeficientes de absortividad molar del fluoróforo y del complejo formado entre éste y la CD a la longitud de onda λ , respectivamente, l es el espesor de disolución que es atravesada por la radiación y $[P]$ y $[P : CD]$ son las concentraciones de equilibrio de fluoróforo libre y complejado, respectivamente. Sustituyendo en esta expresión los valores de la concentración de CD libre y complejada por los dados en las ecuaciones (5.3) y (5.4) se obtiene:

$$\mathcal{A}(\lambda) = \frac{A_1(\lambda) + A_2(\lambda)K[CD]_0}{1 + K[CD]_0} \quad (5.6)$$

$$A_1(\lambda) = \varepsilon_P(\lambda)l[P]_0 \quad (5.7)$$

$$A_2(\lambda) = \varepsilon_{P:CD}(\lambda)l[P]_0 \quad (5.8)$$

En la expresión (5.6) aparece la constante de equilibrio de complejación K y los parámetros $A_1(\lambda)$ y $A_2(\lambda)$ representan las absorbancias del fluoróforo libre y del complejo fluoróforo:CD a la longitud de onda λ . Las representaciones gráficas de los valores de $A_1(\lambda)$ y $A_2(\lambda)$ en función de la longitud de onda constituyen los espectros de absorción de las dos especies, fluoróforo libre y complejo fluoróforo:CD, para la concentración total de fluoróforo utilizada.

La intensidad de fluorescencia medida a cualquier longitud de onda λ , $F(\lambda)$, es la suma de las intensidades de fluorescencia de fluoróforo libre y del complejo formado entre el fluoróforo y la ciclodextrina, cada una de las cuales es proporcional a sus concentraciones de estado estacionario en el estado excitado:

$$F(\lambda) = k_{rP}\sigma_P(\lambda)[P^*]_{SS} + k_{rP:CD}\sigma_{P:CD}(\lambda)[P : CD^*]_{SS} \quad (5.9)$$

En esta ecuación k_{rP} y $k_{rP:CD}$ son las constantes de velocidad de desactivación radiante de P y de P:CD, respectivamente; y $\sigma_P(\lambda)$ y $\sigma_{P:CD}(\lambda)$ son constantes que dependen de las condiciones experimentales en que se realiza la medida y de la longitud de onda de detección λ .

Las concentraciones de estado estacionario de las especies existentes en el estado excitado, según el mecanismo propuesto de la figura 5.10, son directamente proporcionales a las intensidades de radiación absorbidas (I_P e $I_{P:CD}$) e inversamente proporcionales a sus constantes de velocidad de desactivación (k_P y $k_{P:CD}$) y vienen dadas por las ecuaciones siguientes:

$$[P^*]_{SS} = \frac{I_P}{k_P} \quad (5.10)$$

$$[P : CD^*]_{SS} = \frac{I_{P:CD}}{k_{P:CD}} \quad (5.11)$$

Dado que la absorbancia a la longitud de onda de excitación de las disoluciones utilizadas fue suficientemente baja para que la intensidad de radiación absorbida en la unidad de tiempo para cada especie del estado fundamental se pueda considerar directamente proporcional a su absorbancia, se cumple:

$$I_P = I_i\varepsilon_P l[P] \quad (5.12)$$

$$I_{P:CD} = I_i\varepsilon_{P:CD} l[P : CD] \quad (5.13)$$

En estas ecuaciones I_i es la intensidad de radiación incidente por unidad de tiempo, ε_P y $\varepsilon_{P:CD}$ son los coeficientes de absorptividad molar de P y del complejo P:CD a la longitud de onda de excitación y l es el espesor de la cubeta. Sustituyendo estos valores de I_P y de

$I_{P:CD}$ en las ecuaciones (5.10) y (5.11) y posteriormente en la ecuación (5.9), se obtiene la siguiente expresión:

$$F(\lambda) = \frac{k_{rP}\sigma_P(\lambda)I_i\varepsilon_P l[P]}{k_P} + \frac{k_{rP:CD}\sigma_{P:CD}(\lambda)I_i\varepsilon_{P:CD} l[P:CD]}{k_{P:CD}} \quad (5.14)$$

Sustituyendo en esta ecuación las expresiones para las concentraciones de equilibrio de P y de P:CD, dadas en las ecuaciones (5.3) y (5.4), se llega a una expresión que indica la dependencia de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda dada con la constante de complejación y la concentración total de CD:

$$F(\lambda) = \frac{F_1(\lambda) + F_2(\lambda)K[CD]_0}{1 + K[CD]_0} \quad (5.15)$$

siendo:

$$F_1(\lambda) = \frac{k_{rP}\sigma_P(\lambda)I_i\varepsilon_P l[P]_0}{k_P} \quad (5.16)$$

$$F_2(\lambda) = \frac{k_{rP:CD}\sigma_{P:CD}(\lambda)I_i\varepsilon_{P:CD} l[P]_0}{k_{P:CD}} \quad (5.17)$$

En la expresión (5.15), aparece la constante de equilibrio de complejación en el estado fundamental (K) y los parámetros $F_1(\lambda)$ y $F_2(\lambda)$ representan las intensidades de fluorescencia a la longitud de onda λ del fluoróforo libre y del complejo fluoróforo:CD, respectivamente, cuando todo el fluoróforo se encuentra en esa forma y en las condiciones experimentales empleadas para la medida de los espectros de emisión. Las representaciones gráficas de estos parámetros frente a la longitud de onda constituyen los espectros de emisión del fluoróforo libre y del complejo fluoróforo:CD. Debe resaltarse, sin embargo, que las intensidades relativas de estos espectros dependen de las absorptividades molares de las dos especies a la longitud de onda de excitación utilizada.

Dado que las ecuaciones (5.6) y (5.15) son idénticas en forma (sólo varía el significado de las constantes $A_1(\lambda)$ y $A_2(\lambda)$ respecto a $F_1(\lambda)$ y $F_2(\lambda)$) el modelo empleado en el análisis global es el mismo para los datos de absorción y fluorescencia. Estas ecuaciones pueden dividirse en dos sumandos, el primero que indica la contribución a la absorción o a la fluorescencia del fluoróforo libre (E_1) y el segundo que corresponde a la contribución de P:CD (E_2):

$$E_1(\lambda) = \frac{A_1(\lambda)}{1 + K[CD]_0} \quad \text{o bien} \quad = \frac{F_1(\lambda)}{1 + K[CD]_0} \quad (5.18)$$

$$E_2(\lambda) = \frac{A_2(\lambda)K[CD]_0}{1 + K[CD]_0} \quad \text{o bien} \quad = \frac{F_2(\lambda)K[CD]_0}{1 + K[CD]_0} \quad (5.19)$$

Una vez establecido el modelo, se procedió al análisis global de la serie de espectros de absorción y de la serie de espectros de emisión experimentales, cuyos resultados se muestran en el CD adjunto (C5_Ajuste1_PYbetaCD_absorcion.pdf y

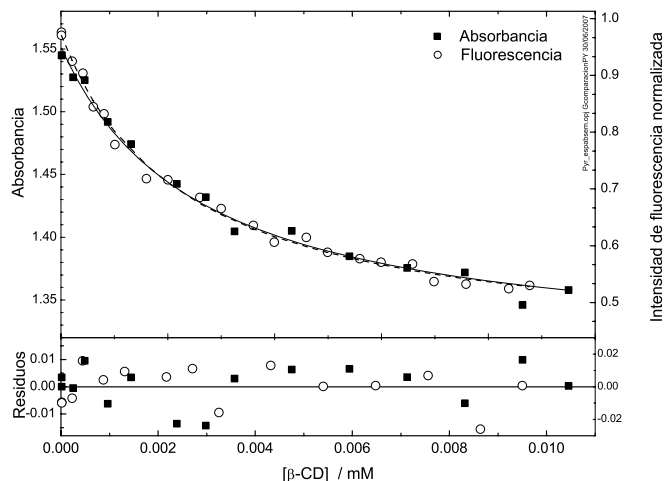


Figura 5.11: Variación de la absorbancia a 547 nm (cuadrados) y de la intensidad de fluorescencia corregida a 565 nm (círculos) de disoluciones acuosas de PY con distintas concentraciones de β -CD. Los puntos son datos experimentales y las curvas representan las variaciones teóricas según los parámetros resultantes del ajuste global (la línea continua para la variación de la absorbancia y la discontinua para la variación de la intensidad de fluorescencia). La gráfica inferior muestra los residuos para ambas series de datos.

C5_Ajuste2_PYbetaCD_emision.pdf, respectivamente). Los ajustes fueron satisfactorios, como se puede observar en los residuos correspondientes, hecho que apoya la validez del modelo aplicado. La calidad de los ajustes globales puede verse en representaciones como la de la figura 5.11 para una cierta longitud de onda de absorción y de emisión, mostradas a modo de ejemplo. Se observa que las curvas optimizadas resultantes de la minimización concuerdan bien con los datos experimentales y que los residuos son aleatorios.

Los resultados fundamentales de estos ajustes son los siguientes:

- Los espectros de absorción (figura 5.12) y de emisión de fluorescencia (figura 5.13) de la pironina libre y del complejo PY: β -CD cuando toda la pironina presente en la muestra se encuentra libre o complejada, respectivamente. Los espectros así obtenidos para la PY libre coinciden, como sería de esperar, con los espectros experimentales a concentración de β -CD igual a cero. Se observa que los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de los dos componentes son similares, aunque el espectro del complejo tiene menor intensidad y está ligeramente desplazado hacia mayores longitudes de onda tanto en el caso de absorción como en el de emisión.

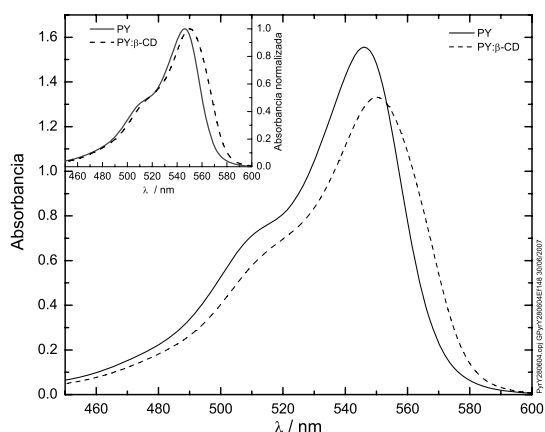


Figura 5.12: Espectros de absorción de la PY libre y del complejo PY: β -CD obtenidos mediante análisis global de la serie de espectros de absorción de la PY a distintas concentraciones de β -CD para una concentración de PY de $1.23 \cdot 10^{-5}$ M. Se inserta una gráfica con los espectros normalizados en el máximo.

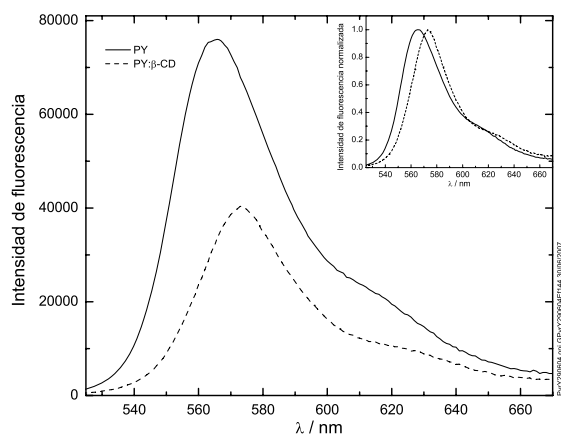


Figura 5.13: Espectros de emisión de fluorescencia corregidos de la PY libre y del complejo PY: β -CD obtenidos mediante análisis global de una serie de espectros de emisión de la PY en función de la concentración de β -CD para una concentración de PY de $7.90 \cdot 10^{-7}$ M y una longitud de onda excitación de 515 nm. Se inserta una gráfica con los espectros normalizados en el máximo.

- La constante de complejación entre la PY y la β -CD con su desviación típica. Los valores obtenidos para esta constante a partir de la serie de espectros de absorción y de la serie de emisión de fluorescencia son los mostrados en la tabla 5.4. Se observa muy buena concordancia entre el valor obtenido a partir de serie de emisión con el obtenido a partir de la serie de absorción.

Serie	K / mM ⁻¹
Absorción	0.39±0.05
Fluorescencia	0.40±0.04
Decaimientos	0.36±0.03

Tabla 5.4: Constantes de complejación obtenidas mediante el análisis global para la PY con β -CD. Se analizaron series de espectros de absorción, de espectros de emisión de fluorescencia y de decaimientos de fluorescencia de la PY a diferentes concentraciones de β -CD.

	τ / ns	ϕ	k_r / ns ⁻¹	k_{nr} / ns ⁻¹
PY	1.78 ± 0.03	0.47	0.27	0.30
PY: β -CD	1.18±0.06	0.27	0.25	0.68

Tabla 5.5: Tiempos de vida, rendimientos cuánticos y constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante para la PY y su complejo con β -CD.

Los espectros de absorción y de emisión puros obtenidos mediante análisis global para la PY libre y para el complejo PY: β -CD (figuras 5.2 y 5.3, respectivamente), permiten determinar el rendimiento cuántico del complejo PY: β -CD, conocido el rendimiento cuántico de la PY libre en disolución acuosa. El valor que se calculó para el rendimiento cuántico del complejo PY: β -CD es 0.27, bastante inferior al que presenta la PY en disolución acuosa (tabla 5.5).

p90
p91

Por tanto, los resultados de PCA y del análisis global de las series de espectros de absorción y de emisión confirman que la estequiometría de la complejación de la PY con la β -CD es 1:1. Esto contradice el modelo propuesto por Schiller de una estequiometría de complejación 1:2 (dos moléculas de CD por cada PY), aunque en ese trabajo hablaba de espectros de absorción con dos isosbéticos y no se explicaba el método de análisis seguido [Schiller 87b].

En cuanto a los tiempos de vida, la PY libre presenta un tiempo de vida de 1.76 ns, que se obtiene de la medida experimental directa de disoluciones de PY en agua sin β -CD (ver figura 5.4 y tabla 5.1). En presencia de β -CD se observa un segundo componente fluorescente de tiempo de vida más corto, en torno a 1 ns (tabla 5.1), que debe atribuirse al complejo PY: β -CD. La contribución a la emisión de este segundo componente aumenta al aumentar la concentración de β -CD, lo que es lógico ya que cuanto mayor es la cantidad de β -CD mayor es la proporción de pironina complejada y menor la de pironina libre. La obtención de valores constantes para los dos tiempos de vida en todos los decaimientos a distintas concentraciones de β -CD confirman que no hay procesos de asociación/disociación en el estado excitado. Por ejemplo, si hubiese asociación en el estado excitado el tiempo de vida de la PY libre iría disminuyendo con la concentración de β -CD. Así pues, no hay interconversión en el estado excitado sino sólo en el estado fundamental.

p92
p93
p93

En principio, las amplitudes de los tiempos de vida de la PY libre y del complejo PY: β -CD deben seguir las dependencias con la concentración de β -CD dada por las ecuaciones (5.18) y (5.19). Sin embargo, esto sólo se cumple en el caso de que los decaimientos hayan sido adquiridos durante un tiempo de adquisición fijo (ver apéndice 1). Dado que las amplitudes de los decaimientos experimentales están normalizadas, porque todos los decaimientos se han obtenido con un número fijo de cuentas en el máximo, la ecuación a ajustar que indica la dependencia de la intensidad de fluorescencia con el tiempo en un decaimiento normalizado es:

$$F_n(t, [CD]_0) = E_{n,P}([CD]_0) \cdot e^{-t/\tau_P} + E_{n,P:CD}([CD]_0) \cdot e^{-t/\tau_{P:CD}} \quad (5.20)$$

donde las amplitudes normalizadas siguen las siguientes dependencias con la concentración de β -CD:

$$E_{n,P}([CD]_0) = \frac{1}{1 + Kq[CD]_0} \quad (5.21)$$

$$E_{n,P:CD}([CD]_0) = \frac{Kq[CD]_0}{1 + Kq[CD]_0} \quad (5.22)$$

Por tanto, la ecuación total que indica la dependencia de la intensidad de fluorescencia con el tiempo en un decaimiento es:

$$F_n(t, [CD]_0) = \frac{1}{1 + Kq[CD]_0} \cdot e^{-t/\tau_P} + \frac{Kq[CD]_0}{1 + Kq[CD]_0} \cdot e^{-t/\tau_{P:CD}} \quad (5.23)$$

En estas ecuaciones τ_P y $\tau_{P:CD}$ son los tiempos de vida de la pironina libre y del complejo, respectivamente. El otro parámetro de ajuste es el producto de la constante de equilibrio K por la constante q (razón entre la amplitud límite del fluoróforo complejado, $\alpha_{P:CD}^0$, y la del fluoróforo libre, α_P^0), definidas en el apéndice 1.

p93 Las variaciones de las amplitudes normalizadas (tanto de la PY libre como del complejo PY: β -CD) de la tabla 5.1 con la concentración de β -CD siguen los modelos esperados dados por las ecuaciones (5.21) y (5.22), como se observa en la figura 5.14. En el ajuste de estas amplitudes normalizadas (con Kq como parámetro global) se obtiene un valor para el producto Kq de $0.32 \pm 0.03 \text{ M}^{-1}$. Utilizando el valor de K obtenido a partir de los datos de absorción y de emisión (tabla 5.4), se obtiene entonces un valor para q de 0.0008 ± 0.0001 .

Si calculamos el cociente de amplitudes del complejo PY: β -CD y de la PY libre, obtenidas del ajuste individual de cada decaimiento ($E_{n,P:CD}/E_{n,P}$), y lo representamos frente a la concentración de β -CD total debe obtenerse una línea recta que pasa por el origen de coordenadas de pendiente qK . Los valores experimentales de este cociente y la recta ajustada se muestran en la gráfica insertada en la figura 5.14. El valor que se ajusta para el producto Kq es 0.32 ± 0.01 , que coincide bien con el valor obtenido en el análisis no lineal.

Por tanto, parece que los datos experimentales cumplen el modelo propuesto. Sin embargo, para hacer un ajuste global de los datos y obtener la constante de complejación a partir de los mismos es necesario que la intensidad de los decaimientos no esté normalizada, sino

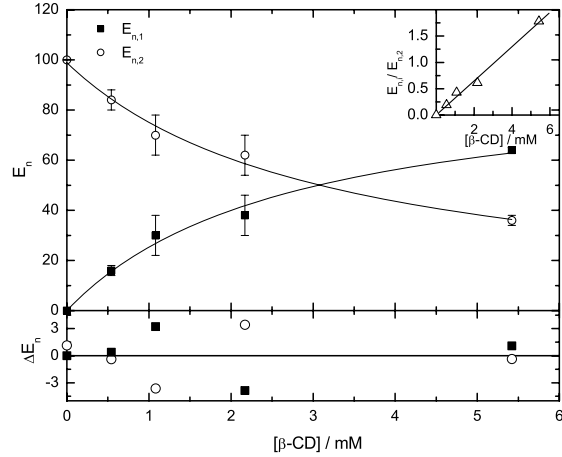


Figura 5.14: Variación de las amplitudes normalizadas obtenidas de los ajustes individuales con un modelo biexponencial a los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de PY con distintas concentraciones de β -CD. Los puntos son datos experimentales y las curvas representan las variaciones teóricas según las ecuaciones 5.21 y 5.22. En la gráfica insertada se muestra la variación del cociente de la amplitud del complejo PY: β -CD entre la de la PY libre.

que sea una intensidad absoluta, correspondiente a un tiempo de adquisición fijo. En este caso la función de ajuste será (véase deducción en el apéndice 1):

$$F(t, [CD]_0) = \frac{1}{1 + K[CD]_0} \alpha_P^0 \cdot e^{-t/\tau_P} + \frac{K[CD]_0}{1 + K[CD]_0} \alpha_{P:CD}^0 \cdot e^{-t/\tau_{P:CD}} \quad (5.24)$$

Utilizando la ecuación anterior como función de ajuste para los decaimientos con intensidades absolutas (ver apéndice 1) se puede hacer un análisis global de los decaimientos experimentales exigiendo a las amplitudes seguir ese modelo teórico (análisis global “target” o dirigido). En estos análisis son parámetros globales (iguales a todas las concentraciones de β -CD) los tiempos de vida de las dos especies fluorescentes y la constante de complejación. Los residuos resultantes de este ajuste global, se incluyen en el archivo C5_Ajuste3_PYbetaCD_tiemposdevida.pdf en el CD adjunto, pudiéndose observar la bondad de los ajustes a través de las gráficas de residuos y la concordancia de las curvas teóricas con los datos experimentales. Los resultados obtenidos del análisis de la serie de decaimientos de la PY medidos a 570 nm y concentración variable de β -CD conduce a unas variaciones lógicas de las amplitudes de los dos componentes, similares a las obtenidas en los análisis individuales. Los resultados obtenidos son: el valor de la constante de complejación K dado en la tabla 5.4 y los tiempos de vida para la PY y su complejo PY: β -CD de 1.78 ± 0.03 ns y 1.18 ± 0.06 ns, respectivamente. Los tiempos de vida tienen muy poco error debido a que los decaimientos se registran con muchos puntos (1024 canales). Sin embargo, el error de K y de las contribuciones (E) es mayor debido a que proceden del ajuste de sólo 5 concentraciones de β -CD diferentes. Según el modelo propuesto, en ausencia de β -CD, la contribución a la

emisión del complejo PY: β -CD es cero y la emisión se debe únicamente a la emisión de la PY libre. A medida que aumenta la concentración de β -CD es mayor la contribución a la emisión del complejo y disminuye la contribución a la emisión de la PY libre. El hecho de que el tiempo de vida de la pironina libre no cambie con la adición de β -CD indica que la reacción de asociación en el estado excitado no puede competir con los procesos de desactivación de la PY.

Los valores obtenidos para los tiempos de vida, los rendimientos cuánticos y las constantes de desactivación radiante y no radiante de la PY y del complejo PY: β -CD se resumen en la tabla 5.5. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la disminución de tiempo de vida y de rendimiento cuántico del complejo respecto a la PY libre es debida al aumento de la constante de desactivación no radiante, que en el complejo es más del doble que en agua, mientras que la constante de desactivación radiante apenas varía.

Pironina B

p94 Al igual que en el caso de la PY, los espectros de excitación de la PB en disolución acuosa (figura 5.6) muestran que la emisión de fluorescencia se debe a una única especie presente en el estado fundamental. La coincidencia de los espectros de excitación con el espectro de absorción no es perfecta, pero esto puede ser debido a defectos en la corrección de los espectros de excitación.

p94 En lo que respecta a las variaciones de los espectros de absorción y de emisión de la PB en presencia de diferentes concentraciones de β -CD, el comportamiento observado es muy similar al de la PY. Así, los resultados del análisis de PCA de las series de espectros de absorción y de emisión de disoluciones acuosas de PB a diferentes concentraciones de β -CD (figuras 5.6 y 5.7) se muestran en las figuras 5.15 y 5.16, respectivamente. El análisis de PCA de las series de espectros de absorción indica claramente dos componentes estructurales según alguno de sus criterios: autovectores frente a la concentración de β -CD y Durbin Watson promedio de los obtenidos a distintas concentraciones de β -CD. Sin embargo, los otros criterios indican un número de componentes mayor debido a que se ven afectados por los artefactos instrumentales propios de los espectros de absorción y conducen a un número elevado de componentes. Los cinco diagramas analizados de la serie de espectros de emisión (autovectores frente a la longitud de onda y frente a la concentración de β -CD, autovalores, error medio y Durbin Watson) indican la presencia de dos componentes estructurales en el sistema.

Por tanto, al igual que en la PY, los análisis de PCA de las series de PB con β -CD indican que las variaciones de los espectros de absorción y de los espectros de emisión con la concentración de β -CD pueden explicarse con un mínimo de dos componentes estructurales.

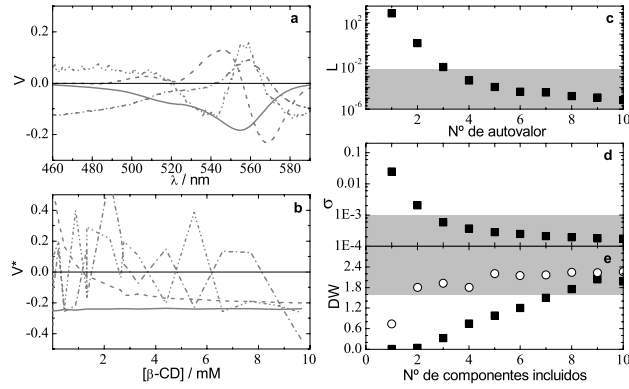


Figura 5.15: Resultados del PCA de la serie de espectros de absorción de PB en presencia de diferentes concentraciones de β -CD a pH 3.4 (datos de la figura 5.6). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de β -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de β -CD (círculos).

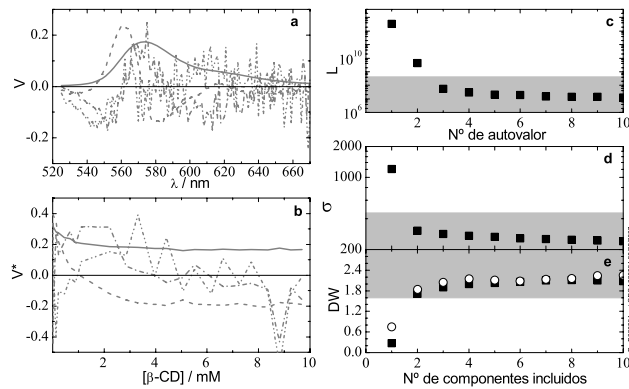


Figura 5.16: Resultados del PCA de datos obtenidos para una serie de espectros de emisión de fluorescencia corregidos de disoluciones acuosas de PB en presencia de distintas concentraciones de β -CD a pH 3.9 (datos de la figura 5.7). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de β -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de β -CD (círculos).

p99

p99

p101

p111

Dada la similitud de las estructuras de las dos pironinas, los dos componentes detectados en el análisis de PCA deben asignarse a la PB libre y al complejo de la PB con β -CD (PB: β -CD), para el que se propone la misma estequiometría 1:1. Por tanto, se propone el mismo modelo que para la PY (figura 5.10) y se realizan análisis globales de la serie de espectros de absorción y de la serie de espectros de emisión sobre la base de dicho modelo, ecuaciones (5.6) y (5.15). El modelo propuesto se ajusta bien a los datos experimentales como puede verse, a modo de ejemplo, para los datos a una longitud de onda de absorción y a otra longitud de onda de emisión en la figura 5.19. Los residuos de los ajustes globales completos para la serie de espectros de absorción y para la serie de espectros de emisión pueden verse en los archivos C5_Ajuste4_PBbetaCD_absorcion.pdf y C5_Ajuste5_PBbetaCD_emision.pdf en el CD adjunto. Por otra parte, los espectros de absorción y de emisión obtenidos para la PB libre en los ajustes globales coinciden con los experimentales. Por tanto, se confirma el modelo propuesto de que la PB se compleja con la β -CD formando un complejo PB: β -CD sin que haya procesos de interconversión en el estado excitado.

Los resultados que se obtienen en estos ajustes son los siguientes:

- Los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de la PB libre y del complejo PB: β -CD, en condiciones tales que toda la pironina presente en la muestra estuviese libre o complejada. Estos espectros se muestran en las figuras 5.17 y 5.18. Se observa que los espectros de absorción y de emisión de la PB libre y del complejo PB: β -CD son similares en su forma, aunque los espectros del complejo tienen menor intensidad y están ligeramente desplazados hacia mayores longitudes de onda.

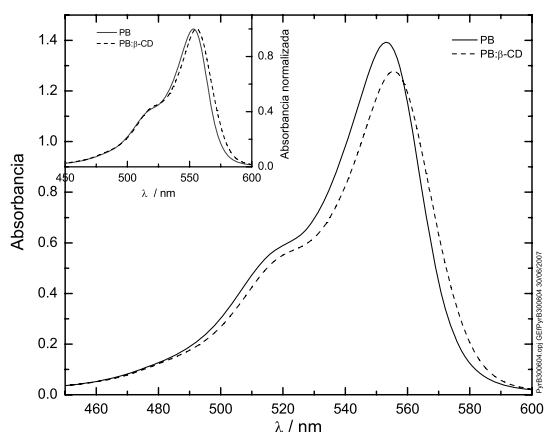


Figura 5.17: Espectros de absorción de la PB libre en disolución acuosa y del complejo PB: β -CD obtenidos mediante análisis global de la serie de espectros de absorción para una concentración total de PB de $1.26 \cdot 10^{-5}$ M. La gráfica insertada muestra estos espectros normalizados en sus respectivos máximos.

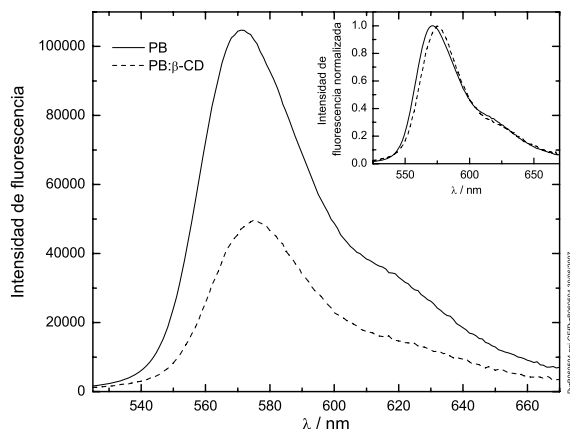


Figura 5.18: Espectros de emisión de fluorescencia corregidos de la PB libre en disolución acuosa y del complejo PB: β -CD obtenidos mediante análisis global de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de PB a pH 3.9 y distintas concentraciones de β -CD para una concentración total de PB de $2.40 \cdot 10^{-6}$ M y una longitud de onda de excitación de 515 nm. La gráfica insertada muestra los espectros normalizados en el máximo.

Serie	K / mM^{-1}
Absorción	2.0 ± 0.4
Fluorescencia	2.1 ± 0.2
Decaimientos	2.0 ± 0.1

Tabla 5.6: Valores de la constante de complejación de la PB con β -CD obtenidos mediante análisis global de las series de absorción, de emisión de fluorescencia de estado estacionario y de decaimientos de fluorescencia.

- Valores para la constante de complejación K entre la PB y la β -CD (tabla 5.6). El valor obtenido para esta constante a partir de la serie de absorción es coincidente con el resultado de la serie de emisión. Conviene mencionar en este punto las dificultades experimentales encontradas en la determinación de un valor fiable para esta constante de equilibrio, especialmente a través de medidas de fluorescencia, debido a la gran tendencia de la PB a sufrir la reacción de hidratación. Se ha comprobado mediante medidas de espectros de emisión que el producto de hidratación también se compleja con la β -CD. De esta forma, la concentración de β -CD real disponible para la complejación con la PB es menor que la inicial, lo que se traduce en una disminución de la constante de equilibrio aparente respecto a la real. También se ha comprobado que el tiempo transcurrido tras la preparación de la disolución madre de PB es un factor determinante en el valor que se obtiene de la constante de complejación. Así, por ejemplo, se realizó una serie de espectros de emisión cuando habían pasado 15 días tras la preparación de la disolución madre y se observó una disminución de la constante de complejación del 35 %.

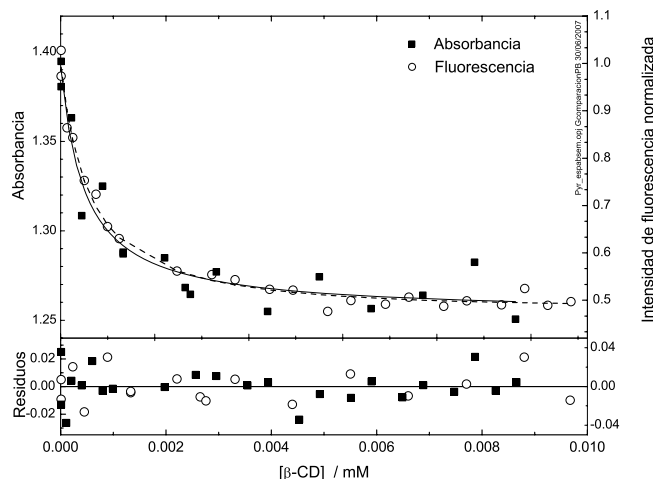


Figura 5.19: Variación de la absorbancia a 550 nm (cuadrados) y de la intensidad de fluorescencia corregida a 570 nm (círculos) de disoluciones acuosas de PB con distintas concentraciones de β -CD. Los puntos son datos experimentales y las curvas representan las variaciones teóricas según los parámetros resultantes del ajuste global. La gráfica inferior muestra los residuos para ambas series de datos.

Los espectros de absorción y de emisión puros obtenidos para la PB libre y para el complejo PB: β -CD (figuras 5.17 y 5.18, respectivamente), permiten determinar el rendimiento cuántico del complejo PB: β -CD, conocido el rendimiento cuántico de la PB libre en disolución acuosa. El valor que se obtiene es 0.19, casi la mitad del que presenta la PB en disolución acuosa (tabla 5.7).

	τ / ns	ϕ	k_r / ns ⁻¹	k_{nr} / ns ⁻¹
PB	1.25	0.36	0.31	0.56
PB: β -CD	0.50	0.19	0.38	1.6

Tabla 5.7: Tiempos de vida, rendimientos cuánticos y constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante para la PB y su complejo con β -CD.

Analizaremos ahora los tiempos de vida de fluorescencia de la PB. En ausencia de β -CD, el tiempo de vida mayoritario es de 1.17 ns y debe ser asignado a la PB libre en disolución acuosa. Existe, sin embargo, un segundo tiempo de vida de muy pequeña contribución cuya asignación no está clara. En presencia de β -CD, los ajustes individuales de los decaimientos con un modelo biexponencial (tabla 5.2) sugieren la existencia de tres tiempos de vida, ya que el tiempo de vida más corto va disminuyendo al aumentar la concentración de β -CD y el tiempo de vida más largo también varía. El tiempo de vida más corto podría ser un tiempo de vida promedio de las dos especies presentes en equilibrio en la disolución: la PB libre y el complejo PB: β -CD, donde el complejo PB: β -CD tendría un tiempo de vida menor

que el de la PB libre (al igual que ocurre en el caso de la PY). Otra posible explicación de ese tiempo de vida decreciente sería que hubiese formación del complejo PB: β -CD en el estado excitado. Sin embargo, aún admitiendo un control por difusión para la constante de asociación correspondiente, el proceso no sería competitivo con el de desactivación de la PB a las concentraciones de β -CD experimentales. Por tanto, se procedió al ajuste triexponencial de los decaimientos para buscar los tiempos de vida de las especies implicadas.

Los resultados de los ajustes individuales con un modelo triexponencial de los decaimientos de disoluciones acuosas de PB con diferentes concentraciones de β -CD se muestran en la tabla 5.3. El tiempo de vida más corto se interpreta como debido al complejo PB: β -CD ya que su amplitud aumenta al aumentar la concentración de β -CD. El tiempo de vida de la PB libre en disolución acuosa, cuya amplitud disminuye al aumentar la concentración de β -CD, tiene un valor de 1.2 ns. Finalmente, se obtiene un tiempo de vida más largo con una contribución muy pequeña, en torno al 1 %, que puede ser debido a alguna impureza presente en las disoluciones de esta pironina. Conviene recordar que la PB tiene una mayor tendencia a sufrir la reacción de hidratación que la PY y el producto resultante de esta reacción podría ser excitado a la longitud de onda utilizada en las medidas de tiempos de vida (310 nm).

Las variaciones con la concentración de β -CD de las amplitudes normalizadas correspondientes al tiempo τ_2 de la PB libre y al tiempo τ_1 como del complejo PB: β -CD (tabla 5.3) siguen el modelo esperado de complejación 1:1, tal como se muestra en la figura 5.20. Tal como se indica en las ecuaciones (5.21) y (5.22), el ajuste de estas amplitudes normalizadas lleva a un valor que corresponde al producto Kq . Para los datos de la PB con β -CD, el ajuste no lineal de las amplitudes lleva a un valor de Kq de $1.3 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1}$, a partir del cual se obtiene un valor de $q = 0.6 \pm 0.2$ utilizando para K el valor dado en la tabla 5.6. La representación del cociente de amplitudes normalizadas obtenido del ajuste individual para cada decaimiento ($E_{n,P:CD}/E_{n,P}$) frente a la concentración de β -CD total debe ser una línea recta que pasa por el origen de coordenadas de pendiente qK . Esto se cumple bastante bien para todos los puntos, salvo para el de mayor concentración de β -CD, como se puede ver en la gráfica insertada de la figura 5.20. El ajuste lineal a los datos experimentales (sin el dato de concentración de β -CD de 5 mM) conduce a un valor del producto Kq de $1.23 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1}$, coincidente con el obtenido en el ajuste no lineal.

A continuación se procedió a corregir los decaimientos experimentales con intensidades normalizadas (ver apéndice 1) para obtener intensidades absolutas y realizar el ajuste global correspondiente. Como función de ajuste se utilizó la ecuación 1.20 con un tercer término exponencial adicional para dar cuenta del tiempo de vida largo residual debido probablemente al producto de la hidratación de la PB (ver tabla 5.3). Se fijó un tiempo de vida de 3 ns para el producto de hidratación con una amplitud constante frente a la concentración de β -CD fija, y dos tiempos de vida libres, cuyas amplitudes varían con la concentración de β -CD según indica la ecuación 1.20. De estos ajustes se obtuvo la constante de complejación indi-

p96

p96

p105

p105

p96

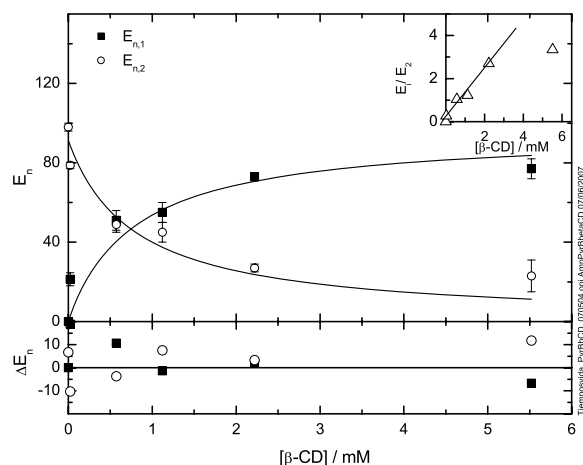


Figura 5.20: Variación de las amplitudes normalizadas de los tiempos τ_1 y τ_2 obtenidas de los ajustes individuales con un modelo triexponencial a los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de PB con distintas concentraciones de β -CD (datos de la tabla 5.3). Los puntos son datos experimentales y las curvas representan las variaciones teóricas según el modelo de complejación. En la gráfica insertada se muestra la variación del cociente de las amplitudes del complejo y de la PB libre frente a la concentración de β -CD.

cada en la última fila de la tabla 5.6 y los tiempos de vida para la PB libre y para el complejo PB: β -CD: 1.25 ± 0.02 ns y 0.50 ± 0.05 ns. La bondad del ajuste queda reflejada en las representaciones de residuos correspondientes (ver C5_Ajuste6_PBbetaCD_tiemposdevida.pdf en CD adjunto). La contribución del producto de hidratación al ajuste es muy pequeña. Este ajuste es mejor (residuos más aleatorios y menor error) que el obtenido con dos componentes sin considerar la pequeña contribución del producto de hidratación. El valor de la constante de equilibrio obtenida a partir de estos datos está en buena concordancia con las obtenidas a partir del análisis global de los espectros de absorción y de emisión (ver tabla 5.6).

Los valores obtenidos para los tiempos de vida, los rendimientos cuánticos y constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante de la PB y del complejo PB: β -CD se muestran en la tabla 5.7. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que una fuerte disminución del tiempo de vida y del rendimiento cuántico del complejo respecto a la PB libre. Esto es debido al aumento de la constante de desactivación no radiante, que en el complejo es unas tres veces mayor que en agua, mientras que la constante de desactivación radiante apenas varía.

Comparación de resultados para las PY y PB con β -CD

Las dos pironinas estudiadas presentan muchos aspectos comunes en su comportamiento fotofísico cuando se complejan con β -CD. El análisis de PCA de las series de espectros de absorción y emisión realizadas con concentración de pironina constante y concentración de β -CD variable indica la presencia de dos componentes, que se atribuyen a la pironina libre y al complejo de estequiometría 1:1 formado entre la pironina y la β -CD. La intensidad de emisión de las pironinas complejadas es menor que la de la pironinas libres, lo que se traduce en una reducción del rendimiento cuántico de las pironinas a aproximadamente la mitad cuando se encuentran complejadas. Este es un comportamiento opuesto al que presentan la mayoría de los fluoróforos cuando se complejan con las CD aunque también se ha observado en otros sustratos como por ejemplo la acridina, en la cual se propuso que existían interacciones específicas sustrato-ligando para explicar este comportamiento atípico [Bortolus 96]. Sin embargo, la variación en los espectros de absorción y emisión con la adición de β -CD se produce a concentraciones menores de ciclodextrina en el caso de la PB que para la PY como puede verse en la figura 5.21. A una concentración de β -CD de 2 mM la disminución tanto en la absorbancia como en la intensidad de fluorescencia es en torno a un 90 % para la PB mientras que sólo supone un 50 % para la PY.

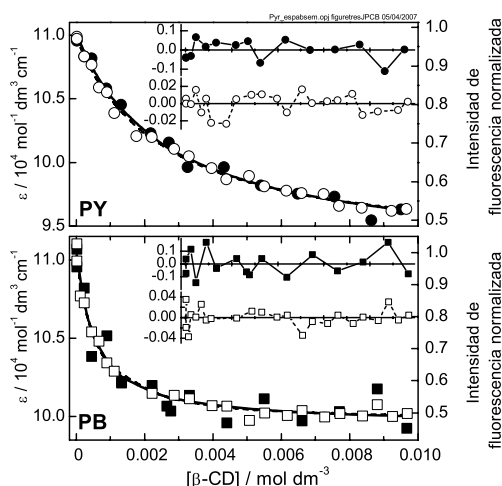


Figura 5.21: Representaciones de la absorptividad molar en los máximos de absorción (símbolos rellenos) e intensidad de fluorescencia corregida en los máximos de emisión (símbolos abiertos) de disoluciones acuosas de PY y PB frente a las concentraciones iniciales de β -CD. Se eligieron las escalas adecuadas para mostrar las coincidencias entre las variaciones de absorción y emisión. Las líneas representan las curvas obtenidas por ajuste global a los espectros de absorción y de emisión. Los residuos se muestran en las gráficas insertadas.

Las diferencias observadas se deben a que los valores de las constantes de equilibrio de complejación son muy diferentes en las dos pironinas. La constante de complejación obtenida es mucho mayor en el caso de la PB (del orden de 2000 M^{-1}) que en el de la PY (sobre 400 M^{-1}). La sustitución de los grupos metilo (PY) por etilo (PB) produce importantes diferencias en la constante de complejación, lo que pone de manifiesto la influencia estos grupos periféricos en la estabilidad de los complejos. Este es un resultado sorprendente ya que dado el mayor tamaño de los etilos es mayor el impedimento estérico en el caso de la PB por lo que podría suponerse que la constante de complejación fuese menor en el caso de la PB.

El análisis global de los espectros y de los decaimientos a diferentes concentraciones de β -CD confirman el modelo de complejación 1:1 sin procesos de interconversión en el estado excitado para ambas pironinas. De estos análisis se obtienen los espectros de absorción y de emisión de los complejos de cada una de las pironinas con la β -CD (figuras 5.17 y 5.18). Estos espectros se desplazan hacia mayores longitudes de onda respecto a los de las pironinas libres, siendo el desplazamiento mayor en el caso de la PY. Además, a partir de estos espectros se calculan los rendimientos cuánticos de los complejos, que son menores que los de las pironinas libres (tablas 5.5 y 5.7), siendo mayor el efecto en el caso de la PB.

Del análisis global de los decaimientos a distintas concentraciones de β -CD se obtuvieron los tiempos de vida de las pironinas libres y de sus complejos con β -CD (tablas 5.5 y 5.7) y se determinaron las constantes de equilibrio de complejación (tablas 5.6 y 5.6). En el caso de la PB se observa también una pequeña contribución de una pequeña impureza, que no se observa en el caso de la PY, que se atribuye al producto de hidratación de la pironina. En ambos casos, el complejo presenta un tiempo de vida más corto que la pironina libre, aunque la disminución de tiempo de vida es significativamente mayor en el caso de la PB.

La disminución de rendimiento cuántico y de tiempo de vida de fluorescencia de los complejos respecto a las pironinas libres se debe a un aumento considerable de la constante de velocidad de desactivación radiante (tablas 5.5 y 5.7), que se duplica y triplica en los complejos de PY y PB, respectivamente. Este aumento se atribuye a la existencia de interacciones específicas de las pironinas con los electrones ricos en oxígeno presentes en esta cavidad.

Resulta interesante comparar nuestros resultados con los de la bibliografía. El modelo propuesto en la bibliografía [Schiller 87b], de complejación 1:1 y 1:2 entre la PY y la β -CD no concuerda con los resultados de los análisis de los datos de absorción y emisión con PCA, que indican dos componentes. Por tanto, nuestros resultados no concuerdan con las constantes de equilibrio ni con los espectros de absorción individuales de los complejos dados en este trabajo. En el caso de la PB, en la bibliografía se propuso un modelo de complejación 1:1 [Schiller 86], que está de acuerdo con nuestros resultados experimentales. El valor de la constante de equilibrio de complejación es aproximadamente el doble que la nuestra pero la de la bibliografía tiene un error del 60 %.

5.2 Complejación de pironinas Y y B con γ -ciclodextrina

5.2.1 Resultados

Pironina Y

En primer lugar se midieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas de diferentes concentraciones de pironina Y para estudiar el posible efecto de la concentración sobre dicho espectro de absorción. Para poder medir la absorbancia de disoluciones de concentraciones elevadas de PY se usó una cubeta de vidrio de 1 mm, pero los valores de la absorbancia de las disoluciones no era reproducible debido a la alta adsorción de la pironina en el vidrio. Por ello, se usó una cubeta de cuarzo de 4 mm de camino óptico para poder medir la absorbancia de disoluciones con concentraciones altas de PY. Concretamente, se midió la absorbancia de disoluciones acuosas de PY, de 0 a 0.170 mM, a un valor de pH de 3.6, si bien en la figura 5.22 sólo se representan los espectros de absorción de las disoluciones de PY hasta una concentración de PY de 0.0583 mM, ya que a partir de esta concentración se observa un achatamiento de la banda de absorción. A partir de una concentración de PY determinada, la variación de la absorbancia con la concentración de PY deja de ser lineal, tal como puede verse en la gráfica insertada en esta figura. Para realizar estas medidas se

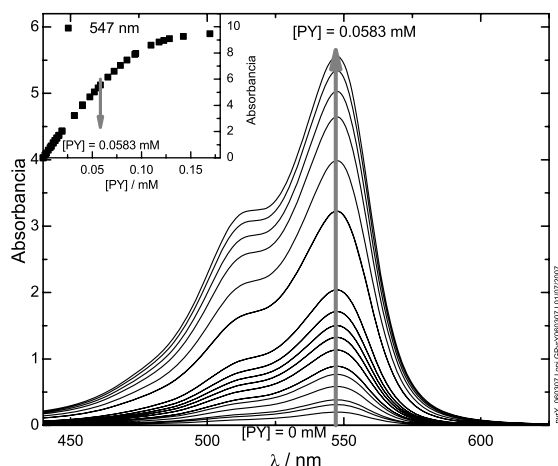


Figura 5.22: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de diferentes concentraciones de PY (de 0 a 0.0583 mM) a pH 3.6. En la gráfica insertada en esta figura se representa la variación de la absorbancia frente a la concentración de PY para la longitud de onda de 547 nm llegando hasta concentraciones de PY más altas (de 0.170 mM). Los valores de absorbancia corresponden a un camino óptico de 10 mm.

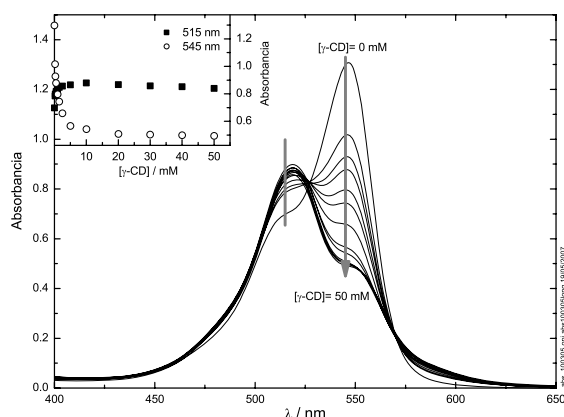


Figura 5.23: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de PY ($6.2 \cdot 10^{-5}$ M) a pH 3.5 en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD. En la gráfica insertada en esta figura se representa la variación de la absorbancia frente a la concentración de γ -CD a 515 y a 545 nm.

usaron cubetas de cuarzo de 4 y 10 mm de camino óptico, pero los valores de absorbancia que se indican son los correspondientes a un camino óptico de 10 mm.

Se midieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas de concentración de PY constante en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD. La adición de γ -CD a una disolución acuosa de PY produce cambios sistemáticos en los espectros de absorción (ver figura 5.23), observándose un punto isobéptico a 527 nm que no se resuelve con claridad. En la gráfica insertada en esta figura se muestra que a 515 nm la absorbancia aumenta con la concentración de ciclodextrina, pero a altas concentraciones de γ -CD la absorbancia no se mantiene constante sino que disminuye de nuevo. A 545 nm la absorbancia disminuye al aumentar la concentración de γ -CD. En los espectros de emisión de fluorescencia de la PY en disoluciones acuosas de diferentes concentraciones de γ -CD (figura 5.24) se observa que, al aumentar la concentración de γ -CD, la intensidad de fluorescencia de la PY disminuye y se produce un ligero desplazamiento del espectro hacia mayores longitudes de onda. Este desplazamiento puede verse fácilmente en la gráfica insertada superior en la figura 5.24, en la que se muestran los espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo. En la gráfica insertada inferior en esta misma figura, se muestra la disminución de la intensidad de fluorescencia que se produce a 565 nm al aumentar la concentración de γ -CD.

Finalmente, se midieron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de PY con diferentes concentraciones de γ -CD. Los decaimientos obtenidos se ajustaron de forma individual con un modelo monoexponencial pero cuando la concentración de γ -CD es mayor de 5 mM no fue posible obtener buenos ajustes con un modelo monoexponencial, por lo que estos se ajustaron con un modelo biexponencial utilizando el propio programa de ajuste del

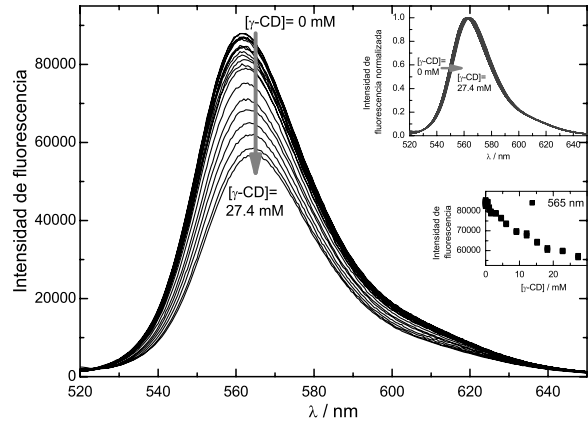


Figura 5.24: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de PY ($2.0 \cdot 10^{-7}$ M) a pH 4.0 en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm. La gráfica insertada superior muestra estos espectros normalizados en el máximo. La gráfica insertada inferior muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a 565 nm con la concentración de γ -CD.

aparato de medida. En la tabla 5.8 se muestran los tiempos de vida obtenidos con estos ajustes. Se observa que la contribución a la fluorescencia del tiempo de vida más largo, $E_{n,2}$, disminuye al aumentar la concentración de γ -CD, mientras que el tiempo de vida más corto aumenta en contribución.

$[\gamma\text{-CD}] / \text{mM}$	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
0	-	1.740 ± 0.004	-	100	1.37
0	-	1.687 ± 0.004	-	100	1.10
0.25	-	1.689 ± 0.004	-	100	1.01
1.5	-	1.689 ± 0.004	-	100	1.16
5.0	1.2 ± 0.2	1.81 ± 0.06	30	70	1.09
10	1.09 ± 0.05	1.8 (f)	30	70	1.07
30	1.07 ± 0.05	1.8 (f)	30	70	1.13
50	1.1 ± 0.1	1.85 ± 0.04	36	64	1.13

Tabla 5.8: Tiempos de vida de disoluciones acuosas de PY (0.00112 mM) a pH 3.5 en presencia de distintas concentraciones de γ -CD obtenidos mediante el análisis individual de los decaimientos registrados a 565 nm con un número fijo de cuentas en el máximo. La longitud de onda de excitación usada fue 310 nm. Los valores de los parámetros fijos se indican como (f). $E_{n,i}$ indica la contribución a la fluorescencia de cada uno de los componentes.

Pironina B

En primer lugar se midieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas de diferentes concentraciones de pironina B con el fin de estudiar el efecto de la concentración sobre su espectro de absorción. Para poder medir la absorbancia de disoluciones con concentración elevada de PB se usó una cubeta de cuarzo de 4 mm de camino óptico (con la cubeta de vidrio de 1 mm se producía una elevada adsorción, al igual que con la PY). Concretamente se midió la absorbancia de disoluciones acuosas de PB, de 0 a 0.0733 mM, a pH 3.5 (figura 5.25). El intervalo de concentraciones se limitó en este caso teniendo en cuenta el problema del achatamiento de la banda observado a concentraciones más altas de PY. En la gráfica insertada en esta figura se representa la variación de la absorbancia a 553 nm con la concentración de PB, que presenta una clara desviación de la linealidad a concentraciones de PB elevadas.

Los espectros de absorción registrados para disoluciones acuosas con una concentración de PB fija en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD a pH 3.5 se muestran en la figura 5.26. Las variaciones que se observan son similares a las de la PY con γ -CD: disminución del máximo de absorción y aumento de absorbancia en el hombro seguido de disminución a altas concentraciones. En la gráfica insertada en esta figura se muestra la variación de la absorbancia frente a la concentración de γ -CD para dos longitudes de onda. A 532 nm (hombro del espectro de la PB) la absorbancia aumenta con la concentración de γ -CD, alcanza un valor máximo y luego disminuye. A 555 nm (máximo del espectro de la PB) la absorbancia disminuye con la concentración de γ -CD pero a concentraciones más altas de γ -CD la absorbancia no se mantiene constante sino que aumenta de nuevo.

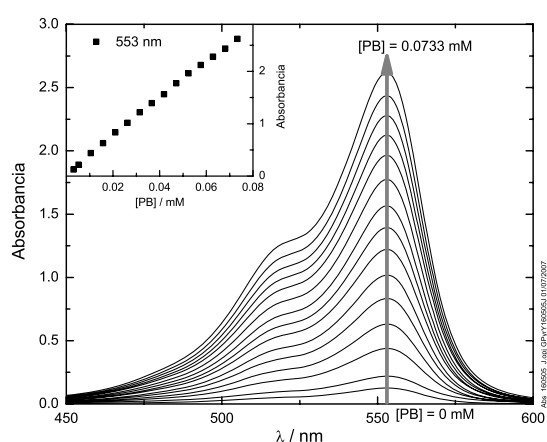


Figura 5.25: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de diferente concentración de PB (de 0 a 0.0733 mM) a pH 3.5. En la gráfica insertada se representa la variación de la absorbancia frente a la concentración de PB a 553 nm.

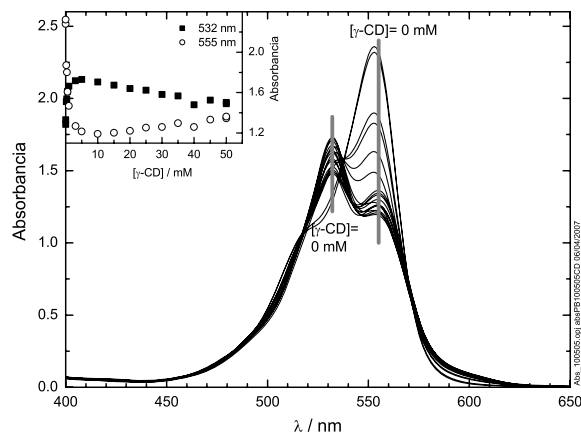


Figura 5.26: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de PB de concentración $2.0 \cdot 10^{-7}$ M a pH 3.5 en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD. En la gráfica insertada se representa la variación de la absorbancia frente a la concentración de γ -CD para dos longitudes de onda.

Se midieron también los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de concentración constante de PB a diferentes concentraciones de γ -CD a pH 5.2 (véase la figura 5.27). La adición de γ -CD produce cambios sistemáticos en los espectros de emisión de fluorescencia de la PB semejantes a los observados para la PY con γ -CD. En la gráfica insertada superior en esta misma figura se pone de manifiesto el desplazamiento de los espectros de emisión hacia mayores longitudes de onda al aumentar la concentración de γ -CD. En la gráfica insertada inferior en esta misma figura se muestra que la intensidad de fluorescencia a 565 nm disminuye con la concentración de γ -CD.

$[\gamma\text{-CD}] / \text{mM}$	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	$E_{n,3}$	χ^2
0	-	1.07 ± 0.02	2.3 ± 0.4	-	97	3	1.08
0.25	-	1.08 ± 0.02	2.6 ± 0.6	-	97	3	1.11
0.75	-	1.049 ± 0.006	2.5 (f)	-	97	3	1.13
1.5	-	1.03 ± 0.02	2.1 ± 0.4	-	97	3	1.18
5.0	0.75 ± 0.09	1.2 (f)	4 ± 1	30	67	1	1.21
10	0.79 ± 0.08	1.2 (f)	3.2 ± 0.7	44	53	3	0.984
30	0.76 ± 0.08	1.2 (f)	3.0 ± 0.5	44	53	3	1.04
50	0.55 ± 0.08	1.2 (f)	2.9 ± 0.3	30	68	3	1.16

Tabla 5.9: Tiempos de vida de disoluciones acuosas de PB ($1 \mu\text{M}$) a pH 3.5 a distintas concentraciones de γ -CD obtenidos mediante el análisis individual de los decaimientos registrados a 565 nm. La longitud de onda de excitación fue 310 nm. Los valores de los parámetros que se mantuvieron fijos en el ajuste se indican como (f). $E_{n,i}$ indica la contribución a la fluorescencia de cada una de las exponenciales.

Por último, se midieron decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de concentración constante de PB a pH 3.5 con diferentes concentraciones de γ -CD. Los resultados de los ajustes individuales de estos decaimientos con un modelo biexponencial o triexponencial (que es necesario cuando la concentración de γ -CD es mayor de 5 mM para obtener tiempos de vida independientes de la concentración de γ -CD) se muestran en la tabla 5.9. A concentraciones de γ -CD bajas se obtiene un tiempo de vida mayoritario del orden de 1 ns, cuya contribución disminuye cuando la concentración de γ -CD aumenta por encima de 5 mM. A esta concentración, aparece un tiempo de vida más corto con una contribución que aumenta al incrementar la concentración de γ -CD. Se observa que la amplitud del tiempo de vida más largo ($E_{n,3}$) es pequeña e independiente de la concentración de γ -CD, del orden del 3%.

5.2.2 Discusión

Pironina Y

Dado que en la bibliografía se habla de un posible efecto de la γ -CD en la formación de dímeros por parte de las pironinas [Schiller 86, Schiller 87b], se estudió en primer lugar el proceso de dimerización en disolución acuosa. Es conocida la tendencia de numerosos colorantes, entre ellos los colorantes xanténicos, a la formación de dímeros, estando este proceso favorecido en disolventes con grupos hidroxílicos [Valdés-Aguilera 89]. Por tanto, se analizaron los cambios que se producen en espectro de absorción de la PY a medida que se aumenta su concentración.

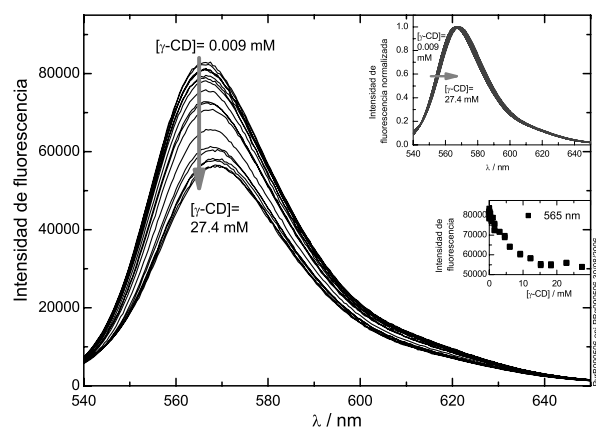


Figura 5.27: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de PB ($2.0 \cdot 10^{-7}$ M) a pH 5.2 en presencia de distintas concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm. La gráfica insertada superior muestra los espectros de emisión normalizados en el máximo. La gráfica insertada inferior muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a 565 nm con la concentración de γ -CD.

El análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de diferentes concentraciones de PY de la figura 5.22 hasta una concentración máxima de PY de 0.0583 mM se muestra en la figura 5.28. Cuando en este análisis se incluyen espectros de disoluciones con concentraciones más altas de PY aparece un número de componentes mayor, lo cual se atribuye al hecho de que se produce un achatamiento del máximo de absorción, es decir, un comportamiento típico del efecto de la luz difusa. El análisis de PCA de los espectros hasta una concentración de PY de 0.0583 mM indica dos componentes espectrales según todos los criterios, salvo los que están afectados por los artefactos inherentes a esta técnica: autovectores frente a la longitud de onda y el Durbin Watson promedio de los obtenidos a diferentes longitudes de onda.

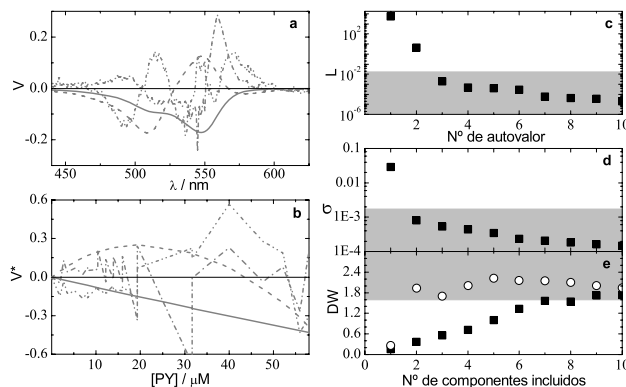


Figura 5.28: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de diferentes concentraciones de PY. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de PY (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de PY (círculos).

Por tanto, dado que en la disolución sólo hay pironina y de acuerdo con la bibliografía, se propone que se produce la dimerización de la PY, tal como se indica en la siguiente ecuación:



siendo K_D la constante de equilibrio de dimerización. Según este modelo, la absorbancia medida a cualquier longitud de onda λ , $\mathcal{A}(\lambda)$, es una combinación lineal de la absorbancia de la pironina en forma monomérica P y del dímero P_2 :

$$\mathcal{A}(\lambda) = \varepsilon_P(\lambda)l[P] + \varepsilon_{P_2}(\lambda)l[P_2] \quad (5.26)$$

siendo $\varepsilon_P(\lambda)$ y $\varepsilon_{P_2}(\lambda)$ los coeficientes de absorptividad molar de las especies P y P_2 , respectivamente y l el camino óptico de la cubeta de medida.

Teniendo en cuenta la definición de la constante de equilibrio K_D y el balance de materia para la PY, se deducen las expresiones de las concentraciones de equilibrio de P y P_2 en función de la concentración total de pironina $[P]_0$, ecuaciones (A3.4) y (A3.5) en apéndice 3. Sustituyendo estas ecuaciones en la ecuación anterior se obtiene la siguiente expresión para la absorbancia $\mathcal{A}(\lambda)$ en función de la concentración total de pironina $[P]_0$:

$$\mathcal{A}(\lambda) = \frac{(1 - \sqrt{1 + 8K_D[P]_0})l[\varepsilon_{P_2}(\lambda) - 2\varepsilon_P(\lambda)] + 4K_D\varepsilon_{P_2}(\lambda)l[P]_0}{8K_D} \quad (5.27)$$

Utilizando la expresión anterior como función de ajuste, se realizó un ajuste global de la serie de espectros de absorción de la PY a diferentes concentraciones. Sin embargo, el ajuste no es satisfactorio ya que sigue apareciendo un efecto de desviación de la linealidad en esta serie de espectros a las concentraciones más altas de PY que el modelo de dimerización no consigue explicar y que, por comparación con medidas realizadas con otro colorante que no presenta dimerización, tampoco puede ser atribuido a la luz difusa. A longitudes de onda altas, la desviación observada de este modelo podría ser debida a una cierta contribución de la fluorescencia de la propia PY que produce un aumento de la cantidad de luz que llega al detector (y en consecuencia una disminución de la absorbancia). Este efecto es posible debido a que los espectros de absorción y de emisión de esta pironina están muy solapados. Por tanto, se seleccionaron los datos de los espectros de absorción en el intervalo de longitudes de onda entre 440 y 525 nm, donde no hay emisión y se realizaron distintos análisis variando la concentración de PY máxima de la serie (prescindiendo de los espectros de mayor concentración de PY) y variando ligeramente el intervalo de longitudes de onda analizado. Estos análisis globales permiten estimar un valor medio de K_D de $3.0 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1}$. Este valor es del mismo orden de magnitud que los obtenidos para otros derivados xanténicos [Valdés-Aguilera 89].

Para obtener los espectros puros del monómero y del dímero hay que analizar los espectros de absorción completos, pero es necesario fijar el valor de la constante de dimerización ($3.0 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1}$) y limitar el intervalo de concentraciones para evitar el efecto de la fluorescencia. Se realizó, por tanto, un análisis global de los espectros de absorción en el intervalo de 440 a 650 nm para los espectros de la figura 5.22 llegando hasta una concentración máxima de PY de 0.0583 mM. Para realizar este análisis no se tuvieron en cuenta los espectros de mayor concentración de PY de 0.0583 M, ya que considerando los espectros hasta esa concentración el análisis de PCA indica claramente 2 componentes. Con este modelo y fijando los distintos valores para la constante de dimerización K_D teniendo en cuenta el error (3.0, 2.5 y 3.5 mM^{-1}), se obtuvieron ajustes satisfactorios, como muestran los residuos correspondientes (ver archivos C5_Ajuste7_PY_absorcion_dimerizacion_KD3.pdf, C5_Ajuste8_PY_absorcion_dimerizacion_KD2.pdf y C5_Ajuste9_PY_absorcion_dimerizacion_KD4.pdf en el CD adjunto). Los distintos valores de K_D empleados (2.5, 3.0 y 3.5 mM^{-1}) llevan a un espectro puro para la PY en forma monomérica coincidente en

los tres casos. La incertidumbre en el espectro del dímero P_2 se muestra en la figura 5.29. Se observa que el valor de la constante de dimerización afecta fundamentalmente al hombro del espectro del dímero, en torno a 550 nm, pero la forma de la banda de absorción, invertida respecto a la banda de la forma monomérica, es independiente del valor de la constante de dimerización. El hecho de que el espectro del dímero esté desplazado hacia menores longitudes de onda que el del monómero, indica, según el modelo del excitón molecular [McRae 64, Kasha 65], que el dímero presenta una estructura tipo H, es decir, con las dos moléculas de PY dispuestas paralelamente.

Los espectros de absorción de la PY a distintas concentraciones de γ -CD (figura 5.23) muestran un punto isobéptico que no se resuelve con claridad, lo que nos lleva a pensar desde un principio en la existencia de, por lo menos, una especie absorbente además de esta pironina y del complejo formado por la PY con la γ -CD. Esto también se observa en la gráfica de absorbancia frente a concentración de γ -CD, pues a altas concentraciones de γ -CD la absorbancia no se mantiene constante, como sería de esperar si se produjese una única complejación. Esto puede indicar la existencia de otro equilibrio. Sin embargo, tal y como se deduce del valor de la constante de dimerización obtenida, la formación de dímeros P_2 no podría explicar estos hechos experimentales, ya que es muy poco significativa a la concentración de PY presente en esta serie ($[P]_0 = 6.2 \cdot 10^{-5}$ M).

Con el fin de conocer el número de componentes estructurales en la serie de espectros de absorción con distintas concentraciones de γ -CD, se analizó con PCA la serie de espectros de absorción de la PY a diferentes concentraciones de γ -CD (véase la figura 5.30). En este

p117

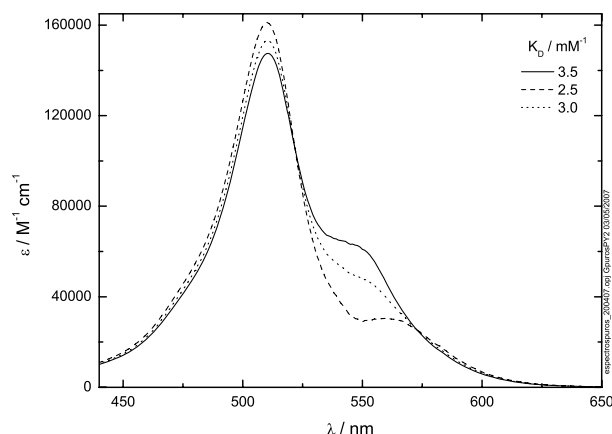


Figura 5.29: Espectros puros de absorción obtenidos para el dímero PY_2 mediante análisis global con diferentes valores de la constante de dimerización K_D de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de distintas concentraciones de PY (con una concentración máxima de 0.0583 M) .

análisis se obtienen al menos tres componentes según la mayoría de los criterios: autovectores frente a la concentración de γ -CD, autovalores y Durbin Watson promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de γ -CD. El error medio indica cuatro componentes y tanto los autovectores frente a la longitud de onda como el Durbin Watson promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda indican más de cuatro componentes estructurales, debido a que están afectados por los artefactos inherentes a esta técnica.

Se realizaron varios análisis globales con distintos modelos basados en diferentes estequiometrías de complejación a la serie de espectros de absorción de PY con distintas concentraciones de γ -CD. Concretamente los modelos usados fueron los de complejación 1:1, 1:2 y 2:1, pero ninguno de ellos explica satisfactoriamente los datos experimentales. Teniendo en cuenta que los cambios espectrales que se producen por la adición de γ -CD son similares a los producidos por la dimerización, se propuso un modelo de complejación de la PY con γ -CD que tiene en cuenta la dimerización de la pironina para dar P_2 y su posterior complejación para dar un dímero complejado P_2 :CD, y la formación de un complejo 1:1 P:CD seguida de la entrada de una segunda molécula de PY para dar el dímero complejado P_2 :CD. Este modelo de cuatro equilibrios interconectados se representa en la figura 5.31, siendo K_1 y K_2 las constantes de equilibrio de complejación para las estequiometrías 1:1 y 2:1, respectivamente, K_D la constante de dimerización en ausencia de CD y K_D^C la constante de dimerización de la pironina cuando ésta se encuentra complejada por la CD.

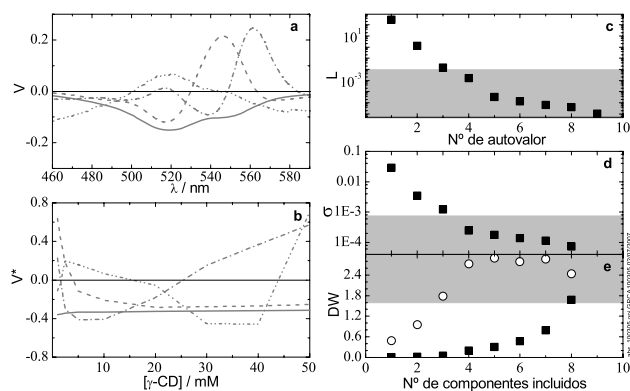


Figura 5.30: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de las disoluciones acuosas de PY en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de γ -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (- · - ·); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de γ -CD (círculos).

Asumiendo que las cuatro especies químicas presentes contribuyen a la absorbancia medida a una cierta longitud de onda, $\mathcal{A}(\lambda)$, se tiene que:

$$\mathcal{A}(\lambda) = \varepsilon_P(\lambda)l[P] + \varepsilon_{P_2}(\lambda)l[P_2] + \varepsilon_{P:CD}(\lambda)l[P:CD] + \varepsilon_{P_2:CD}(\lambda)l[P_2:CD] \quad (5.28)$$

siendo $\varepsilon_i(\lambda)$ los coeficientes de absortividad molar a la longitud de onda λ de cada una de las i especies. Teniendo en cuenta las definiciones de las constantes de equilibrio del sistema y que la concentración total de pironina es constante ($[P]_0$), se pueden deducir fácilmente las expresiones de las concentraciones de equilibrio de las cuatro especies existentes (ver apéndice 3), que una vez sustituidas en la ecuación anterior llevan a la siguiente expresión final para la absorbancia según este modelo:

$$\begin{aligned} \mathcal{A}(\lambda) = & \\ & \frac{(\varepsilon_P(\lambda)l + \varepsilon_{P:CD}(\lambda)lK_1[CD]_0)4K_D(1+K_2[CD]_0)[-(1+K_1[CD]_0)+R]}{16K_D^2(1+K_2[CD]_0)^2} + \\ & + \frac{(\varepsilon_{P_2}(\lambda)lK_D + \varepsilon_{P_2:CD}(\lambda)lK_DK_2[CD]_0)[2(1+K_1[CD]_0)^2 + 8K_D(1+K_2[CD]_0)[P]_0 - 2(1+K_1[CD]_0)R]}{16K_D^2(1+K_2[CD]_0)^2} \end{aligned}$$

con

$$R = \sqrt{(1 + K_1[CD]_0)^2 + 8K_D(1 + K_2[CD]_0)[P]_0} \quad (5.29)$$

El ajuste de este modelo completo a las series de espectros de absorción no permitió determinar las tres constantes de equilibrio K_1 , K_2 y K_D debido a las fuertes correlaciones entre los parámetros de ajuste, la cuarta constante de equilibrio se obtiene directamente a partir de las otras tres mediante la ecuación (A3.12). El ajuste global con este modelo fijando el valor de la constante K_D al valor obtenido en el análisis de la serie de espectros de absorción sin γ -CD a distintas concentraciones de PY no permitió resolver estas correlaciones. Por esta

p324

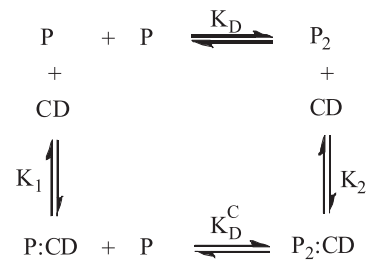


Figura 5.31: Modelo de equilibrios interrelacionados entre el monómero de P, su dímero P_2 , los complejos P:CD y P_2 :CD, y la CD libre.

razón, se procedió al análisis de la serie de espectros de emisión de fluorescencia con el fin de obtener más información sobre este sistema.

p118 El análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de la figura 5.24 (registrados a
 baja concentración de PY a fin de minimizar la formación de dímeros y hacer que el sistema
 sea más fácil de analizar) indica que las variaciones del espectro de emisión de la PY con
 la concentración de γ -CD pueden explicarse con dos componentes espectrales, que corres-
 p118 ponderían a un mínimo de dos especies químicas diferentes. En la figura 5.32 se muestran
 los resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de la
 figura 5.24. Se analizó con PCA esta serie de espectros de fluorescencia a partir de 540 nm,
 ya que a menores longitudes de onda se observa la fluorescencia de una impureza de la γ -CD.
 Se obtienen claramente dos componentes estructurales según todos los criterios. Por tanto,
 y teniendo en cuenta la similitud del comportamiento observado en los espectros de emisión
 p91 con el que esta pironina presenta en función de la concentración de β -CD (figura 5.3), se
 propone que las variaciones del espectro de emisión se deben a la complejación 1:1 entre la
 p99 pironina y la CD en el estado fundamental (figura 5.10). Esto supone despreciar la existencia
 de dímeros, lo cual está justificado por la baja concentración de pironina utilizada en las
 medidas de emisión y el hecho de que, aún de existir pequeñas concentraciones de dímeros,
 éstos no deben presentar fluorescencia [Valdés-Aguilera 89].

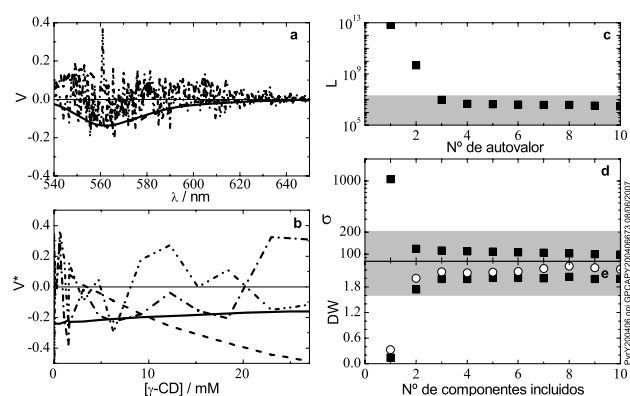


Figura 5.32: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de PY en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de γ -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de γ -CD (círculos).

Por tanto, se realizó el análisis global de la serie de espectros de emisión con el modelo de complejación 1:1 (ecuación (5.15)). Los residuos de este ajuste indican que el ajuste es bueno (ver archivo C5_Ajuste10_PYgammaCD_emision_Serie1.pdf en el CD adjunto). El análisis global con este mismo modelo de otra serie de espectros de emisión de PY con distintas concentraciones de γ -CD también es satisfactorio (ver residuos en el archivo C5_Ajuste11_PYgammaCD_emision_Serie2.pdf en el CD adjunto). Por tanto, no es necesario considerar el modelo de cuatro equilibrios para explicar las variaciones del espectro de emisión de la PY con diferentes concentraciones de γ -CD. En estos análisis globales se obtuvieron los siguientes resultados:

- Los espectros de emisión de fluorescencia (figura 5.33) de la pironina libre y del complejo PY: γ -CD cuando toda la pironina presente en la muestra se encuentra libre o complejada, respectivamente. Los espectros así obtenidos para la PY libre coinciden, como sería de esperar, con los espectros experimentales a concentración de γ -CD igual a cero. El espectro de emisión del complejo tiene menor intensidad y está ligeramente desplazado hacia mayores longitudes de onda.

- Los valores de la constante de complejación K_1 de la PY con la γ -CD mostrados en la tabla 5.10. Se observa buena concordancia entre los valores obtenidos a partir de las dos series de emisión, del que también se muestra la media. El valor obtenido para esta constante es del orden de 10 veces inferior al de la constante de equilibrio de formación del complejo PY: β -CD ($K = 0.40 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1}$). Esta diferencia se analizará en el capítulo siguiente en el que se estudia la dinámica de estos procesos de asociación.

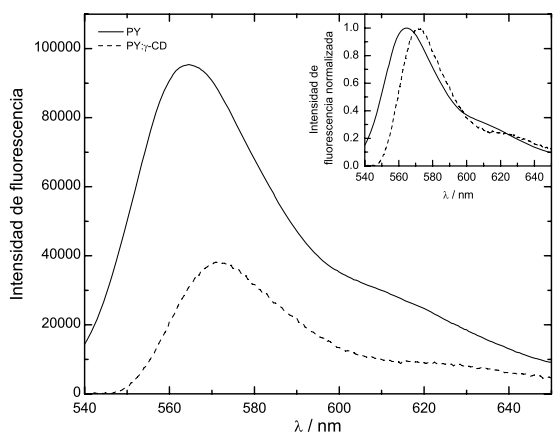


Figura 5.33: Espectros puros de emisión de fluorescencia corregidos obtenidos mediante análisis global para la PY libre y formando un complejo 1:1 con la γ -CD (PY: γ -CD) si toda la pironina presente en la muestra estuviese en forma libre o complejada, respectivamente. Se inserta una figura con los espectros normalizados en el máximo. Longitud de onda de excitación de 515 nm.

Serie	K_1 / mM^{-1}
1	0.03 ± 0.01
2	0.04 ± 0.01
Media	0.035 ± 0.007

Tabla 5.10: Valores de la constante de complejación K_1 obtenidos mediante el análisis global de dos series de espectros de emisión de fluorescencia de PY con diferentes concentraciones de γ -CD.

Una vez obtenido el valor de la constante de complejación mediante el análisis global de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de PY a distintas concentraciones de γ -CD, retomaremos el análisis de la serie de espectros de absorción de PY a distintas concentraciones de γ -CD.

Tal como se indicó anteriormente, en el análisis de los datos de absorción con el modelo de cuatro equilibrios (figura 5.31), el error en K_D ($3.0 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1}$) y en el espectro de absorción del dímero no tiene mucha influencia. Esto se debe a que los perfiles de concentración indican que del dímero se forma una pequeña proporción y ésta desaparece rápidamente al aumentar la concentración de γ -CD. Se observa una correlación fuerte entre los parámetros K_D y K_2 . Incluso fijando la constante de complejación K_1 al valor obtenido a partir del análisis global de la serie de espectros de emisión de fluorescencia ($0.035 \pm 0.007 \text{ mM}^{-1}$), no se consigue un ajuste satisfactorio ya que existe demasiada correlación entre los espectros de los complejos PY: γ -CD y PY₂: γ -CD. Si se simulan los perfiles de concentración de cada una de las especies químicas presentes en el sistema (ecuaciones (A3.13) a (A3.16) en apéndice 3) se deduce que el componente dominante en el sistema es el complejo de estequiometría 2:1, salvo a concentraciones muy bajas de γ -CD.

p324
p324

Por ello, se decidió simplificar el modelo de cuatro equilibrios despreciando la dimerización directa de la PY y teniendo en cuenta sólo la formación de complejos 1:1 y 2:1, es decir, planteando un modelo en el cual la dimerización se ve favorecida por la presencia de γ -CD. Este modelo simplificado (que incluye las constantes K_1 y K_D^C) sólo es aplicable a concentraciones de γ -CD relativamente elevadas, por lo que para realizar este análisis se suprimieron los espectros de absorción de concentración de γ -CD menor de 1.5 mM. El objetivo de este análisis fue obtener un espectro puro de absorción para el complejo 2:1 que después pudiera ser utilizado en el análisis de la serie de espectros completa. Se fijó el espectro puro del monómero, siendo necesario fijar una de las constantes de equilibrio debido a la elevada correlación de los parámetros de ajuste: concretamente el valor de $K_1 = 0.04 \text{ mM}^{-1}$ obtenido a partir del análisis de los espectros de emisión de fluorescencia. El ajuste con este modelo fue satisfactorio (ver residuos en el archivo C5_Ajuste12_PYGammaCD_absorcion_PY2CD.pdf en el CD adjunto) y permitió estimar el valor de la constante de equilibrio K_D^C ($10000 \pm 90000 \text{ mM}^{-1}$) y determinar el espectro del complejo PY₂: γ -CD. El valor de la constante obtenida tiene un error muy grande, pero permite estimar la forma del espectro. Sin embargo, se ha comprobado que el valor de la constante K_1 fijado no afecta al espectro del complejo PY₂: γ -CD obtenido.

A continuación se utilizó este espectro del complejo 2:1 para analizar la serie completa de espectros de absorción con el modelo de cuatro equilibrios (figura 5.31) y obtener así un espectro puro para el complejo 1:1. En este nuevo análisis se fijaron todos los parámetros ya conocidos, tanto espectros puros como constantes de equilibrio. Se fijó entonces el valor de K_D en 3.0 mM^{-1} y los espectros puros de PY y PY_2 (datos obtenidos del análisis de la serie de espectros de absorción a distintas concentraciones de PY) así como el espectro puro de $\text{PY}_2:\gamma\text{-CD}$ (obtenido con el modelo simplificado, teniendo en cuenta sólo la formación de complejos 1:1 y 2:1), aunque no su relación relativa de intensidad con los espectros anteriores. Los residuos del ajuste global anteriormente descrito son satisfactorios y pueden verse en el archivo C5_Ajuste13_PYGammaCD_absorcion_cuatroequilibrios.pdf en el CD adjunto. Con este análisis se obtuvo un valor para la constante de complejación $K_1=0.066 \text{ mM}^{-1}$ (que es del orden del valor obtenido a partir de la serie de espectros de fluorescencia, 0.035 mM^{-1} , aunque casi el doble) y un valor para la constante $K_2=26.5 \text{ mM}^{-1}$. Los espectros puros resultantes en escala de absorptividad molar se muestran en la figura 5.34, siendo las relaciones de intensidades entre ellos las resultantes del ajuste. En resumen, los valores obtenidos para las constantes de equilibrio fueron: $K=0.066 \text{ mM}^{-1}$, $K_2=26.5 \text{ mM}^{-1}$ y $K_D=3.0\pm 0.5 \text{ mM}^{-1}$. Por tanto, el valor calculado para la constante K_D^C (K_2K_D/K) fue 1200 mM^{-1} . Este valor es más razonable que el valor que habíamos presentado con el modelo simplificado, que presentaba gran error ($10000 \pm 90000 \text{ mM}^{-1}$)

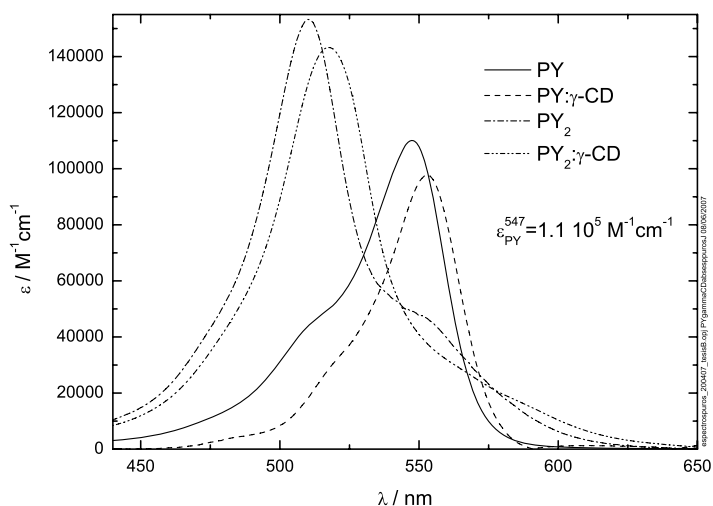


Figura 5.34: Espectros puros de absorción de las diferentes especies existentes en el sistema PY + $\gamma\text{-CD}$ obtenidos mediante análisis global de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de PY a distintas concentraciones de $\gamma\text{-CD}$, con una concentración total de PY de $6.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

p90 En la figura 5.34 se observa que el espectro del complejo PY: γ -CD es bastante similar al que se obtuvo para el complejo de esta pironina con β -CD (ver figura 5.2), con menor intensidad y desplazamiento hacia el rojo respecto al espectro de la PY en disolución acuosa. En cuanto al espectro del dímero complejado (o complejo 2:1), PY₂: γ -CD, su forma y posición espectral son muy similares a las del espectro del dímero PY₂, lo que sugiere que también en este caso se produce una agregación en paralelo de las moléculas de pironina (dímero tipo H).

p118 A continuación se analizaron los tiempos de vida resultantes de los ajustes individuales de los decaimientos de la PY en presencia de γ -CD con un modelo biexponencial, dados en la tabla 5.8. Por analogía con los resultados de tiempos de vida de la PY con β -CD (ver p93 tabla 5.1), el tiempo de vida más largo debe asignarse a la PY libre y el tiempo más corto al complejo PY: γ -CD. Como ya se ha dicho anteriormente, se asume que los dímeros no son fluorescentes. Las variaciones de las amplitudes normalizadas de los dos tiempos de vida frente a la concentración de γ -CD se muestran en la figura 5.35. Estas amplitudes, a pesar de p319 su error, se pueden ajustar utilizando las funciones dadas en el apéndice 1, ecuaciones (A1.26) p319 y (A1.27), si bien la amplitud del tiempo de vida correspondiente a la PY libre no tiende a cero a concentraciones de CD elevadas, tal como se esperaría.

Con el fin de obtener un valor para la constante de equilibrio K_1 a partir de los decaimientos de fluorescencia, se realizó un ajuste global con el modelo biexponencial a la serie de decaimientos de fluorescencia de la PY registrados a distintas concentraciones de γ -CD, corrigiendo previamente los decaimientos por el tiempo de adquisición para que presenten

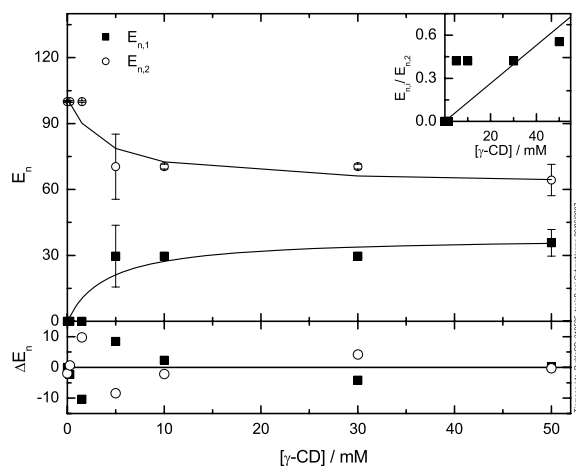


Figura 5.35: Amplitudes absolutas de los tiempos de vida de la PY libre E_2 y del complejo PY: γ -CD (E_1) obtenidas mediante ajustes individuales con un modelo biexponencial a la serie de decaimientos de fluorescencia de la PY con distintas concentraciones de γ -CD.

intensidades absolutas. El ajuste con amplitudes libres es bueno (ver los residuos en el archivo C5_Ajuste14_PYgammaCD_tiemposdevida.pdf en el CD adjunto). Sin embargo, no fue posible realizar un ajuste global dirigido satisfactorio. Como resultado del análisis global se obtuvieron las amplitudes (no normalizadas) de la figura 5.36 y valores para el tiempo de vida de la pironina libre ($\tau_2=1.730\pm 0.003$) y el tiempo de vida del complejo PY: γ -CD ($\tau_1=0.60\pm 0.02$ ns). Sin embargo, la variación de las amplitudes de estos tiempos de vida no es la que sería de esperar con este modelo, ya que el tiempo de vida τ_1 tiene cierta amplitud cuando la concentración de γ -CD es cero. Además, la amplitud correspondiente a la PY libre no tiende a cero a concentraciones altas de CD.

Por tanto, el modelo propuesto no explica satisfactoriamente los datos de tiempos de vida, que encierran una gran complejidad. La variación de la amplitud del tiempo de vida corto (E_1) de la figura 5.36 sugiere que su valor es un promedio de la amplitud del tiempo de vida del complejo PY: γ -CD y la de otro tiempo de vida. El hecho de que la amplitud de este tiempo E_1 no sea cero en ausencia de γ -CD indica que es importante la contribución de ese segundo tiempo de vida a bajas concentraciones de γ -CD.

Medidas de tiempos de vida realizadas con equipos de mayor precisión (en los laboratorios del Prof. M. Mosquera y del Prof. C. A. M. Seidel) indican que las disoluciones acuosas de PY sin CD tienen, además del tiempo de vida que detectamos con nuestro equipo, la presencia de un tiempo corto (τ_s , de aproximadamente 0.8 ns) que no detectamos con nuestro equipo dado su pequeño valor, siendo su contribución menor del 10 %. Estos resultados son independientes de la longitud de onda de excitación (se usaron 310 nm, 370 nm, 470 nm y 510 nm) y de la

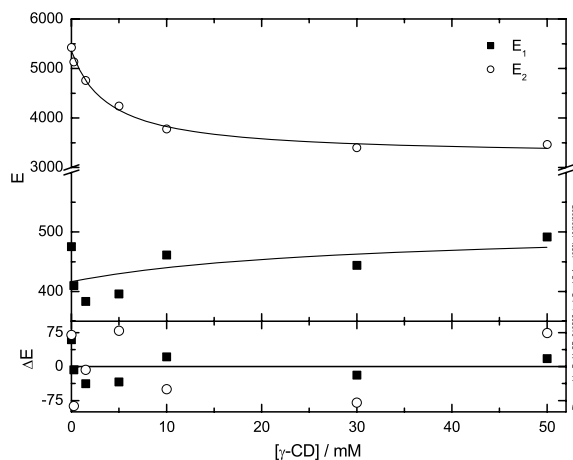


Figura 5.36: Amplitudes normalizadas de los tiempos de vida de la PY libre ($E_{n,2}$) y del complejo PY: γ -CD ($E_{n,1}$) obtenidas mediante el ajuste global con un modelo biexponencial a los decaimientos de fluorescencia de la PY con distintas concentraciones de γ -CD (tabla 5.8).

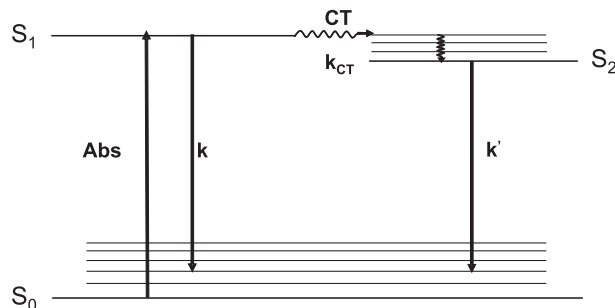


Figura 5.37: Mecanismo de transferencia de carga de la pironina en el estado excitado en disolución acuosa.

longitud de onda de emisión para valores mayores o iguales de 570 nm, si bien a las longitudes de onda de emisión de 550 y 560 nm hay un aumento significativo en la contribución del tiempo de vida corto a la fluorescencia total. Estos resultados parecen indicar que existe un segundo estado emisoro de la PY cuando ésta se encuentra en disolución acuosa.

Una posible interpretación de estos resultados es la existencia de un proceso de transferencia de carga intramolecular de la pironina en el estado excitado, que ocurriría fundamentalmente en disolución acuosa (y en otros disolventes polares). Se propone que los dos estados excitados tienen casi la misma energía (véase figura 5.37), por lo que no se observa doble banda de emisión ni un tiempo de formación en el análisis de los decaimientos de fluorescencia, pero el estado de mayor energía sería el S_1 , formado directamente tras la excitación. Según este modelo, el espectro de fluorescencia debido al tránsito desde el estado de mayor energía (S_1) estaría a longitudes de onda más bajas que el debido al tránsito desde el estado S_2 . Los tiempos de vida serían:

$$\tau_s = \frac{1}{k + k_{CT}} \quad (5.30)$$

$$\tau = \frac{1}{k'} \quad (5.31)$$

Por tanto, el tiempo de vida debido al tránsito desde el estado S_2 sería más largo que el debido al tránsito desde el estado S_1 . Así, el tiempo de vida corto (τ_s) observado experimentalmente en los equipos con mejor resolución que el nuestro es debido a la emisión de fluorescencia que se produce desde el estado directamente excitado (S_1).

Si el espectro de emisión de fluorescencia debido al tránsito desde el estado de mayor energía (S_1) está a longitudes de onda más bajas que el debido al tránsito desde el estado S_2 , la contribución del tiempo de vida más corto debe ser mayor a longitudes de onda más bajas (tal como se observa a 550 y 560 nm). Además, habría un tiempo de formación con tiempo de vida corto a longitudes de onda mayores, que no se observa porque los espectros de

absorción y de emisión de esta pironina están muy solapados (por lo que amplitud negativa se compensa con la positiva). Por tanto, los resultados experimentales pueden ser explicados mediante el modelo propuesto.

Cuando la pironina se compleja con la γ -CD, se encuentra en un entorno más apolar, por lo que el proceso de transferencia de carga en el estado excitado sería menos efectivo. El hecho experimental de que se obtenga un único tiempo de vida para el complejo PY: γ -CD parece indicar que en éste no se produce la transferencia de carga y que la emisión proviene del estado directamente excitado (S_1^{CD}).

Con el fin de confirmar esta interpretación, se realizó el ajuste global con un modelo triexponencial de la serie de decaimientos de fluorescencia de la PY en función de la concentración de γ -CD (tabla 5.8). Se fijaron dos tiempos de vida: el de la pironina libre cuando el tránsito se produce desde el estado S_1 , τ_s , con un valor de 0.5 ns y el tiempo debido al tránsito desde el estado S_2 , con un valor de 1.75 ns (τ_1 de la tabla 5.8). Los residuos del ajuste con este modelo son aleatorios y pueden verse en el archivo C5_Ajuste14_PYgammaCD_tiemposdevida.pdf en el CD adjunto. En el ajuste se obtuvo el tercer tiempo de vida con un valor de 1.06 ± 0.06 ns, que se atribuye al tiempo de vida del complejo PY: γ -CD y que coincide bien con el obtenido a partir de los ajustes individuales (τ_1 en la tabla 5.8). Según este modelo la amplitud del tiempo de vida del complejo, E_1 , debería aumentar al aumentar la concentración de CD, la amplitud de la PY libre, E_2 , debería disminuir al aumentar la concentración de CD y la amplitud del tiempo de vida corto, E_s , también debería disminuir al aumentar la concentración de CD. Las amplitudes resultantes de este ajuste se muestran en la figura 5.38, en la que se observa que a altas concentraciones de γ -CD las amplitudes de los dos tiempos de vida cortos (E_1 y E_s) no siguen el comportamiento esperado. En esta figura se representa además la suma de estas amplitudes, $E_1 + E_s$, y se observa que esta suma es aproximadamente constante para los distintos valores de concentración de γ -CD. El hecho de que no sea posible resolver las amplitudes de estos tiempos de vida se debe posiblemente a la alta correlación entre estos tiempos de vida, al ser dos tiempos muy cortos y muy cercanos.

Cabe destacar que la amplitud correspondiente al tiempo de vida de la PY libre (E_2) no sigue el modelo propuesto ya que esta amplitud no tiende a cero a concentraciones altas de γ -CD. Sin embargo, es bueno el ajuste a este modelo con una amplitud fija no nula a concentraciones altas de γ -CD. Las razones por las que esta amplitud no tiende a cero pueden ser:

- 1- La presencia de dímero de PY, porque aunque éste no emita fluorescencia, su existencia afecta al valor de la concentración de pironina libre. A partir de los valores de los parámetros obtenidos para este modelo se puede estimar que la dimerización de la PY se produce en muy pequeña proporción en ausencia de γ -CD. Por tanto, la concentración de dímero, PY_2 , es despreciable para las disoluciones con las concentraciones usadas en las medidas de fluorescencia (menor del 1%). Sin embargo, la concentración de dímero complejado,

p118

p118

p118

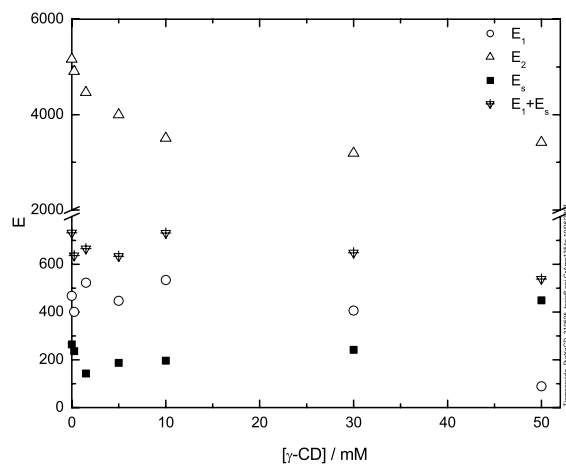


Figura 5.38: Amplitudes absolutas de los tiempos de vida de la PY libre en sus estados S_1 (E_s) y S_2 (E_2) y del complejo PY: γ -CD (E_1) obtenidos mediante el ajuste global con un modelo triexponencial a la serie de decaimientos de fluorescencia de la PY con distintas concentraciones de γ -CD. E_1 , E_2 y E_s corresponden a las amplitudes de los tiempos de vida de 1.06 ns, 1.75 ns y 0.5 ns, respectivamente. También se representa la suma de amplitudes $E_1 + E_s$.

PY₂: γ -CD, es relativamente alta. Por ejemplo, cuando la concentración total de PY es de $1 \cdot 10^{-6}$ M (valor de la concentración de PY en las disoluciones utilizadas para registrar los decaimientos de fluorescencia), la concentración de equilibrio del dímero complejado es en torno al 20 % en el rango de concentración de γ -CD de 10 a 50 mM. Para la concentración de pironina total usada en las medidas de fluorescencia de estado estacionario ($2.0 \cdot 10^{-7}$ M), la concentración de dímero complejado es menor del 8 %. Aunque esta concentración no es despreciable, sólo se detectan dos componentes en las series de espectros de emisión por lo que se concluye que los dímeros complejados no son fluorescentes. Es importante destacar que a pesar de que los dímeros no emitan fluorescencia están presentes en la disolución y por tanto tienen un cierto efecto en las concentraciones de equilibrio de las otras especies, especialmente en la concentración de PY libre.

2- Es posible que se produzca transferencia de carga en el caso del complejo formado con γ -CD. Esto es debido a que la pironina en la γ -CD no está tan ajustada como dentro de la β -CD. Por tanto, es lógico que existan moléculas de agua en el interior de la cavidad que aporten un entorno más polar. Además, la mayor libertad de movimiento de la PY dentro de la cavidad de γ -CD puede facilitar el proceso de transferencia de carga en el complejo PY: γ -CD.

Utilizando los resultados obtenidos para los espectros puros de absorción y de emisión del complejo PY: γ -CD, se determinó el rendimiento cuántico de esta especie, que permitió

	τ / ns	ϕ	k_r / ns ⁻¹	k_{nr} / ns ⁻¹
PY: γ -CD	1.06	0.31	0.29	0.65

Tabla 5.11: Tiempo de vida, rendimiento cuántico y constantes de desactivación radiante y no radiante para el complejo PY: γ -CD.

calcular los valores de las constantes de desactivación radiante y no radiante del complejo. El tiempo de vida, el rendimiento cuántico y las constantes de desactivación radiante y no radiante del complejo PY: γ -CD se resumen en la tabla 5.11.

Al igual que ocurría con el complejo PY: β -CD (tabla 5.5), se observa un aumento significativo de la constante de desactivación no radiante en el complejo respecto a la PY libre en disolución acuosa.

p104

Pironina B

El comportamiento observado tanto en absorción como en emisión para la PB en presencia de γ -CD es muy similar al de la PY analizado anteriormente. Por tanto, se seguirá un procedimiento de análisis análogo, empezando por la determinación de la constante de dimerización a partir de los espectros de absorción de diferentes concentraciones de PB, siguiendo por la determinación de la constante de equilibrio de complejación K_1 a partir de los espectros de emisión y finalmente, la obtención de los espectros de absorción de las diferentes especies implicadas en el sistema PB + γ -CD.

El análisis de PCA de la serie de espectros de absorción a distintas concentraciones de PB de la figura 5.39 indica dos componentes según el diagrama de autovectores frente a la concentración de PB y el Durbin Watson promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de PB. Los restantes criterios indican un mayor número de componentes, pero están afectados por los artefactos inherentes a la técnica de absorción. El análisis global de esta serie de espectros de absorción con el modelo de dimerización en el intervalo de 440 a 540 nm a distintas concentraciones de PB permitió determinar el valor de la constante de equilibrio de dimerización $K_D=5.0\pm 0.8$ mM⁻¹. Fijando este valor para la constante de dimerización se realizó el ajuste global para la serie de espectros completos (ver residuos en el archivo C5_Ajuste15_PB_absorcion_dimerizacion.pdf en el CD adjunto) y se obtuvieron los espectros puros del monómero y del dímero de la PB (véase la figura 5.43).

p140

El análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de PB a distintas concentraciones de γ -CD (figura 5.40) indica claramente la existencia de dos componentes según los criterios en función de la concentración: autovectores frente a la concentración de γ -CD, autovalores, error medio y Durbin Watson promedio de los obtenidos a distintas concentraciones de γ -CD. Sin embargo, otros criterios se ven afectados por los

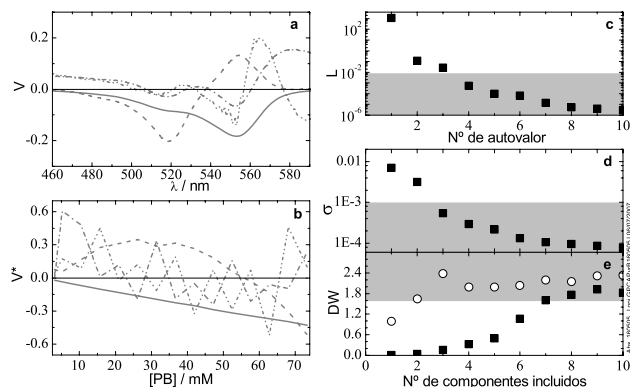


Figura 5.39: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de diferentes concentraciones de PB a pH 3.5 (datos de la figura 5.25). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de PB (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (-.-) y cuarto (·-·); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de PB (círculos).

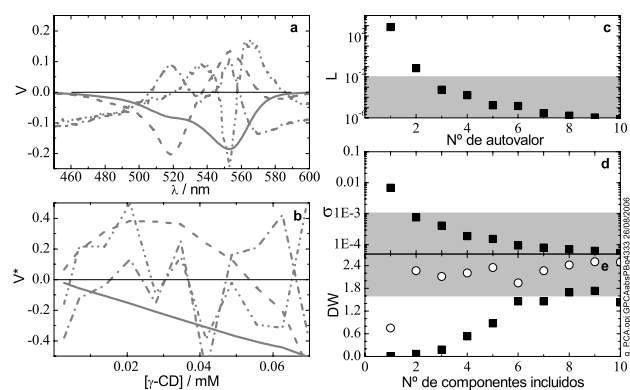


Figura 5.40: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de la PB en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD a pH 3.5 (datos de la figura 5.26). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de γ -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (-.-) y cuarto (·-·); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de γ -CD (círculos).

artefactos instrumentales propios de los espectros de absorción y conducen a un número elevado de componentes. Según el resultado de PCA, estos datos experimentales deberían explicarse mediante un modelo sencillo, como una complejación 1:1 entre la PB y la γ -CD. Sin embargo, éste no es el caso.

Para obtener una mayor información acerca del sistema, se analizan los espectros de emisión de la PB en presencia de γ -CD. El análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de disoluciones acuosas de PB a distintas concentraciones de γ -CD (figura 5.41) muestra dos componentes según la mayoría de los criterios, si bien puede detectarse la presencia de un pequeño tercer componente según alguno de los criterios (autovectores frente a la concentración de γ -CD, autovalores).

Dada la similitud de las estructuras de las dos pironinas empleadas, se propone el mismo modelo que el usado para la complejación de la PY con γ -CD, indicado en el esquema de la figura 5.31. Dada la complejidad del análisis de los espectros de absorción se procedió en primer lugar a realizar el análisis global de la serie de espectros de emisión. A diferencia del modelo propuesto para la serie de espectros de absorción, la función de ajuste para la serie de espectros de emisión de fluorescencia, será una combinación lineal de las concentraciones de pironina libre y complejo 1:1, que son las únicas especies que se considera que emiten radiación. Los residuos del ajuste global con este modelo para dos series de espectros de emisión indican que el ajuste es bueno y pueden verse en el CD adjunto (archivos C5_Ajuste16_PBgammaCD_emision_Serie1.pdf y C5_Ajuste17_PBgammaCD_emision_Serie2.pdf). A partir de estos análisis globales se obtuvieron los siguientes resultados:

p126

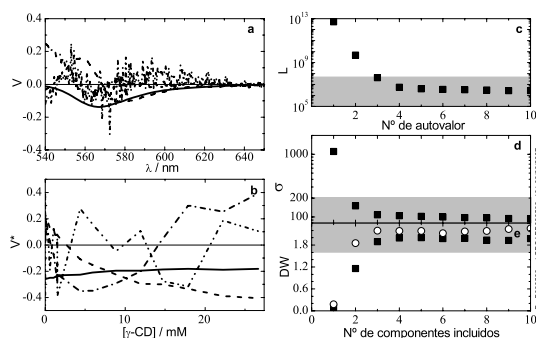


Figura 5.41: Resultados del análisis de PCA de una serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de PB en presencia de distintas concentraciones de γ -CD a pH 5.2. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de γ -CD (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de γ -CD (círculos).

Serie	K_1 / mM^{-1}
1	0.17 ± 0.04
2	0.20 ± 0.05
Media	0.19 ± 0.03

Tabla 5.12: Valores de la constante de complejación K_1 obtenidos mediante el análisis global de series de espectros de emisión de fluorescencia de la PB con γ -CD.

- Los valores de la constante de complejación K_1 indicados en la tabla 5.12 (se indican los valores obtenidos para dos series de espectros de emisión de fluorescencia y el valor medio de ambos). La concordancia entre los valores es buena dentro del error que presentan. Al igual que ocurría para la PY, la constante de complejación de la PB con γ -CD es unas 10 veces menor que con β -CD ($K = 2.0 \text{ mM}^{-1}$).

- Los espectros puros de emisión de fluorescencia para la PB libre y su complejo de estequiometría 1:1 PB: γ -CD, que se muestran en la figura 5.42. En la gráfica insertada en esta figura se muestran los espectros puros de emisión normalizados en el máximo. En esta gráfica se observa un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda del espectro del complejo PB: γ -CD respecto al espectro de la PB, al igual que ocurría con el complejo PB: β -CD (figura 5.18).

p110

Al igual que se hizo con la PY, una vez obtenido el valor de la constante de complejación a partir de la serie de espectros de emisión de fluorescencia, analizamos los espectros de absorción en función de la concentración de γ -CD.

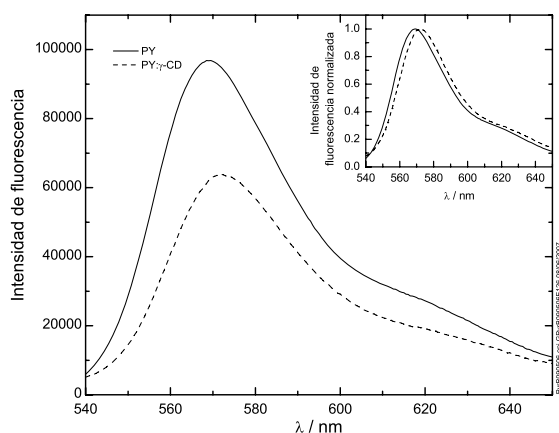


Figura 5.42: Espectros puros de emisión de fluorescencia obtenidos mediante el análisis global de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de PB a pH 5.2 para la PB libre y formando el complejo PB: γ -CD. La figura insertada muestra dichos espectros normalizados en el máximo. Longitud de onda de excitación de 515 nm.

Con el modelo de cuatro equilibrios indicado en la figura 5.31 y fijando los espectros de PB y de PB_2 junto con el valor de K_D (5.0 mM^{-1}) obtenidos anteriormente a partir de los espectros de absorción a diferentes concentraciones de PB y el valor de K_1 , obtenido a partir de la serie de espectros de emisión ($0.19 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1}$), se procede al análisis de la serie de espectros de absorción a distintas concentraciones de γ -CD de la figura 5.26 para la obtención del resto de espectros puros. Los residuos del ajuste con este modelo fijando el valor de la constante de complejación $K = 0.19 \text{ mM}^{-1}$ indican que se trata de un ajuste satisfactorio (ver archivo C5_Ajuste18_PBgammaCD_absorcion_cuatroequilibrios_K186.pdf en el CD adjunto). A partir de este ajuste se obtuvieron:

- Los espectros puros de absorción de los complejos $PB:\gamma$ -CD y $PB_2:\gamma$ -CD. Estos espectros se muestran en la figura 5.43, junto con los espectros de absorción de la PB libre y del dímero PB_2 .

- El valor de la constante $K_2 = 8.3 \text{ mM}^{-1}$ que, utilizando la ecuación (A3.12), conduce a un valor de la constante K_D^C de 222 mM^{-1} .

La influencia del valor de la constante K_1 sobre el espectro puro del complejo $PB:\gamma$ -CD se analizó fijando otros valores para la constante de complejación K_1 (0.16 mM^{-1} y 0.22 mM^{-1} , valores mínimo y máximo de esta constante según su error). En los dos casos se obtuvieron buenos ajustes (ver residuos en los archivos C5_Ajuste19_PBgammaCD_absorcion_cuatroequilibrios_K156.pdf y C5_Ajuste20_PBgammaCD_absorcion_cuatroequilibrios_K216.pdf en el CD adjunto). Los valores de la constante K_2 así obtenidos son prácticamente iguales y la variación espectral en el espectro del complejo $PB:\gamma$ -CD no es muy grande (ver figura 5.44).

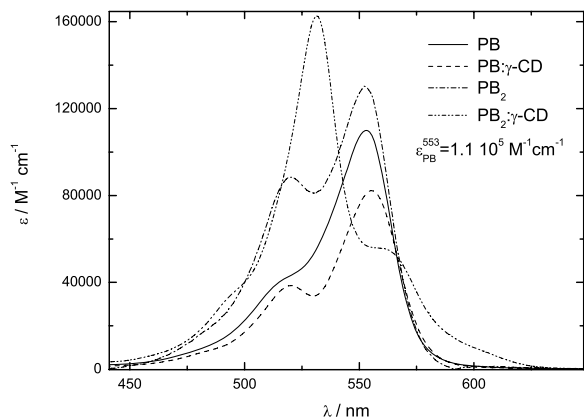


Figura 5.43: Espectros puros de absorción obtenidos para las diferentes especies existentes cuando la PB está en presencia de γ -CD mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de PB en presencia de distintas concentraciones de γ -CD.

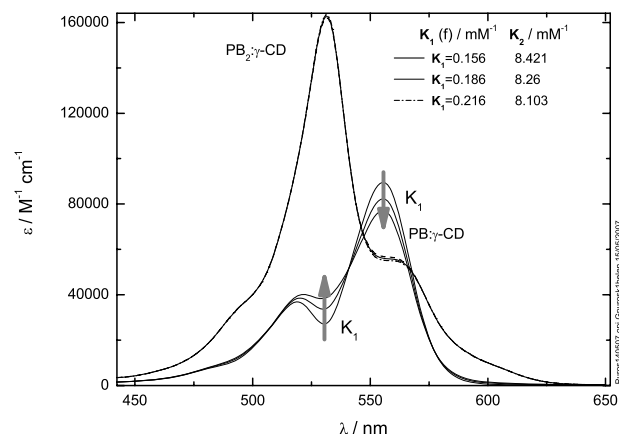


Figura 5.44: Espectros puros de absorción obtenidos para el complejo PB: γ -CD y para el complejo PB₂: γ -CD mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de PB con distintas concentraciones de γ -CD fijando diferentes valores de la constante K_1 .

Si se analizan los espectros puros obtenidos para las diferentes especies existentes en el sistema PB + γ -CD (figura 5.43), se observa que el espectro del complejo PB: γ -CD es muy similar al del complejo PB: β -CD (figura 5.17), con un desplazamiento hacia el rojo y menor intensidad que el de la PB en disolución acuosa. En cuanto a los espectros de los dímeros, éstos son completamente diferentes entre sí: el dímero PB₂ presenta su máximo a longitudes de onda similares a la PB libre, lo cual sugiere que se trata de un agregado tipo J, donde las moléculas de pironina presentan una asociación tipo cabeza-cola; en cambio, el dímero complejoado PB: γ -CD presenta un espectro de absorción significativamente desplazado hacia el azul respecto al de la PB libre, lo cual se interpreta como un agregado tipo H con las moléculas asociadas paralelamente.

En cuanto a los tiempos de vida (tabla 5.9) los valores obtenidos son similares a los de la PB con β -CD (tabla 5.3) y se interpretan de la misma forma: un tiempo de vida intermedio en torno a 1 ns debido a la PB en disolución acuosa, un tiempo de vida corto debido al complejo PB: γ -CD y un tercer tiempo de vida residual debido a una impureza, cuya contribución es independiente de la concentración de γ -CD. La representación de las variaciones de las amplitudes normalizadas de esos tiempos de vida frente a la concentración de γ -CD puede verse en la figura 5.45. Tal como se esperaba, se observa que la amplitud del tiempo debido a la PB libre disminuye al tiempo que la amplitud correspondiente al complejo PB: γ -CD aumenta al incrementar la concentración de γ -CD, aunque las amplitudes a las más altas concentraciones no siguen esas tendencias. La relación de amplitudes, que debería ser lineal con la concentración de CD, muestra clara desviación de la linealidad (ver gráfica insertada en la figura 5.45). Por tanto, el comportamiento de los tiempos de vida se acerca al esperado pero no coincide en su totalidad.

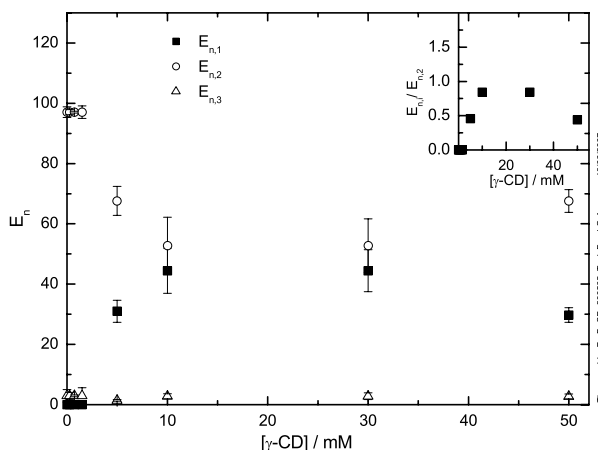


Figura 5.45: Amplitudes normalizadas de los tiempos de vida de la PB libre ($E_{n,2}$), del complejo PB: γ -CD ($E_{n,1}$) y de la impureza ($E_{n,3}$) obtenidas mediante ajustes individuales con un modelo triexponencial de los decaimientos de fluorescencia de la PB con distintas concentraciones de γ -CD (tabla 5.9).

Para analizar más cuantitativamente los datos experimentales, se procedió a un análisis global de la serie de decaimientos, previamente convertidos a intensidades absolutas. El ajuste global de la serie de decaimientos de fluorescencia de PB a distintas concentraciones de γ -CD con un modelo triexponencial con amplitudes libres fue satisfactorio (ver archivo C5_Ajuste21_PBgammaCD_tiemposdevida.pdf en el CD adjunto). De este ajuste se obtuvieron los tres tiempos de vida esperados, uno de 1.091 ± 0.001 ns para la PB libre; otro menor, con un valor de 0.70 ± 0.03 ns, que se correspondería con el del complejo PB: γ -CD, ya que sólo aparece cuando existe en la disolución γ -CD; y un tercer tiempo de 2.55 ± 0.05 ns, que sería el que se atribuye a una impureza, con aportación pequeña pero constante con la concentración de CD. Las amplitudes resultantes de este ajuste global se muestran en la figura 5.46. La amplitud correspondiente al complejo PB: γ -CD, E_1 , aumenta con la concentración de γ -CD; la amplitud correspondiente a la PB libre, E_2 , disminuye con la concentración de γ -CD; y la amplitud correspondiente al tercero de los tiempos observados no tiene una tendencia clara presentando un valor prácticamente independiente de la concentración de γ -CD. Sin embargo, cabe señalar que la amplitud correspondiente a la PB libre no sigue el modelo que se esperaría (ecuación (A1.26) en apéndice 1). El ajuste de las amplitudes con este modelo no es bueno, ya que la amplitud cuyo valor disminuye no tiende a cero a concentraciones altas de γ -CD (el ajuste con este modelo que obliga a la amplitud a haerse cero cuando toda la PB está complejada se representa como una línea a trazos en la figura 5.46). Sin embargo, un modelo con una amplitud fija no nula a concentraciones altas de γ -CD permite obtener un buen ajuste (línea continua en la figura 5.46). Las razones por las que esta amplitud no tiende a cero a concentraciones altas de γ -CD pueden ser las mismas que las que ya hemos indicado para el complejo PY: γ -CD:

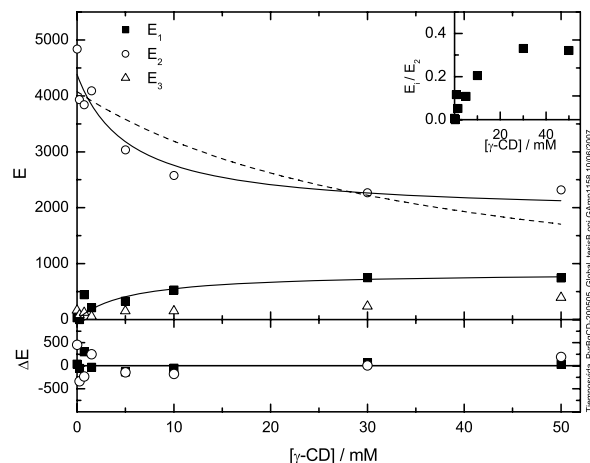


Figura 5.46: Amplitudes absolutas de los tiempos de vida de la PB libre (E_2), del complejo PB: γ -CD (E_1) y de la impureza (E_3) obtenidas mediante el ajuste global con un modelo triexponencial a la serie de decaimientos de fluorescencia de la PB con distintas concentraciones de γ -CD.

1- Existencia de dímero de PB. En este caso la concentración de dímero complejoado para la concentración de PB usada en las medidas de decaimientos de fluorescencia ($1 \cdot 10^{-6}$ M) es sobre el 5 % en el intervalo de concentración de γ -CD de 5 a 10 mM.

2- Posible transferencia de carga en el complejo PB: γ -CD.

3- Transferencia de carga de la PB libre.

Medidas de tiempos de vida realizadas con mayor precisión indican que las disoluciones acuosas de PB sin γ -CD presentan, además del tiempo de vida que detectamos con nuestro equipo, un tiempo corto (τ_s , de aproximadamente 0.5 ns para la PB) que no detectamos con nuestro equipo dado su pequeño valor, siendo su contribución menor del 10 %. La presencia de este tiempo corto, que podría provenir de la emisión desde el estado directamente excitado de la PB libre, podría influir tanto en los valores de los tiempos obtenidos como en sus amplitudes.

Finalmente, se calculó el valor del rendimiento cuántico de la PB en el complejo PB: γ -CD, con el que se obtuvieron las constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante. El tiempo de vida, el rendimiento cuántico y las constantes de desactivación radiantes y no radiantes del complejo PB: γ -CD se muestran en la tabla 5.13. De nuevo, la complejación lleva a un aumento de la constante de velocidad de desactivación no radiante del complejo respecto a la PB libre, aunque de menor magnitud que en el caso del complejo PB: β -CD.

	τ / ns	ϕ	k_r / ns ⁻¹	k_{nr} / ns ⁻¹
PB: γ -CD	0.70	0.28	0.40	1.03

Tabla 5.13: Tiempo de vida, rendimiento cuántico y constantes de desactivación radiantes y no radiantes para el complejo PB: γ -CD.

Comparación de resultados para las PY y PB con γ -CD y con β -CD

Los sistemas formados por la PY o la PB con la γ -CD, son más complejos que los formados por estas pironinas con la β -CD, dado que la dimerización de las pironinas está favorecida por la presencia de la γ -CD.

Las constantes de estabilidad de los complejos pironina:ciclodextrina estudiados tienen valores aproximadamente diez veces mayores para los complejos pironina: β -CD que para los complejos pironina: γ -CD (tabla 5.14). Por tanto, la fortaleza de los complejos que forman la PY y PB con la β -CD es mayor que la de los complejos que forman estas dos pironinas con la γ -CD.

El valor de la constante de complejación K de los complejos que forma la pironina B con la β -ciclodextrina es unas 5 veces mayor que el obtenido para el complejo de la pironina Y con esta CD (tabla 5.14). Esta relación coincide perfectamente con la encontrada para la complejación de las PY y PB con la γ -CD (véase la tabla 5.14). Esto se ha atribuido a interacciones específicas entre el anillo xanténico de las pironinas y los oxígenos glucosídicos de estas ciclodextrinas, las cuales son mucho mayores en el caso de la PB que en el de la PY. Esta concordancia en el comportamiento para estas dos ciclodextrinas parece indicar que la naturaleza de las interacciones es parecida en el caso de la complejación de estas pironinas con la β -CD y con la γ -CD.

Las diferencias encontradas entre las constantes de complejación K_1 de las dos pironinas con las dos ciclodextrinas se analizarán más detalladamente en el capítulo siguiente, en el que se estudia la dinámica del proceso de complejación.

Otro resultado que merece la pena destacar es el referido a las estructuras de los dímeros de las pironinas en su forma libre (P_2) o complejada (P_2 :CD). Utilizando la teoría del

K / mM ⁻¹	β -CD	γ -CD
PY	0.40±0.04	0.035±0.007
PB	2.1±0.2	0.19±0.03

Tabla 5.14: Resumen de los valores de las constantes del equilibrio de complejación de la PY y PB con β -CD y γ -CD obtenidos mediante el análisis global de series de emisión de fluorescencia en estado estacionario a distintas concentraciones de CD.

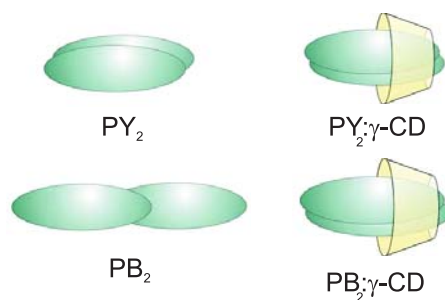


Figura 5.47: Representación esquemática de la disposición de las moléculas de PY y PB en los respectivos dímeros P_2 y en los complejos de tipo 2:1 (P_2 :CD) que estas pironinas forman con la γ -CD.

excitón se dedujo que los dímeros PY_2 están más próximos a una disposición tipo H (paralela o tipo emparedado) que los PB_2 , cuya estructura sería más alargada cabeza-cola (tipo J), posiblemente debido al mayor impedimento estérico de los grupos etilo. Cuando se introducen dentro de la γ -CD, ambas pironinas presentan agregados tipo H, es decir, en disposición paralela, lo cual implica una reorganización para el caso de la PB. La figura 5.47 muestra una representación esquemática de los dímeros de PY y PB y de los complejos de tipo 2:1 que estas pironinas forman con la γ -CD.

En cuanto a la efectividad del proceso de dimerización de las pironinas, se ha visto que en disolución acuosa la dimerización es poco efectiva y es semejante para las dos pironinas, como indican los valores de las respectivas constantes de dimerización K_D (tabla 5.15). Con la adición de γ -CD, aumenta mucho la tendencia a la dimerización en las dos pironinas, pero el incremento es muy superior en el caso de la PY, tal como ponen de manifiesto los valores más altos de las constantes K_2 y K_D^C para esta pironina. Este resultado es lógico si se tiene en cuenta que la PY posee grupos laterales menos voluminosos que la PB de manera que su dímero puede ser incluido más fácilmente en el interior de la cavidad de la γ -CD.

	PY	PB
K_1 / mM^{-1}	0.066	0.19
K_2 / mM^{-1}	26.5	8.26
K_D / mM^{-1}	3.0	5.00
K_D^C / mM^{-1}	1200	222

Tabla 5.15: Valores de las constantes K_1 , K_2 , K_D y K_D^C para las dos pironinas con γ -CD.

5.3 Comportamiento fotofísico de las pironinas Y y B en diferentes disolventes

En este apartado se analiza el comportamiento fotofísico de las pironinas Y y B en disolventes de diferentes polaridades con el fin de compararlo con el observado para los complejos formados entre estas pironinas y las ciclodextrinas β -CD y γ -CD.

5.3.1 Resultados

Pironina Y

En la figura 5.48 se muestra que el espectro de absorción de la PY en los distintos disolventes sufre sólo pequeños desplazamientos hacia el rojo respecto al espectro en agua, excepto en el 1,4-dioxano, donde la variación del espectro de absorción es grande. En 1,4-dioxano la banda de absorción se hace más compleja, presentando a longitudes de onda altas la tendencia mostrada en los otros disolventes, es decir, un desplazamiento hacia el rojo según disminuye la polaridad del disolvente (véase la gráfica insertada en la figura 5.48), pero a la vez presenta una absorbancia significativa a longitudes de onda bajas que origina un desplazamiento del máximo de absorción de la PY en 1,4-dioxano hacia longitudes de onda bajas. Además de estos espectros obtenidos experimentalmente en diferentes disolventes, se representa el espectro de absorción del complejo PY: β -CD, obtenido mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de PY a distintas concentraciones de β -CD (véase la figura 5.12). Se observa que el espectro del complejo PY: β -CD está desplazado hacia mayores longitudes de onda respecto al de la PY en agua y coincide a longitudes de onda altas con el obtenido en 1,4-dioxano. Se representan también los espectros de absorción del complejo PY: γ -CD, obtenidos mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de PY a distintas concentraciones de γ -CD (véase la figura 5.34). El espectro de absorción del complejo PY: γ -CD presenta el máximo de absorción desplazado hacia mayores longitudes de onda respecto al máximo de absorción de la PY en los disolventes estudiados.

p103

p130

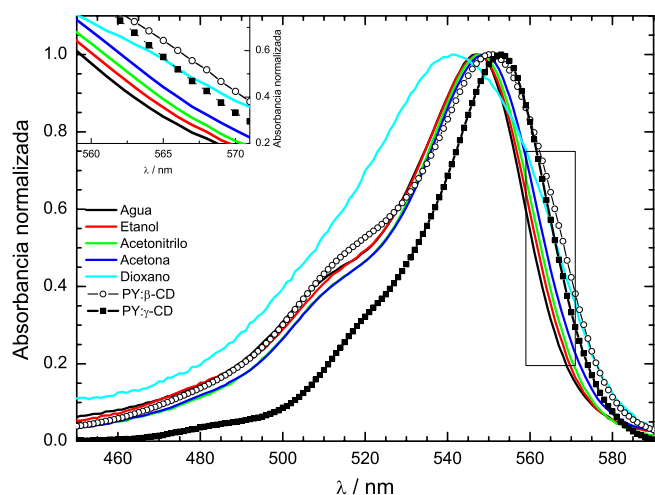


Figura 5.48: Espectros de absorción normalizados en el máximo de la PY en distintos disolventes. Además de los espectros obtenidos experimentalmente, se representan los espectros de absorción de los complejos PY: β -CD y PY: γ -CD. La gráfica insertada muestra una ampliación de la zona espectral señalada en la figura.

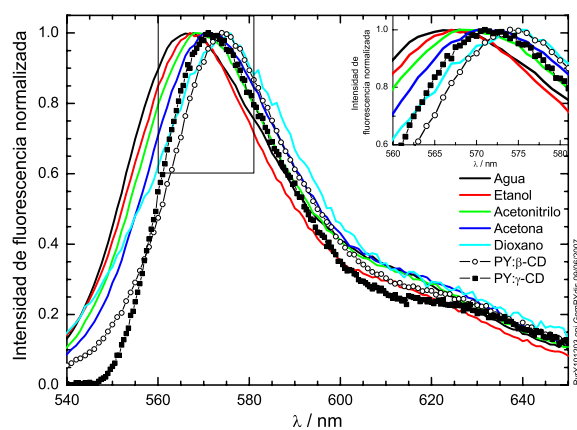


Figura 5.49: Espectros de emisión corregidos normalizados en el máximo de la PY en distintos disolventes. Además de los espectros obtenidos experimentalmente se representan los espectros de emisión de los complejos PY: β -CD y PY: γ -CD. En la gráfica insertada se muestra una ampliación de la zona espectral señalada en la figura.

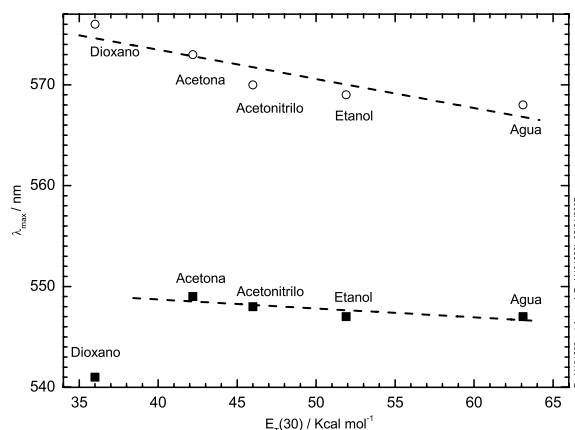


Figura 5.50: Representación de la longitud de onda a la que se encuentran los máximos de absorción (cuadrados) y de emisión (círculos) de la PY en distintos disolventes frente al parámetro empírico $E_T(30)$.

En la figura 5.49 se representan los espectros de emisión experimentales normalizados en el máximo de la PY en diferentes disolventes. Se observa un pequeño desplazamiento del espectro hacia el rojo a medida que disminuye la polaridad del disolvente. Además, se representa el espectro de emisión del complejo PY: β -CD, obtenido mediante el análisis global de la serie de espectros de emisión de la PY con diferentes concentraciones de β -CD (véase la figura 5.13) y el espectro de emisión del complejo PY: γ -CD, obtenido mediante el análisis global de la serie de espectros de emisión de la PY con diferentes concentraciones de γ -CD (véase la figura 5.33). Se observa que el espectro de emisión del complejo PY: β -CD está desplazado hacia mayores longitudes de onda respecto al de la PY en agua y la posición del máximo de emisión del complejo PY: β -CD coincide con la observada en el 1,4-dioxano. Sin embargo, a longitudes de ondas menores de 560 nm el espectro de emisión de la PY en 1,4-dioxano presenta un hombro que no se observa en el espectro del complejo PY: β -CD. El espectro de emisión del complejo PY: γ -CD aparece a menores longitudes de onda que el del complejo PY: β -CD, presentando el máximo de emisión a aproximadamente la misma longitud de onda que una disolución de la PY en acetona.

p103

p128

En la figura 5.50 se representa la longitud de onda a la que se encuentran los máximos de absorción y de emisión de la PY en distintos disolventes frente al parámetro $E_T(30)$. A medida que disminuye la polaridad del disolvente se observa un muy pequeño desplazamiento de la banda de absorción hacia mayores longitudes de onda. En 1,4-dioxano el máximo de absorción de la PY se desplaza de forma anómala hacia menores longitudes de onda, si bien a longitudes de onda altas se observa el comportamiento general (véase la figura 5.48). Se observa que conforme el entorno en el que se encuentra la PY es más apolar la banda de emisión se desplaza de una forma sistemática hacia mayores longitudes de onda.

Disolvente	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
Agua	1.758 ± 0.004	-	100	-	0.988
Etanol	2.18 ± 0.01	5.8 ± 0.7	100	<1	1.19
Acetonitrilo	1.851 ± 0.008	7 ± 2	100	<1	1.07
Acetona	1.94 ± 0.03	3.40(f)	100	<1	1.16
1,4-Dioxano	1.03 ± 0.03	3.4 ± 0.1	92	8	1.21

Tabla 5.16: Tiempos de vida de la PY en distintos disolventes obtenidos mediante análisis individuales de los decaimientos de fluorescencia registrados a 570 nm con un número fijo de cuentas en el máximo. La longitud de onda de excitación usada fue 310 nm. $E_{n,i}$ indica la contribución a la fluorescencia de cada una de las exponenciales.

Los tiempos de vida obtenidos experimentalmente para la PY en los distintos disolventes, a partir del análisis de los decaimientos de fluorescencia medidos a 570 nm se muestran en la tabla 5.16. Salvo para la PY en agua, no fue posible obtener buenos ajustes con un modelo monoexponencial sino que fue necesario un modelo biexponencial, si bien esta segunda exponencial tiene una contribución muy pequeña, $E_{n,2}$.

Pironina B

Los resultados obtenidos para la PB en los diferentes disolventes usados en este trabajo son similares a los de la PY. La figura 5.51 muestra los espectros de absorción de la PB en los distintos disolventes. En la figura 5.51 se observa que el espectro de absorción de la PB sufre un ligero ensanchamiento hacia el rojo a medida que disminuye la polaridad del disolvente. En 1,4-dioxano a bajas longitudes de onda el espectro de absorción presenta una contribución adicional que hace que el máximo de absorción se desplace hacia menores longitudes de onda. Se observa que el espectro del complejo PB: β -CD (dado en la figura 5.17) está desplazado hacia mayores longitudes de onda respecto al espectro de la PB en agua y coincide a longitudes de onda altas con el obtenido en 1,4-dioxano. El espectro de absorción del complejo PB: γ -CD (figura 5.43) sigue un comportamiento análogo al del complejo PB: β -CD, aunque el hombro a bajas longitudes de onda es más pronunciado.

En la figura 5.52 se muestran los espectros de emisión de la PB en diferentes disolventes. Se observa que la banda de emisión de la PB se desplaza hacia mayores longitudes de onda conforme el disolvente es más apolar. En el espectro de emisión de fluorescencia de la PB en 1,4-dioxano se observa un hombro a longitudes de onda bajas. El espectro de emisión del complejo PB: β -CD (dado en la figura 5.18) es muy similar al que presenta esta pironina en 1,4-dioxano. Sin embargo, en 1,4-dioxano aparece un hombro a longitudes de onda bajas que no aparece en el caso de los dos complejos PB:CD estudiados. El espectro de emisión del complejo PB: γ -CD (dado en la figura 5.42) presenta su máximo de emisión

p109

p140

p110

p139

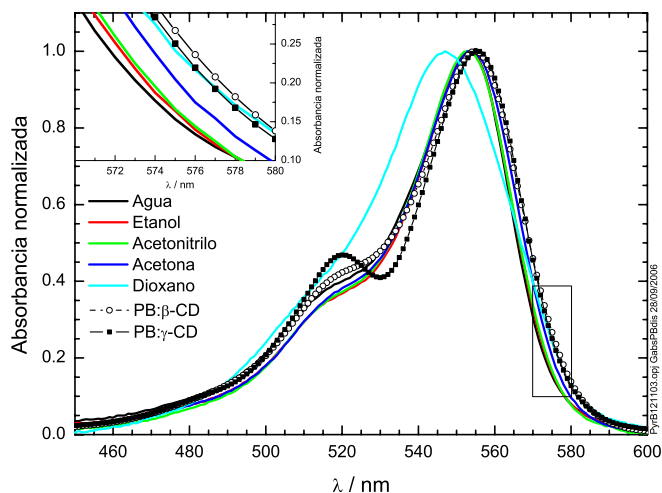


Figura 5.51: Espectros de absorción normalizados en el máximo de la PB en distintos disolventes. Además de los espectros obtenidos experimentalmente, se representan los espectros de absorción de los complejos PB: β -CD y PB: γ -CD. La gráfica insertada es una ampliación de la zona indicada en la figura.

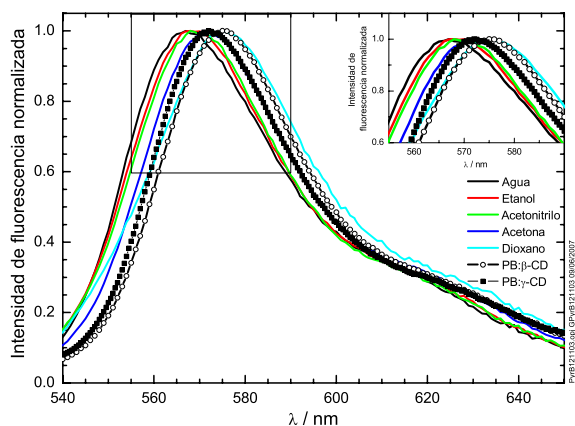


Figura 5.52: Espectros de emisión normalizados en el máximo de la PB en distintos disolventes. Además de los espectros obtenidos experimentalmente se representan los espectros de emisión de los complejos PB: β -CD y PB: γ -CD. La gráfica insertada es una ampliación de la zona indicada en la figura.

a aproximadamente la misma longitud de onda que el que presenta el espectro de emisión de esta pironina en acetona.

En la figura 5.53 se representa la posición de los máximos de absorción y de emisión de fluorescencia frente al parámetro empírico de polaridad $E_T(30)$. En los espectros de absorción

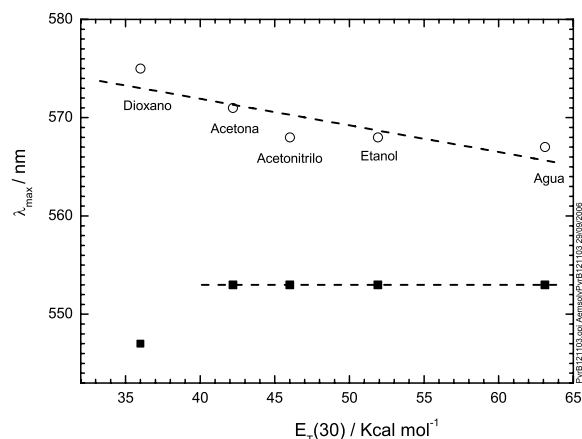


Figura 5.53: Representación de la longitud de onda a la que se encuentra el máximo de absorción (cuadrados) y de emisión (círculos) de la PB en distintos disolventes frente al parámetro empírico de polaridad $E_T(30)$.

no se observa apenas variación en la posición del máximo de absorción. En 1,4-dioxano el máximo de absorción se desplaza de forma anómala hacia menores longitudes de onda. Sin embargo, a longitudes de onda altas se observa el comportamiento general (véase la figura 5.51), es decir conforme el disolvente es más apolar la banda de absorción se ensancha en la zona de mayores longitudes de onda. Se observa que conforme el entorno en el que se encuentra la PB es más apolar la banda de emisión se desplaza de una forma sistemática hacia mayores longitudes de onda.

Los tiempos de vida obtenidos experimentalmente para la PB en los distintos disolventes a partir de análisis individuales de los decaimientos registrados a 570 nm se muestran en la tabla 5.17. En todos ellos, para obtener un buen ajuste, es necesario usar un modelo biexponencial. Además del tiempo de vida τ_1 correspondiente a la PB, se observa un segundo tiempo de vida más largo τ_2 de pequeña contribución.

5.3.2 Discusión

Pironina Y

Los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia presentados parecen indicar que la polaridad del disolvente tiene un efecto de carácter general sobre las bandas de absorción y de emisión de la PY. La longitud de onda a la que se encuentra el máximo de emisión del complejo PY: β -CD es prácticamente la misma que la que presenta la PY en 1,4-dioxano, ya que en este caso la posición del máximo de emisión no se ve afectada por el hombro a

Disolvente	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
Agua	1.17 ± 0.01	2.5 ± 0.5	98	2	1.16
Etanol	1.71 ± 0.04	2.7 ± 0.6	94	6	1.02
Acetonitrilo	1.24 ± 0.01	3.6 ± 0.9	100	<1	1.04
Acetona	1.52 ± 0.02	3.5(f)	93	7	1.25
1,4-Dioxano	0.92 ± 0.03	3.45 ± 0.04	68	32	1.34

Tabla 5.17: Tiempos de vida de la PB en distintos disolventes obtenidos mediante análisis individuales de los decaimientos de fluorescencia registrados a 570 nm con un número fijo de cuentas en el máximo. $E_{n,i}$ indica la contribución a la fluorescencia de cada una de las exponenciales. La longitud de onda de excitación usada fue 310 nm. Se fijó el valor del parámetro indicado como (f).

bajas longitudes de onda presente en 1,4-dioxano. De ello se deduce que la polaridad del microentorno en el que se encuentra la PY en presencia de la β -CD es muy similar a la que presenta en 1,4-dioxano, lo que es lógico dada la similitud estructural de los oxígenos del 1,4-dioxano con los oxígenos glucosídicos de la β -CD. El microentorno de la PY en presencia de γ -CD es más polar (máximo de emisión similar al que presenta en acetona) que en el caso de la β -CD, lo que está de acuerdo con el mayor tamaño de la cavidad que permite la introducción en ella de moléculas de agua.

Sin embargo, en 1,4-dioxano el espectro de emisión (véase la figura 5.49), a longitudes de ondas menores de 560 nm, presenta un hombro que parece corresponderse con la banda de absorción anómala a bajas longitudes de onda para la PY en 1,4-dioxano (ver figura 5.48). Con la PY en el caso del 1,4-dioxano parece existir algún efecto, que no se observa dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina, responsable del importante desplazamiento del espectro de absorción hacia longitudes de onda bajas y del hombro a bajas longitudes de onda en el espectro de emisión. Esta diferencia de comportamiento de la PY en 1,4-dioxano y en presencia de β -ciclodextrina podría explicarse por la formación de agregados fluorescentes en el 1,4-dioxano, mientras que los dímeros en el interior de esta ciclodextrina no se forman. Según la bibliografía, los dímeros de PY presentan el máximo de absorción en torno a 545 nm [Gianneschi 74]. Sin embargo, según nuestros datos experimentales el máximo de absorción de este dímero se sitúa en torno a 510 nm (ver figura 5.34) y el máximo de absorción del complejo $PY_2:\gamma$ -CD se sitúa en torno a 517 nm. Los valores de estos máximos no coinciden con el valor del máximo del espectro de absorción de la PY en 1,4-dioxano (541 nm) ni con el valor del máximo del espectro de absorción de la PY en agua (547 nm). Sin embargo, el desplazamiento, respecto al máximo de absorción de la PY en agua, de los máximos de absorción de los dímeros PY_2 y $PY_2 : \gamma$ -CD se produce en la misma dirección que en el caso de la PY en 1,4-dioxano (hacia menores longitudes de onda). Pero este desplazamiento es mucho menos acusado para la PY en 1,4-dioxano que para los dímeros $PY_2:\gamma$ -CD y PY_2 .

p147

p147

p130

En cuanto a los tiempos de vida (tabla 5.16), además del tiempo de vida correspondiente a la PY (τ_1), se observa un segundo tiempo de vida de contribución muy pequeña que se atribuye a productos de reacciones análogas a la hidratación con las moléculas de los diferentes disolventes. Este producto no aparece para la PY en disolución acuosa. El tiempo de vida de la PY varía en los distintos disolventes, pero el análisis de estas variaciones debe hacerse en función de las constantes de desactivación derivadas.

Para calcular los rendimientos cuánticos de las pironinas en distintos disolventes es necesario conocer los índices de refracción del medio, que medimos experimentalmente con un refractómetro de Abbe. Los índices de refracción experimentales de los disolventes utilizados son los indicados en la tabla 5.18. Estos valores de índices de refracción obtenidos experimentalmente para los diferentes disolventes coinciden muy bien con los de la bibliografía [Weast 86].

Disolvente	$n_{exp}^{22^\circ C}$	$n_{bib}^{20^\circ C}$
Agua	1.3329	1.333
Etanol	1.3612	1.360
Acetonitrilo	1.3435	1.342
Acetona	1.3594	1.357
1,4-Dioxano	1.4217	1.420

Tabla 5.18: Índice de refracción de diferentes disolventes determinados experimentalmente con un refractómetro de Abbe a $22^\circ C$ (n_{exp}) comparados con los de la bibliografía (n_{bib}) [Weast 86].

También se comprobó si la adición de CD tenía algún efecto sobre el índice de refracción de la disolución acuosa. Los resultados se muestran en la tabla 5.19, en la que se observa que el índice de refracción del agua apenas varía con la adición de β -CD, aunque conforme se incrementa la concentración de β -CD aumenta ligeramente el valor del índice de refracción. Sin embargo, estas variaciones en el índice de refracción con la concentración de β -CD son despreciables a la hora de la determinación del rendimiento cuántico.

Se usó como referencia para la determinación de los rendimientos cuánticos la rodamina B en etanol básico, con un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.70 [López Arbeloa 91]. El rendimiento cuántico de los complejos PY: β -CD y PY: γ -CD se determinó suponiendo que el índice de refracción de la disolución con ciclodextrina es aproximadamente igual al que presenta en agua, según se deduce de la pequeña variación en el índice de refracción con la concentración de β -CD mostrada en la tabla 5.19. Los valores de rendimiento cuántico de estos complejos son, por tanto, los obtenidos en apartados anteriores (tablas 5.5 y 5.11).

Se observa que, salvo para el agua, el rendimiento cuántico disminuye cuanto menor es la polaridad del disolvente. El rendimiento cuántico del complejo PY: β -CD es muy similar al obtenido en 1,4-dioxano al igual que el rendimiento cuántico del complejo PY: γ -CD.

$[\beta\text{-CD}] / \text{mM}$	$n_{exp} (22^\circ\text{C})$
0.00	1.3329
2.17	1.3332
4.34	1.3333
6.50	1.3334
10.8	1.3336

Tabla 5.19: Índices de refracción de disoluciones acuosas con diferente concentración de $\beta\text{-CD}$ determinados experimentalmente con un refractómetro de Abbe a 22°C .

Disolvente	ϕ	$k_r / 10^9 \text{ s}^{-1}$	$k_{nr} / 10^9 \text{ s}^{-1}$
Agua	0.47	0.27	0.30
Etanol	0.61	0.28	0.18
Acetonitrilo	0.60	0.32	0.22
Acetona	0.53	0.27	0.24
1,4-Dioxano	0.26	0.26	0.71
PY: $\beta\text{-CD}$	0.27	0.25	0.68
PY: $\gamma\text{-CD}$	0.31	0.29	0.65

Tabla 5.20: Valores de rendimiento cuántico (ϕ), constante de velocidad de desactivación radiante (k_r) y constante de velocidad de desactivación no radiante (k_{nr}) de la PY en distintos disolventes y en los complejos con CDs.

Para interpretar mejor estos resultados es necesario calcular las constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante que determinan el valor del rendimiento cuántico. Los valores de estas constantes, calculadas a partir de los valores experimentales de rendimientos cuánticos y de tiempos de vida, se muestran en la tabla 5.20.

Disolvente	τ_{exp} / ns	τ_F^F / ns	τ_F^{SB} / ns	$k_{nr}^F / \text{ns}^{-1}$	$k_{nr}^{SB} / \text{ns}^{-1}$
Agua	1.8	3.6	3.6	0.27	0.27
Etanol	2.2	4.7	4.6	0.25	0.24
Acetonitrilo	1.9	3.6	3.5	0.26	0.26
Acetona	1.9	3.0	3.0	0.21	0.21
1,4-Dioxano	1.0	8.4	7.9	0.85	0.84
PY: $\beta\text{-CD}$	1.2	4.3	4.1	0.60	0.59
PY: $\gamma\text{-CD}$	1.06	5.2	5.4	0.75	0.76

Tabla 5.21: Tiempos de vida de fluorescencia experimentales de la PY en diferentes disolventes y complejos con CDs, tiempos de vida de fluorescencia radiantes calculados según Förster (τ_F^F) y según Strickler-Berg (τ_F^{SB}) y constantes de velocidad de desactivación no radiante calculadas según Förster (k_{nr}^F) y según Strickler-Berg (k_{nr}^{SB}).

p22
p22

Para confirmar los resultados anteriores, se calcularon los tiempos de vida de fluorescencia radiante (τ_F) según la ecuación de Förster y de Strickler-Berg, ecuaciones (2.11) y (2.12), y sus valores se muestran en la tabla 5.21. Se observa una muy buena concordancia entre los valores obtenidos por ambos métodos. El tiempo de vida de fluorescencia radiante es, en todos los casos, mayor que el tiempo de vida experimental lo que es lógico ya que éste, a diferencia del primero, tiene en cuenta los procesos de desactivación no radiantes. Se observa que las constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante calculadas a partir del rendimiento cuántico y del tiempo de vida (tabla 5.20) están en acuerdo con las calculadas a partir de los espectros de absorción y emisión usando las ecuaciones teóricas de Förster y Strickler-Berg (tabla 5.21), lo que prueba la consistencia de los resultados.

En la figura 5.54 se representan las constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante obtenidas experimentalmente (tabla 5.19) frente al parámetro empírico de polaridad $E_T(30)$ de los diferentes disolventes. También se representan los valores de estas constantes para los complejos PY: β -CD y PY: γ -CD. Las constantes de desactivación radiantes no se ven influidas por la polaridad del disolvente y presentan valores muy similares en todos los casos, tal como sería de esperar por la menor sensibilidad de los procesos radiantes al microentorno. En cambio, en presencia de β -CD, γ -CD y en 1,4-dioxano la constante de desactivación no radiante es unas tres veces mayor que en los demás disolventes. Esto es coherente con el menor rendimiento cuántico de la PY en el interior de estas ciclodextrinas y en 1,4-dioxano con respecto al resto de los disolventes. Por tanto, parece que las interacciones entre la PY y los oxígenos ricos en carga del 1,4-dioxano o de la cavidad de las ciclodextrinas influyen de forma decisiva en el comportamiento fotofísico de esta molécula y, especialmente, en la velocidad de desactivación no radiante de la molécula excitada.

Pironina B

p140

El comportamiento fotofísico de la PB en los diferentes disolventes y en los complejos con las CDs es muy similar al observado para la PY. En el caso de la PB, el máximo de los espectros de absorción no varía significativamente con la polaridad del disolvente (figura 5.43). Sin embargo, sí se observa un desplazamiento en el espectro de emisión de fluorescencia que parece indicar que la polaridad del disolvente tiene un efecto de carácter general sobre la banda de emisión de la PB. La longitud de onda a la que se encuentra el máximo de emisión del complejo PB: β -CD es prácticamente la misma que presenta en 1,4-dioxano la PB, ya que en este caso la posición del máximo de emisión no se ve afectada por el hombro a bajas longitudes de onda que presenta esta pironina en 1,4-dioxano. De ello se deduce que la polaridad del microentorno en el que se encuentra la PB en presencia de la β -CD es muy similar a la que presenta en 1,4-dioxano, lo que es lógico dada la similitud estructural de los oxígenos del 1,4-dioxano con los oxígenos glucosídicos de la β -CD. El

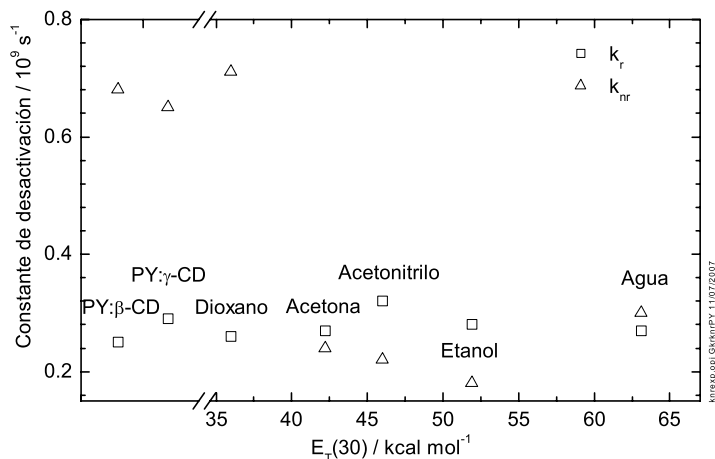


Figura 5.54: Representación de las constantes de desactivación radiantes (cuadrados) y no radiantes (triángulos) de la PY en distintos disolventes frente al parámetro $E_T(30)$. Además, se representan los valores de estas constantes para los complejos PY: β -CD y PY: γ -CD.

microentorno de la PB en presencia de γ -CD es más polar (máximo de emisión similar al que presenta en acetona) que en el caso de la β -CD, lo que está de acuerdo con el mayor tamaño de la cavidad que permite la introducción en ella de moléculas de agua.

Sin embargo, en 1,4-dioxano el espectro de emisión (véase la figura 5.52), a longitudes de ondas menores de 560 nm, presenta un hombro que parece corresponderse con la banda de absorción anómala a bajas longitudes de onda para la PB en 1,4-dioxano (ver figura 5.51). Con la PB en el caso del 1,4-dioxano parece existir algún efecto, que no se observa dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina, responsable del importante desplazamiento del espectro de absorción hacia longitudes de onda bajas y del hombro a bajas longitudes de onda en el espectro de emisión. La explicación de este comportamiento anómalo de la PB en 1,4-dioxano podría ser, al igual que en el caso de la PY, la formación de agregados fluorescentes de la PB en este disolvente. Según nuestros datos experimentales el máximo de absorción del dímero PB₂ se sitúa en torno a 552 nm (ver figura 5.43) y el máximo de absorción del dímero complejado PB₂: γ -CD se sitúa en torno a 531 nm. Los valores de estos máximos no coinciden con el valor del máximo del espectro de absorción de la PB en 1,4-dioxano (547 nm) ni con el valor del máximo del espectro de absorción de la PB en agua (553 nm). Sin embargo, el desplazamiento respecto al máximo de absorción de la PB en agua, del máximo de absorción del dímero PB₂ : γ -CD se produce en la misma dirección que en el caso de la PB en 1,4-dioxano (hacia menores longitudes de onda).

En cuanto a los tiempos de vida (tabla 5.17), además del tiempo de vida de la PB, aparece una pequeña contribución de un segundo tiempo de vida más largo, atribuido a los

p150

p150

p140

p152

Disolvente	ϕ	$k_r / 10^9 \text{ s}^{-1}$	$k_{nr} / 10^9 \text{ s}^{-1}$
Agua	0.36	0.31	0.56
Etanol	0.65	0.36	0.20
Acetonitrilo	0.44	0.35	0.44
Acetona	0.50	0.33	0.33
1,4-Dioxano	0.18	0.19	0.87
PB: β -CD	0.19	0.39	1.6
PB: γ -CD	0.28	0.40	1.03

Tabla 5.22: Rendimiento cuántico (ϕ) de la PB en distintos disolventes. Constantes de velocidad de desactivación radiante (k_r) y no radiante (k_{nr}) calculadas a partir de los valores de rendimiento cuántico y de tiempo de vida experimentales.

productos resultantes de reacciones similares a la de hidratación con las moléculas de los diferentes disolventes. También en este caso se observa variación del tiempo de vida de la PB en los distintos disolventes y complejos.

Los rendimientos cuánticos de la PB en distintos disolventes, calculados usando rodamina B en etanol básico como referencia son los indicados en la tabla 5.22. En esta tabla también se muestran los rendimientos cuánticos de los complejos PB: β -CD y PB: γ -CD (valores de las tablas 5.7 y 5.13), para cuyo cálculo se ha despreciado la pequeña variación del índice de refracción entre las disoluciones sin y con CD. En esta tabla también aparecen los valores de las constantes de desactivación radiante y no radiante, calculados a partir de los valores de rendimientos cuánticos y de tiempos de vida. Los valores de k_{nr} en agua y etanol concuerdan razonablemente con los de la bibliografía, donde estos valores son 0.41 y 0.28, respectivamente [Onganer 92].

Los resultados de rendimientos cuánticos (tabla 5.22) ponen de manifiesto un aumento de la fluorescencia de la PB en todos los disolventes salvo en 1,4-dioxano en relación al agua. En cambio, en 1,4-dioxano el rendimiento cuántico se reduce a la mitad, igual que cuando la PB está en el interior de la cavidad hidrofóbica de la β -CD, si bien la reducción no es tan grande en el interior de la γ -CD.

A partir de los espectros de absorción y de emisión se calcularon las constantes de desactivación radiante de la PB en los diferentes medios. Se obtuvieron valores concordantes de los tiempos de vida de fluorescencia radiante (τ_F) según la ecuación de Förster y de Strickler-Berg (tabla 5.23), que como es lógico son mayores que los tiempos de vida experimentales (τ_{exp}). Se observa que las constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante (tabla 5.22) están de acuerdo con las calculadas de los espectros de absorción y emisión usando las ecuaciones teóricas de Förster y Strickler-Berg (tabla 5.23), lo que prueba la consistencia de los resultados.

Disolvente	τ_{exp} / ns	τ_F^F / ns	τ_F^{SB} / ns	k_{nr}^F / ns ⁻¹	k_{nr}^{SB} / ns ⁻¹
Agua	1.2	4.3	4.2	0.60	0.59
Etanol	1.8	4.7	4.1	0.35	0.32
Acetonitrilo	1.3	3.9	3.9	0.54	0.53
Acetona	1.5	3.7	3.7	0.38	0.39
1,4-Dioxano	0.94	3.7	3.5	0.79	0.78
PB: β -CD	0.50	4.6	4.6	1.8	1.8
PB: γ -CD	0.40	5.4	5.3	1.2	1.2

Tabla 5.23: Tiempos de vida de fluorescencia experimentales de la PB en diferentes disolventes, tiempos de vida de fluorescencia radiantes calculados según Förster (τ_F^F) y según Strickler-Berg (τ_F^{SB}) y constantes de velocidad de desactivación no radiante calculadas según Förster (k_{nr}^F) y según Strickler-Berg (k_{nr}^{SB}).

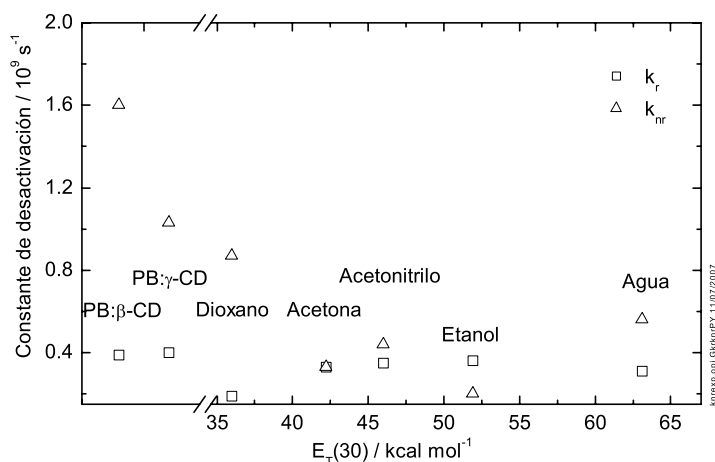


Figura 5.55: Representación de las constantes de desactivación radiantes (cuadrados) y no radiantes (triángulos) de la PB en distintos disolventes frente al parámetro $E_T(30)$. Además, se representan los valores de estas constantes para los complejos PB: β -CD y PB: γ -CD.

En la figura 5.55 se representan las constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiante obtenidas a partir de los datos experimentales frente al parámetro empírico de polaridad $E_T(30)$ para los diferentes disolventes y para los complejos PB: β -CD y PB: γ -CD. Las constantes de desactivación radiantes son del mismo orden en los diferentes disolventes y coinciden con las obtenidas para los complejos de la PB con las ciclodextrinas. Sin embargo, se observa que en presencia de β -CD ó γ -CD la constante de desactivación no radiante es aproximadamente el doble que la que presenta la PB en 1,4-dioxano y 3-4 veces mayor que en los otros disolventes. Estos resultados sugieren que el entorno de la PB en las cavidades

de estas ciclodextrinas es aún más hidrofóbico que el 1,4-dioxano, probablemente debido a una total inclusión de la molécula en el interior de la cavidad y a un mayor grado de estabilización por los oxígenos glucosídicos. En el complejo con γ -CD, el aumento de k_{nr} no es tan grande como en el complejo con β -CD, lo cual es lógico por el mayor tamaño de la cavidad, que permite la presencia de moléculas de agua que hacen que el microentorno de la PB sea menos hidrofóbico.

Comparación de resultados para las PY y PB en distintos disolventes y en los complejos con ciclodextrinas

Los espectros de emisión de las pironinas en distintos disolventes ponen de manifiesto el efecto que sobre ellos tiene la polaridad del entorno. Cuando el disolvente es más apolar la banda de emisión de las pironinas se desplaza hacia mayores longitudes de onda (figuras 5.50 y 5.53), o hacia menores números de onda (figura 5.56). Según Reichardt, para interacciones no específicas soluto-disolvente, la posición del máximo de absorción o de emisión debería exhibir una buena correlación (casi lineal) con el parámetro $E_T(30)$, parámetro empírico que mide la polaridad del disolvente [Reichardt 88]. No se observa una correlación lineal como sería de esperar para un efecto general de la polaridad del disolvente (ver figura 5.56), lo que indica que las interacciones específicas son responsables del desplazamiento espectral. El desplazamiento observado en la banda de emisión de las pironinas hacia menores números de onda cuando están complejadas con ciclodextrinas es lógico, ya que así están en un entorno más apolar que el agua. La similitud de los espectros de emisión de los complejos PY: β -CD y PB: β -CD con los espectros de estas pironinas en 1,4-dioxano indica que las interacciones fluoróforo-medio son del mismo tipo en los dos casos. Esto se ha observado para otras moléculas, concretamente la adición de α -CD a una disolución acuosa de p-t-butilfenol causa un cambio espectral casi idéntico al observado cuando este fenol se disuelve en 1,4-dioxano [Bender 78]. Sin embargo, el máximo de los espectros de emisión de la PY y la PB en γ -CD concuerda mejor con el que presentan estas pironinas en acetona. Por tanto, el microentorno de estas pironinas en γ -CD parece más polar que en β -CD, lo que es lógico dado el mayor tamaño de la cavidad de la γ -CD, lo que le permite albergar moléculas de agua en su interior.

Con respecto al tiempo de vida de estas pironinas en agua, los tiempos de vida de la PY y PB en etanol, acetonitrilo y acetona (tablas 5.21 y 5.23) aumentan entre un 5 y un 45 %, correspondiendo la mayor variación al etanol. Por el contrario, en 1,4-dioxano, hay un decrecimiento significativo del tiempo de vida de fluorescencia de aproximadamente un 40 % para la PY y un 20 % para la PB. El tiempo de vida de la PY en 1,4-dioxano (1.0 ns) es muy similar al del complejo PY: β -CD (1.2 ns), mientras que el del complejo PB: β -CD (0.50 ns) es todavía menor que el esta pironina en 1,4-dioxano (0.94 ns). El tiempo de vida del complejo PY: γ -CD (1.06 ns) es prácticamente el mismo que el que presenta esta pironina

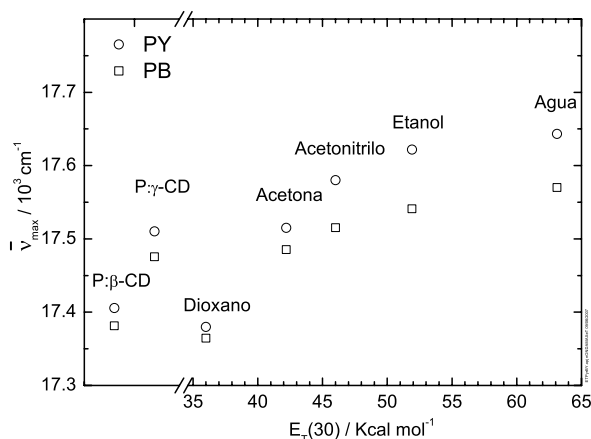


Figura 5.56: Representación de los números de onda a los que se encuentra el máximo de emisión para la PY (círculos) y la PB (cuadrados) en diferentes disolventes y en los complejos P:CD frente al parámetro empírico de polaridad $E_T(30)$.

en 1,4-dioxano (1.0 ns) mientras que el tiempo de vida del complejo PB: γ -CD (0.40 ns) es muy inferior respecto al que presenta esta pironina en 1,4-dioxano (0.94 ns).

Se observan variaciones análogas en los rendimientos cuánticos de fluorescencia (tablas 5.20 y 5.22), con incrementos entre el 13 y el 81 % en etanol, acetonitrilo y acetona y disminuciones de aproximadamente el 50 % en 1,4-dioxano respecto al presentado en agua. Los rendimientos cuánticos de los complejos PY: β -CD (0.27) y PB: β -CD (0.19) coinciden bien con los que presentan en 1,4-dioxano estas pironinas (0.26 y 0.18, respectivamente), indicando similitud en el microentorno de las pironinas en los dos medios. Esto puede entenderse dado que los oxígenos glucosídicos que están hacia el interior de la cavidad de β -CD son oxígenos tipo éter como los del 1,4-dioxano, por tanto en ambos casos las pironinas estarían en entornos ricos en electrones. Los rendimientos cuánticos de los complejos PY: γ -CD (0.31) y PB: γ -CD (0.28) son ligeramente más altos a los que presentan estas pironinas en 1,4-dioxano, es decir, se acercan más a los valores que presentan en un ambiente ligeramente más polar que en 1,4-dioxano.

Las constantes de velocidad de desactivación radiante tienen valores similares en todos los disolventes estudiados para las dos pironinas. Esto sería de esperar dado que esta constante normalmente no depende mucho del disolvente. Por el contrario, se observan diferencias en las constantes de velocidad de desactivación no radiantes, representadas frente al parámetro empírico de polaridad $E_T(30)$ en la figura 5.57. No se observa correlación entre estas constantes de velocidad con respecto al parámetro $E_T(30)$. Para la PY se obtienen valores entre 0.18 y 0.30 ns⁻¹ en agua, etanol, acetonitrilo y acetona, mientras que la PY en 1,4-dioxano y en los complejos PY: β -CD y PY: γ -CD presenta valores de esta constante de aproximada-

mente unas 3 veces mayor. Para la PB en agua, etanol, acetonitrilo y acetona los valores de la constante de desactivación no radiante varían entre 0.20 y 0.56 ns⁻¹. Como en el caso de la PY, esta constante de velocidad aumenta significativamente en 1,4-dioxano. Este aumento es mayor para el complejo PB:γ-CD y todavía mayor para el complejo PB:β-CD, donde k_{nr} es aproximadamente el doble que en 1,4-dioxano. De forma general puede decirse que los valores de la constante de desactivación no radiante son constantes en los cuatro disolventes polares y las únicas variaciones significativas se producen para ambas pironinas en 1,4-dioxano y en el interior de las ciclodextrinas. Estos resultados sugieren de nuevo la existencia de interacciones específicas de las pironinas con los electrones ricos en oxígeno presentes en estos medios.

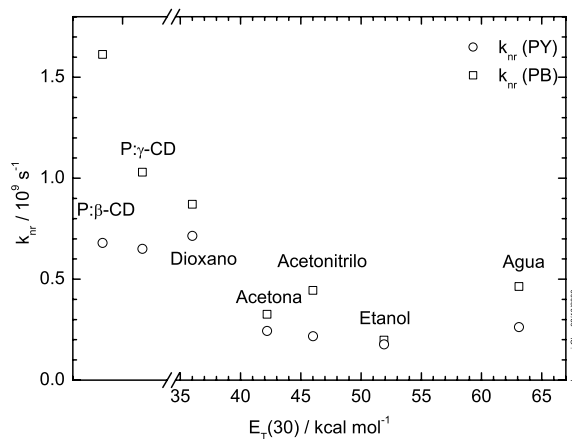


Figura 5.57: Representación de las constantes de velocidad de desactivación no radiantes para la PY (círculos) y la PB (cuadrados) en diferentes disolventes y en los complejos P:CD frente al parámetro empírico de polaridad $E_T(30)$.

Debe proponerse un mecanismo para explicar los efectos de disolvente observados en las propiedades fotofísicas de las pironinas. El efecto del disolvente en las constantes de desactivación no radiantes de las rodaminas ha sido ampliamente estudiado y se han propuesto diversos mecanismos para la desactivación donde se produce la transferencia de carga de los grupos amino al esqueleto xanténico e interacciones enlace hidrógeno con las moléculas del disolvente [López Arbeloa 91, López Arbeloa 92]. Se usaron modelos análogos para explicar el comportamiento de la PB en disolventes polares próticos y apróticos [Onganer 92, Acemioglu 02]. En estos trabajos se propone un mecanismo de dos estados donde un estado planar fluorescente está en rápido equilibrio con un estado no planar y no emisivo, cuya energía está afectada por la polaridad del disolvente originando las variaciones observadas en k_{nr} . Sin embargo, los efectos del disolvente mencionados no son tan importantes como los determinados para las pironinas en 1,4-dioxano o en los complejos con β-CD ó γ-CD.

Teniendo en cuenta todos estos modelos, se propone la siguiente interpretación para los resultados presentados, ya presentada en el análisis de los tiempos de vida de las pironinas con γ -CD (figura 5.37). El modelo propuesto implica la existencia de dos estados excitados de la pironina, el estado obtenido por excitación directa S_1 y el formado mediante un proceso de transferencia de carga S_2 . Este estado excitado de transferencia de carga podría ser un estado TICT (“Twisted Intramolecular Charge Transfer”) pero nuestros datos no apoyan ni contradicen esta hipótesis. En medios polares el estado S_2 contribuye más a la fluorescencia que el S_1 , incrementándose la contribución de este último a medida que disminuye la polaridad del medio. Sin embargo, la diferencia energética entre estos dos estados no debe ser grande a juzgar por el pequeño desplazamiento espectral de la banda de emisión. En cambio, el valor de la constante de desactivación no radiante está muy determinado por la habilidad del disolvente de estabilizar este estado.

Capítulo 6

Dinámica de los complejos de inclusión entre pironinas y ciclodextrinas

Se ha estudiado mediante espectroscopia de correlación de fluorescencia la dinámica del equilibrio de reparto de las pironinas Y y B con las ciclodextrinas (β -CD y γ -CD) con el objetivo de comprender los procesos de asociación y disociación de estos sistemas supramoleculares y su dinámica difusional.

6.1 Complejación de pironinas Y y B con β -ciclodextrina

6.1.1 Resultados

En primer lugar se midieron las curvas de correlación de fluorescencia de disoluciones acuosas de PY a pH 4.0 a diferentes potencias de excitación. Los ajustes individuales de estas curvas a una ecuación que incluye los términos de “antibunching”, triplete y difusión, indicados en la ecuación (2.20), conducen a residuos aleatorios. En la figura 6.1 se representa la amplitud del triplete, A_T , de las curvas de correlación de disoluciones acuosas de PY y de rodamina 6G (R6G) en función de la potencia de excitación y de la irradiancia (potencia incidente por unidad de superficie). La amplitud del triplete aumenta con la potencia de excitación debido a una cada vez mayor ocupación del estado singlete excitado y la consiguiente mayor probabilidad de pasar al estado triplete. Este aumento de amplitud se produce

en mayor medida para la R6G que para la PY. Para realizar las medidas de las curvas de correlación de fluorescencia en presencia de distintas concentraciones de ciclodextrina se eligió una potencia de excitación muy baja que mantiene la amplitud del triplete debajo del 2 % en todas las medidas a fin de que el análisis de las curvas de correlación sea más sencillo. Concretamente, la potencia de excitación (medida en el foco del objetivo) elegida fue de $290 \mu\text{W}$, que corresponde a una irradiancia de aproximadamente $25\text{-}30 \text{ kW cm}^{-2}$ según la geometría del foco del experimento.

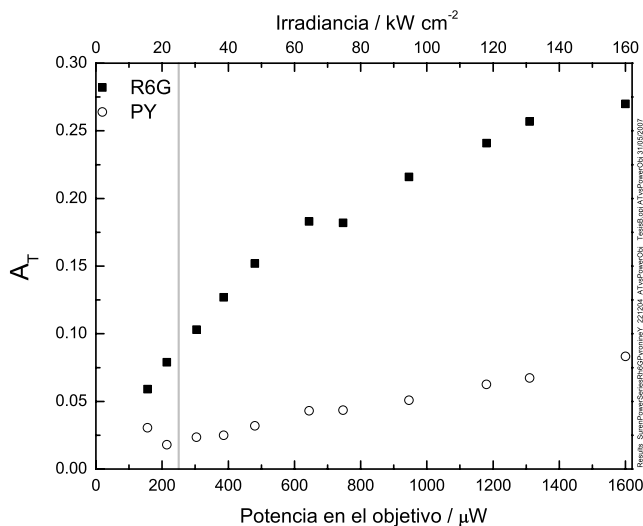


Figura 6.1: Amplitud del término de triplete de disoluciones acuosas de PY a pH 4.0 y de R6G a pH natural a diferentes potencias de excitación.

Con esta potencia de excitación, $290 \mu\text{W}$, se obtuvieron las curvas de correlación de fluorescencia de disoluciones acuosas de las pironinas Y (y B) a pH constante en presencia de diferentes concentraciones de $\beta\text{-CD}$. Estas curvas se muestran en las figuras 6.2 y 6.3 para PY y PB, respectivamente. Se distinguen varios tramos correspondientes a los diferentes procesos existentes, indicados en la figura 6.2.

La curva de correlación de fluorescencia normalizada de una disolución acuosa de PY, sin $\beta\text{-CD}$ añadida, se muestra en la figura 6.2 en azul. Esta curva presenta un rápido aumento de la función de autocorrelación $G(\tau_C)$ en el intervalo de 1 a 10 ns (“antibunching”), luego una zona aproximadamente constante hasta unos $10 \mu\text{s}$ (sin término de reacción y solamente una pequeña contribución del triplete) y finalmente un fuerte decrecimiento hasta 0 a mayores tiempos de correlación (término de difusión). Las disoluciones acuosas de PB a diferentes concentraciones de $\beta\text{-CD}$ presentan curvas de correlación de fluorescencia con un comportamiento similar, figura 6.3.

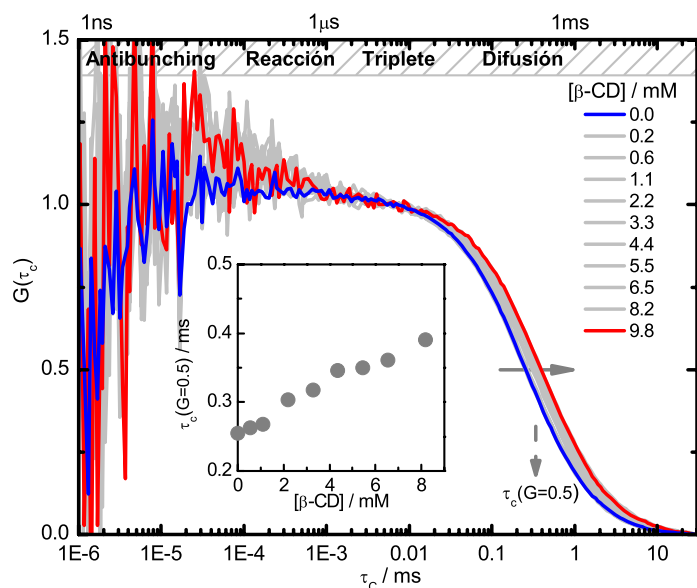


Figura 6.2: Curvas de correlación normalizadas ($G(0.006 \text{ ms})=1.0$) de disoluciones acuosas de PY ($9 \cdot 10^{-9} \text{ M}$) medidas a $\text{pH } 4.0 \pm 0.2$ en presencia de diferentes concentraciones de β -CD. En la figura insertada se muestran los tiempos de correlación a mitad de altura del término de difusión $\tau_C(G = 0.5)$ frente a la concentración de β -CD.

La adición de β -CD a cada una de estas dos pironinas provoca dos cambios significativos en las curvas de correlación de fluorescencia (véanse las figuras 6.2 y 6.3):

1- Los términos de difusión se desplazan a mayores tiempos de correlación. El gráfico de los tiempos de correlación a mitad de altura del término de difusión normalizado $\tau_C(G = 0.5)$ en función de la concentración de β -CD (gráfica insertada en las figuras 6.2 y 6.3) indica que el incremento inicial en el tiempo de difusión $\tau_C(G = 0.5)$ con la concentración de β -CD es más rápido para PB que para PY.

2- Adicionalmente a los términos antes descritos, aparece un nuevo término a tiempos de correlación intermedios que se desplaza hacia menores tiempos de correlación al aumentar la concentración de β -CD (término de reacción). Se observa que su amplitud no es máxima a las concentraciones de β -CD más altas.

6.1.2 Función general de correlación para un equilibrio químico.

En el caso de que exista reacción química o asociación entre el fluoróforo y el ligando se añade otro término a la función de correlación indicada en la ecuación (2.20), el término de reacción $G_R(\tau_C)$.

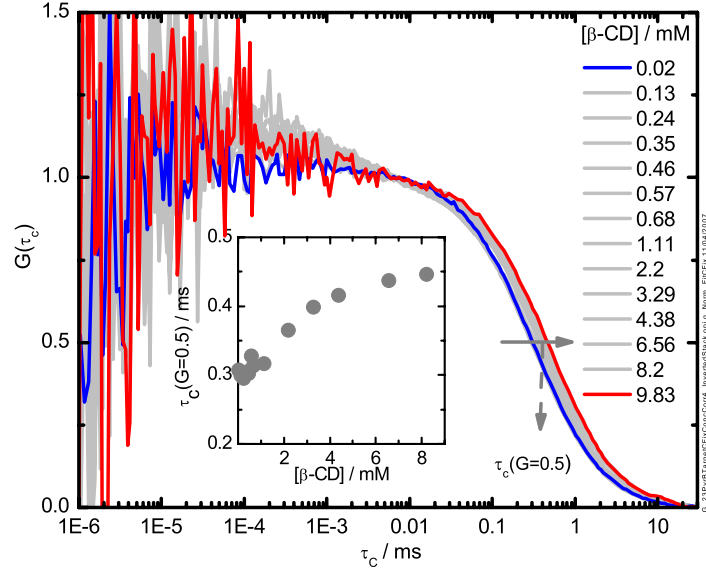


Figura 6.3: Curvas de correlación normalizadas ($G(0.006 \text{ ms}) = 1.0$) de disoluciones acuosas de PB ($4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) medidas a pH 4.0 en presencia de diferentes concentraciones de β -CD. En la figura insertada se muestran los tiempos de correlación a mitad de altura del término de difusión $\tau_C(G = 0.5)$ frente a la concentración de β -CD.

En las medidas de FCS realizadas, la concentración de ligando libre es siempre mucho mayor que la de sustrato, $[CD] \gg [P]$, pudiendo aproximarse la concentración de ligando como la concentración total de ligando, $[CD] \approx [CD]_0$. La reacción será de pseudoprimer orden con un tiempo de relajación τ_R , que vendrá dado por la inversa de la suma de las constantes de velocidad de asociación y disociación:

$$\tau_R = (k_+[CD]_0 + k_-)^{-1} \quad (6.1)$$

La función de correlación que tiene en cuenta el término de reacción será:

$$G_R(\tau_C) = (1 + A_R e^{-\tau_C/\tau_R}) \quad (6.2)$$

En esta ecuación τ_R es el tiempo de relajación de reacción y A_R la amplitud del término de reacción.

La función de correlación general que describe el proceso de difusión está dada por la ecuación (2.16). En nuestro caso, fue necesario derivar una nueva solución que describe este término de difusión para el proceso entre dos especies fluorescentes que se interconvierten con coeficientes de difusión diferentes.

Debido a la condición de intercambio rápido durante el tiempo de residencia de la molécula en el volumen de observación, sólo se observa un término de difusión promedio con un tiempo de difusión promedio $\bar{\tau}_D$ [Berne 90] y una amplitud $N^{-1} = (N_P + N_{P:CD})^{-1}$, que es el promedio de moléculas fluorescentes en el volumen de observación. N no depende de la luminosidad de los colorantes o de si están libres o complejados. La amplitud N^{-1} corresponde a la amplitud total cuando no hay término de reacción, $A_R = 0$. Introduciendo en la ecuación (2.16) el tiempo de difusión promedio, $\bar{\tau}_D$, y teniendo en cuenta que el número promedio de fluoróforos, N , es la suma de los números promedios de fluoróforos libres y complejados en el volumen de observación ($N_P + N_{P:CD}$) se obtiene la siguiente ecuación [Al-Soufi 05]:

$$G_D(\tau_C) = \frac{1}{N_P + N_{P:CD}} \left(1 + \frac{\tau_C}{\bar{\tau}_D}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau_C}{\bar{\tau}_D}\right]^{-1/2} \quad (6.3)$$

Por tanto, la ecuación que incluye el término de reacción, dado por la ecuación (6.2), y el término de difusión, dado por la ecuación (6.3), aplicando la suposición de que la velocidad de relajación de la reacción es mucho más rápida que los tiempos de difusión típicos del sustrato y del complejo (intercambio rápido, $\tau_R \ll \tau_{D,P}, \tau_{D,P:CD}$), será el producto de ambas ecuaciones:

$$G_R(\tau_C)G_D(\tau_C) = \frac{1}{N_P + N_{P:CD}} \left(1 + \frac{\tau_C}{\bar{\tau}_D}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau_C}{\bar{\tau}_D}\right]^{-1/2} (1 + A_R e^{-\tau_C/\tau_R}) \quad (6.4)$$

Por último, análogamente a la ecuación (2.20), estos procesos de relajación del equilibrio de complejación y difusión son independientes de los términos de “antibunching” y de formación del estado triplete, por tanto la función de correlación completa vendrá dada por el producto de las funciones de correlación individuales (2.18), (2.19) y (6.4).

$$G(\tau_C) = G_F(\tau_C)G_T(\tau_C)G_R(\tau_C)G_D(\tau_C) \quad (6.5)$$

Propiedades de la función de correlación.

Para ciertas condiciones experimentales, se han publicado soluciones particulares para el término de reacción, $G_R(\tau_C)$. Elson y Magde derivaron una solución general para este término de reacción de la función de correlación para una isomerización unimolecular, suponiendo, a diferencia de nuestro caso, un volumen de observación cilíndrico iluminado por un haz láser con un perfil de intensidad gaussiano [Elson 74]. Esta solución se ha simplificado para el caso particular en que los coeficientes de difusión de P y P:CD no cambian durante la reacción ($D_P = D_{P:CD}$) [Elson 74, Palmer III 87]. Para este caso especial,

la solución para iluminación gaussiana en un dispositivo confocal también ha sido publicada [Thompson 91, Krichevsky 02, Widengren 99, Malvezzi-Campeggi 01]. Widengren y colaboradores dedujeron una solución incluyendo la población del estado triplete pero simplificaron su sistema suponiendo un complejo no fluorescente, lo que no es aplicable a nuestro sistema [Widengren 97]. Por tanto, derivaremos la expresión de este término a partir del valor de la **amplitud del término de reacción**, A_R :

$$A_R = \frac{N_P N_{P:CD} (Q_P - Q_{P:CD})^2}{(Q_P N_P + Q_{P:CD} N_{P:CD})^2} = \frac{[P][P:CD](Q_P - Q_{P:CD})^2}{(Q_P[P] + Q_{P:CD}[P:CD])^2} \quad (6.6)$$

Si definimos la razón entre luminosidades del complejo P:CD y el fluoróforo libre P como $Q = Q_{P:CD}/Q_P$ esta ecuación puede escribirse:

$$A_R = \frac{[P][P:CD](1 - Q)^2}{([P] + Q[P:CD])^2} \quad (6.7)$$

Esta amplitud depende de dos factores (véase la variación con la concentración de CD con datos simulados en el diagrama superior de la derecha de la figura 6.4):

- La razón entre las luminosidades del complejo P:CD y el fluoróforo libre P, $Q = Q_{P:CD}/Q_P$. La luminosidad de un fluoróforo se define como el producto del coeficiente de extinción y el rendimiento cuántico de fluorescencia, calculado teniendo en cuenta la eficiencia del sistema de detección:

$$Q_x = \varepsilon_x \phi_x \quad (6.8)$$

- La concentración de ambas especies. La amplitud del término de reacción es muy pequeña a muy bajas y muy altas concentraciones de ligando, es decir, cuando $N_{P:CD} = 0$ ó $N_P = 0$, respectivamente.

Si sustituimos la concentración de complejo, $[P:CD]$, por $K[P][CD]_0$ (usamos la aproximación de que la concentración de CD de equilibrio es la total) en la ecuación (6.7) obtenemos:

$$A_R = \frac{K[CD]_0(1 - Q)^2}{(1 + QK[CD]_0)^2} \quad (6.9)$$

El **tiempo de relajación del término de reacción**, τ_R , dado por la ecuación (6.1), puede expresarse en función de la constante de equilibrio K , si tenemos en cuenta la ecuación (6.20) ($k_+ = Kk_-$):

$$\tau_R([CD]_0) = (k_+[CD]_0 + k_-)^{-1} = [k_-(K[CD]_0 + 1)]^{-1} \quad (6.10)$$

Este tiempo, τ_R , disminuye al aumentar la concentración de ligando, $[CD]_0$ (véase el diagrama intermedio de la derecha de la figura 6.4).

El **tiempo de difusión medio**, $\bar{\tau}_D$, depende del coeficiente de difusión medio ponderado en número, \bar{D} , que se obtiene a partir de los coeficientes de difusión individuales del fluoróforo libre y complejado: D_P y $D_{P:CD}$, respectivamente.

$$\bar{\tau}_D = \frac{w_{xy}^2}{4\bar{D}}, \quad \bar{D} = X_P D_P + X_{P:CD} D_{P:CD} \quad (6.11)$$

En el caso particular en que el coeficiente de difusión individual del fluoróforo complejado sea el mismo que el del fluoróforo libre, $D_P = D_{P:CD}$, no se observaría variación del tiempo de difusión $\bar{\tau}_D$ con concentración de CD.

Si se utiliza la aproximación de que la concentración de CD de equilibrio, $[CD]$, coincide con la total, $[CD]_0$, (al ser ésta mucho mayor que la concentración total de fluoróforo) pueden escribirse las fracciones molares en función de la constante de equilibrio y la concentración total de CD (véase el apéndice 1):

$$X_P = \frac{[P]}{[P] + [P:CD]} = \frac{1}{1 + K[CD]_0} \quad (6.12)$$

$$X_{P:CD} = \frac{[P:CD]}{[P] + [P:CD]} = \frac{K[CD]_0}{1 + K[CD]_0} \quad (6.13)$$

Por tanto, la ecuación (6.11) puede escribirse directamente en función de la concentración de ligando $[CD]_0$ y la constante de equilibrio K :

$$\bar{\tau}_D = \frac{w_{xy}^2}{4 \left(\frac{1}{1+K[CD]_0} D_P + \frac{K[CD]_0}{1+K[CD]_0} D_{P:CD} \right)} \quad (6.14)$$

p34 Si consideramos la ecuación (2.17) ($w_{xy}^2 = 4\tau_{D,P} D_P$) esta expresión puede escribirse como:

$$\bar{\tau}_D = \frac{4\tau_{D,P} D_P}{4 \left(\frac{1}{1+K[CD]_0} D_P + \frac{K[CD]_0}{1+K[CD]_0} D_{P:CD} \right)} = \frac{\tau_{D,P}(1 + K[CD]_0)}{1 + \frac{D_{P:CD}}{D_P} K[CD]_0} \quad (6.15)$$

p34 Si tenemos en cuenta que el radio del volumen de observación es el mismo para P y para $P:CD$ y la ecuación (2.17):

$$\frac{D_{P:CD}}{D_P} = \frac{\frac{w_{xy}^2}{4\tau_{D,P:CD}}}{\frac{w_{xy}^2}{4\tau_{D,P}}} = \frac{\tau_{D,P}}{\tau_{D,P:CD}} \quad (6.16)$$

Por tanto, podemos expresar el tiempo de difusión promedio, $\bar{\tau}_D$, de la ecuación (6.15) en función de los tiempos de difusión límite del fluoróforo libre y complejado:

$$\bar{\tau}_D([CD]_0) = \frac{\tau_{D,P}(1 + K[CD]_0)}{1 + \frac{\tau_{D,P}}{\tau_{D,P:CD}} K[CD]_0} \quad (6.17)$$

Al aumentar la concentración de ligando, $[CD]_0$, el valor del tiempo de difusión observado, $\bar{\tau}_D$, varía desde el tiempo de difusión para el fluoróforo libre, $\tau_{D,P}$, al tiempo de difusión del fluoróforo complejoado, $\tau_{D,P:CD}$, (véase el diagrama inferior de la derecha de la figura 6.4).

Las propiedades de la **función de correlación que incluye los términos de reacción y difusión**, $G_R(\tau_C) G_D(\tau_C)$, se ilustran con curvas simuladas en la figura 6.4, según las ecuaciones (6.4), (6.9), (6.10), y (6.17) [Al-Soufi 05]. Los parámetros usados para la simulación fueron: el número total de fluoróforos en el volumen de observación $N_P + N_{P:CD}$ de 1, el tiempo de difusión del fluoróforo libre $\tau_{D,P}$ de 0.25 ms, el tiempo de difusión del complejo $\tau_{D,P:CD}$ de 0.60 ms, el factor geométrico del volumen de observación w_z/w_{xy} de 5, la constante de complejación K de 2000 M⁻¹, la razón de luminosidades entre el fluoróforo complejoado y el fluoróforo libre $Q = Q_{P:CD}/Q_P$ de 0.5 y la constante de velocidad de disociación, k_- , de $5 \cdot 10^5$ s⁻¹.

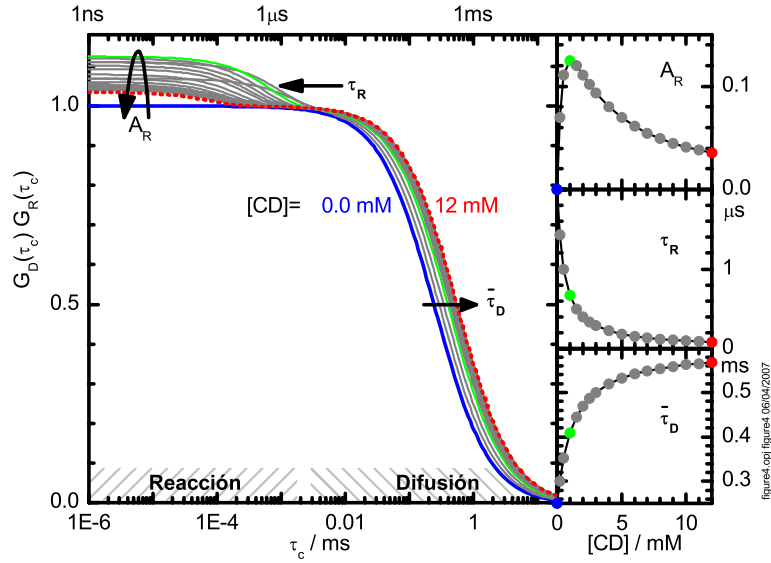


Figura 6.4: Curvas de correlación simuladas mostrando la variación de $G_D(\tau_C)G_R(\tau_C)$ con el tiempo de correlación al aumentar la concentración total de ligando, $[CD]$ según las ecuaciones 6.4, 6.9, 6.10, y 6.17. Dependencia de A_R , τ_R y $\bar{\tau}_D$ de la concentración total de ligando. Los valores de los parámetros vienen dados en el texto.

Se observa que la amplitud de la función de correlación cuando τ_C tiende a cero tiene un valor que depende de la amplitud del término de reacción, A_R , dada por la expresión (6.6):

$$G_R(0)G_D(0) = \frac{1 + A_R}{N_P + N_{P:CD}} = \frac{N_P Q_P^2 + N_{P:CD} Q_{P:CD}^2}{(Q_P N_P + Q_{P:CD} N_{P:CD})^2} \quad (6.18)$$

Se observa que el valor de esta función de correlación cuando τ_C tiende a infinito es cero.

p165
p166

Las variaciones observadas en las curvas de correlación experimentales con la adición de β -CD a las disoluciones acuosas de PY o PB de las figuras 6.2 y 6.3 se pueden explicar perfectamente en base de la complejación de las pironinas por la ciclodextrina siguiendo las ecuaciones y simulaciones (figura 6.4) presentadas.

1 - El proceso de difusión se desplaza hacia mayores tiempos de correlación al aumentar la concentración de β -CD, debido al mayor tiempo de difusión del complejo respecto al del fluoróforo libre, tal como predice la ecuación (6.17).

2 - El tiempo de relajación del término de reacción se desplaza a tiempos de correlación más cortos al aumentar la concentración de β -CD, tal y como predice la ecuación (6.10). La amplitud de este término no es máxima para la concentración de β -CD más alta sino que primero aumenta rápidamente y luego disminuye al aumentar la concentración de β -CD.

6.1.3 Discusión

La asociación de un sustrato fluorescente, P, y un ligando no fluorescente, CD, que forman un complejo, P:CD, puede tratarse como una reacción química con una constante de equilibrio de complejación K :



La constante del equilibrio de complejación vendrá dada por el cociente entre la constante de velocidad de asociación, k_+ , y la de disociación, k_- .

$$K = \frac{k_+}{k_-} \quad (6.20)$$

Mecanismo de complejación. El mecanismo cinético para la complejación de un fluoróforo P por un ligando para formar un complejo P:CD incluiría todos los procesos de asociación/disociación entre el colorante libre y complejo en el estado electrónico fundamental S_0 , en el estado electrónico excitado singlete S_1 y en el estado excitado triplete T_1 , como se muestra en la figura 6.5.

Sin embargo, bajo ciertas condiciones puede simplificarse este mecanismo general teniendo sólo en cuenta los procesos que ocurren en el estado fundamental. Las constantes de velocidad de asociación bimoleculares están limitadas por la difusión ($k_+ \leq k_d \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). La concentración de ligando (en el caso de la β -CD) está limitada por su solubilidad (concentración de β -CD menor o igual de 0.010 M). La concentración de ligando no complejoado es aproximadamente la total, ya que la concentración de sustrato es mucho menor que la de ligando.

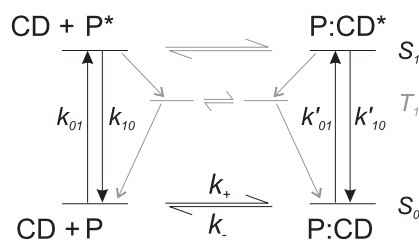


Figura 6.5: Mecanismo cinético general propuesto para la complejación de un sustrato P por un ligando CD.

En estas condiciones la constante de velocidad de asociación ($k_+[CD]_0$) es menor o del orden de 10^7 s^{-1} . Por tanto, esta constante es generalmente mucho menor que las constantes de velocidad de decaimiento de fluorescencia típicas para el estado singlete excitado de moléculas orgánicas ($k_{10} = 10^8\text{-}10^9 \text{ s}^{-1}$). Además, este valor de la constante de velocidad de asociación puede reducirse disminuyendo la concentración total de ligando.

La constante de velocidad de disociación k_- puede estimarse a partir de la constante del equilibrio de complejación, ecuación (6.20). El valor más alto de la constante de disociación se obtendría para un valor de constante de complejación bajo y un valor alto de velocidad de asociación. Para un valor de constante de equilibrio de complejación muy bajo, de 100 M^{-1} , y una constante de velocidad de asociación máxima ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), la constante de disociación sería 10^7 s^{-1} . Este valor máximo está por debajo de los valores típicos de la constante de velocidad de decaimiento de fluorescencia k_{10} .

Por tanto, mientras la velocidad de excitación del fluoróforo (k_{10}) sea suficientemente baja (potencias de excitación bajas), la relajación del estado singlete excitado es mucho más rápida que la dinámica de asociación/disociación en el estado fundamental, pudiendo despreciarse la asociación/disociación del fluoróforo en el estado singlete excitado. A energías de excitación suficientemente bajas y constantes de velocidad de cruce intersistemas bajas, puede despreciarse también la asociación/disociación del fluoróforo en su estado triplete.

Por tanto, el mecanismo general propuesto en estas condiciones se reduce al equilibrio de complejación en el estado fundamental, donde tanto el fluoróforo libre como complejo emiten fluorescencia.

Análisis de las curvas de FCS.

A continuación se analizarán las curvas de correlación de forma cuantitativa. Las curvas de correlación de fluorescencia de las disoluciones acuosas de las pironinas PY y PB sin β -CD se analizaron con un modelo que tiene en cuenta todos los procesos observados, indicados en la ecuación (2.20) (por tanto sin el término de reacción).

Estas curvas de correlación de fluorescencia de la pironinas PY y PB se ajustan perfecta-
 mente con la ecuación (2.20) en el intervalo entre 1 ns a 100 ms usando el factor geométrico
 del volumen de observación ($w = w_z/w_{xy} = 2.4 \pm 0.2$) determinado con la rodamina 6G
 (véase la figura 3.6 y la explicación correspondiente). Los tiempos de difusión obtenidos para
 las pironinas PY y PB, $\tau_{D,P}$, fueron de 0.251 ± 0.001 ms y 0.31 ± 0.03 ms, respectivamente.
 Los tiempos de correlación de los términos triplete, alrededor de $\tau_T = 1 \mu\text{s}$ para ambas
 pironinas, tienen amplitudes muy pequeñas, de aproximadamente $A_T = 0.02$. El tiempo de
 los términos de “antibunching”, $\tau_F = 2 \pm 1$ ns, obtenidos para las dos pironinas coincide
 bien con sus tiempos de vida de fluorescencia determinados anteriormente, de 1.7 y 1.1 ns,
 respectivamente. Durante las medidas, la velocidad de excitación $k_{01} \approx 10^7 \text{ s}^{-1}$ se mantuvo
 constante y tan baja que los tiempos de correlación del “antibunching” $\tau_F = (k_{01} + k_{10})^{-1}$, se
 pueden determinar a partir del tiempo de vida del estado excitado, $\tau_F \approx k_{10}^{-1}$. Cabe destacar
 que el dispositivo de FCS empleado para estas medidas también permitiría determinar el
 tiempo del proceso de “antibunching” con mucha mayor precisión, pero éste no fue el objetivo
 de este estudio.

Las curvas de correlación de fluorescencia de las disoluciones acuosas de las pironinas
 PY y PB en presencia de distintas concentraciones de β -CD se ajustan perfectamente en
 el intervalo de 1 ns a 100 ms con la función de correlación indicada por la ecuación (6.5),
 que tiene en cuenta además de los términos de “antibunching” (G_F), formación de triplete
 (G_T) y difusión (G_D) (considerados para el ajuste de las curvas de las pironinas sin β -CD)
 el término de reacción (G_R).

Sin embargo, el análisis de los términos de difusión de las curvas de correlación de fluo-
 rescencia individuales de las pironinas PY y PB en presencia de distintas concentraciones de
 β -CD por separado presenta ciertas dificultades. Debido a la baja constante de asociación
 de estas pironinas y la relativa baja solubilidad de la β -CD en agua, incluso a la concentra-
 ción más alta de β -CD sobre el 20 % de las moléculas de la PY están todavía libres. Así, el
 tiempo de difusión del complejo $\tau_{D,P:CD}$ no puede determinarse directamente. Al intentar
 determinar $\tau_{D,P:CD}$ y K a partir de la dependencia del tiempo de difusión $\bar{\tau}_D$ en función
 de la concentración de β -CD, dada por la ecuación (6.17), a partir de análisis individuales
 de los términos de difusión se obtienen valores de $\tau_{D,P:CD}$ y K con una alta incertidumbre
 y un valor medio de K significativamente menor que el obtenido anteriormente a partir
 del análisis de las series de espectros de fluorescencia. Esto se debe a fuertes correlaciones
 estadísticas entre los parámetros de ajuste.

Para hacer mejor uso de los datos experimentales y reducir la correlación entre paráme-
 tros se analizaron conjuntamente todas las curvas de correlación completas en un análisis
 global dirigido [Beechem 85], teniendo en cuenta la dependencia de algunos parámetros con
 la concentración de β -CD. Los parámetros dependientes de la concentración, tales como el
 tiempo de difusión medio $\bar{\tau}_D$, el tiempo de relajación del término de reacción τ_R , y el término
 de amplitud de reacción A_R , se recalcularon en cada iteración a partir de los parámetros
 globales de interés (los tiempos de difusión de la pironina libre $\tau_{D,P}$ y complejada $\tau_{D,P:CD}$,

la razón de luminosidades Q , la constante de equilibrio K , y la constante de velocidad de disociación del complejo k_- usando las ecuaciones (6.17), (6.10) y (6.9). Otros parámetros como el tiempo de relajación del triplete (τ_T), el tiempo de “antibunching” (τ_F) y el factor geométrico del volumen de observación (w_z/w_{xy}), se conocen a partir de medidas de calibración y se fijaron a sus valores conocidos durante el análisis global dirigido. Para las dos series presentadas (PY y PB) se usaron valores fijos de $\tau_T = 1.5 \mu\text{s}$, determinado a partir de los ajustes realizados en curvas de correlación de fluorescencia obtenidos a altas energías en las que se distingue bien este proceso; $\tau_F = 2 \text{ ns}$, que es aproximadamente el tiempo de vida de fluorescencia de las pironinas (este valor de 2 ns se elige como aproximación entre el valor de pironina libre y complejada); y el factor geométrico del volumen de observación $w_z/w_{xy} = 5.2$, que se determinó de medidas de calibración con rodamina 6G.

p169
p168
p168

Así, los parámetros $\tau_{D,P}$, $\tau_{D,P:CD}$, w_z/w_{xy} , K , τ_T , Q , k_- y τ_F fueron globales para todas las curvas de correlación. Otros parámetros, como el número medio de moléculas $N = N_P + N_{P:CD}$ y la amplitud del triplete A_T , varían individualmente para cada curva de correlación. Las amplitudes de los términos triplete (A_T) están siempre por debajo de 0.02. El ajuste se inició fijando los parámetros globales a los valores iniciales esperados que se liberaron uno a uno en los ajustes sucesivos. Este procedimiento asegura que se alcance un mínimo en un tiempo razonable. Los valores de los parámetros ajustados con la constante de complejación fija y libre son los dados en la tabla 6.1.

Las curvas resultantes del ajuste correspondientes a las curvas de correlación de fluorescencia experimentales para la PY con la constante de complejación fija, obtenida de medidas de fluorescencia en estado estacionario, se representan en la figura 6.6. Dejando K libre en el análisis se obtiene un valor de la constante de complejación K (para la PY) que está de acuerdo con el dado a partir de técnicas clásicas de emisión de fluorescencia (mostrado en la tabla 5.4). La enorme incertidumbre obtenida indica una fuerte correlación estadística con otros parámetros, especialmente con $\tau_{D,P:CD}$ y k_- . Fijando K al valor obtenido con la técnica de fluorescencia en estado estacionario se reducen las incertidumbres de los otros parámetros sin cambiar significativamente sus valores ajustados (ver tabla 6.1).

p104

Los ajustes globales de las curvas de correlación para las disoluciones acuosas de PB a distintas concentraciones de β -CD con el mismo modelo usado para la PY fijando el valor de la constante de complejación, obtenida a partir de la serie de espectros de fluorescencia en estado estacionario (véase la tabla 5.6), se muestran en la figura 6.7. Los valores de los parámetros ajustados con la constante de complejación fija y libre son los dados en la tabla 6.1.

p110

Considerando los espectros de fluorescencia corregidos en estado estacionario se calcularon las razones de luminosidades, véase la definición de luminosidad en la ecuación (6.8), $Q = Q_{P:CD}/Q_P$, $Q(\text{PY})=0.50$ y $Q(\text{PB})=0.49$, que están de acuerdo con los datos determinados en los ajustes (véase la tabla 6.1). Los resultados de esta tabla de k_- y K confirman

p168

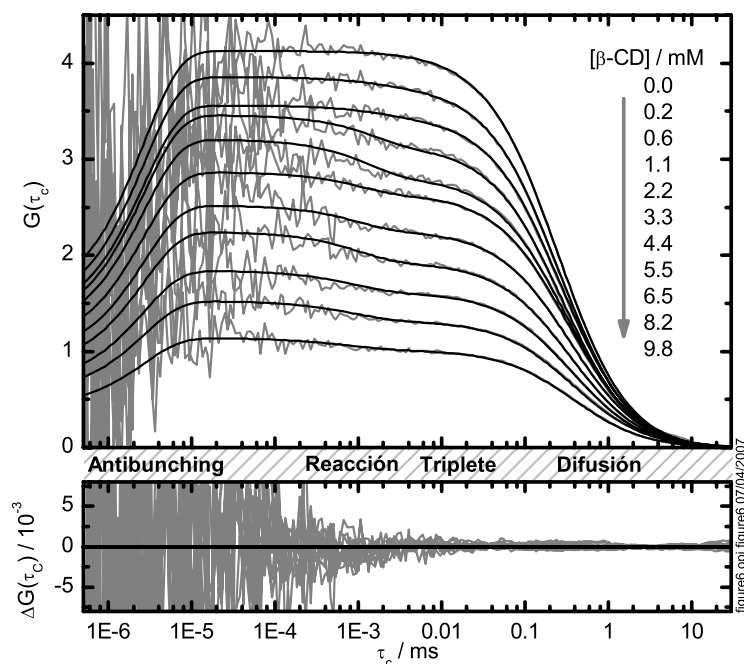


Figura 6.6: Curvas de correlación de disoluciones acuosas de PY medidas con diferentes concentraciones de β -CD (véase también la figura 6.2). Las curvas en gris son las curvas experimentales normalizadas, $G(0.006 \text{ ms})=1.0$, y luego escaladas arbitrariamente para separarlas visualmente. Las curvas negras son las curvas teóricas determinadas mediante ajustes globales dirigidos.

	$\tau_{D,P} / \text{ms}$	$\tau_{D,P;\beta\text{-CD}} / \text{ms}$	$K / 10^3 \text{ M}^{-1}$	Q	$k_- / 10^4 \text{ s}^{-1}$
PY	0.25 ± 0.02	0.46 ± 0.13	0.36 ± 0.55	0.6 ± 0.2	50 ± 80
Ref	0.25 ± 0.02	0.45 ± 0.06	0.4 (f)	0.6 ± 0.2	50 ± 30
PB	0.30 ± 0.02	0.42 ± 0.06	1.2 ± 0.9	0.48 ± 0.12	9.5 ± 8.4
Ref	0.30 ± 0.02	0.40 ± 0.04	2 (f)	0.49 ± 0.04	7.6 ± 2.7
			2.1 ± 0.2	0.49	

Tabla 6.1: Resultados de los ajustes globales dirigidos de una serie de curvas de correlación medidas a diferentes concentraciones de β -CD, ambas con valores libres y fijos de K . Los valores de referencia se obtuvieron mediante medidas de emisión de fluorescencia en estado estacionario a distintas concentraciones de β -CD. Los valores que han sido fijados en el ajuste se indican con (f).

el hecho experimental de que el tiempo de correlación del término de reacción debe ser más pequeño para la PY que para la PB, observable comparando las figuras 6.2 y 6.3. Este tiempo de correlación puede calcularse para una concentración determinada de CD total, $[CD]_0$, con la ecuación (6.10) obteniéndose un valor más pequeño para la PY que para la PB.

p165

p166

p168

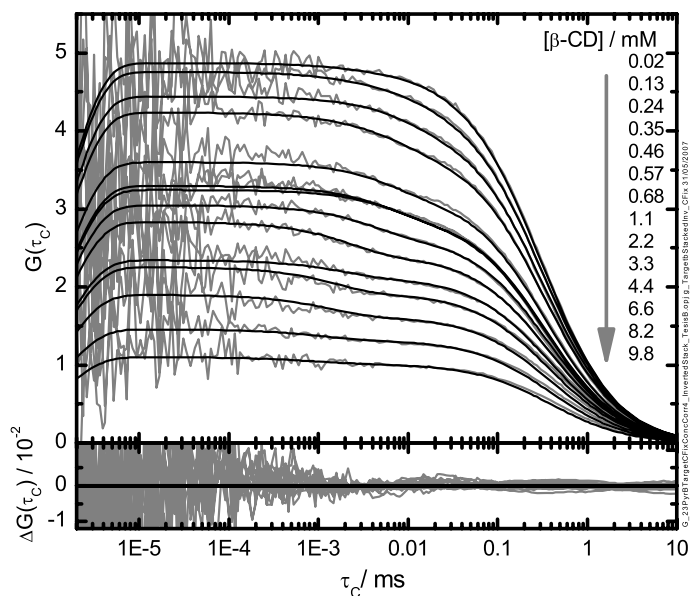


Figura 6.7: Curvas de correlación de disoluciones acuosas de PB medidas en presencia de diferentes concentraciones de β -CD como se indica en la figura (véase también la figura 6.3). Las curvas en gris son las experimentales normalizadas, $G(0.006 \text{ ms})=1.0$, y luego escaladas arbitrariamente para separarlas visualmente. Las curvas negras son las curvas teóricas determinadas mediante ajustes globales dirigidos.

Por tanto, las variaciones observadas en las curvas de correlación de las figuras 6.2 y 6.3 pueden explicarse perfectamente mediante la complejación de las pironinas con la β -CD, como se ha predecido mediante las simulaciones de la figura 6.4:

p165

p166

p170

1- La masa molar del complejo formado es sobre 5 veces mayor que la del fluoróforo libre y, en consecuencia, el tiempo de difusión medio observado aumenta de aproximadamente 0.25 a 0.40 ms para la PY, y de 0.30 a 0.45 ms para la PB.

2- La diferencia de luminosidad del fluoróforo libre y complejado y la rápida formación y disociación del complejo durante el tiempo de residencia del fluoróforo en el volumen de observación se reflejan en un término de reacción en la curva de correlación con un tiempo de correlación típico, dado por la velocidad de relajación del proceso de complejación, en el intervalo de 0.1 a 1 μ s.

6.2 Complejación de pironinas Y y B con γ -ciclodextrina

6.2.1 Resultados

Se obtuvieron las curvas de correlación de fluorescencia a potencia de excitación constante de $290 \mu\text{W}$ de disoluciones acuosas de la PY y de la PB a pH constante (4.0) en presencia de diferentes concentraciones de γ -CD. Estas curvas se muestran en las figuras 6.8 y 6.9 para la PY y PB, respectivamente. Al igual que en las curvas de correlación obtenidas con β -CD, se distinguen varios tramos en estas curvas de correlación, correspondientes a los diferentes procesos existentes. Las disoluciones acuosas de PY y PB a diferentes concentraciones de γ -CD presentan curvas de correlación de fluorescencia con un comportamiento similar al observado con la β -CD. Cabe destacar que con esta CD el término de reacción es más rápido y cae a tiempos de correlación más bajos con respecto a los de la β -CD (tanto para la PY como para la PB). Por tanto, este término aparece en una zona donde el ruido de la curva de correlación es mayor debido al menor número de fotones registrados en esta zona.

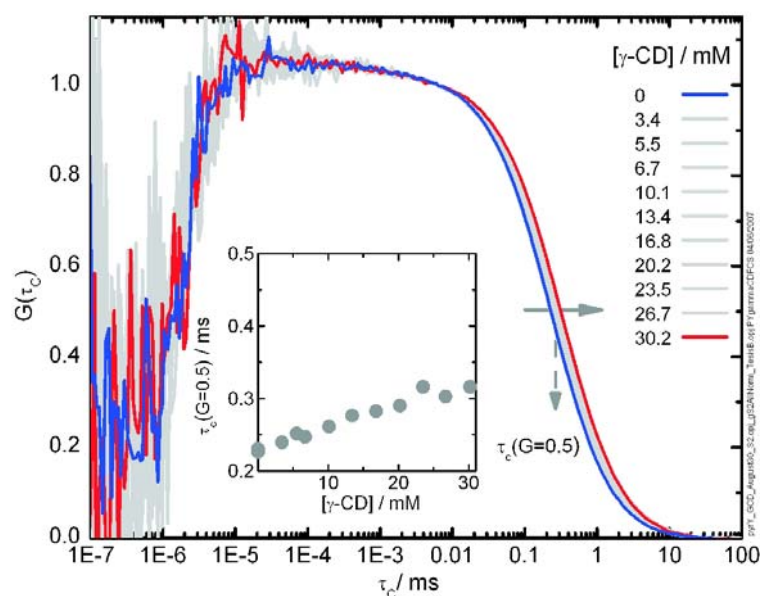


Figura 6.8: Curvas de correlación normalizadas, $G(0.006 \text{ ms}) = 1.0$, de disoluciones acuosas de PY medidas a diferentes concentraciones de γ -CD. En la figura insertada se muestran los tiempos de correlación a mitad de altura del término de difusión $\tau_C(G = 0.5)$ frente a la concentración de γ -ciclodextrina.

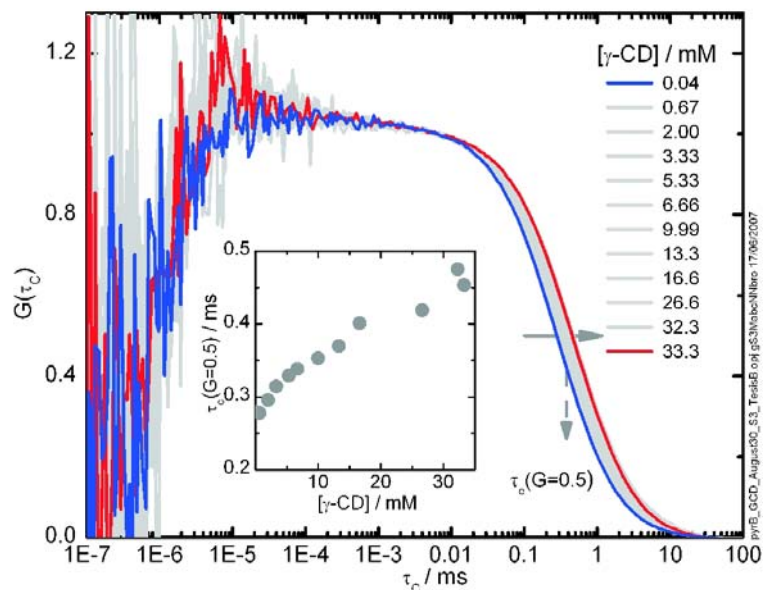


Figura 6.9: Curvas de correlación normalizadas, $G(0.006 \text{ ms})=1.0$, de disoluciones acuosas de PB medidas a diferentes concentraciones de γ -CD. En la figura insertada se muestran los tiempos de correlación a mitad de altura del término de difusión $\tau_C(G = 0.5)$ frente a la concentración de γ -ciclodextrina.

La adición de γ -CD en las curvas de correlación de estas dos pironinas provoca dos cambios significativos (figuras 6.8 y 6.9):

1- El término de difusión se desplaza hacia mayores tiempos de correlación al aumentar la concentración de γ -CD.

2- Los tiempos de correlación a mitad de altura del término de difusión $\tau_C(G = 0.5)$ aumentan con la concentración de γ -CD en menor medida en la PY que en la PB. En ambos casos el aumento total es menor que el observado en las medidas con la β -CD (véanse las figuras 6.2 y 6.3), a pesar de la mayor concentración final de la γ -CD.

3- Aparece el término de reacción con una amplitud que primero aumenta con la concentración de γ -CD para después volver a bajar a las concentraciones más altas.

6.2.2 Discusión

En el caso de las curvas de correlación de estas pironinas con γ -CD la concentración máxima de CD usada fue del orden de 0.03 M, por lo que sigue cumpliéndose que la constante

de velocidad de asociación ($k_+[CD]$ sería $3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ para una constante de velocidad de asociación máxima sólo limitada por la difusión $k_+ = 10^9 \text{ s}^{-1}$) es menor que la velocidad de decaimiento de fluorescencia ($k_{10} \approx 10^9 \text{ s}^{-1}$). Por tanto, también para este sistema se propone el mismo mecanismo de equilibrio de asociación en el estado fundamental que el indicado anteriormente para la β -CD en la figura 6.5.

p172

Se usó el mismo procedimiento de análisis global que el descrito para estas pironinas con la β -CD fijando el factor geométrico del volumen de observación en el determinado con rodamina 6G. Los resultados del ajuste global con este modelo se muestran en las figuras 6.10 y 6.11 para la PY y PB, respectivamente. Se observa que los residuos no son tan aleatorios como los obtenidos para estas pironinas con la β -CD. Se muestran a trazo discontinuo curvas simuladas con los mismos parámetros que las curvas continuas ajustadas, y únicamente eliminando el término de reacción ($A_R = 0$). Se observa especialmente en el caso de la PY que el término de reacción tiene poco efecto en los ajustes debido a que aparece en una zona con mucho ruido y en parte solapado con el término de “antibunching”, lo que dificultará el análisis de estas curvas de correlación. Sin embargo, en el caso de la PB los ajustes son significativamente mejores considerando este término. Los parámetros de

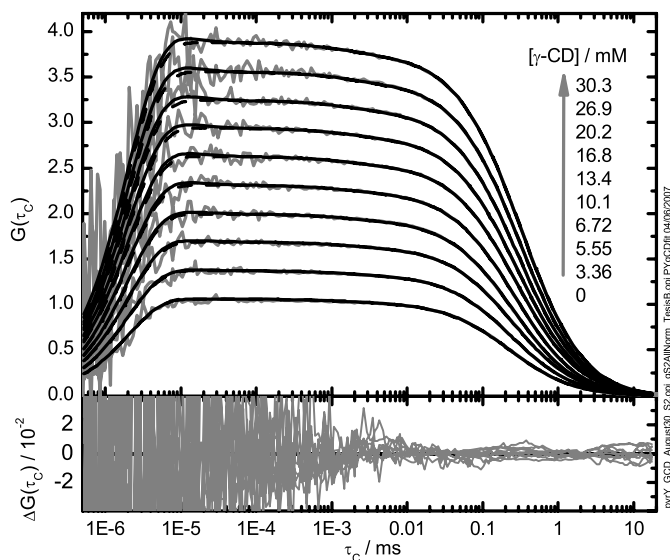


Figura 6.10: Curvas de correlación de disoluciones acuosas de PY medidas con diferentes concentraciones de γ -CD. Las curvas en gris son las experimentales normalizadas, $G(0.006 \text{ ms})=1.0$, y luego escaladas arbitrariamente para separarlas visualmente. Las curvas negras son las curvas teóricas determinadas mediante ajustes globales dirigidos. Se muestran a trazo discontinuo las curvas resultantes del mismo ajuste eliminando el término de reacción.

	$\tau_{D,P} / \text{ms}$	$\tau_{D,P:\gamma\text{-CD}} / \text{ms}$	K / M^{-1}	Q	$k_- / 10^4 \text{ s}^{-1}$
PY	0.23 ± 0.01	0.49 ± 0.05	35(f)	0.34(f)	(4000)
PB	0.28 ± 0.02	0.48 ± 0.05	186(f)	0.67(f)	300 ± 50

Tabla 6.2: Resultados de los ajustes globales dirigidos de una serie de curvas de correlación de fluorescencia medidas a diferentes concentraciones de γ -CD, ambas con valores fijos de K . Los valores de referencia de K (presentados anteriormente) y Q se obtuvieron previamente mediante medidas de emisión de fluorescencia en estado estacionario. El valor de k_- de la PY se indica solamente a modo orientativo.

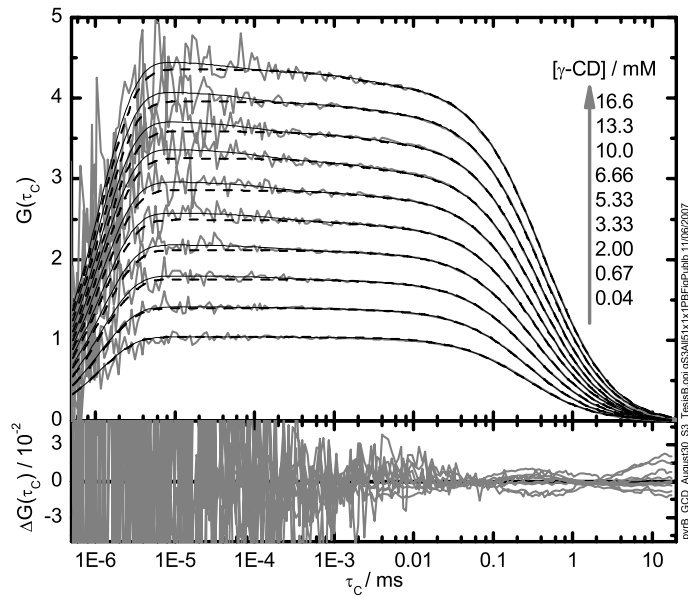


Figura 6.11: Curvas de correlación de disoluciones acuosas de PB medidas con diferentes concentraciones de γ -CD. Las curvas en gris son las experimentales normalizadas, $G(0.006 \text{ ms})=1.0$, y luego escaladas arbitrariamente para separarlas visualmente. Las curvas negras son las curvas teóricas determinadas mediante ajustes globales dirigidos. Se muestran a trazo discontinuo las curvas resultantes del ajuste sin tener en cuenta el término de reacción.

interés resultantes de los ajustes se resumen en la tabla 6.2. El valor de k_- de la PY se indica solamente a modo orientativo ya que por las razones expuestas no es posible determinar un valor fiable.

6.3 Comparación de la complejación de las pironinas con β -CD y γ -CD

Coefficientes de difusión traslacionales.

p34

Los tiempos de difusión determinados a partir de las curvas de correlación de fluorescencia pueden convertirse en coeficientes de difusión traslacionales usando la ecuación (2.17) con el radio del volumen de observación w_{xy} obtenido de una calibración con un estándar, la rodamina 6G. De estos coeficientes de difusión se ha calculado el radio hidrodinámico indicado en la tabla 6.3, R_h , aplicando la relación de Stokes-Einstein:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (6.21)$$

En esta ecuación la viscosidad del agua es $\eta(25^\circ C) = 0.8905$ cP. Todos los valores están corregidos para una temperatura de $25^\circ C$.

Como puede verse en la tabla 6.3, los fluoróforos libres PY y PB muestran los mayores coeficientes de difusión, D , que dan información del tamaño y del comportamiento hidrodinámico de estos sistemas. El coeficiente de difusión de la PB es significativamente menor que el de PY, lo que refleja su mayor tamaño y por tanto menor velocidad de difusión. Los complejos de inclusión de estas dos pironinas con β -CD tienen coeficientes de difusión mucho más pequeños que, sin embargo, no son significativamente diferentes entre sí. Los valores de la bibliografía para los coeficientes de difusión de la β -CD y de la γ -CD caen entre los valores de los fluoróforos libres y los de los complejos $P : CD$.

	$D / 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$R_h / \text{Å}$	M_w / Da
PY	4.2 ± 0.3	5.8 ± 0.4	267
PY: β -CD	2.4 ± 0.3	10 ± 1	1402
PY: γ -CD	2.1 ± 0.2	12 ± 1	1564
PB	3.5 ± 0.3	7.0 ± 0.6	324
PB: β -CD	2.6 ± 0.3	9 ± 1	1459
PB: γ -CD	2.2 ± 0.2	11 ± 1	1621
β -CD	$(3.23 \pm 0.07)^a$	7.6 ± 0.2	1135
γ -CD	$(3.09 \pm 0.05)^a$	7.9 ± 0.1	1297

^a datos de medidas de RMN [Cameron 02].

Tabla 6.3: Coeficientes de difusión traslacionales y radios hidrodinámicos a $25^\circ C$ calculados a partir de los tiempos de difusión de las tablas 6.1 y 6.2. Las masas molares M_w no incluyen los contraiones de los cationes de los fluoróforos. Los errores no incluyen los errores de la calibración.

Estos resultados reflejan cuantitativamente las diferentes dimensiones estéricas de las moléculas involucradas. El fluoróforo libre PY es el más pequeño, seguido de la PB, y luego de los complejos P: β -CD y P: γ -CD. El aumento en el tamaño de PY a PB debido al cambio de dos grupos metilo por dos grupos etilo afecta a las propiedades de difusión de los fluoróforos libres, pero no cuando se forman los complejos de inclusión. Los radios hidrodinámicos derivados de la PY y PB corresponden bien a dimensiones geométricas estimadas de modelos moleculares. Los radios hidrodinámicos de los complejos son muy similares para los complejos PY: β -CD y PB: β -CD y algo mayores que los obtenidos para la β -CD sola, sin pironina. Del mismo modo, los radios hidrodinámicos de los complejos son muy similares para los complejos PY: γ -CD y PB: γ -CD y algo mayores que los obtenidos para la γ -CD sola, sin pironina.

Según la ecuación de Stokes-Einstein, indicada en la ecuación (6.21), es de esperar que el coeficiente de difusión de partículas esféricas homogéneas cambie con la masa molar siguiendo una variación potencial con exponente $-1/3$. Esto se debe a que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al radio hidrodinámico, siendo éste proporcional a la raíz cúbica de la masa molecular, es decir $D \sim R_h^{-1} \sim M_w^{-1/3}$. La figura 6.12 muestra un diagrama doblemente logarítmico del coeficiente de difusión frente a la masa molar para las moléculas aquí estudiadas y para algunos valores de la bibliografía de otros sustratos sin carga, ciclodextrinas de otros tamaños y complejos de ciclodextrinas. Los valores de la bibliografía de las moléculas neutras muestran en el diagrama doblemente logarítmico una excelente correlación lineal. El ajuste de la expresión potencial indicada en la siguiente ecuación a los datos conduce a un exponente $\nu = 0.399 \pm 0.003$ (línea a trazos en la figura 6.12).

$$D = aM_w^{-\nu} \quad (6.22)$$

Este valor cae ligeramente por encima del valor de $\nu = 1/3$ esperado para esferas homogéneas. Si la disposición fuese similar a la de las cadenas de polímeros al azar se obtendría $\nu = 1/2$ y si fuera similar al obtenido para barras rígidas se esperaría $\nu = 1$ [Burchard 94]. Esto indica propiedades difusionales muy similares para los pequeños azúcares, los esteroides, las ciclodextrinas y los complejos formados entre esteroides y sustratos. Cabe destacar que las ciclodextrinas a pesar de su cavidad abierta, se ajustan perfectamente a este esquema. Esto indica que su interior no está hueco durante la difusión, es decir que difunden con moléculas de agua en su interior.

Sin embargo, el valor de la bibliografía para el coeficiente de difusión de la rodamina 6G cae mucho más abajo que este grupo de datos aunque se determinó con la misma técnica de RMN, como los datos de esteroides y ciclodextrinas.

Los coeficientes de difusión de la PY y PB y de los colorantes pironina 110 (P110) y rodamina 110 (R110) muestran la misma tendencia que la rodamina 6G (R6G). Al ser las pironinas modelos del esqueleto xanténico de las rodaminas, se puede ajustar el modelo a estos valores (línea de puntos en la figura 6.12). El exponente resultante de aproximadamente $\nu = 0.7 \pm 0.1$ indica una desviación fuerte de la distribución de masa esférica, que estaría de

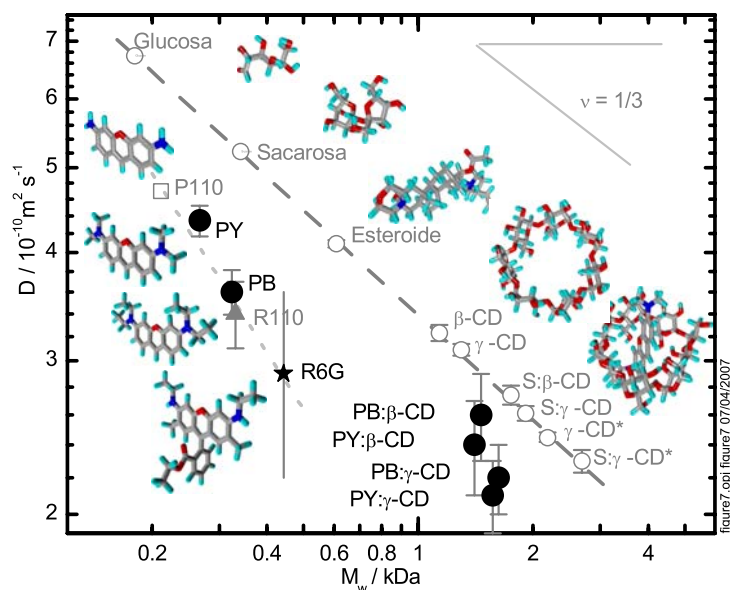


Figura 6.12: Diagrama doblemente logarítmico de los coeficientes de difusión traslacionales frente a la masa molecular. Los círculos rellenos indican los valores experimentales de PY y PB y sus complejos con la β -CD y la γ -CD de la tabla 6.3. La estrella indica el valor de referencia de la rodamina 6G [Gell 01]. El triángulo gris indica el valor para la rodamina 110 determinado por FCS del mismo modo que para las pironinas. Los círculos abiertos indican valores de la bibliografía (de azúcares glucosa y sacarosa [Weast 86] y de esteroides (S), CDs y complejos esteroides:CD de datos de RMN [Cameron 02]). La línea a trazos es el ajuste a la ley potencial de la ecuación 6.22 de los valores de la bibliografía (círculos abiertos) con $\nu = 0.399 \pm 0.003$. La línea a puntos indica el ajuste a la ley potencial de los valores de varios colorantes (PY, PB, P110, R110 y R6G) con $\nu = 0.7 \pm 0.1$. La barra de error en el valor de referencia de la R6G indica $\pm 25\%$ de precisión, que no está incluido en las barras de error de los otros valores. Todos los valores están dados para una temperatura de 25°C . Las masas molares de los colorantes cargados no incluyen los contraiones.

acuerdo con la configuración planar de la estructura aromática de estos colorantes en comparación con los azúcares y los complejos de esteroides analizados antes. Se ha considerado también que todos los colorantes de este grupo llevan una carga positiva que aumenta sus volúmenes de hidratación y por tanto reduce sus coeficientes de difusión.

Se observa un comportamiento diferente en los coeficientes de difusión de los complejos de inclusión P:CD respecto a los de los colorantes libres. Estos complejos muestran coeficientes de difusión similares, cercanos a los de los complejos esteroide:CD. Esto indica que las diferencias en la forma observadas para los diferentes sustratos es de menor importancia una vez que los sustratos se incluyen en el ligando. Los complejos de inclusión P:CD resultantes son globulares con una distribución de masas similar.

Dinámica de complejación.

Asociación. Las constantes de velocidad de asociación, k_+ , se calcularon a partir de los valores de las constantes de velocidad de disociación k_- (dados en las tablas 6.1 y 6.2 para la β -CD y para la γ -CD, respectivamente) usando la ecuación (6.19) y el valor de la constante de complejación dado en dichas tablas. Los valores obtenidos para las constantes de velocidad de asociación (k_+) para las PY y PB con β -CD y γ -CD se dan en la tabla 6.4. Cabe señalar que los errores de estas constantes son mucho mayores en el caso de los complejos con γ -CD debido a que el término de reacción en estas curvas de correlación aparece a tiempos de correlación más cortos, donde el ruido de los datos es mucho mayor. Las velocidades de asociación/disociación no son suficientemente altas como para competir con los procesos de desactivación en el estado excitado de las pironinas libres y los complejos P:CD, incluso a las concentraciones más altas de CD alcanzadas, si bien esta condición se cumple mejor con la β -CD que con la γ -CD. Esto está de acuerdo con el mecanismo propuesto en el que no se consideraron procesos de asociación/disociación en el estado excitado.

p175

p171

Los valores de las constantes de velocidad de asociación (k_+) de la PY y PB coinciden dentro del error experimental tanto para la β -CD como para la γ -CD (ver tabla 6.4) a pesar del mayor volumen de los grupos etilo de la PB respecto a los grupos metilo de la PY. La constante de asociación de la PB con γ -CD es significativamente mayor que en el caso de la β -CD. El valor para la asociación entre PY y γ -CD no se ha podido determinar con precisión, pero se estima en todo caso que es mayor que el valor obtenido para la asociación con la β -CD. Los valores de las constantes de velocidad de asociación (k_+) de la PB y PY están entre los valores de constantes de velocidad de asociación más altos dados para una serie de sustratos aromáticos y alifáticos en su estado fundamental [Cramer 67] y son del mismo orden que los determinados para azoalcanos bicíclicos por Nau y sus colaboradores [Zhang 02].

Usando las propiedades de difusión (D y R_h) determinadas ya mediante FCS, pueden estimarse las constantes de velocidad limitadas por la difusión (k_d) para un proceso de asociación controlado por difusión aplicando la ecuación de Smoluchowski para la reacción entre un sustrato P y un ligando CD [Caldin 01].

$$k_d = 4\pi D_{P+CD} R_{h,P+CD} N_0 \quad (6.23)$$

En esta ecuación $D_{P+CD} = D_P + D_{CD}$, $R_{h,P+CD} = R_{h,P} + R_{h,CD}$ y N_0 es el número de Avogadro. Los valores de k_d calculados para las dos pironinas son muy similares, como se indica en la tabla 6.4. Es interesante destacar que en la ecuación (6.23) el efecto de las diferencias entre los coeficientes de difusión, D_P , para la PY y PB se compensa principalmente por la diferencia entre sus radios $R_{h,P}$ (ver tabla 6.3).

Si comparamos el valor de k_d con el de k_+ se observa que el valor de la constante cinética del proceso de difusión k_d es mucho mayor que la constante cinética de asociación (véase la tabla 6.4). Por tanto, en este proceso de complejación debe de haber alguna etapa mucho más

	k_+ ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{-d} (10^9 s^{-1})	k_r (10^9 s^{-1})	k_{-r} (10^4 s^{-1})
PY: β -CD	0.2 ± 0.1	7.5 ± 0.5	1.7 ± 0.1	0.05 ± 0.02	50 ± 30
PB: β -CD	0.15 ± 0.05	7.4 ± 0.5	1.3 ± 0.1	0.03 ± 0.01	7.6 ± 2.7
PY: γ -CD	(1.4)	7.7 ± 0.3	1.7 ± 0.1	(0.4)	(5000)
PB: γ -CD	0.6 ± 0.1	7.5 ± 0.4	1.3 ± 0.1	0.10 ± 0.03	300 ± 100

Tabla 6.4: Constantes de velocidad de asociación entre las pironinas y la β -CD y γ -CD. Las constantes de velocidad k_d , k_{-d} y k_r se calcularon aplicando la teoría de reacción bimolecular usando las ecuaciones 6.23, 6.24, 6.26 y 6.27 y los valores de las tablas 6.1, 6.2 y 6.3.

lenta que la etapa de difusión que limite la velocidad de complejación. Por esto proponemos un mecanismo que incluya una etapa previa a la complejación en la que se forma un complejo de encuentro.

Por tanto, describimos la complejación como un proceso en dos pasos aplicando la teoría de reacciones bimoleculares usada en transferencia de electrones o en la teoría de desactivación de fluorescencia [Eigen 54, Ebersson 82, Valeur 02]:

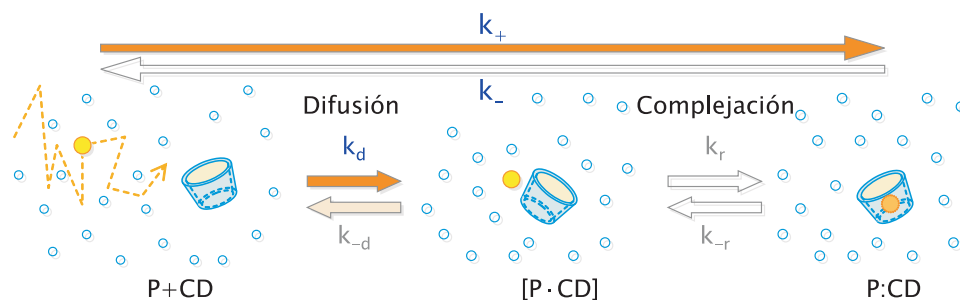


Figura 6.13: Mecanismo de complejación con una etapa de formación de un complejo de encuentro.

Debido a la difusión, el sustrato, P , y el ligando, CD , se ponen en contacto ocasionalmente con una constante de velocidad limitada por la difusión k_d , dada por la ecuación (6.23), para formar un complejo de encuentro $[P \cdot CD]$, donde P y CD están en una cavidad común rodeados por moléculas de disolvente. El complejo de encuentro se disocia con la constante de disociación k_{-d} , que puede estimarse a partir del tiempo necesario para que el ligando y el sustrato difundan al menos su radio molecular R_{P+CD} .

La constante de disociación del complejo de encuentro puede calcularse a partir del tiempo de difusión, ecuación (2.17), usando la siguiente ecuación:

$$(k_{-d})^{-1} \approx \frac{R_{h,P+CD}^2}{4D_{P+CD}} \quad (6.24)$$

Los valores de k_{-d} para las dos pironinas difieren aproximadamente un 30 % (véase tabla 6.4). El valor más pequeño para la PB se debe al hecho de que en este caso el coeficiente de difusión es más pequeño y el radio es más grande para la PB y ambos factores aumentan el tiempo de vida del correspondiente al complejo de encuentro (k_{-d}^{-1}). Así, la razón k_d/k_{-d} depende sólo del volumen ocupado por el ligando y el sustrato y es proporcional al radio $R_{h,P+CD}$ al cubo:

$$\frac{k_d}{k_{-d}} = \pi R_{h,P+CD}^3 N_0 \quad (6.25)$$

Una vez que sustrato y ligando están en contacto puede formarse el complejo de inclusión $P : CD$ con la constante de velocidad de reacción k_r . La constante de velocidad k_{-r} describe la reacción de vuelta desde el complejo al par de encuentro. En base a este modelo podemos separar el equilibrio de complejación total en un pre-equilibrio entre moléculas libres y el complejo de encuentro con $K_{enc} \approx k_d/k_{-d}$, y el equilibrio de inclusión entre el complejo de encuentro y el complejo de inclusión con $K_r \approx k_r/k_{-r}$:

$$K = K_{enc} K_r = \frac{k_+}{k_-} = \frac{k_d}{k_{-d}} \frac{k_r}{k_{-r}} \quad (6.26)$$

Con los valores dados en la tabla 6.4, estimamos de la razón k_d/k_{-d} una constante de equilibrio del complejo de encuentro K_{enc} de sobre 5 M^{-1} para las dos pironinas con las dos CD. Conocidas las constantes de equilibrio totales K (tablas 6.1 y 6.2), pueden calcularse las constantes del equilibrio de inclusión $K_r(\text{PY}:\beta\text{-CD})= 90$, $K_r(\text{PB}:\beta\text{-CD})= 350$, $K_r(\text{PY}:\gamma\text{-CD})= (8)$ y $K_r(\text{PB}:\gamma\text{-CD})= 30$. Estos valores de K_r indican que la velocidad de formación del complejo, k_r , es mucho más rápida que la velocidad de disociación, k_{-r} . Esto justifica el que se pueda despreciar k_{-r} en la siguiente descripción cinética de k_+ .

p175

p180

Asumiendo condiciones de estado estacionario para la concentración de $[P \cdot CD]$ y despreciando k_{-r} se obtiene una constante de pre-equilibrio que tiene en cuenta la formación del complejo con $K_{enc} = \frac{k_d}{k_{-d} + k_r}$. La constante de velocidad de formación del complejo $P : CD$, k_+ , puede expresarse como $k_r K_{enc}$:

$$k_+ = k_r \frac{k_d}{k_{-d} + k_r} = \frac{k_d}{1 + \frac{k_d k_{-d}}{k_r k_d}} \Leftrightarrow k_r = \frac{k_+ k_{-d}}{k_d - k_+} \quad (6.27)$$

Esta expresión nos permite estimar la constante de velocidad unimolecular k_r de formación del complejo dadas en la tabla 6.4. Los diferentes valores de k_r indican que la PY tiene una probabilidad ligeramente mayor que la PB de formar el complejo durante el tiempo de vida de su par de encuentro. Esta ventaja, sin embargo, es en parte eliminada por el menor tiempo de vida del par de encuentro de la PY. Por tanto, las constantes de velocidad de asociación total k_+ de la PY y PB no son significativamente diferentes. El efecto compensatorio entre la velocidad de reacción y el tiempo de vida del complejo de encuentro puede explicar también en cierta extensión que los valores de las constantes de velocidad de asociación encontrados

por otros autores para moléculas sustrato de menor tamaño sean muy similares y la pequeña influencia de diferentes sustituciones en esta constante [Zhang 02].

Por tanto, se comprobó que el proceso de asociación no está controlado por la difusión, ya que la constante de velocidad de asociación (k_+) es mucho menor que la constante de velocidad controlada por la difusión (k_d). Este hecho (y simulaciones realizadas en nuestro grupo de investigación [Al-Soufi 05]) indican que las restricciones geométricas determinan el proceso de complejación de las ciclodextrinas, que se comportan como cavidades rígidas. No es suficiente para que se produzca la complejación que el fluoróforo y la ciclodextrina difundan y se encuentren próximos sino que han de tener la orientación adecuada para que se produzca la complejación. Las ciclodextrinas se diferencian de otras cavidades que son más “blandas” para la entrada del fluoróforo. Así en las micelas de Triton X-100 la asociación de un fluoróforo (rodamina 123) está determinada por la etapa de difusión ($k_+ \approx k_d$), lo que indica que la micela no impone restricciones geométricas a la entrada del fluoróforo [Novo 07].

Disociación. Contrariamente a lo que sucede con las constantes de velocidad de asociación, que son muy similares, se observa una gran diferencia entre las constantes de velocidad de disociación, k_- , para las dos pironinas estudiadas, tanto con la β -CD como con la γ -CD. Así, en los complejos con la β -CD el valor obtenido para esta constante para la PY es 6 veces mayor que para la PB (ver tabla 6.1) y en los complejos con la γ -CD el valor estimado para esta constante para la PY es mucho mayor que para la PB (ver tabla 6.2). Esto implica que la mayor estabilidad de los complejos PB:CD se debe fundamentalmente a su más lenta disociación. Se encontraron resultados análogos en la bibliografía, por ejemplo, para los ya mencionados bicicloalcanos [Zhang 02] o para los isómeros de 1-naftil-1-etanol y 2-naftil-1-etanol, donde la posición del sustituyente que permite a la molécula penetrar más o menos profundamente en la cavidad de la β -CD tiene un fuerte efecto en la constante de velocidad de disociación pero menor en la constante de velocidad de asociación.

De las ecuaciones (6.26) y (6.27) y del hecho de que $k_{-d} \gg k_r$ es fácil ver que la constante de velocidad de disociación total (k_-) está limitada por la constante de velocidad con que el sustrato abandona el ligando formando de nuevo un complejo de encuentro, k_{-r} , y que éste es el paso más lento de todos los implicados.

El hecho de que la constante de velocidad de disociación de los complejos PB:CD sea mucho menor que la de los complejos PY:CD confirma que la PB interactúa mucho más fuertemente que la PY con el interior de la cavidad de la β -CD y de la γ -CD. Esto ya se había propuesto previamente en base a los estudios de estado estacionario y resueltos en el tiempo pero no pudo confirmarse hasta obtener información de la dinámica de complejación. Interacciones específicas entre el esqueleto xanténico cargado positivamente de las pironinas y los oxígenos glucosídicos ricos en electrones de la cavidad de estas CD estabilizan probablemente los complejos de inclusión de ambas pironinas, pero parecen ser mucho más fuertes en el caso de la PB.

p175

p180

Por tanto, la constante de velocidad de disociación (k_-) depende de interacciones específicas sustrato-ligando y determina la estabilidad termodinámica de estos complejos supra-moleculares.

Por último se calculó la razón $k_r/k_{-d} \approx 0.02$ obtenida para las dos pironinas estudiadas con β -CD. Esta razón (llamada probabilidad de reacción) indica que sólo un 2 % de los pares de encuentro formados conduce al complejo de inclusión. Esta razón es mucho mayor para los complejos formados con γ -CD (de aproximadamente un 8 % para la PB y aún mayor para la PY), lo que es razonable debido al mayor tamaño de la cavidad de esta ciclodextrina y por tanto el menor impedimento estérico. Simulaciones realizadas en nuestro grupo de investigación indican que la reorientación geométrica puede ser un paso determinante en el proceso de formación de complejos de inclusión y que la velocidad del proceso de complejación de las pironinas con las CD puede estar determinada por efectos estéricos [Al-Soufi 05].

Capítulo 7

Comportamiento fotofísico de la 7-hidroxycumarina en disolventes próticos

En este capítulo se estudia el comportamiento fotofísico de la 7-HC en dos disolventes próticos, agua y etanol, analizando el efecto de la acidez en el mismo. Este estudio tiene como finalidad identificar las especies prototrópicas existentes para la 7-HC en los estados fundamental y excitado en función de la acidez, determinar las velocidades de interconversión entre las distintas especies excitadas y conocer las diferencias de comportamiento debidas a un relativamente pequeño cambio de disolvente entre agua y etanol. Esta información es necesaria para abordar el estudio de la interacción de la 7-HC con sistemas micelares y caracterizar su comportamiento fotofísico en dichos sistemas.

7.1 Comportamiento fotofísico de la 7-Hidroxycumarina en disolución acuosa

7.1.1 Resultados

En la figura 7.1 se muestran los espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC en tampón de fosfatos 0.01 M a distintos valores de pH a 25°C. La concentración de 7-HC se mantuvo constante en un valor de $1.04 \cdot 10^{-4}$ M. El espectro de absorción en medio ácido (pH 1.25) consiste en una única banda cuyo máximo está situado a 324 nm. Este

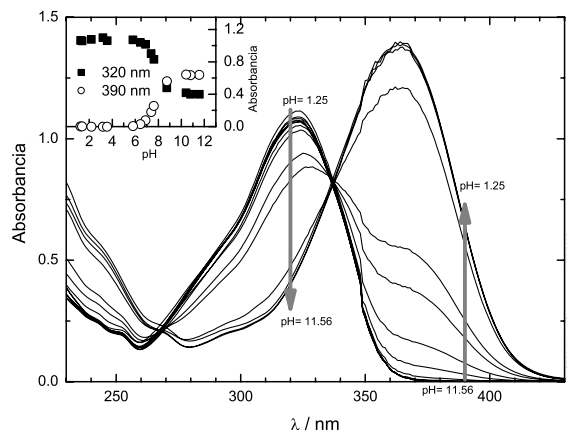


Figura 7.1: Espectros de absorción de la 7-HC en disolución acuosa con 0.01 M de fosfatos en el intervalo de pH entre 1.25 y 11.56. La concentración de 7-HC empleada en estas disoluciones fue de $1.04 \cdot 10^{-4}$ M.

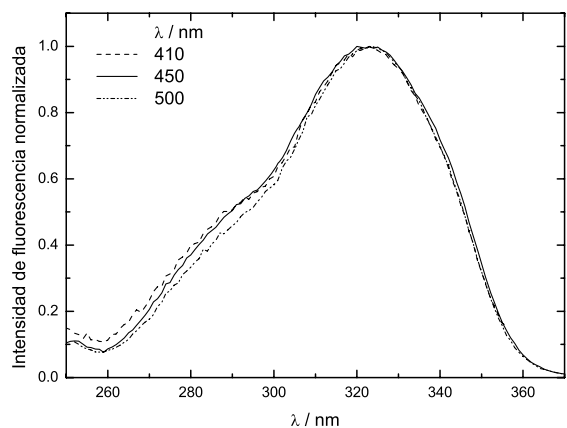


Figura 7.2: Espectros de excitación normalizados en el máximo de la 7-HC ($4.36 \cdot 10^{-7}$ M) en disolución acuosa a pH 4.83 a diferentes longitudes de onda de emisión.

espectro se mantiene invariable al disminuir la acidez hasta valores de pH en torno a 5. Por encima de este valor, la banda de absorción disminuye de intensidad según se incrementa el pH, apareciendo una nueva banda con máximo a 365 nm. En medio fuertemente básico se obtiene únicamente la banda con máximo de absorción a 365 nm. Se observa un punto isobéstico a 337 nm.

Los espectros de excitación registrados a distintas longitudes de onda de emisión de disoluciones acuosas de 7-HC a pH 4.83 no presentan diferencias significativas (figura 7.2).

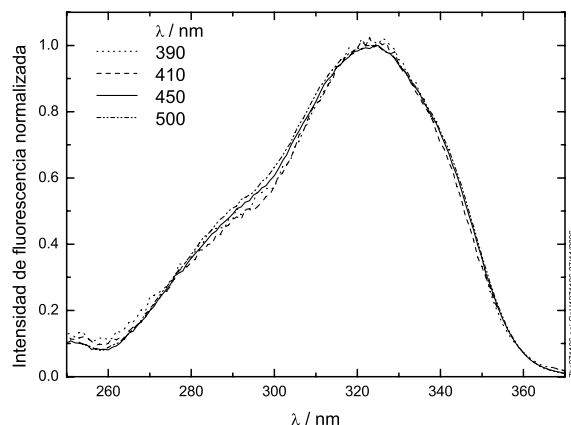


Figura 7.3: Espectros de excitación normalizados en el máximo de la 7-HC ($4.36 \cdot 10^{-7}$ M) en disolución acuosa a pH 1.01 a diferentes longitudes de onda de emisión.

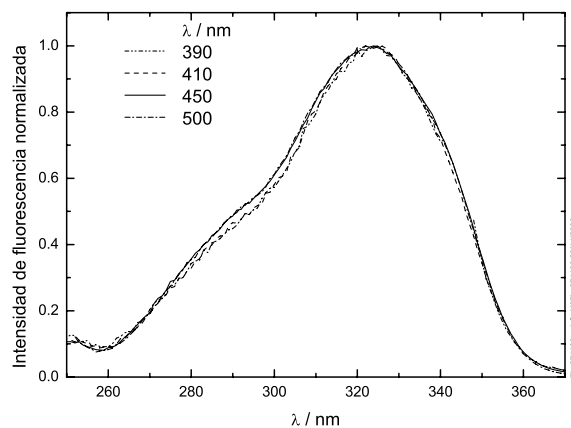


Figura 7.4: Espectros de excitación normalizados en el máximo de la 7-HC ($8.72 \cdot 10^{-7}$ M) en disolución acuosa a pH 0.08 a diferentes longitudes de onda de emisión.

Tampoco se observan diferencias entre los espectros de excitación obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión de las disoluciones de 7-HC en agua a pH 1.01 y a pH 0.08 (figuras 7.3 y 7.4, respectivamente).

También se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en disolución acuosa a distintos valores de pH en presencia de 0.01 M de fosfatos manteniendo la concentración de 7-HC constante y excitando a 390 nm. Dichos espectros se muestran en la figura 7.5. Se observa una banda con máximo a aproximadamente 456 nm, cuya intensidad disminuye conforme disminuye el pH siguiendo una variación de tipo sinusoidal (ver gráfi-

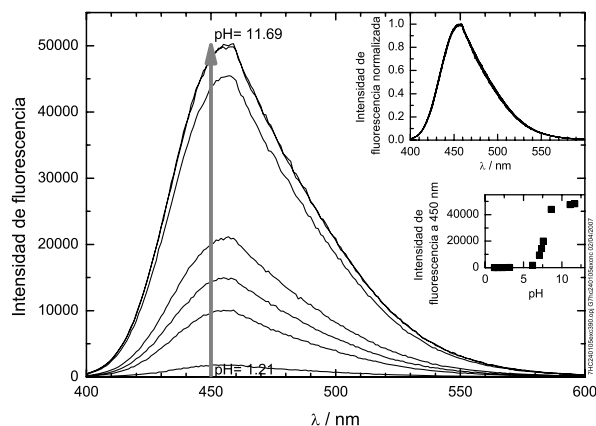


Figura 7.5: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC ($8.35 \cdot 10^{-6}$ M) en disolución acuosa a diferentes valores de pH (de 1.21 a 11.69) con tampón de fosfatos 0.01 M. Longitud de onda de excitación: 390 nm. En la gráfica insertada superior se muestran dichos espectros normalizados en el máximo. La gráfica insertada inferior muestra la variación de intensidad de fluorescencia a 450 nm con el pH.

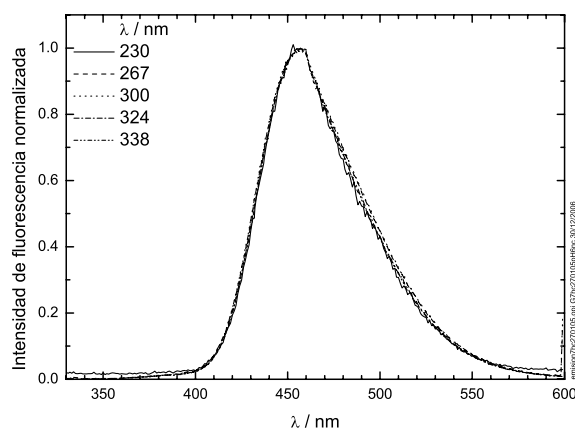


Figura 7.6: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos normalizados en el máximo de la 7-HC ($8.35 \cdot 10^{-6}$ M) en disolución acuosa a pH 6.49 obtenidos a diferentes longitudes de onda de excitación.

ca insertada inferior). Esta banda no cambia de forma como puede verse en los espectros normalizados de la gráfica insertada superior.

Los espectros de emisión de disoluciones acuosas de 7-HC obtenidos a distintas longitudes de onda de excitación coinciden perfectamente una vez normalizados, tanto a pH 6.49 (figura 7.6) como a pH 0.97 (figura 7.7).

A continuación se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en disolución acuosa a distintos valores de pH excitando a 320 nm (figura 7.8). La 7-HC a pH

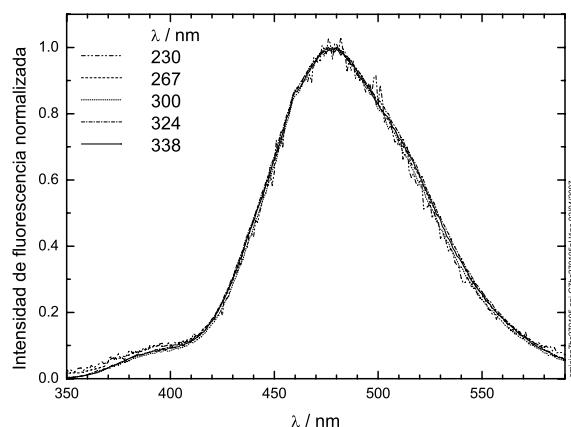


Figura 7.7: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos normalizados en el máximo de la 7-HC ($8.35 \cdot 10^{-6}$ M) en disolución acuosa a pH 0.97 obtenidos a diferentes longitudes de onda de excitación.

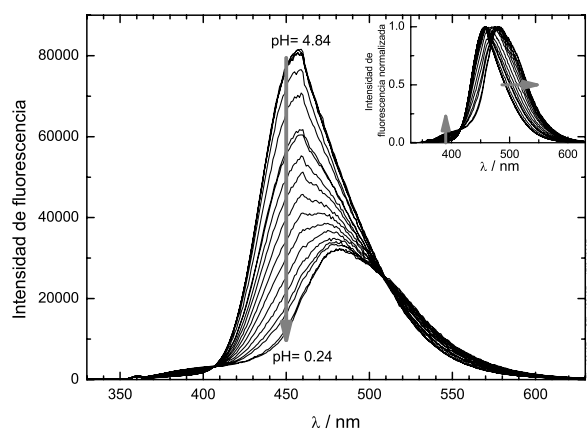


Figura 7.8: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC ($5.90 \cdot 10^{-6}$ M) a diferentes valores de pH (de 0.24 a 4.84) obtenidos excitando a 320 nm. La gráfica insertada muestra dichos espectros normalizados en el máximo.

4.84 presenta una banda de emisión fluorescente con máximo a 456 nm. A valores de pH más ácidos disminuye la intensidad de esta banda y aparecen dos bandas nuevas: una banda en torno a 390 nm de poca intensidad, y otra con máximo alrededor de 480 nm. En los espectros normalizados (gráfica insertada de la figura 7.8) se puede observar claramente un desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia hacia mayor longitud de onda al aumentar la acidez debido a la aparición de la banda con máximo a 480 nm.

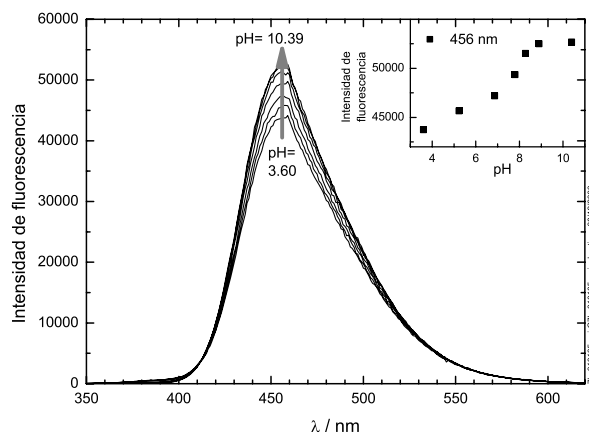


Figura 7.9: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC en disolución acuosa ($9.43 \cdot 10^{-6}$ M) a diferentes valores de pH (de 3.60 a 10.39) con tampón fosfatos 0.01 M excitando a 338 nm. En la gráfica insertada se representa la intensidad de fluorescencia a 456 nm en función del pH.

Al excitar aproximadamente en el isobéptico disoluciones acuosas de 7-HC a distintos valores de acidez se observa, como se muestra en la figura 7.9, que todos los espectros presentan un máximo a 456 nm. A valores de pH ácidos disminuye ligeramente la intensidad de la banda a 456 nm (ver gráfica insertada en la figura 7.9), mientras que la banda a 390 nm aumenta ligeramente en intensidad. Si se normalizan los espectros en el máximo, se observa que la banda de emisión a 456 nm aumenta en intensidad en la zona de altas longitudes de onda al disminuir el pH.

El rendimiento cuántico de la 7-HC en agua a pH 4.5 se determinó tomando como referencia el del sulfato de quinina en disolución acuosa de ácido sulfúrico 2 M como 0.546 (este valor es el que presenta a 25°C según la bibliografía [Demas 71], si bien las medidas las hemos realizado a 20°C , por lo que podría haber un pequeño error en los valores absolutos de rendimientos cuánticos). El valor así obtenido experimentalmente es 0.78, que coincide bien con el valor de 0.79 publicado para la 7-HC en agua [Azuma 03].

En lo que respecta a las medidas de fluorescencia con resolución temporal, en primer lugar se midieron los espectros resueltos en el tiempo de una disolución acuosa de 7-HC a pH 4.50 excitando a 320 nm (es decir, se registraron los decaimientos de fluorescencia a longitudes de onda de 380 hasta 500 nm cada 10 nm). Los resultados de los ajustes individuales de cada uno de los decaimientos medidos a las diferentes longitudes de onda se muestran en la tabla 7.1. Se observan tres tiempos de vida: un tiempo de vida de menos de un nanosegundo en el intervalo de longitudes de onda de 380 a 400 nm, un tiempo de formación de 1.16 ± 0.03 ns (media ponderada por el error de los datos de 420 a 480 nm) y otro tiempo de vida de unos 5.4 ns, en todo el intervalo de longitudes de onda.

λ / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	E_1	E_2	χ^2
380	0.192 ± 0.008	3.66 ± 0.04	0.070	0.001	1.37
390	0.214 ± 0.007	4.66 ± 0.03	0.081	0.001	1.29
400	0.13 ± 0.01	5.35 ± 0.01	0.14	0.005	1.00
410	-	5.54 ± 0.02	-	0.001	1.03
420	1.3 ± 0.1	5.40 ± 0.04	-0.001	0.002	1.06
430	1.31 ± 0.08	5.36 ± 0.02	-0.002	0.005	1.07
440	1.14 ± 0.06	5.36 ± 0.01	-0.003	0.008	0.991
450	1.20 ± 0.07	5.37 ± 0.01	-0.003	0.010	1.07
460	1.11 ± 0.07	5.36 ± 0.01	-0.003	0.010	1.06
470	0.93 ± 0.09	5.38 ± 0.01	-0.002	0.008	0.962
480	1.2 ± 0.2	5.35 ± 0.02	-0.001	0.007	1.09
490	-	5.421 ± 0.008	-	0.005	1.08
500	-	5.377 ± 0.009	-	0.004	1.06

Tabla 7.1: Tiempos de vida de 7-HC ($1.20 \cdot 10^{-5}$ M) en disolución acuosa a pH 4.50 y a la longitud de onda de emisión λ . Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un tiempo de adquisición fijo.

Asimismo, se midieron los espectros resueltos en el tiempo de una disolución acuosa de 7-HC a pH 0.50 excitando a 320 nm. Los resultados de los ajustes individuales de los diferentes decaimientos se muestran en la tabla 7.2. Se observan dos tiempos de vida: un tiempo de aproximadamente 0.1 ns en el intervalo de longitudes de onda de 370 nm a 430 nm y otro tiempo de vida de unos 4.3 ns, presente en todo el intervalo de longitudes de onda. El ajuste de algunos de los decaimientos entre 470 nm y 530 nm con dos exponenciales mejora ligeramente la calidad del ajuste dando como resultado prácticamente el mismo tiempo de vida que el obtenido con el ajuste monoexponencial y un tiempo de formación muy corto, de menos de un nanosegundo, con mucho error y muy poca amplitud. Sin embargo, los ajustes individuales en este intervalo con una única exponencial son perfectamente aceptables.

λ / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	E_1	E_2	χ^2
370	0.04±0.10	4.29±0.07	0.04	0.002	1.05
380	0.2±0.1	4.30±0.06	0.015	0.003	0.969
390	0.2±0.1	4.40±0.05	0.021	0.005	0.989
400	0.15±0.08	4.33±0.04	0.035	0.006	1.09
410	0.1±0.5	4.30 (f)	0.050	0.006	1.19
420	0.1±0.2	4.30 (f)	0.069	0.008	1.05
430	0.20 (f)	4.35±0.02	0.016	0.011	1.16
440	-	4.32±0.02	-	0.018	1.12
450	-	4.33±0.01	-	0.028	1.06
460	-	4.35±0.01	-	0.044	1.14
470	-	4.328±0.008	-	0.059	0.999
480	-	4.312±0.007	-	0.067	1.15
490	-	4.310±0.007	-	0.066	1.03
500	-	4.317±0.007	-	0.060	1.19
510	-	4.308±0.008	-	0.053	1.04
520	-	4.322±0.008	-	0.044	1.16
530	-	4.33±0.01	-	0.034	1.11
540	-	4.33±0.01	-	0.026	0.923
550	-	4.36±0.01	-	0.018	1.01
560	-	4.32±0.02	-	0.013	1.19
570	-	4.36±0.02	-	0.009	1.18

Tabla 7.2: Tiempos de vida de 7-HC ($4.27 \cdot 10^{-6}$ M) en disolución acuosa a pH 0.50 y la longitud de onda de emisión λ . La longitud de onda de excitación fue 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un tiempo de adquisición fijo.

Finalmente, se midieron decaimientos de fluorescencia a distintas longitudes de onda de emisión (400, 450 y 520 nm) de disoluciones acuosas de 7-HC con diferentes valores de pH. Los resultados de los ajustes individuales de estos decaimientos a una suma de dos exponenciales se muestran en la tabla 7.3. A cualquiera de las longitudes de onda se observa un tiempo de vida (τ_2) que disminuye de 5.3 a 4.3 ns al disminuir el pH. La otra exponencial es debida a un tiempo de vida muy corto constante en las medidas a 400 nm y a un tiempo de formación que disminuye al aumentar la acidez a la longitud de onda de emisión de 450 nm. Para los decaimientos a 520 nm no es necesaria una segunda exponencial para obtener un buen ajuste.

pH	λ / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
4.50*	400	0.13±0.01	5.35±0.01	0.135	0.005	1.00
3.90	400	0.15±0.01	5.28±0.02	0.520	0.023	1.08
3.65	400	0.04±0.01	5.34±0.01	1.241	0.027	1.10
2.44	400	0.8±0.1	5.04±0.01	-0.020	0.076	1.06
1.34	400	0.16±0.02	4.50±0.01	0.40	0.037	1.15
0.50	400	0.8±0.6	4.29±0.01	-0.004	0.074	1.07
4.50*	450	1.20±0.07	5.37±0.01	-0.003	0.010	1.07
3.90	450	1.08±0.06	5.31±0.01	-0.029	0.081	1.03
2.44	450	1.0±0.1	5.04±0.01	-0.015	0.076	0.948
1.34	450	0.3(f)	4.498±0.008	0.039	0.068	1.10
0.50	450	-	4.33±0.01	-	0.028	1.06
3.90	520	-	5.191±0.008	-	0.068	1.43
		1.1 (f)	5.28±0.01	0.010	0.065	1.04
2.44	520	-	4.996±0.007	-	0.071	1.21
1.34	520	-	4.519±0.007	-	0.071	1.17
0.50	520	-	4.323±0.007	-	0.072	1.02

Tabla 7.3: Tiempos de vida de la 7-HC ($4.27 \cdot 10^{-6}$ M, y $1.20 \cdot 10^{-5}$ M para los datos señalados con un asterisco) en disolución acuosa a distintos valores de pH a la longitud de onda de emisión λ . Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un valor fijo de cuentas en el máximo.

7.1.2 Discusión

La existencia de dos bandas en los espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC a diferentes valores de pH y la existencia de un punto isobéptico sugieren que en el estado fundamental hay dos especies que absorben ligadas por un equilibrio ácido-base.

El análisis de PCA de los espectros de absorción de la 7-HC en agua a distintos valores de pH (espectros de la figura 7.1) se muestra en la figura 7.10. Este análisis indica la existencia de dos componentes estructurales en la mayoría de sus criterios: autovectores frente al pH, autovalores, error medio y Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de pH. Los autovectores frente a la longitud de onda y el Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda indican más componentes por los artefactos inherentes a la técnica de absorción [Al-Soufi 01].

p190

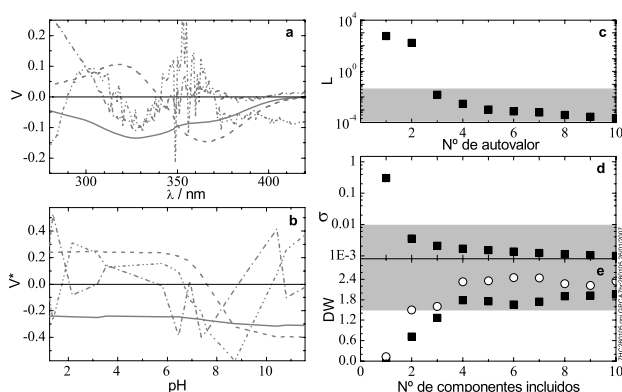


Figura 7.10: Resultados de PCA de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en disolución acuosa a distintos valores de pH. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al pH (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (-·-) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de pH (círculos).

Dado que la 7-HC sólo posee un hidrógeno ácido, parece lógico pensar que las dos especies que existen en el estado fundamental a estos valores de pH son la forma neutra (N, cuya banda de absorción tiene el máximo a 324 nm) y el anión, que aparece debido a la pérdida del protón a pH más básicos (A, responsable de la absorción a 365 nm), encontrándose ambas especies en equilibrio, tal como se indica en la siguiente ecuación:



donde la constante de acidez K_a viene dada por la expresión siguiente:

$$K_a = \frac{[A][H^+]}{[N]} \quad (7.2)$$

Dado que la concentración total de 7-HC $[C]_0$ se mantiene constante en todas las medidas, se puede plantear el siguiente balance de materia:

$$[C]_0 = [N] + [A] \quad (7.3)$$

Resolviendo el sistema formado por las ecuaciones (7.2) y (7.3) se obtienen las concentraciones de la forma neutra y del anión en función de la concentración de protones:

$$[N] = \frac{[C]_0[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (7.4)$$

$$[A] = \frac{[C]_0 K_a}{K_a + [H^+]} \quad (7.5)$$

La absorbancia a una longitud de onda λ , $\mathcal{A}(\lambda)$ vendrá dada por la suma de las absorbancias de las dos especies que absorben, especie neutra y anión, cuyas concentraciones se han obtenido anteriormente:

$$\mathcal{A}(\lambda) = \varepsilon_N(\lambda)l[N] + \varepsilon_A(\lambda)l[A] \quad (7.6)$$

Sustituyendo las expresiones (7.4) y (7.5) en la ecuación (7.6) se obtiene la expresión que relaciona la absorbancia medida a una cierta longitud de onda con la concentración de protones:

$$\mathcal{A}(\lambda) = \frac{A_N(\lambda)[H^+] + A_A(\lambda)K_a}{K_a + [H^+]} \quad (7.7)$$

siendo $A_N(\lambda)$ la absorbancia cuando toda la 7-HC está como especie neutra, $A_N(\lambda) = \varepsilon_N(\lambda)l[C]_0$, y $A_A(\lambda)$ el valor de la absorbancia cuando toda la 7-HC está como anión, $A_A(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda)l[C]_0$. Se hizo un ajuste global de la ecuación (7.7) a los espectros de absorción completos de la figura 7.1, obteniéndose un valor para el pK_a de 7.81 ± 0.02 . Los espectros puros resultantes del ajuste global, es decir, los espectros de la especie neutra y del anión, son los que se muestran en la figura 7.11. Las representaciones de los residuos muestran que el modelo propuesto se ajusta bien a los datos experimentales (ver el archivo C7_Ajuste1_7HCagua_pKaabsorcion.pdf en el CD adjunto). El valor de pK_a obtenido experimentalmente coincide con el presentado en la bibliografía, donde aparecen valores a $20^\circ C$ de 7.75 [Moriya 83] y 8.0 ± 0.1 [Grzywacz 77].

El hecho de que las variaciones espectrales registradas se expliquen satisfactoriamente con un único equilibrio ácido-base indica que no existen otros procesos de protonación en el

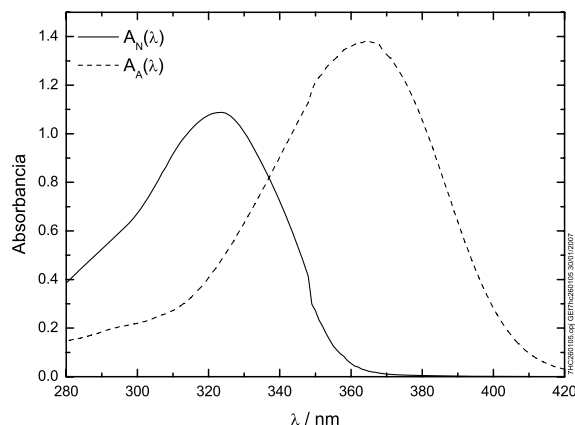


Figura 7.11: Espectros de absorción puros de la especie neutra N y del anión A resultantes del ajuste global de los espectros de absorción de la 7-HC en agua a distintos valores de pH.

estado fundamental, como sería la formación del catión por protonación del grupo carbonilo, al menos en el intervalo de pH estudiado (entre 1 y 12).

Los espectros de excitación de disoluciones acuosas de 7-HC a distintos valores de pH (4.83, 1.01 y 0.08) obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión no presentan diferencias significativas (figuras 7.2, 7.3 y 7.4). En la figura 7.12 se comparan los espectros de excitación (a 450 nm) de disoluciones acuosas de 7-HC, obtenidos a los pH indicados, con el espectro de absorción de la especie neutra. Los espectros de excitación coinciden bien entre sí y también coinciden con el espectro de absorción, salvo en el intervalo de 330 a 360 nm, donde el espectro de absorción tiene menor intensidad. Esto podría deberse a algún defecto instrumental en la corrección de los espectros de excitación. La coincidencia de estos espectros indica que sólo hay especie neutra en el estado fundamental en el intervalo de pH de 4.84 a 0.08. Por tanto, no se observa la formación de catión en el estado fundamental ni siquiera en condiciones de pH tan bajo como 0.08. Esto concuerda con lo observado por Moriya, que sólo consiguió detectar fluorescencia debida al catión a concentraciones de protones superiores a 1 M.

p190
p191
p191

En los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en disolución acuosa a distintos valores de pH de la figura 7.5 excitando a 390 nm, donde sólo absorbe el anión, se observa una banda de fluorescencia que es imagen especular de la banda de absorción del anión, y que por tanto debe ser atribuida a dicha especie química. A medida que aumenta la acidez, disminuye la intensidad de la banda, pero ésta no cambia de forma, tal como se observa en la gráfica insertada de la figura 7.5 con los espectros normalizados. El PCA de esta serie de espectros indica un único componente según todos los criterios excepto el Durbin Watson, que presenta valores algo menores de los esperados (figura 7.13). Por tanto, la

p192

p192

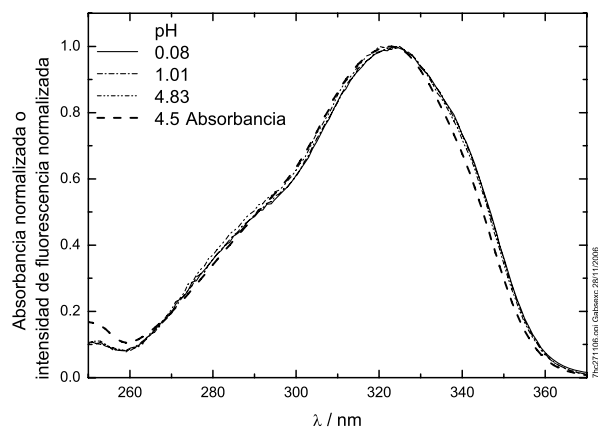


Figura 7.12: Espectros de excitación normalizados en el máximo de la 7-HC en disolución acuosa a distintos valores de pH, medidos a 450 nm de longitud de onda de emisión, comparados con el espectro de absorción de la especie neutra.

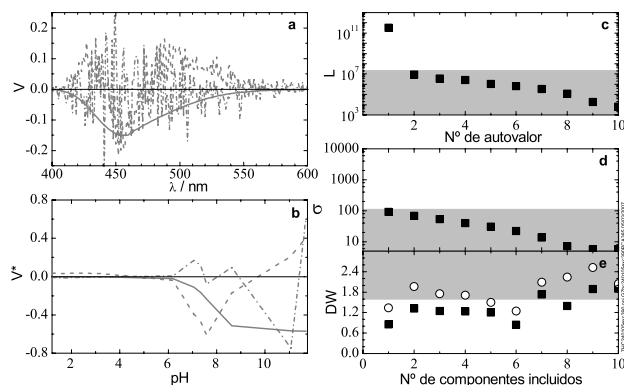


Figura 7.13: Resultados de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en disolución acuosa a distintos valores de pH excitando a 390 nm. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al pH (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (-.-); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de pH (círculos).

fluorescencia observada excitando a 390 nm es debida a única especie química que es el anión. Conforme disminuye el pH se reduce la intensidad de fluorescencia debido a que es menor la concentración de anión en el estado fundamental al formarse 7-HC neutra, hasta desaparecer la banda a valores de pH suficientemente bajos. Según esta interpretación, el esquema propuesto es el indicado en la figura 7.14.

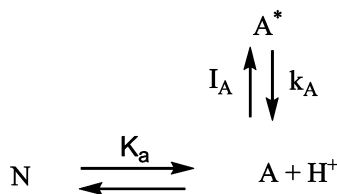


Figura 7.14: Mecanismo propuesto para la explicar la fluorescencia de la 7-HC en agua excitando el anión de la 7-HC, A .

Aplicando la condición de estado estacionario al anión excitado se obtiene la concentración de estado estacionario del anión excitado:

$$[A^*]_{SS} = \frac{I_A}{k_A} = \frac{I_0 \varepsilon_A l [A]}{k_A} \quad (7.8)$$

En esta ecuación la concentración de anión en el estado fundamental viene dada por la ecuación (7.5), por lo que se obtiene:

$$[A^*]_{SS} = \frac{I_0 \varepsilon_A l [C]_0 K_a}{k_A (K_a + [H^+])} \quad (7.9)$$

Sustituyendo en la expresión $F(\lambda) = \sigma_A(\lambda) k_{rA} [A^*]_{SS}$ la ecuación (7.9) se obtiene la siguiente expresión para la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de protones:

$$F(\lambda) = \frac{\alpha(\lambda)}{K_a + [H^+]} \quad (7.10)$$

La constante $\alpha(\lambda)$ viene dada por:

$$\alpha(\lambda) = \frac{\sigma_A(\lambda) k_{rA} I_0 \varepsilon_A l [C]_0 K_a}{k_A} \quad (7.11)$$

El ajuste global de la ecuación (7.10) a la serie de espectros de emisión completos de la figura 7.5 conduce al espectro de la forma aniónica de la 7-HC en disolución acuosa y a un valor de pK_a de 7.72 ± 0.01 (ver resultados en el archivo C7_Ajuste2_7HCagua_emision_exc390nm.pdf el CD adjunto). Este valor coincide bien con el obtenido a partir de los espectros de absorción anteriormente presentado, 7.81 ± 0.02 . (Debe tenerse en cuenta que los errores de ambos valores son errores del ajuste y no incluyen posibles errores de calibración del medidor de pH.) El hecho de que estos valores coincidan indica que no se producen procesos de protonación del anión excitado en el intervalo de pH analizado.

Por otra parte, si se comparan los espectros de emisión de la 7-HC a pH neutro (pH 6.49) obtenidos a distintas longitudes de onda de excitación (figura 7.6) se observa que son coinci-

p192 dentes y que presentan sólo una banda de emisión. Esta banda corresponde a la emisión del anión por ser idéntica a la banda obtenida a valores de pH básicos con excitación del anión (figura 7.5). Por tanto, a pesar de que la forma aniónica no es la mayoritaria en el estado fundamental a este pH (la 7-HC está en forma neutra fundamentalmente dado el valor del pK_a de la 7-HC en agua), ésta es la única que emite fluorescencia. Ello indica que se produce una rápida fotodisociación de la especie neutra en el estado excitado para dar anión excitado, debido al cambio de las propiedades ácido-base de la molécula en el estado excitado. En concreto, el grupo hidroxilo adquiere características más ácidas [Ireland 76, Ríos Rodríguez 90] y por tanto tiene lugar la desprotonación de la especie neutra excitada para dar lugar a la forma aniónica excitada. A valores de pH ácidos (pH 0.97) los espectros de emisión normalizados registrados a distintas longitudes de onda de excitación también coinciden (figura 7.7). p193 Sin embargo, a este pH se observa que la banda de emisión es más ancha, posiblemente debido a la presencia de una nueva especie excitada que emite fluorescencia alrededor de 480 nm, y que aparece una nueva banda de fluorescencia en torno a 390 nm. La banda a 390 nm debe ser originada por la emisión de la especie neutra excitada, puesto que aparece a valores de pH ácidos y es aproximadamente imagen especular del espectro de absorción de la especie neutra. El hecho de que los espectros de emisión registrados a diferentes longitudes de onda de excitación coincidan, incluso excitando a 338 nm (donde se observaba una pequeña diferencia entre los espectros de excitación y de absorción), confirma que sólo hay especie neutra en el estado fundamental. Se concluye, por tanto, que la pequeña diferencia observada entre los espectros de excitación y el de absorción en la figura 7.12 debe ser causada por un defecto en la corrección de los espectros de excitación.

p193 Los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en disolución acuosa a distintos valores de pH excitando a 320 nm (figura 7.8) indican que hay tres especies en el estado excitado emitiendo de forma simultánea. La banda con máximo a 456 nm, que fue asignada al anión, disminuye su intensidad al aumentar la acidez debido a que la concentración de esta especie es cada vez menor, posiblemente debido a la protonación de dicha especie al aumentar la concentración de protones. Debe recordarse que en el intervalo de valores de pH estudiado (entre 0.24 y 4.84) no existe anión en el estado fundamental, pero éste se forma en el estado excitado por disociación de la especie neutra. Al aumentar la acidez aparece una banda de poca intensidad en torno a 390 nm que fue asignada anteriormente a la especie neutra excitada N^* , y otra banda cuyo máximo de emisión se sitúa en torno a 480 nm. Esta última banda corresponde a la emisión de una especie cuya formación en el estado excitado se ve favorecida por la presencia de protones en el medio. En el estado excitado el oxígeno del grupo carbonilo aumenta su basicidad [Ireland 76, Ríos Rodríguez 90]. Esto hace que sea posible la formación de un tautómero T^* , tal y como se propone en la mayor parte de la bibliografía. Esta especie podría originarse a partir del anión excitado, mediante la protonación de éste en el oxígeno del carbonilo, o bien a partir de la especie neutra a través de un proceso de tautomerización.

En la figura 7.15 se muestra el resultado de PCA de los espectros de emisión de las disoluciones acuosas de 7-HC a pH de 0.42 a 4.84 excitando a 320 nm (figura 7.8). Todos los criterios del análisis de PCA indican la presencia de dos componentes estructurales. Si incluimos en el análisis de PCA el espectro de pH 0.24 se obtiene un pequeño tercer componente tanto en autovectores frente a longitud de onda como en los residuos espectrales. Esto nos indica que, aunque sean tres las especies fluorescentes, las variaciones espectrales observadas se pueden explicar como combinación lineal de dos componentes estructurales, por lo que dos de las especies fluorescentes deben presentar idénticas dependencias de su concentración con el pH. Sobre la base de este resultado se propondrá un mecanismo que permita explicar el comportamiento fotofísico observado para la 7-HC en estas condiciones experimentales.

p193

En disoluciones acuosas de 7-HC a pH 4, empleando 320 nm como longitud de onda de excitación, se excita la especie neutra (figura 7.1). Sin embargo, a este pH se observa fundamentalmente la fluorescencia de A^* (figura 7.8). Se propone, por tanto, la disociación de N^* para dar A^* , bien directamente o mediante desprotonación del tautómero excitado T^* que se forma previamente por un proceso de fototautomerización de N^* . Dado que el PCA de los espectros de estado estacionario indica dos componentes (figura 7.15), debe haber sólo un proceso dependiente de protones en el mecanismo. Como la especie excitada mayoritaria en estas condiciones es el anión A^* , parece lógico pensar que la protonación que se produce es la de esta especie. Hay dos posibilidades de protonación de A^* : en el oxígeno hidroxílico para

p190

p193

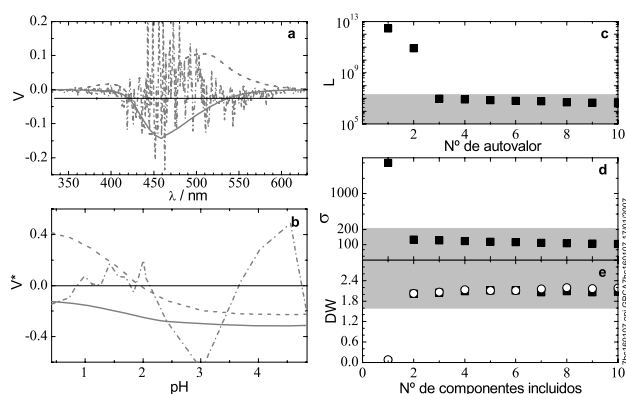


Figura 7.15: Resultados del PCA de datos obtenidos para una serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC a distintos valores de pH: 0.42 a 4.84. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (**a**) y frente al valor de pH (**b**): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (- · -); **c**: diagrama logarítmico de autovalores; **d**: diagrama del error medio; **e**: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de pH (círculos).

dar N^* , o en el oxígeno carbonílico para dar T^* . De haber los dos procesos de protonación el análisis de PCA indicaría tres componentes y no dos. Dado que la banda de T^* aumenta mucho al aumentar la concentración de protones (más que la de N^*), parece lógico pensar que la protonación que se produce es la que origina T^* . Por tanto, el mecanismo que se propone es el indicado en la figura siguiente:

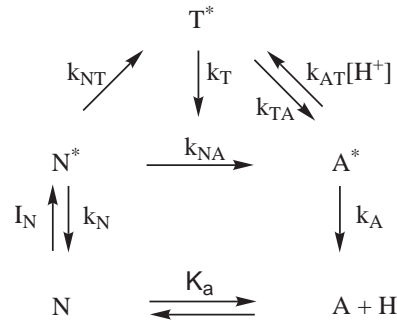


Figura 7.16: Mecanismo propuesto para la aparición y desaparición de las distintas especies derivadas de la 7-HC en el estado excitado en medio ácido cuando se excita únicamente la especie neutra.

Según este modelo las concentraciones de las especies existentes en el estado excitado, obtenidas aplicando la condición de estado estacionario a cada una de las especies excitadas, son:

$$[N^*]_{SS} = \frac{I_N}{k_N + k_{NA} + k_{NT}} \quad (7.12)$$

$$[A^*]_{SS} = \frac{I_N k_{NA} (k_T + k_{TA}) + I_N k_{TA} k_{NT}}{(k_N + k_{NT} + k_{NA}) (k_{AT} [H^+] + k_A - \frac{k_{AT} k_{TA}}{k_T + k_{TA}} [H^+]) (k_T + k_{TA})} \quad (7.13)$$

$$[T^*]_{SS} = \frac{I_N k_A k_{NT} + (I_N k_{NT} k_{AT} + I_N k_{AT} k_{NA}) [H^+]}{(k_N + k_{NT} + k_{NA}) (k_{AT} [H^+] + k_A - \frac{k_{AT} k_{TA}}{k_T + k_{TA}} [H^+]) (k_T + k_{TA})} \quad (7.14)$$

En estas ecuaciones $I_N = I_i \varepsilon_N l [N]$, siendo la concentración de N en el estado fundamental constante e igual a $[C]_0$, ya que en este intervalo de pH toda la 7-HC se encuentra como especie neutra. Las constantes de velocidad han sido definidas en el mecanismo (figura 7.16).

Teniendo en cuenta que la fluorescencia registrada a una longitud de onda λ , $F(\lambda)$, vendrá dada por la suma de las intensidades de fluorescencia de cada una de las especies excitadas:

$$F(\lambda) = \sigma_N(\lambda) k_{rN} [N^*]_{SS} + \sigma_A(\lambda) k_{rA} [A^*]_{SS} + \sigma_T(\lambda) k_{rT} [T^*]_{SS} \quad (7.15)$$

y sustituyendo las ecuaciones (7.12), (7.13) y (7.14) en la ecuación anterior, se obtiene una expresión con la misma forma que la de un equilibrio ácido-base para la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de protones:

$$F(\lambda) = \frac{A(\lambda)K + B(\lambda)[H^+]}{K + [H^+]} \quad (7.16)$$

siendo:

$$A(\lambda) = \frac{[\sigma_N(\lambda)k_{rN}(k_T+k_{TA})k_A + \sigma_A(\lambda)k_{rA}(k_{NA}(k_T+k_{TA})+k_{TA}k_{NT}) + \sigma_T(\lambda)k_{rT}k_{NT}k_A]I_i\varepsilon_N l[C]_0}{(k_N+k_{NT}+k_{NA})k_A(k_T+k_{TA})} \quad (7.17)$$

$$B(\lambda) = \frac{[\sigma_N(\lambda)k_{rN}k_Tk_{AT} + \sigma_T(\lambda)k_{rT}(k_{NT}k_{AT} + k_{AT}k_{NA})]I_i\varepsilon_N l[C]_0}{k_{AT}k_T(k_N + k_{NT} + k_{NA})} \quad (7.18)$$

$$K = \frac{k_A(k_T + k_{TA})}{k_{AT}k_T} \quad (7.19)$$

Este modelo está en concordancia con el hecho de que el PCA de los espectros de disoluciones acuosas de 7-HC en el intervalo de pH de 0.42 a 4.84 indique dos componentes. Un componente espectral viene dado por $A(\lambda)$ e incluye la emisión de la especie neutra, del anión y del tautómero en ausencia de protones (o concentraciones muy bajas). El segundo, dado por $B(\lambda)$, corresponde a la emisión de la especie neutra y del tautómero que se forman en presencia de protones. Por tanto, se realizó un análisis global de la serie de espectros de emisión de la 7-HC con excitación a 320 nm (figura 7.8) utilizando la ecuación (7.16) como función de ajuste. El ajuste es muy satisfactorio, como muestran los residuos obtenidos (ver el archivo C7_Ajuste3_7HCagua_emision_exc320nm.pdf en el CD adjunto). En la figura 7.17 se muestran los espectros puros resultantes. El espectro del primer componente coincide con el obtenido experimentalmente a pH 4.84 y corresponde básicamente al espectro del anión, ya que en ausencia de protones apenas existe emisión de las especies neutra y tautomérica, por ser la disociación muy efectiva. El espectro del segundo componente, $B(\lambda)$, es suma de las bandas de emisión de la especie neutra y del tautómero, cuyas concentraciones siguen la misma dependencia con el pH, por lo que no es posible separar los espectros puros de las dos especies. El valor de la razón de constantes K es de 0.0215 ± 0.0009 M. Este valor se analizará más adelante sobre la base de los resultados de tiempos de vida.

p193

Finalmente, quedan por analizar los espectros de emisión obtenidos excitando en el punto isobéptico para un intervalo de pH entre 3.60 y 10.39. Al excitar aproximadamente en el isobéptico disoluciones acuosas de 7-HC a distintos valores de pH se observa, en la figura 7.9, que mayoritariamente emite el anión, ya que todos los espectros presentan un máximo a 456 nm. En medios ácidos disminuye la proporción de anión excitado y se forma una pequeña cantidad de especie neutra, ya que a valores de pH ácidos aumenta la banda a 390 nm de forma sistemática, y podría haber una pequeña contribución del tautómero, ya que la intensidad relativa de fluorescencia a 500 nm aumenta de forma sistemática al disminuir el pH. Sin embargo, y como es lógico, las variaciones observadas en la intensidad de fluorescencia

p194

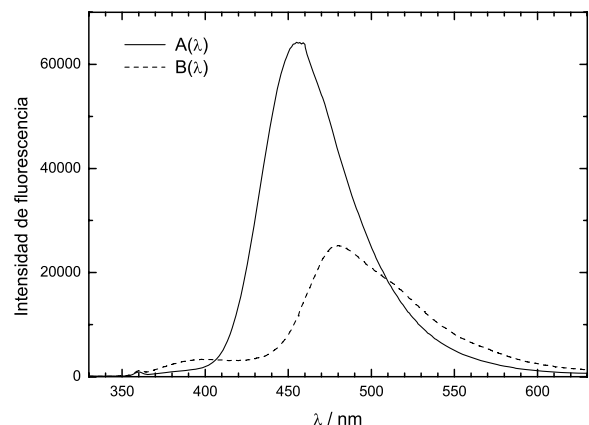


Figura 7.17: Espectros puros corregidos obtenidos del análisis global de los datos obtenidos para la serie de espectros de emisión de fluorescencia con excitación a 320 nm de disoluciones acuosas de 7-HC a distintos valores de pH: en el intervalo de 0.42 a 4.84.

al excitar cerca del isobéstico son mucho menores que las observadas al excitar a 320 nm, donde hay mucha diferencia de absorbancia entre las especies neutra y aniónica.

En este punto abordaremos la interpretación de los resultados de las medidas de tiempos de vida de fluorescencia. Las ecuaciones diferenciales que se deducen del mecanismo mostrado en la figura 7.16 para la dependencia temporal de las concentraciones de las especies excitadas son:

$$\frac{d[N^*]}{dt} = -(k_N + k_{NT} + k_{NA})[N^*] \quad (7.20)$$

$$\frac{d[T^*]}{dt} = k_{NT}[N^*] + k_{AT}[H^+][A^*] - (k_T + k_{TA})[T^*] \quad (7.21)$$

$$\frac{d[A^*]}{dt} = k_{NA}[N^*] + k_{TA}[T^*] - (k_{AT}[H^+] + k_A)[A^*] \quad (7.22)$$

Teniendo en cuenta que la única especie presente en el estado fundamental es la especie neutra, las condiciones iniciales necesarias para la resolución de las ecuaciones diferenciales son:

$$[N^*]_0 = [N^*]_0 \quad (7.23)$$

$$[A^*]_0 = 0 \quad (7.24)$$

$$[T^*]_0 = 0 \quad (7.25)$$

La resolución de estas tres ecuaciones diferenciales conduce a las siguientes expresiones para cada una de las especies excitadas:

$$[N^*] = [N^*]_0 e^{-\gamma t} \quad (7.26)$$

$$[A^*] = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{-\gamma t} \quad (7.27)$$

$$[T^*] = De^{-\alpha t} + Ee^{-\beta t} + Fe^{-\gamma t} \quad (7.28)$$

en las que exponenciales vienen dadas por las siguientes relaciones de constantes de velocidad:

$$\alpha = \frac{1}{2}(k_{TA} + k_T + k_{AT}[H^+] + k_A - R) \quad (7.29)$$

$$\beta = \frac{1}{2}(k_{TA} + k_T + k_{AT}[H^+] + k_A + R) \quad (7.30)$$

$$\gamma = (k_N + k_{NA} + k_{NT}) \quad (7.31)$$

$$R = (k_{TA}^2 + 2k_{TA}k_T + 2k_{TA}k_{AT}[H^+] - 2k_Ak_{TA} + k_T^2 -$$

$$-2k_{AT}k_T[H^+] - 2k_Ak_T + k_{AT}^2[H^+]^2 + 2k_{AT}k_A[H^+] + k_A^2)^{1/2} \quad (7.32)$$

Las ecuaciones (7.27) y (7.28) muestran que el anión y el tautómero tienen la misma dependencia temporal, con tres tiempos de vida comunes uno de los cuales coincide con el tiempo de vida de la especie neutra, ecuación (7.26). Por tanto, los decaimientos medidos a cualquier longitud de onda deben ser triexponenciales, incluso en la zona de emisión de la especie neutra donde se observa también una pequeña emisión del anión (ver figura 7.17). A concentraciones de protones bajas, $[H^+] < 10^{-4}$ M, la ecuación (7.32) se simplifica al ser despreciables los términos que incluyen la concentración de protones, quedando la siguiente relación sencilla:

$$R = k_{TA} - k_A + k_T \quad (7.33)$$

Por tanto, las ecuaciones (7.29) y (7.30) a concentraciones de protones bajas se reducen a las siguientes expresiones:

$$\alpha = k_A \quad (7.34)$$

$$\beta = k_{TA} + k_T \quad (7.35)$$

Según esto, a concentraciones de protones bajas, el parámetro α es el inverso del tiempo de vida del anión que, teniendo en cuenta el espectro de fluorescencia de esta especie, debería presentar mayor contribución a 450 ó 460 nm. Por ello es lógico pensar, a la vista de los datos a pH 4.50 de la tabla 7.1 (de concentración de protones muy baja), que el anión tiene el tiempo de vida (τ_2) de 5.4 ns. El tiempo de vida más corto, en torno a 0.2 ns, aparece en la zona donde emite la 7-HC neutra (380 y 390 nm), por lo que debe ser el tiempo de vida de la especie neutra, $\gamma^{-1} = (k_N + k_{NT} + k_{NA})^{-1}$, según la ecuación (7.26). El tiempo de formación de 1.16 ± 0.03 ns (media ponderada por el error de los tiempos de vida obtenidos de los ajustes individuales) que aparece de 420 a 480 nm, según la solución de las ecuaciones diferenciales planteadas para el modelo propuesto, debe corresponder al tiempo de vida del tautómero en ausencia de protones, $\beta^{-1} = (k_{TA} + k_T)^{-1}$. Según este modelo, también debería aparecer en la zona donde emite el anión otro tiempo de formación debido

a la especie neutra. Sin embargo, esta exponencial no es necesaria para obtener un buen ajuste individual de los decaimientos, debido a que se trata de un tiempo de vida muy corto y con muy poca contribución para ser resuelto con el equipo de medida utilizado. Es posible que el valor del tiempo de formación ajustado en este intervalo esté influenciado por dicho tiempo.

La serie de decaimientos de fluorescencia en función de la longitud de onda o serie de espectros resueltos en el tiempo de la 7-HC a pH 4.50 fue analizada mediante PCA a partir de 410 nm. Los resultados de este análisis (figura 7.18) indican dos componentes según todos los criterios. Dado que no se distingue el tiempo de formación de la especie neutra, los componentes detectados deben ser el tiempo de vida del anión y el tiempo de formación de éste a partir del tautómero. El ajuste global de un modelo biexponencial a estos decaimientos es satisfactorio (ver el archivo C7_Ajuste4_7HCagua_TRES_pH4.pdf en CD adjunto) y conduce a dos tiempos: un tiempo de vida de 5.362 ± 0.002 ns, que corresponde a k_A^{-1} , y un tiempo de formación de 0.92 ± 0.01 ns, que corresponde a $(k_{TA} + k_T)^{-1}$. El tiempo de vida de la especie neutra no aparece ya que no analizamos el intervalo donde debería emitir la especie neutra, por ser medido con muy poca intensidad, y en la zona donde emite el anión no es necesario en el ajuste como tiempo de formación, por ser muy corto. Los espectros puros correspondientes a estos dos tiempos obtenidos en el análisis global se muestran en la figura 7.19. El espectro negativo indica que éste es un tiempo de formación, mientras que el espectro correspondiente al tiempo de vida más largo es propiamente un decaimiento.

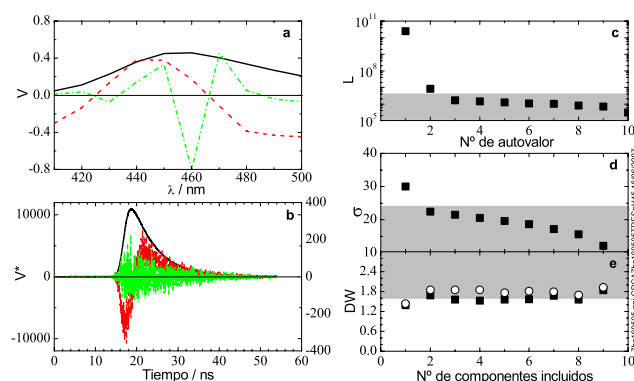


Figura 7.18: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros resueltos en el tiempo de una disolución acuosa de 7-HC de pH 4.50 en el intervalo de longitudes de onda de 410 a 500 nm. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al tiempo (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (---) (el primero con la escala en el eje de ordenadas de la izquierda y los otros dos en el de la derecha); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes tiempos (círculos).

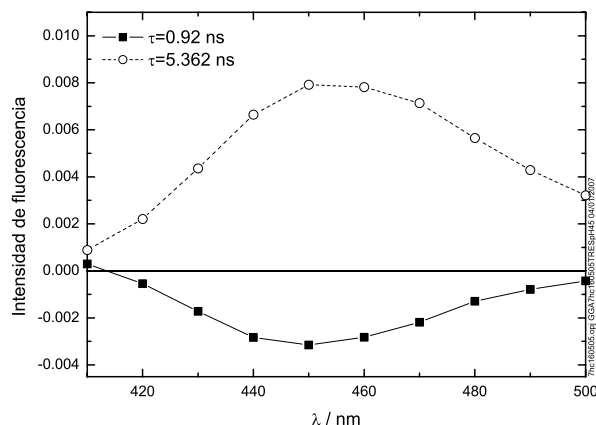


Figura 7.19: Espectros puros obtenidos a partir del análisis global con dos exponenciales de la serie de espectros resueltos en el tiempo de una disolución acuosa de 7-HC de pH 4.50 en el intervalo de 410 a 500 nm.

Los ajustes individuales de los decaimientos a distintas longitudes de onda de emisión de disoluciones acuosas de 7-HC a pH 0.50, cuyos resultados se muestran en la tabla 7.2, indican la presencia de dos tiempos de vida a longitudes de onda bajas y un único tiempo de vida a longitudes de onda altas: un tiempo de aproximadamente 0.1 ns de 370 a 430 nm, que se asigna al tiempo de vida de la especie neutra, dado que aparece donde emite esta especie, y otro tiempo de vida de unos 4.3 ns, que es el único tiempo observado a longitudes de onda mayores de 440 nm. En este caso no podemos despreciar la concentración de protones en la determinación de los parámetros α ó β de las ecuaciones (7.29) y (7.30). Dado que en estas condiciones de acidez no se observa anión sino especie neutra y tautómero, en los espectros en estado estacionario (figura 7.17), es lógico pensar que el tiempo de vida observado de 4.3 ns sea el del tautómero. Matemáticamente, si se consideran en la ecuación (7.30) los valores de k_A y k_{TA} despreciables frente al valor de $k_{AT}[H^+]$, se obtiene $\beta = k_T$, por lo que el tiempo de vida observado en condiciones de elevada acidez es el del tautómero. Teóricamente serían necesarias otras dos exponenciales correspondientes a los tiempos de formación que son los valores inversos de $\alpha = k_{AT}[H^+]$ y $\gamma = k_N + k_{NA} + k_{NT}$. Sin embargo, éstas no son necesarias en los ajustes por el valor elevado de estas constantes, que conduce a dos tiempos de formación muy pequeños, no detectables con nuestro sistema de medida.

El análisis de PCA de esta serie de espectros resueltos en el tiempo a pH 0.50, mostrado en la figura 7.20, indica dos componentes correspondientes a la especie neutra y al tautómero. El ajuste global con dos exponenciales de dicha serie (ver el fichero C7_Ajuste5_7HCagua_TRES_pH0.pdf en el CD adjunto) conduce a dos espectros puros (figura 7.21): un espectro positivo en todo el intervalo de longitudes de onda y con máximo en torno a 490 nm, que corresponde al tautómero y otro espectro correspondiente a la es-

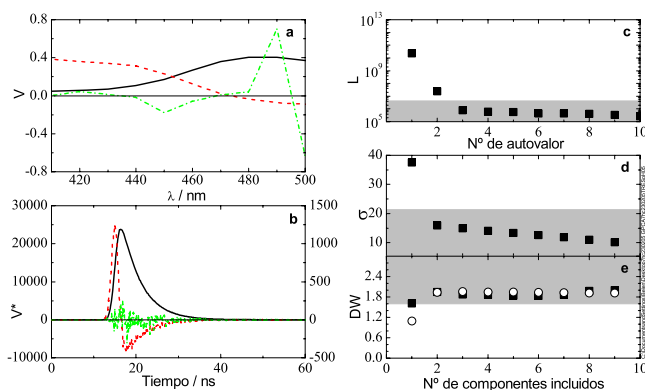


Figura 7.20: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros resueltos en el tiempo de una disolución acuosa de 7-HC de pH 0.50. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al tiempo (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (- · - ·); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes tiempos (círculos).

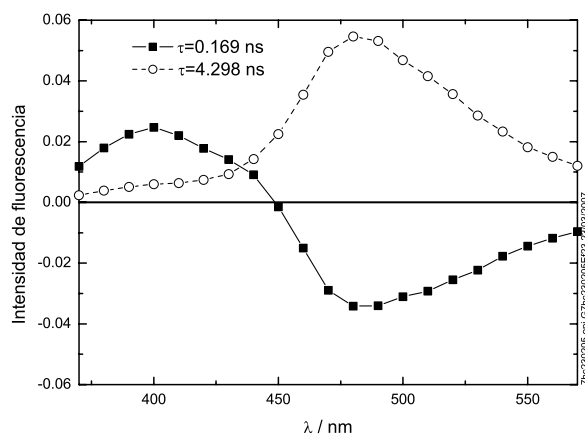


Figura 7.21: Espectros puros corregidos obtenidos a partir del análisis global con dos exponenciales de la serie de espectros resueltos en el tiempo de la 7-HC en agua a pH 0.50.

pecie neutra que es positivo en la zona donde emite dicha especie y negativo donde emite el tautómero. Los dos tiempos de vida así obtenidos son 4.298 ± 0.001 ns para el tautómero y 0.169 ± 0.004 ns para la especie neutra. Sin embargo, el segundo espectro así obtenido no es totalmente correcto, ya que el tiempo de vida de la especie neutra debe ser algo distinto al tiempo de formación del tautómero. Habría que ajustar los datos con tres exponenciales: el tiempo de vida de la especie neutra de aproximadamente 0.1 ns, el tiempo de formación

del tautómero y el tiempo de vida del tautómero de 4.3 ns. Sin embargo, el ajuste con tres exponenciales (incluso fijando los tiempos de vida del tautómero o del tautómero y de la especie neutra) conduce a tres espectros puros, siendo los dos primeros casi iguales a los obtenidos con dos exponenciales mientras que el tercero es prácticamente nulo, aunque tiene una ligera contribución negativa en la zona de la banda del tautómero. Esto es debido a la imposibilidad de separar dos tiempos de vida tan parecidos y tan cortos medidos con este equipo.

Por tanto, se ha visto que el mecanismo propuesto permite interpretar y ajustar los espectros resueltos en el tiempo en las condiciones de acidez extremas (bajas concentraciones de protones a pH 4.50 y altas concentraciones de protones a pH 0.50). Se analizarán ahora los resultados de tiempos de vida obtenidos a diferentes valores de pH a ciertas longitudes de onda (tabla 7.3). Los decaimientos medidos a distintos valores de pH a 400 nm (tabla 7.3) se pueden explicar sobre la base del modelo propuesto como suma de un decaimiento con el tiempo de vida de la 7-HC neutra, τ_1 , y otro decaimiento con un tiempo de vida que disminuye con el pH, variando desde el tiempo de vida del anión a pH 4.50 (5.4 ns) hasta el tiempo de vida del tautómero a pH 0.50 (4.3 ns). Este segundo tiempo tiene muy baja contribución ya que la emisión de estas especies a 400 nm es muy baja. A 450 nm se observa un tiempo de formación, cuyo valor disminuye al disminuir el pH, llegando incluso a no detectarse por su pequeño valor en condiciones de pH muy ácido. Se observa también a 450 nm el mismo tiempo de vida variable con el pH que a 400 nm con valores coincidentes para la misma concentración de protones (ver puntos en la figura 7.22). A 520 nm también se observa básicamente el mismo tiempo de vida τ_2 variable con el pH. Teniendo en cuenta los resultados anteriormente discutidos, este tiempo de vida τ_2 , que varía entre los tiempos de vida del anión y del tautómero, debe seguir la dependencia con el pH dada por el inverso del parámetro α de la ecuación (7.29).

El valor de $(k_{TA} + k_T)^{-1}$ (obtenido de la media ponderada por el error del tiempo de formación del TRES a pH 4.50 de la tabla 7.1 de 420 a 480 nm, 1.16 ± 0.03 ns) y el valor de k_T indicado en la tabla 7.4 (obtenido a partir del tiempo de vida del tautómero en condiciones de elevada acidez, concretamente del TRES a pH 0.50, $k_T^{-1} = 4.298 \pm 0.001$ ns), permiten obtener el valor de la constante de velocidad k_{TA} de $(0.63 \pm 0.02) \cdot 10^9$ s⁻¹. Este valor es del orden del obtenido para la 7-hidroxi-4-metilcumarina en disoluciones acuosas, de $0.25 \cdot 10^9$ s⁻¹ [Seixas de Melo 93]. El ajuste de los tiempos de vida τ_2 medidos a 400, 450 y 520 nm en función del pH con el modelo dado por el inverso del parámetro α , dado por la ecuación (7.29), fijando los valores de las constantes de velocidad k_A (inverso del tiempo de vida del anión, obtenido del TRES a pH 4.50 $k_A^{-1} = 5.362 \pm 0.002$ ns), k_T y k_{TA} de la tabla 7.4 se muestra en la figura 7.22. Se obtiene de este ajuste para la constante de velocidad k_{AT} un valor de $(57 \pm 4) \cdot 10^9$ M⁻¹ s⁻¹. Este valor es un poco alto, si bien es del orden de magnitud del obtenido para la 7-hidroxi-4-metilcumarina en disoluciones acuosas, de $27 \cdot 10^9$ M⁻¹ s⁻¹ [Seixas de Melo 93]. Conviene recordar que este valor está determinado con poca precisión ya que se utilizaron pocos datos experimentales (figura 7.22).

p197

p197

p208

p195

p208

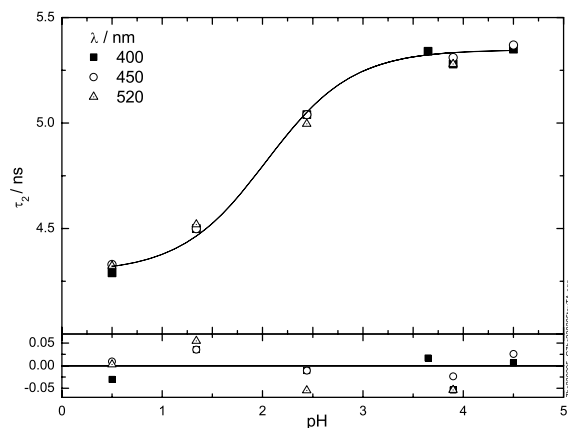


Figura 7.22: Ajuste de la ecuación 7.29 a los tiempos de vida τ_2 de la 7-HC en agua a los distintos valores de pH y distintas longitudes de onda de emisión.

$k_A / 10^9 \text{ s}^{-1}$	0.1865 ± 0.0001	0.1885 (*)
$k_T / 10^9 \text{ s}^{-1}$	0.2327 ± 0.0001	0.2305 (*)
$k_{TA} / 10^9 \text{ s}^{-1}$	0.63 ± 0.02	0.6011 (*)
$k_{AT} / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	57 ± 4	30.7 (*)
$K = \left(\frac{k_A(k_T + k_{TA})}{k_{AT}k_T} \right) / \text{M}$	0.0121 ± 0.0009	0.0225 (*)
$k_{NT} \approx k_{NA} / 10^9 \text{ s}^{-1}$		8 ± 1 (*)
$\frac{k_{NT}}{[\text{H}_2\text{O}]} / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$		0.15 ± 0.02 (*)

Tabla 7.4: Valores de las constantes cinéticas de la 7-HC en disolución acuosa. Los valores marcados con asterisco son resultado de medidas adicionales realizadas en el laboratorio del Prof. M. Mosquera.

Con los valores de k_A , k_{TA} , k_T y k_{AT} , obtenidos a partir de los datos de tiempos de vida e indicados en la tabla 7.4, el valor de la constante obtenida a partir de los espectros de estado estacionario $K = \left(\frac{k_A(k_T + k_{TA})}{k_{AT}k_T} \right)$ de la ecuación (7.19) sería de $0.0121 \pm 0.0009 \text{ M}$. Este valor no coincide bien con el obtenido en el ajuste de los espectros de estado estacionario, donde el valor de K era $0.0215 \pm 0.0009 \text{ M}$, si bien es del mismo orden de magnitud.

La simulación con las constantes de velocidad anteriormente calculadas del tiempo de vida correspondiente al inverso de β , ecuación (7.30), conduce a un tiempo de formación de 1.16 ns a pH 4.50 (figura 7.23) que disminuye al disminuir el pH hasta 0.05 ns a pH 0.5. Se observa que los tiempos de formación experimentales τ_1 coinciden bien con los valores simulados con estos parámetros (tabla 7.3 y figura 7.23), si bien cuando este tiempo presenta un valor muy bajo, es decir, a pH ácidos, no es necesaria esta exponencial para obtener un buen ajuste de los decaimientos de fluorescencia.

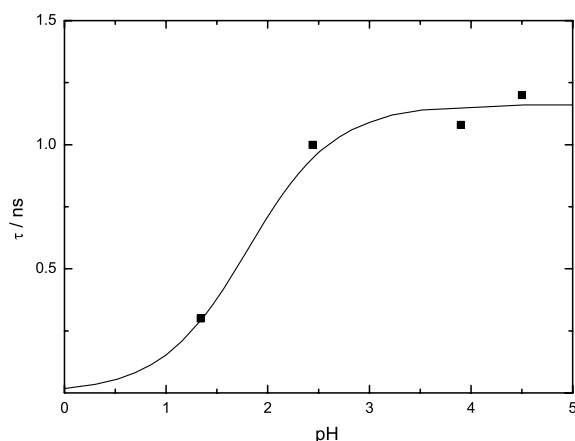


Figura 7.23: Valores experimentales del tiempo de formación ($1/\beta$) de la 7-HC en función del pH (τ_1 a 450 nm en tabla 7.3) y curvas simuladas para dicho tiempo utilizando la ecuación 7.30 y los valores de las constantes de velocidad indicados en el texto.

Medidas realizadas por el Prof. M. Mosquera en un equipo *LifeSpec-ps* conducen a un valor medio para el tiempo de vida de la especie neutra de 0.06 ± 0.01 ns, que está claramente fuera de la resolución de nuestro equipo, y un valor de k_{AT} más preciso, al estar basado en mayor número de datos experimentales, de $30.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que es más parecido al de la 7-hidroxi-4-metilcumarina [Seixas de Melo 93]. Con este valor de $k_{AT} = 30.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y los valores de k_A , k_{TA} y k_T determinados anteriormente e indicados en la tabla 7.4, se obtiene un valor de la razón de constantes obtenida a partir de los espectros de estado estacionario, $K = \frac{k_A(k_T + k_{TA})}{k_{AT}k_T}$ de la ecuación (7.19), de 0.0225 M. Este valor coincide bien con el obtenido en el ajuste de los espectros de estado estacionario, donde obteníamos un valor de 0.0215 ± 0.0009 M.

p206

El inverso del tiempo de vida de la especie neutra es el indicado en la ecuación (7.31) y el tiempo de vida de la especie neutra medido por el Prof. M. Mosquera es 0.06 ± 0.01 ns. Si se hace la suposición de que los procesos de disociación y de tautomerización son mucho más rápidos que la desactivación de N^* , $k_N \ll (k_{NT} + k_{NA})$, y de que ambos procesos son igual de rápidos, $k_{NT} \approx k_{NA}$, se puede estimar el valor de la constante cinética k_{NT} y el valor de la constante cinética intrínseca $k_{NT}/[H_2O]$. Los resultados se muestran en la tabla 7.4, donde se puede ver que los valores obtenidos para estas constantes son razonables y coinciden en orden de magnitud con los publicados para la 7-hidroxi-4-metilcumarina [Seixas de Melo 93].

p208

7.2 Comportamiento fotofísico de la 7-Hidroxycumarina en etanol

7.2.1 Resultados

En primer lugar se procedió a estudiar el efecto de la acidez sobre el espectro de absorción de la 7-HC en disolución ácida de etanol, adicionando diferentes cantidades de HClO_4 disuelto en etanol. Dado que la adición de ácido perclórico lleva implícita la adición de agua (el HClO_4 comercial es del 70 %), se examinó el efecto del agua sobre el espectro de absorción de la 7-HC disuelta en etanol. Para ello se midieron los espectros de absorción de la 7-HC en etanol a distintas concentraciones de agua, de $2.05 \cdot 10^{-4}$ a 2.21 M, los cuales se muestran en la figura 7.24. Para el intervalo de concentraciones de agua estudiado no se observa variación alguna en el espectro de absorción de la 7-HC en etanol con la concentración de agua.

A continuación se midieron los espectros de absorción de la 7-HC en etanol adicionando diferentes concentraciones de HClO_4 con concentración de agua constante de 2.22 M (figura 7.25). La concentración de HClO_4 se varió entre $1.4 \cdot 10^{-4}$ M y 0.38 M, que en la escala de pH corresponde al intervalo entre pH 3.86 y pH 0.42. (En adelante se utilizará la escala de pH, aunque debe tenerse en cuenta que los valores dados se refieren a concentraciones de protones y no a actividades.) No se observa variación en el espectro de absorción de la 7-HC en etanol con la concentración de protones en dicho intervalo de pH.

También se analizó la dependencia con la longitud de onda de la fluorescencia de la 7-HC en etanol. Los espectros de excitación de la 7-HC en etanol a pH 0.24 registrados a distintas

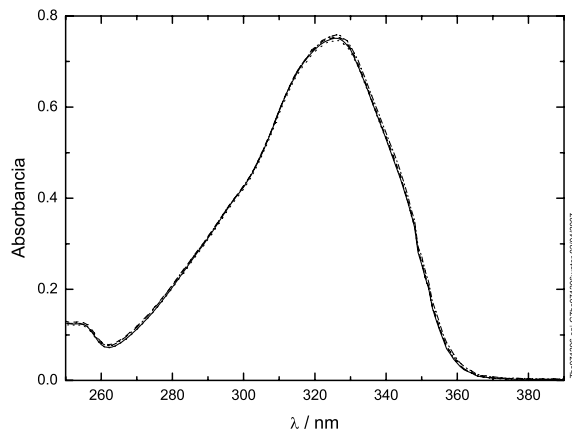


Figura 7.24: Espectros de absorción de la 7-HC ($5.05 \cdot 10^{-5}$ M) en etanol a pH 4.05 a distintas concentraciones de agua de $2.05 \cdot 10^{-4}$ a 2.21 M.

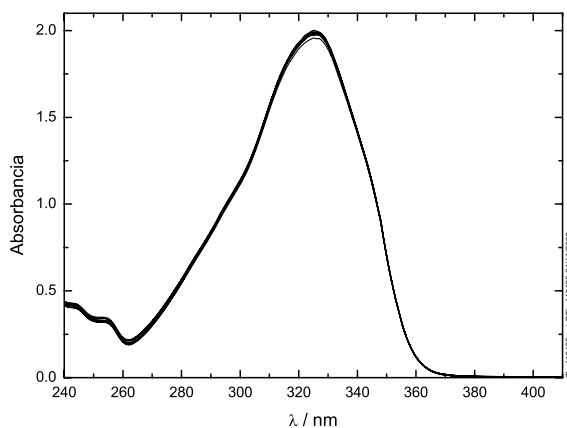


Figura 7.25: Espectros de absorción de la 7-HC ($1.30 \cdot 10^{-4}$ M) en etanol con 2.22 M de agua a diferentes valores de pH: de 0.42 a 3.86.

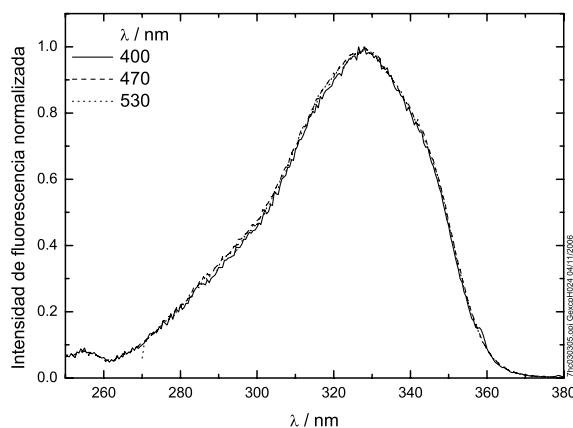


Figura 7.26: Espectros de excitación normalizados en el máximo registrados a diferentes longitudes de onda de emisión de la 7-HC en etanol ($4.43 \cdot 10^{-6}$ M) a pH 0.24 con la cantidad de agua contenida en el ácido perclórico empleado (1.39 M).

longitudes de onda de emisión coinciden una vez normalizados en el máximo, tal como se observa en la figura 7.26. Tampoco se observa variación significativa en los espectros de excitación normalizados en el máximo registrados a distintas longitudes de onda de emisión para disoluciones de 7-HC en etanol de pH 2.16 y 4.03 (véanse figuras 7.27 y 7.28). Además, los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol a pH 4.00 registrados a dos longitudes de onda de excitación distintas coinciden una vez normalizados en el máximo (véase la figura 7.29). Se comprobó que a este pH no hay emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol cuando la longitud de onda de excitación es de 380 nm.

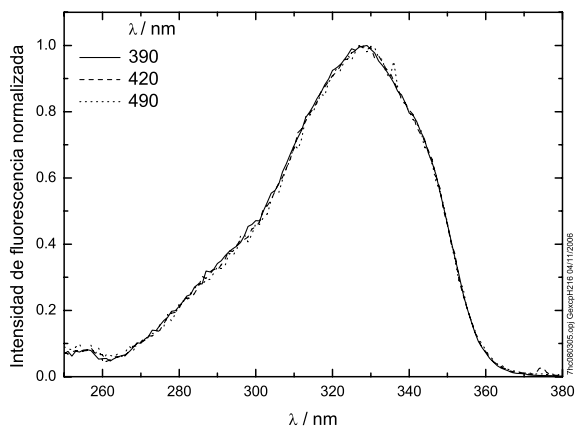


Figura 7.27: Espectros de excitación normalizados en el máximo a diferentes longitudes de onda de emisión de la 7-HC ($3.95 \cdot 10^{-6}$ M) en etanol a pH 2.16 con la cantidad de agua contenida en el ácido perclórico empleado (0.017 M).

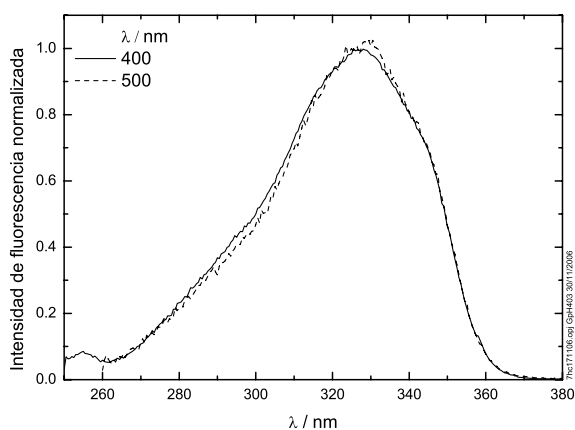


Figura 7.28: Espectros de excitación normalizados en el máximo a diferentes longitudes de onda de emisión de la 7-HC ($4.54 \cdot 10^{-6}$ M) en etanol a pH 4.03 con concentración de agua 0.234 M.

La dependencia de la emisión de la 7-HC en etanol con la acidez se estudió midiendo los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol con distintas concentraciones de ácido perclórico, que también aporta una cierta concentración variable de agua. Los espectros obtenidos en estas condiciones se muestran en la figura 7.30. La cantidad de agua añadida es mayor cuanto mayor es la concentración de ácido, es decir, a valores de pH más bajos. Se observa que a pH natural, es decir, en ausencia de ácido y en consecuencia también de agua, existen dos bandas de emisión, una de gran intensidad con máximo a 390 nm y

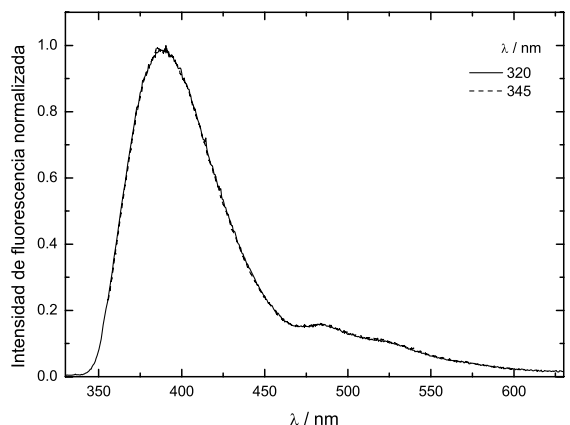


Figura 7.29: Espectros de emisión normalizados en el máximo a diferentes longitudes de onda de excitación de la 7-HC ($4.65 \cdot 10^{-6}$ M) en etanol a pH 4.00 con concentración de agua $2.29 \cdot 10^{-4}$ M.

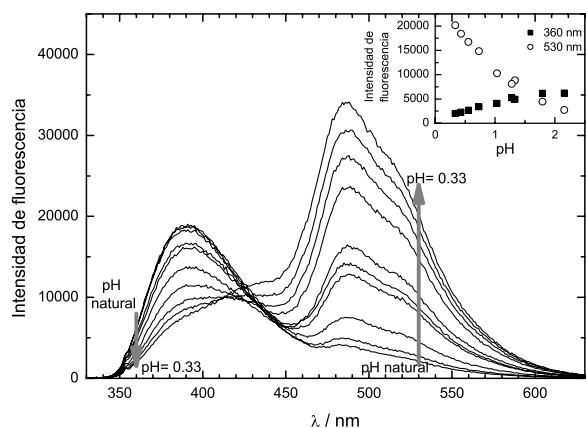


Figura 7.30: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC ($3.95 \cdot 10^{-6}$ M) en etanol a distintos valores de pH (de 0.33 a pH natural) con las distintas concentraciones de agua presentes en el HClO_4 añadido. El espectro de pH menos ácido representado después del de pH natural corresponde a un valor de pH 2.16. Longitud de onda de excitación de 320 nm. La gráfica insertada muestra las variaciones de la intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda de emisión en función del pH.

otra de menor intensidad en torno a 490 nm. A medida que se aumenta la concentración de ácido y, por tanto, también la de agua, la banda de mayor energía disminuye en intensidad mientras que la de menor energía aumenta. Esto se puede ver en las variaciones de intensidad de fluorescencia frente al pH (gráfica insertada en la figura 7.30). Como el efecto observado podría ser debido a la variación en la concentración de protones o en la de agua,

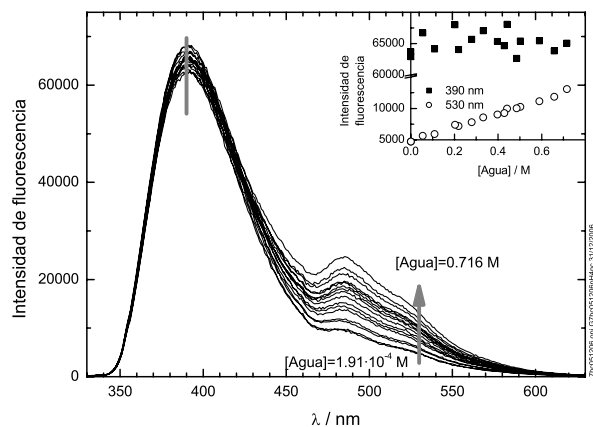


Figura 7.31: Espectros de emisión no corregidos de la 7-HC ($4.94 \cdot 10^{-6}$ M) en etanol a pH 4.1 con concentraciones de agua variables de $1.91 \cdot 10^{-4}$ a 0.716 M. Longitud de onda de excitación: 320 nm. La gráfica insertada representa las variaciones de intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda de emisión en función de la concentración de agua.

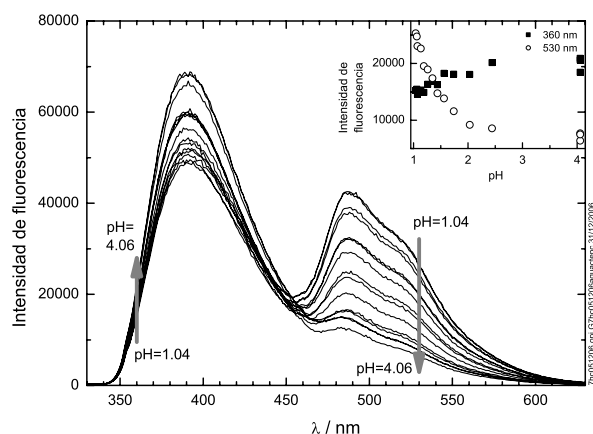


Figura 7.32: Espectros de emisión no corregidos de la 7-HC ($4.94 \cdot 10^{-6}$ M) en etanol a distintos valores de pH (de pH 1.04 a 4.06) con concentración de agua constante de 0.217 M. Longitud de onda de excitación: 320 nm. La gráfica insertada representa las variaciones de la intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda de emisión en función del pH.

se realizaron nuevos experimentos fijando una de ellas y variando la otra. Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol a distintas concentraciones de agua a una concentración de protones baja y constante (pH 4.1), los cuales se muestran en la figura 7.31. Se observan variaciones aleatorias en la banda de mayor energía y que la banda de menor energía aumenta linealmente con la concentración de agua (ver gráfica

insertada en la figura 7.31). Los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol a concentración de agua fija (0.217 M) y distintas concentraciones de protones (de pH 1.04 a 4.06) se representan en la figura 7.32. Se observa que la banda a 390 nm disminuye de intensidad a medida que aumenta la concentración de protones mientras que la intensidad de la banda a 490 nm aumenta significativamente (ver gráfica insertada en la figura 7.32). Se observa también un punto isoemisivo, aunque no claramente definido.

El rendimiento cuántico de la 7-HC en etanol a pH 4.0 y en presencia de una concentración de agua mínima ($2.39 \cdot 10^{-4}$ M) se determinó tomando como referencia el del sulfato de quinina en disoluciones acuosas de ácido sulfúrico 2 M como 0.546 (este valor es el que presenta a 25°C según [Demas 71], si bien las medidas las hemos realizado a 20°C , por lo que podría haber un pequeño error en los valores absolutos de rendimientos cuánticos). El valor así obtenido experimentalmente es 0.24, que es bastante parecido al valor de rendimiento cuántico obtenido para la 7-HC en metanol, 0.23 [Azuma 03].

Finalmente, se midieron los tiempos de vida de la 7-HC en etanol a distintos valores de pH y distintas longitudes de onda de emisión con la concentración de agua presente en el ácido perclórico añadido para conseguir el pH indicado. Los resultados de los análisis individuales de los decaimientos de fluorescencia para cada una de las longitudes de onda se resumen en la tabla 7.5, en la que también se indican los valores de pH y de concentración de agua de las disoluciones utilizadas. Se observa que, a excepción de las medidas realizadas para una disolución de 7-HC en etanol de pH natural (sin ácido ni agua añadidos), todos los decaimientos son biexponenciales con un tiempo de vida corto, cuyo valor disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido y que presenta amplitud negativa a ciertas longitudes de onda, y un tiempo más largo que aumenta ligeramente a altas concentraciones de ácido.

Además, se midieron los espectros resueltos en el tiempo en el intervalo de 360 a 540 nm de una disolución de 7-HC en etanol a pH 2.98 con una concentración de agua de $2.50 \cdot 10^{-3}$ M debida al ácido perclórico añadido. Los resultados de los análisis individuales de los decaimientos de fluorescencia se muestran en la tabla 7.6. Los ajustes son monoexponenciales a las longitudes de onda más bajas, con un tiempo de vida constante de unos 0.8 ns. A longitudes de onda mayores de 410 nm aparece una segunda exponencial con un tiempo más largo, de unos 4.5 ns.

λ / nm	pH	[Agua] / M	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
375	natural*	0	0.800±0.004	-	0.175	-	1.22
375	2.46	0.00834	0.80±0.01	1.9±0.4	0.167	0.002	0.980
375	1.46	0.0834	0.781±0.009	2.4±0.3	0.172	0.002	1.10
375	0.63	0.556	0.484±0.006	3.7±0.1	0.239	0.002	1.34
375	0.33	1.11	0.427±0.006	4.44±0.08	0.268	0.003	1.01
375	-0.07	2.78	0.264±0.007	4.85±0.03	0.37	0.010	1.10
400	2.46	0.00834	0.823±0.005	8±5	0.168	0.000	1.08
400	1.98**	0.0250	0.789±0.005	2.4±0.3	0.043	0.000	1.19
400	1.46	0.0834	0.802±0.008	3.1±0.4	0.166	0.001	1.09
400	1.00**	0.239	0.708±0.003	3.5±0.1	0.045	0.000	1.25
400	0.63	0.556	0.530±0.006	4.41±0.08	0.221	0.002	1.05
400	0.49**	0.770	0.476±0.003	4.43±0.04	0.059	0.001	1.18
400	0.33	1.11	0.447±0.007	4.67±0.05	0.246	0.005	1.03
400	0.24*	1.391	0.383±0.007	4.69±0.03	0.277	0.008	0.977
400	-0.07	2.78	0.28±0.01	4.94±0.02	0.31	0.020	1.03
400	-0.07**	2.78	0.320±0.006	4.93±0.01	0.066	0.005	1.12
440	1.98**	0.0250	0.791±0.005	2.89±0.08	0.041	0.001	1.07
440	1.49**	0.0779	0.796±0.004	4.10±0.08	0.040	0.001	1.03
440	1.00**	0.239	0.727±0.004	4.44±0.05	0.043	0.001	1.04
440	0.49**	0.770	0.524±0.005	4.57±0.01	0.047	0.004	1.05
440	-0.07**	2.78	0.34±0.01	4.953±0.006	0.030	0.013	1.11
480	0.24*	1.391	0.33±0.04	4.719±0.009	-0.08	0.082	1.04
500	natural*	0	-	4.470±0.007	-	0.078	1.05
500	2.46	0.00834	0.8±0.1	4.49±0.01	-0.019	0.083	0.990
500	1.98**	0.0250	0.79±0.04	4.469±0.006	-0.006	0.021	1.04
500	1.49**	0.0779	0.75±0.02	4.480±0.005	-0.012	0.021	1.06
500	1.46	0.0834	0.77±0.03	4.58±0.01	-0.060	0.094	0.941
500	1.00**	0.239	0.63±0.01	4.534±0.005	-0.018	0.022	1.08
500	0.63	0.556	0.56±0.03	4.594±0.009	-0.07	0.089	1.06
500	0.49**	0.770	0.41±0.01	4.544±0.004	-0.019	0.021	1.21
500	0.33	1.11	0.48±0.04	4.791±0.009	-0.07	0.089	1.01
500	0.24*	1.391	0.33±0.05	4.721±0.009	-0.09	0.082	1.24
500	-0.07	2.78	0.5±0.1	4.942±0.009	-0.023	0.077	0.990
500	-0.07**	2.78	0.29±0.03	4.929±0.004	-0.016	0.019	1.02
530	0.24*	1.391	0.44±0.03	4.725±0.009	-0.07	0.081	1.18

Tabla 7.5: Tiempos de vida de la 7-HC en etanol a la longitud de onda de emisión λ y distintos valores de pH y de concentración de agua (añadida con el ácido). Longitud de onda de excitación: 320 nm. Concentración de 7-HC: $4.94 \cdot 10^{-6}$ M, $4.43 \cdot 10^{-6}$ M (*) y $6.79 \cdot 10^{-6}$ M (**). Los decaimientos fueron medidos con un número fijo de cuentas en el máximo.

λ / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	E_1	E_2	χ^2
360	0.871±0.003	-	0.016	-	1.21
370	0.861±0.002	-	0.029	-	1.29
380	0.847±0.002	-	0.039	-	1.40
390	0.849±0.002	-	0.041	-	1.42
400	0.841±0.002	-	0.039	-	1.39
410	0.852±0.002	-	0.034	-	1.30
420	0.813±0.006	2.8±0.2	0.028	0.000	1.10
430	0.827±0.006	3.76±0.02	0.021	0.000	1.07
440	0.844±0.007	3.7±0.1	0.015	0.000	1.04
450	0.855±0.009	3.85±0.09	0.010	0.000	1.02
460	0.86±0.01	4.17±0.06	0.007	0.001	1.00
470	0.86±0.02	4.27±0.04	0.004	0.001	1.13
480	0.78±0.05	4.35±0.03	0.002	0.001	1.03
490	0.6±0.1	4.42±0.02	0.001	0.002	1.09
500	-	4.52±0.02	-	0.001	1.12
510	0.8±0.1	4.50±0.03	-0.001	0.001	0.967
520	0.78±0.09	4.52±0.03	-0.001	0.001	1.12
530	0.75±0.08	4.56±0.03	-0.001	0.001	1.08
540	0.9±0.1	4.52±0.04	-0.001	0.001	1.04

Tabla 7.6: Tiempos de vida de la 7-HC ($6.79 \cdot 10^{-6}$ M) en etanol a pH 2.98 (concentración de agua añadida con el ácido $2.50 \cdot 10^{-3}$ M) en función de la longitud de onda de emisión λ . Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un tiempo de adquisición fijo.

7.2.2 Discusión

Cuando la 7-HC se disuelve en etanol, el valor de su pK_a aumenta respecto al del agua, llegando a un valor de 8.78 para un contenido en etanol del 90 % según la bibliografía [Arora 82]. Es por ello que, al pH natural del etanol, existe una pequeña proporción de 7-HC que se encuentra en forma aniónica y el espectro de absorción medido en esas condiciones presenta una pequeña banda en torno a 380 nm debida al anión. Por tanto, para evitar la presencia de anión, se acidificó ligeramente el medio hasta alcanzar valores de pH del orden de 4.

El espectro de absorción de la 7-HC en etanol (figuras 7.24 y 7.25) es muy similar al observado en agua a valores de pH inferiores a 6 y debe ser atribuido a la absorción de la especie neutra de la 7-HC. El espectro de absorción de la 7-HC en etanol no varía con la concentración de agua, al menos hasta una concentración de agua de 2.21 M a pH 4.05 (figura 7.24). Tampoco varía con el pH a una concentración de agua constante en el intervalo de pH de 0.42 a 3.86 (figura 7.25). Por tanto, se deduce que las concentraciones de protones

p215

p216

p215

p216

y de agua no tienen influencia alguna sobre la especie mayoritaria en el estado fundamental, que es la especie neutra, al menos en los intervalos de acidez y de concentración de agua estudiados.

Los espectros de excitación de disoluciones de 7-HC en etanol medidos a distintas longitudes de onda de emisión y a varios valores de pH (0.24, 2.16 y 4.03) con las concentraciones de agua adicionadas con el ácido no presentan diferencias significativas entre sí (figuras 7.26, 7.27 y 7.28). En la figura 7.33 se compara uno de los espectros de excitación (el registrado en la banda de mayor energía) a cada pH con el espectro de absorción de la especie neutra. Los espectros de excitación coinciden entre ellos aunque están ligeramente desplazados hacia mayores longitudes de onda respecto al espectro de absorción. El hecho de que los espectros de excitación coincidan entre sí indica que la emisión registrada proviene de la misma especie química en el estado fundamental, independientemente de la acidez. Esta especie química debe ser la especie neutra, si bien no existe una buena coincidencia de los espectros de excitación con el espectro de absorción de dicha especie. Esto podría ser debido a un error en la corrección de los espectros de excitación, como ocurría en los espectros de la 7-HC en disolución acuosa (figura 7.12), aunque el efecto es mayor en este caso por lo que parece ser una diferencia real, que podría ser atribuida a diferentes conformaciones de la 7-HC en etanol. La coincidencia de los espectros de emisión registrados a diferentes longitudes de onda de excitación de la figura 7.29 también indica que sólo hay una especie química en el estado fundamental a un valor de pH de 4.00.

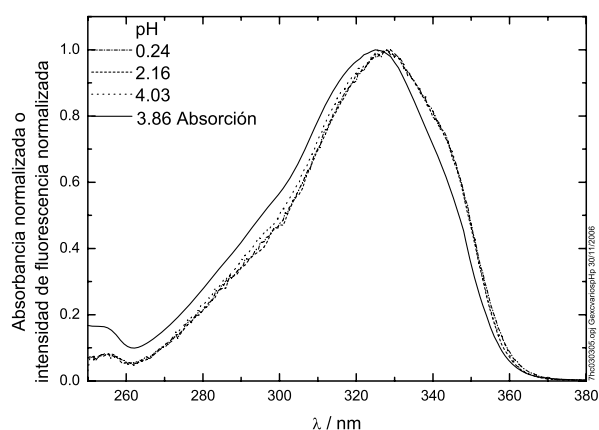


Figura 7.33: Espectros de excitación normalizados en el máximo de la 7-HC en etanol a distintos valores de pH comparados con el espectro de absorción. Los espectros de excitación representados son los registrados a la longitud de onda de emisión de 400 nm, salvo para el de pH 2.16, en el que se empleó 390 nm.

El espectro de emisión de la 7-HC en etanol a pH natural (en ausencia de protones y de agua) presenta dos bandas, una a 390 nm que se atribuye a la especie neutra, por su posición espectral y su similitud con la observada en disolución acuosa en condiciones de elevada acidez, y otra en torno a 490 nm, que se asemeja a la observada para el tautómero en disolución acuosa (ver figura 7.17). Se comprobó también que a cuando el valor del pH es 4.00 no hay anión no existe anión en el estado excitado ya que no hay emisión de fluorescencia en los espectros de emisión cuando la longitud de onda de excitación es de 380 nm.

p207

El hecho de que se forme tautómero en el estado excitado en condiciones de elevada acidez no puede justificarse por la presencia de agua residual en el etanol, por lo que parece ser debido al propio etanol. Este resultado concuerda con los obtenidos para la 4-metil-7-hidroxicumarina en disoluciones de alcoholes sin añadir agua, donde se observaba la banda de T* [Bardez 92]. A medida que se aumenta la concentración de ácido, la banda debida a la especie neutra disminuye en intensidad, mientras que la banda del tautómero aumenta, observándose un punto isoemisivo en torno a 445 nm. Sin embargo, a valores de pH inferiores a 1, los espectros dejan de pasar por el punto isoemisivo debido a la aparición de una nueva banda de emisión de fluorescencia en torno a 450 nm.

Por tanto, en condiciones de acidez baja, la emisión parece ser debida a dos especies químicas, la especie neutra y el tautómero, mientras que a concentraciones de protones elevadas aparece una nueva especie emisiva. Esto se confirma con el análisis de PCA de la serie de espectros de emisión. El PCA de esta serie sin considerar el de pH natural, del que desconocemos la concentración de protones, indica la presencia de tres componentes (figura 7.34). En cambio, si limitamos el intervalo de acidez a valores de pH entre 1.03 y 2.16 (valor de pH más alto del que disponemos) el análisis de PCA indica la presencia de dos componentes (figura 7.35), aunque se detecta una muy pequeña contribución del tercer componente en los autovectores y en el Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda. El hecho de que el análisis de PCA sin los datos de pH más ácido indique dos componentes y que el tercer componente emita sobre 450 nm podría indicar que el tercer componente es debido a la cantidad de agua contenida en el ácido perclórico, y atribuirse al anión formado por la presencia de agua. Por ello, se analizó la influencia del agua en los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol a concentración de protones fija, para ver si se produce formación del anión debido a la presencia de agua. Otra posibilidad es que este tercer componente se deba únicamente a la presencia de mayor concentración de protones, por lo que podría ser catión, cuya banda de emisión podría aparecer en esa zona espectral, por similitud con el catión de la 7-HC en disolución acuosa que emite a 431 nm según la bibliografía [Moriya 83]. Por tanto, se analizó también el efecto de la acidez sobre el espectro de emisión de la 7-HC en etanol a concentración de agua constante.

Los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol a distintas concentraciones de agua (de $1.91 \cdot 10^{-4}$ a 0.716 M) y pH 4.1 (figura 7.31) indican que ya hay tautómero a la concentración más baja de agua, lo que es lógico ya que incluso lo había en el espectro

p219

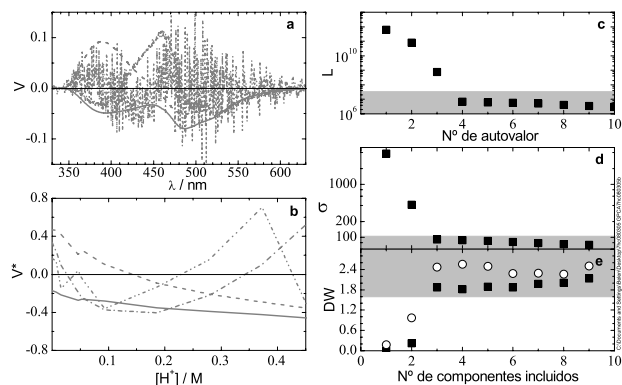


Figura 7.34: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones de 7-HC en etanol a distintos valores de pH (de 0.33 a 2.16) en presencia de diferentes concentraciones de agua añadida con el ácido. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (— · —) y cuarto (— · · —); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de protones (círculos).

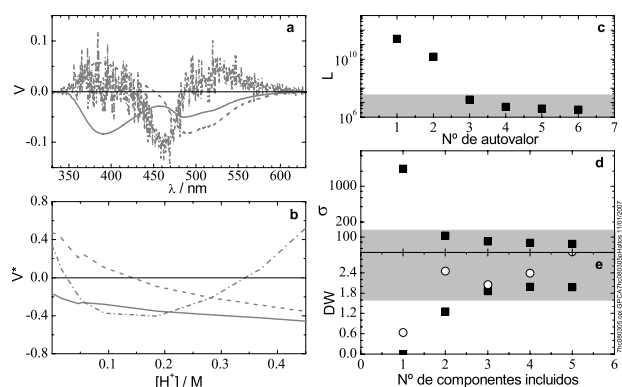


Figura 7.35: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones de 7-HC en etanol a distintos valores de pH (de 1.03 a 2.16) en presencia de diferentes concentraciones de agua, añadida con el ácido. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de protones (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (— · —); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama del Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de protones (círculos).

obtenido sin añadir perclórico (espectro de pH natural en la figura 7.30). Al aumentar la concentración de agua, la banda de emisión del tautómero aumenta en intensidad de forma aproximadamente lineal con la concentración de agua (ver gráfica insertada en la figura 7.31), mientras que la banda de emisión de la especie neutra no presenta variaciones sistemáticas de intensidad. Por tanto, la adición de agua provoca un incremento de la emisión del tautómero, pero no parece llevar a la formación de anión, al menos en el intervalo de concentraciones estudiado. El PCA de estos espectros indica la presencia de dos componentes (figura 7.36), por lo que se confirma que no existe emisión del anión A^* y que la emisión proviene de las especies N^* y T^* . El hecho de que aumente la banda de T^* al aumentar la concentración de agua indica que debe haber un proceso de conversión de N^* en T^* que depende de la concentración de agua ($k_{NT}[\text{H}_2\text{O}]$). Para que sea posible la existencia de T^* en ausencia de agua debe existir un proceso de conversión de N^* en T^* que no dependa de la concentración de agua que correspondería a un proceso de fototautomerización asistido por las moléculas de etanol ($k'_{NT}[\text{EtOH}]$). Por tanto, el modelo que se propone para explicar la dependencia con la concentración de agua del espectro de emisión de la 7-HC en etanol es el indicado en la figura 7.37. En condiciones de pH ligeramente ácido (pH aproximadamente 4) sólo existe especie neutra en el estado fundamental, y las especies fluorescentes son N^* y el tautómero T^* formado mediante fototautomerización asistida por el disolvente y por las moléculas de agua presentes.

p218

p219

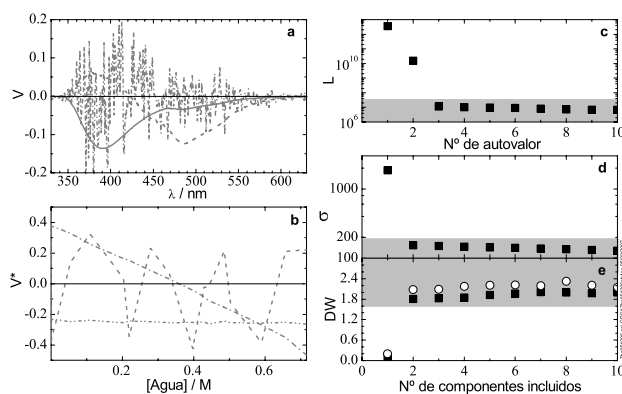


Figura 7.36: Resultados del PCA de una serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones en etanol de 7-HC a pH 4.1 a distintas concentraciones de agua (de $1.91 \cdot 10^{-4}$ a 0.716 M). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al valor de pH (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (-.-); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama del Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de agua (círculos).

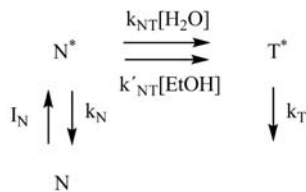


Figura 7.37: Mecanismo propuesto para explicar el comportamiento de la 7-HC en etanol a acideces moderadas (para un pH de aproximadamente 4) con concentración de agua variable.

Planteado el mecanismo, se procede a deducir la relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de agua. La intensidad de fluorescencia medida a cualquier longitud de onda λ , $F(\lambda)$, será la suma de las intensidades de fluorescencia de las especies que emiten fluorescencia según la expresión siguiente:

$$F(\lambda) = \sigma_N(\lambda)k_{rN}[N^*]_{SS} + \sigma_T(\lambda)k_{rT}[T^*]_{SS} \quad (7.36)$$

En esta expresión k_{rX} es la constante de velocidad de desactivación radiante de X; y $\sigma_X(\lambda)$ es una constante que depende de las condiciones experimentales en que se realiza la medida y de la longitud de onda de detección λ para la especie X.

Según el modelo propuesto las concentraciones de estado estacionario de las especies existentes en el estado excitado son:

$$[N^*]_{SS} = \frac{I_N}{k_N + k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH]} \quad (7.37)$$

$$[T^*]_{SS} = \frac{(k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH])[N^*]_{SS}}{k_T} \quad (7.38)$$

Dado que la absorbancia a la longitud de onda de excitación de las disoluciones usadas era suficientemente baja para que la intensidad de radiación absorbida en la unidad de tiempo para cada especie del estado fundamental se pueda considerar directamente proporcional a su absorbancia, se cumple que:

$$I_N = I_i \varepsilon_N l [N] \quad (7.39)$$

En esta expresión I_i es la intensidad de radiación incidente por unidad de tiempo, ε_N es el coeficiente de absorptividad molar de N a la longitud de onda de excitación, l es el espesor de la cubeta y N es la concentración de especie neutra, que es la concentración total de 7-HC $[C]_0$ ya que sólo existe esta especie en el estado fundamental. Sustituyendo esta expresión en las ecuaciones (7.37) y (7.38) y éstas en la ecuación (7.36), se obtiene la siguiente expresión final:

$$F(\lambda) = \frac{\frac{I_i \varepsilon_N [C]_0}{k_{NT}} \left(\sigma_N(\lambda)k_{rN} + \frac{\sigma_T(\lambda)k_{rT}k'_{NT}[EtOH]}{k_T} \right) + \frac{I_i \varepsilon_N [C]_0 \sigma_T(\lambda)k_{rT}}{k_T} [H_2O]}{\frac{k_N + k'_{NT}[EtOH]}{k_{NT}} + [H_2O]} \quad (7.40)$$

Teniendo en cuenta que la concentración de etanol se puede considerar constante al tratarse del disolvente, la ecuación anterior se puede escribir de la forma siguiente:

$$F(\lambda) = \frac{A(\lambda) + B(\lambda)[H_2O]}{K + [H_2O]} \quad (7.41)$$

con las siguientes expresiones para $A(\lambda)$, $B(\lambda)$ y K :

$$A(\lambda) = \frac{I_i \varepsilon_N [C]_0}{k_{NT}} \left(\sigma_N(\lambda) k_{rN} + \frac{\sigma_T(\lambda) k_{rT} k'_{NT} [EtOH]}{k_T} \right) \quad (7.42)$$

$$B(\lambda) = \frac{I_i \varepsilon_N [C]_0 \sigma_T(\lambda) k_{rT} [H_2O]}{k_T} \quad (7.43)$$

$$K = \frac{k_N + k'_{NT} [EtOH]}{k_{NT}} \quad (7.44)$$

La ecuación (7.41) fue utilizada como función de ajuste en el análisis global de la serie de espectros de emisión de la figura 7.31. El ajuste es bueno según indican los residuos (ver el archivo C7_Ajuste6_7HCetanol_emision_pHcte_concagua.pdf en el CD adjunto). No obstante, se obtiene un valor para la constante K con enorme error ($K = 9 \pm 40$ M). Esto es debido a la gran correlación existente entre los parámetros $B(\lambda)$ y K , ya que en el intervalo de concentraciones de agua estudiado la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de agua es prácticamente lineal (ver gráfica insertada en la figura 7.31). Los espectros puros obtenidos con el modelo indicado en la ecuación (7.41) son los mostrados en la figura 7.38. El espectro del primer componente coincide con el espectro obtenido experimentalmente a la menor concentración de agua y está compuesto por la banda de emisión de

p219

p219

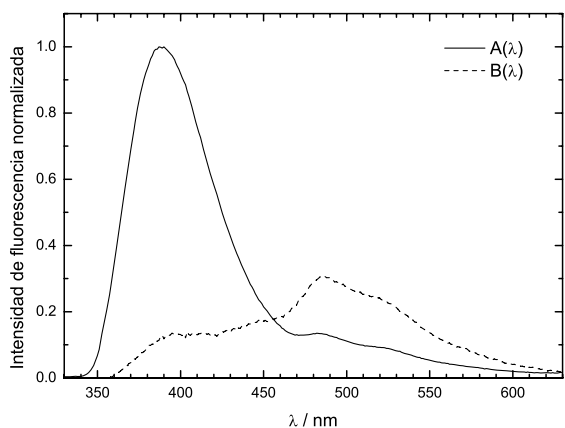


Figura 7.38: Espectros puros obtenidos mediante análisis global de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de la 7-HC en etanol a pH 4.1 y a distintas concentraciones de agua (hasta 0.716 M).

la especie neutra y la banda de emisión del tautómero que se forma fundamentalmente por tautomerización asistida por el etanol. El espectro del segundo componente corresponde al espectro del tautómero formado mediante el proceso de fototautomerización asistida por el agua. Este espectro tiene una gran incertidumbre debido a la correlación entre parámetros anteriormente mencionada. La pequeña contribución negativa a 358 nm se atribuye a una distorsión debida a la banda Raman del agua.

Por tanto, estos resultados indican que la presencia de agua favorece la fototautomerización pero no da lugar a formación de anión excitado en el intervalo analizado, hasta una concentración de agua máxima de 0.7 M (concentración que se alcanzaría al adicionar una cantidad de ácido perclórico correspondiente a pH 0.23). No obstante, conviene indicar que la adición de cantidades mayores de agua conducen a la formación del anión (datos no mostrados).

p219

A continuación se analiza el efecto de la acidez sobre el espectro de emisión de la 7-HC en etanol manteniendo la concentración de agua baja y constante (espectros de la figura 7.32). El PCA de estos datos indica la presencia de dos componentes, aunque se observa un pequeño tercer componente residual según algunos de los criterios (figura 7.39). Los resultados son, por tanto, análogos a los obtenidos en el análisis de PCA mostrado en la figura 7.35, correspondiente a los espectros de emisión de pH mayor que 1 y concentración de agua variable.

p225

Dado que la concentración de agua se mantuvo constante, para que haya dos componentes en el análisis de la serie de espectros obtenidos a diferentes concentraciones de protones tiene que existir, además de los procesos de conversión de N* a T* planteados en el modelo de la figura 7.37, un proceso dependiente de protones.

Parece lógico pensar que este proceso sea la protonación de N* o de T*. Según el ciclo de Förster se puede calcular el pK_a^* para la disociación de C* para dar N* y para dar T* y ver cuál de los dos procesos de protonación está más favorecido termodinámicamente. Usando los datos de [Moriya 83] para la 7-HC en agua (el pK_a del equilibrio catión-especie neutra del estado fundamental es igual a -2) y estimando el número de ondas al que aparece la transición $0 \rightarrow 0$ a partir de la longitud de onda de los máximos de emisión de fluorescencia ($\lambda_{C,max} = 431$ nm, $\lambda_{X,max} = 397$ nm para X = N* y 478 nm para X = T*) se obtiene el valor de pK_a^* del estado excitado a partir de la ecuación (7.45), válida para una temperatura de 298 K y para la longitud de onda de los máximos de absorción en nm.

$$pK_a^* = pK_a + 0.00209 \cdot 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{X,max}} - \frac{1}{\lambda_{C,max}} \right) \quad (7.45)$$

El valor de pK_a^* calculado según la ecuación (7.45) para la formación de N* a partir de C* es 2 y para la formación de T* a partir de C* es -7, lo que indica que la protonación de N* está más favorecida que la de T* en agua. En etanol, dado que la longitud de onda a la que aparece el máximo de emisión de fluorescencia del tautómero (489 nm) es mayor que la de la especie neutra (388 nm), se obtiene un pK_a^* menor para la formación de T* a partir de

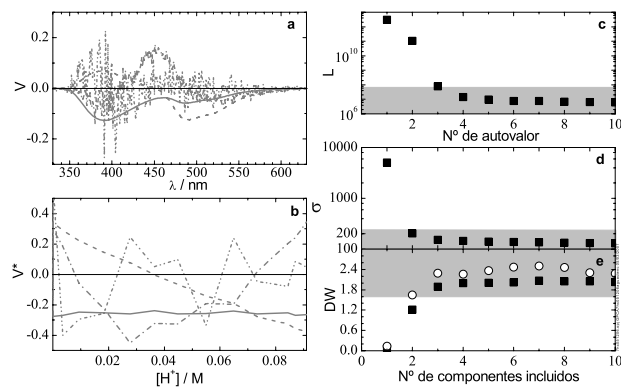


Figura 7.39: Resultados del PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones en etanol de 7-HC a distintos valores de pH (de 1.04 a 4.06) y concentración de agua constante de 0.217 M. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al valor de pH (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de pH (círculos).

C^* que para la formación de N^* a partir de C^* , lo que indica que, al igual que en agua, la protonación de T^* está menos favorecida que la de N^* en etanol.

Por tanto, se propone un mecanismo en el que N^* se protona para dar C^* , que posteriormente pierde un protón para dar T^* (figura 7.40). Este proceso explica la disminución de la emisión de N^* y el aumento de la emisión de T^* a medida que aumenta la concentración de protones.

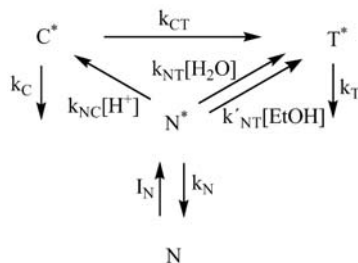


Figura 7.40: Esquema propuesto para explicar el comportamiento de la 7-HC en etanol a distintos valores de acidez (pH de 1.04 a 4.06) con concentración de agua constante de 0.217 M. Según este mecanismo se produce la fototautomerización directa de la 7-HC, así como la formación de tautómero a través del catión.

Se procede entonces a deducir la función de ajuste basada en el mecanismo propuesto. La intensidad de fluorescencia medida a cualquier longitud de onda λ , $F(\lambda)$, será la suma de las intensidades de fluorescencia de las especies excitadas presentes:

$$F(\lambda) = \sigma_N(\lambda)k_{rN}[N^*]_{SS} + \sigma_C(\lambda)k_{rC}[C^*]_{SS} + \sigma_T(\lambda)k_{rT}[T^*]_{SS} \quad (7.46)$$

Según el modelo las concentraciones de estado estacionario de las especies existentes en el estado excitado serían:

$$[N^*]_{SS} = \frac{I_N}{k_N + k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH] + k_{NC}[H^+]} \quad (7.47)$$

$$[C^*]_{SS} = \frac{k_{NC}[H^+][N^*]_{SS}}{k_C + k_{CT}} \quad (7.48)$$

$$[T^*]_{SS} = \frac{k_{CT}[C^*]_{SS} + (k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH])[N^*]_{SS}}{k_T} \quad (7.49)$$

Dado que la absorbancia a la longitud de onda de excitación de las disoluciones usadas era suficientemente baja para que la intensidad de radiación absorbida en la unidad de tiempo para cada especie del estado fundamental se pueda considerar directamente proporcional a su absorbancia, se cumple:

$$I_N = I_i \varepsilon_N l [N] \quad (7.50)$$

En esta ecuación I_i es la intensidad de radiación incidente por unidad de tiempo, ε_N es el coeficiente de absortividad molar de N a la longitud de onda de excitación, l es el espesor de la cubeta y $[N]$ es la concentración de especie neutra en el estado fundamental, que coincide con la concentración total de 7-HC, $[C]_0$. Sustituyendo esta ecuación en las ecuaciones (7.47), (7.48) y (7.49) y posteriormente en la ecuación (7.46), se obtiene la siguiente expresión:

$$F(\lambda) = \frac{\frac{I_i \varepsilon_N [C]_0}{k_{NC}} \left[\sigma_N(\lambda)k_{rN} + \frac{\sigma_T(\lambda)k_{rT}(k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH])}{k_T} \right] + \frac{I_i \varepsilon_N [C]_0 \sigma_T(\lambda)k_{rT}}{k_T} [H^+]}{\frac{k_N + k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH]}{k_{NC}} + [H^+]} \quad (7.51)$$

Agrupando términos en la expresión anterior y definiendo la constante K como:

$$K = \frac{k_N + k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH]}{k_{NC}} \quad (7.52)$$

se llega a la ecuación típica de un equilibrio ácido-base, que explica los dos componentes detectados en el análisis de PCA:

$$F(\lambda) = \frac{A(\lambda)K + B(\lambda)[H^+]}{K + [H^+]} \quad (7.53)$$

siendo:

$$A(\lambda) = \frac{I_i \varepsilon_N [C]_0 \left[\sigma_N(\lambda)k_{rN} + \frac{\sigma_T(\lambda)k_{rT}(k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH])}{k_T} \right]}{k_N + k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH]} \quad (7.54)$$

$$B(\lambda) = \frac{I_i \varepsilon_N [C]_0 \sigma_T(\lambda) k_{rT}}{k_T} \quad (7.55)$$

En este modelo, el primer componente espectral, dado por los valores de $A(\lambda)$ a las diferentes longitudes de onda, corresponde a la emisión de N^* y de T^* observada en ausencia de protones para la concentración de agua presente. El segundo componente, dado por los valores de $B(\lambda)$, es la suma de los espectros de emisión del catión C^* y del tautómero T^* formados a partir de N^* en presencia de protones. La ecuación (7.53) fue utilizada como función de ajuste en el análisis global de los espectros de emisión de la figura 7.32. Los espectros puros obtenidos para los dos componentes anteriormente descritos son los mostrados en la figura 7.41. Se observa de nuevo una pequeña parte negativa del espectro correspondiente al segundo componente en la zona de la banda Raman. El espectro del primer componente coincide con el espectro de emisión observado experimentalmente a la concentración de agua de 0.217 M en ausencia de protones y es una combinación del espectro de la especie neutra con una pequeña contribución del tautómero. El espectro del segundo componente corresponde básicamente al tautómero, aunque la pequeña banda existente en torno a 430 nm podría ser debida al catión, ya que aparece en la zona espectral donde se esperaría la emisión de esta especie según la bibliografía [Moriya 83]. El modelo permite un buen ajuste de los datos experimentales (ver *C7_Ajuste7_7HCetanol_emision_aguacte_pH.pdf* en CD adjunto) con un valor de la razón de constantes K de 0.3 ± 0.4 M. El elevado error de esta constante es debido a la gran correlación existente entre parámetros, concretamente entre K y $B(\lambda)$, lo cual conduce a una alta imprecisión en el valor de K y en el espectro del segundo componente.

p219

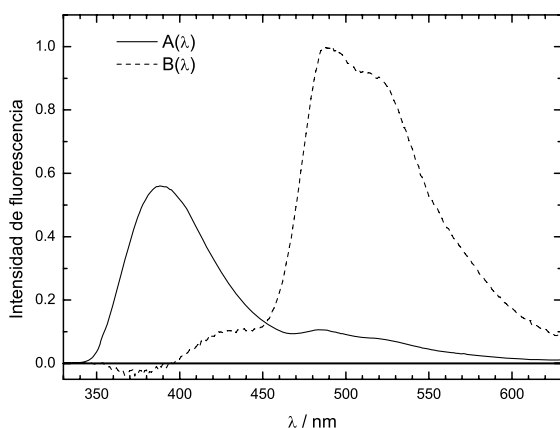


Figura 7.41: Espectros puros de la 7-HC en etanol obtenidos en el ajuste global de la función 7.53 a partir de la serie de espectros de emisión de fluorescencia a concentración de agua constante 0.217 M y pH de 1.04 a 4.06.

Los espectros puros de la figura 7.41 permiten obtener el valor del rendimiento cuántico de la 7-HC en etanol ácido, que se calcula usando como referencia el de la 7-HC en etanol a pH 4.0 (obtenido experimentalmente con un valor de 0.24) y teniendo en cuenta que no hay variación en el espectro de absorción con el pH. El valor obtenido es 0.51. Esto indica que el rendimiento cuántico de la 7-HC aumenta en medio ácido respecto a medio neutro debido a la efectividad en la formación del tautómero, con un rendimiento cuántico de fluorescencia superior al de la especie neutra.

p219

En la figura 7.42 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia estimados para la forma neutra y el tautómero de la 7-HC en etanol, que han sido normalizados a la unidad en sus máximos correspondientes. El espectro de la 7-HC neutra se obtuvo a partir de los espectros experimentales de la 7-HC en etanol a pH 4.1 (figura 7.31) restando al espectro de mayor concentración de agua (0.716 M) el de menor concentración de agua ($1.91 \cdot 10^{-4}$ M), tras normalizar ambos espectros a la misma intensidad a 520 nm. El espectro del tautómero se obtuvo a partir de esos mismos espectros de fluorescencia, restando del espectro con una concentración de agua 0.716 M el espectro con $1.91 \cdot 10^{-4}$ M de agua, una vez normalizados esos dos espectros en el máximo de emisión de la banda de la neutra. Aunque los espectros así obtenidos son bastante imprecisos, son una buena estimación de las bandas de emisión de N^* y de T^* , con máximos a 390 nm y a 485 nm, respectivamente.

p218

Finalmente, consideraremos de nuevo la serie de espectros de emisión de la 7-HC en etanol de la figura 7.30, en la que se alcanzaron acideces más elevadas (hasta pH 0.33) y la concentración de agua correspondía a la añadida con el ácido (hasta 1.12 M). En

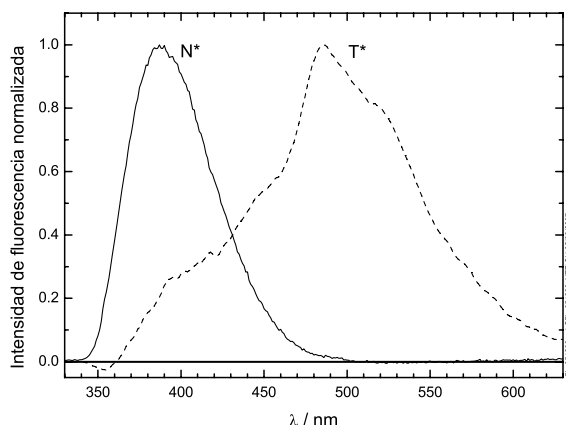


Figura 7.42: Espectros de emisión de fluorescencia estimados para la forma neutra (N^*) y para el tautómero (T^*) de la 7-HC en etanol a partir de los espectros experimentales de la 7-HC a pH 4.1 con diferentes concentraciones de agua (figura 7.31). Los espectros han sido normalizados a la unidad en sus respectivos máximos.

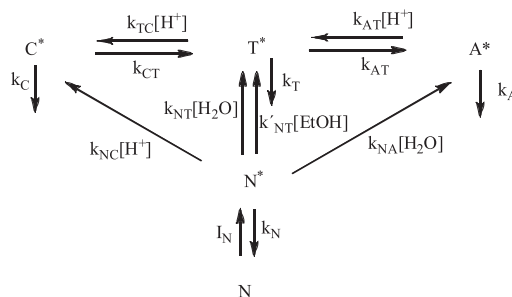


Figura 7.43: Esquema general que incluye todos los posibles procesos existentes entre las diferentes especies excitadas de la 7-HC en etanol en presencia de concentraciones de protones y de agua elevadas.

esta serie de espectros se observa que a valores de pH más ácidos que 1 los espectros de emisión de fluorescencia dejan de pasar por el punto isoemisivo (figura 7.30). Además el análisis de PCA indica tres componentes (figura 7.34), lo que no es explicable con el modelo anteriormente propuesto (figura 7.40). Ese tercer componente podría ser anión, formado debido a la presencia de agua, o catión formado por protonación del tautómero, siendo necesario proponer un nuevo mecanismo dependiente de protones que de cuenta del nuevo componente. Por tanto, a concentraciones de protones elevadas proponemos que es viable la formación de C* a partir de T* a través de un proceso de velocidad $k_{TC}[H^+]$, y la de A* a partir de N*, debido al aumento de la eficiencia del proceso de fotodisociación al incrementarse la concentración de agua (directamente ligada a la concentración de ácido). El mecanismo completo que incluye ambos procesos junto con los procesos ya propuestos en el mecanismo anterior se muestra en la figura 7.43. Tanto la protonación de T* para dar C* como la fotodisociación de N* para dar A* son procesos que dependen de la concentración de ácido añadido, por lo que podrían explicar el tercer componente detectado en el análisis de PCA. Sin embargo, con los datos experimentales disponibles no es posible discernir entre ambos procesos y es probable que los dos estén presentes en cierta proporción. Por ello, el análisis cuantitativo de la dependencia con la acidez se ha limitado a la serie de la figura 7.32, en la que se mantuvo la concentración de agua baja y constante y el pH estuvo por encima de 1.

p218
p225

p219

Con el mecanismo mostrado en la figura 7.40, válido para valores de pH no demasiado ácidos según los espectros de estado estacionario, se plantearon las siguientes ecuaciones diferenciales con el fin de analizar cuantitativamente los datos de tiempos de vida de fluorescencia:

p230

$$\frac{d[N^*]}{dt} = -(k_N + k'_{NT}[EtOH] + k_{NT}[H_2O] + k_{NC}[H^+])[N^*] \quad (7.56)$$

$$\frac{d[C^*]}{dt} = k_{NC}[H^+][N^*] + k_{TC}[H^+][T^*] - (k_C + k_{CT})[C^*] \quad (7.57)$$

$$\frac{d[T^*]}{dt} = (k_{NT}[H_2O] + k'_{NT}[EtOH])[N^*] + k_{CT}[C^*] - (k_T + k_{TC}[H^+])[T^*] \quad (7.58)$$

La resolución de estas ecuaciones diferenciales, teniendo en cuenta que la concentración inicial de la especie neutra es $[N^*]_0$ y que las de catión y tautómero son cero, conduce a las siguientes ecuaciones:

$$[N^*] = [N^*]_0 e^{-\gamma t} \quad (7.59)$$

$$[C^*] = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{-\gamma t} \quad (7.60)$$

$$[T^*] = De^{-\alpha t} + Ee^{-\beta t} + Fe^{-\gamma t} \quad (7.61)$$

donde los exponentes corresponden a las siguientes relaciones de constantes:

$$\alpha = \frac{1}{2}(k_T + k_{TC}[H^+] + k_{CT} + k_C - R) \quad (7.62)$$

$$\beta = \frac{1}{2}(k_T + k_{TC}[H^+] + k_{CT} + k_C + R) \quad (7.63)$$

$$\gamma = k_N + k'_{NT}[EtOH] + \left(k_{NT} \frac{[H_2O]}{[H^+]} + k_{NC} \right) [H^+] \quad (7.64)$$

siendo:

$$R = (k_T^2 + 2k_T k_{TC}[H^+] - 2k_{CT} k_T - 2k_C k_T + k_{TC}^2 [H^+]^2 + 2k_{TC} k_{CT}[H^+] - 2k_C k_{TC}[H^+] + k_{CT}^2 + 2k_{CT} k_C + k_C^2)^{1/2} \quad (7.65)$$

A concentraciones de protones bajas, $[H^+] < 10^{-4}$ M, la ecuación (7.65) se simplifica a la siguiente expresión:

$$R = k_T - k_{CT} - k_C \quad (7.66)$$

Por tanto, las ecuaciones (7.62), (7.63) y (7.64) a concentraciones de protones bajas se reducen a las siguientes expresiones sencillas:

$$\alpha = k_C + k_{CT} \quad (7.67)$$

$$\beta = k_T \quad (7.68)$$

$$\gamma = k_N + k'_{NT}[EtOH] \quad (7.69)$$

La ecuación (7.59) indica que donde sólo emite la especie neutra debería haber un único tiempo de vida correspondiente al inverso de γ , ecuación (7.64). En los datos de tiempos de vida medidos a 375 y a 400 nm (tabla 7.5) se obtiene un tiempo de vida τ_1 mayoritario, que debe asignarse a dicha especie neutra. La contribución del tiempo τ_2 en estos datos es pequeña salvo en condiciones de elevada acidez y puede ser atribuida a la contribución a la emisión de las otras especies excitadas presentes. La emisión de la especie neutra sí que aparece como monoexponencial a las longitudes de onda más bajas en el espectro resuelto

p222

en el tiempo de la 7-HC a pH 2.98 (tabla 7.6). El valor obtenido, del orden de 0.8 ns, puede atribuirse al tiempo de vida de N^* en condiciones de baja acidez, que viene dado por la ecuación (7.69).

Cuando se incrementa la concentración de protones, la ecuación (7.64) indica que el inverso del tiempo de vida de la especie neutra debe variar linealmente con la concentración de protones. En los datos de la tabla 7.5 se pone de manifiesto esta variación, con una disminución de τ_1 a medida que aumenta la acidez. En la figura 7.44 se representa el inverso de τ_1 frente a la concentración de protones, observándose una relación lineal, si bien los datos de concentraciones de protones más altas se desvían de la linealidad. Esta desviación puede explicarse sobre la base de que a valores de pH muy ácidos es posible la formación de catión por protonación del tautómero o de anión debido al agua presente en el ácido perclórico, con lo que la dependencia de la acidez se hace muy compleja.

p221

Según el mecanismo propuesto, las especies C^* y T^* presentan dependencias temporales idénticas de tipo triexponencial, ecuaciones (7.60) y (7.61). Una de las exponenciales coincide con la de la especie neutra, con γ dada por la ecuación (7.64), y, según el análisis de los factores preexponenciales, corresponde a un tiempo de formación, es decir, de amplitud negativa. Las otras dos exponenciales son relaciones complejas de constantes de velocidad con la concentración de protones, ecuaciones (7.62) y (7.63), aunque, en condiciones de baja acidez corresponden a los tiempos de vida del catión, ecuación (7.67), y del tautómero, ecuación (7.68).

Los resultados de las medidas tipo TRES realizadas en condiciones de baja acidez (tabla 7.6) muestran la existencia de dos tiempos de vida, uno del orden de 0.8 ns que tiene amplitud positiva a longitudes de onda bajas y negativa a las más altas, ya asignado a la especie neutra, y otro de 4.5 ns, cuya contribución empieza a ser significativa a partir de 460 nm. Dado que este tiempo aparece en la zona de emisión del tautómero y su valor es similar al de esta especie en agua, se asigna al tiempo de vida del tautómero de la 7-HC en etanol. La tercera exponencial debida al catión no se observa en estas condiciones, lo cual es lógico porque apenas existe formación de T^* a través de catión para estas pequeñas concentraciones de protones. De hecho, la amplitud del τ_1 es igual y de signo contrario a la del τ_2 (tabla 7.6), por lo que la formación de T^* debe producirse directamente a partir de N^* .

p222

p222

De todas formas, los decaimientos medidos en condiciones de mayor acidez (tabla 7.5) son también biexponenciales, con un tiempo de vida corto atribuible a la especie neutra y un tiempo de vida de 4.5 ns, que es constante salvo a concentraciones de ácido muy elevadas. No se observa, por tanto, el tiempo de vida debido al catión, que debería aparecer como tiempo de formación a las longitudes de onda de emisión del tautómero, posiblemente por el pequeño valor de este tiempo que se deduce de la gran eficiencia de la disociación de C^* para dar T^* (k_{CT} muy elevada).

p221

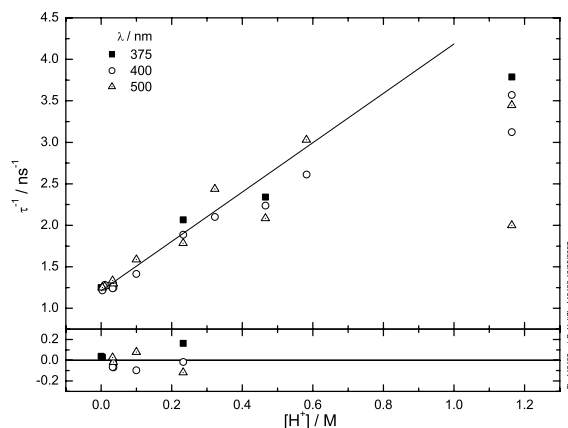


Figura 7.44: Representación del inverso del tiempo de vida de la especie neutra de la 7-HC en etanol (τ_1 en tabla 7.5) en función de la concentración de protones para diferentes longitudes de onda de emisión. La recta se obtuvo por ajuste de los datos de concentraciones de protones inferiores a 0.24 M.

p221

El inverso del tiempo de formación τ_1 observado a 500 nm en función de la concentración de protones (tabla 7.5) se ajusta a una línea recta cuya pendiente y ordenada en el origen coinciden dentro del error experimental con las obtenidas para el inverso del tiempo de vida a 400 nm a distintas concentraciones de protones (figura 7.44). Esto indica que el tiempo de formación obtenido a 500 nm es el de N^* , por lo que se deduce que el proceso de formación de T^* a partir de C^* es muy rápido (k_{CT}) comparado con el proceso de formación del C^* a partir de N^* ($k_{NC}[H^+]$), que sería el limitante en estas condiciones de acidez.

El ajuste de los datos del tiempo de vida τ_1 obtenidos a concentraciones de protones menores de 0.24 M (ya que se ha comprobado que no aparece anión en los espectros de fluorescencia en estado estacionario a pH 4.1 llegando hasta una concentración de agua correspondiente a esa concentración de protones) a 375, 400 y 500 nm conduce a valores muy similares de pendiente y ordenada en el origen, que coinciden dentro del error. Del ajuste de estos datos se obtiene una pendiente de $(3.0 \pm 0.2) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una ordenada en el origen de $(1.21 \pm 0.02) \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$.

Teniendo en cuenta que el ácido perclórico empleado es del 70 %, la contribución de agua debida al ácido perclórico sería:

$$\frac{[H_2O]}{[H^+]} = 2.39 \quad (7.70)$$

Por lo tanto, dicha pendiente según la ecuación (7.64) sería igual a $k_{NC} + k_{NT}[H_2O]/[H^+] = k_{NC} + 2.39k_{NT}$ y la ordenada en el origen $k_N + k'_{NT}[EtOH]$, cuyo inverso ($0.83 \pm 0.01 \text{ ns}$) corresponde al tiempo de vida de la 7-HC neutra en etanol cuando la concentración de protones es despreciable ($\tau_1 = 0.800 \pm 0.004 \text{ ns}$ a 375 nm a pH natural, dado en la tabla 7.5). Estos resultados se resumen en la tabla 7.7.

p221

$k_{NC} + 2.39 k_{NT} / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	3.0 ± 0.2
$k_N + k_{NT}' [\text{EtOH}] / 10^9 \text{ s}^{-1}$	1.21 ± 0.02
$k_{NT} / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	0.1 ± 0.6
$k_{NC} / 10^9 \text{ s}^{-1}$	3 ± 1

Tabla 7.7: Valores de las constantes cinéticas de la 7-HC en etanol.

Con el tiempo de vida de la especie neutra obtenido anteriormente y el valor de la razón de constantes $(k_N + k_{NT}' [\text{EtOH}]) / k_{NT}$ de $9 \pm 40 \text{ M}$, ecuación (7.44), obtenido a partir del análisis global de los datos de la 7-HC en etanol a pH 4.1 y concentración de agua variable, se obtiene un valor para k_{NT} de $(0.1 \pm 0.6) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, indicado en la tabla 7.7. Este valor coincide bien, dentro de su gran error, con el obtenido en agua para esta constante intrínseca, $0.15 \pm 0.02 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dado en la tabla 7.4. Con este valor de k_{NT} y el valor de la pendiente de la gráfica 7.44, $(3.0 \pm 0.2) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} = k_{NC} + 2.39 k_{NT}$, se puede estimar un valor para la constante de velocidad de protonación de N* para dar C*: $k_{NC} = (3 \pm 1) \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, indicado en la tabla 7.7. Comparando los valores estimados para las constantes cinéticas k_{NT} y k_{NC} de la 7-HC en etanol, se deduce que el proceso de protonación de la especie neutra para dar catión es mucho más rápido que la velocidad del proceso de tautomerización asistido por el agua presente en el ácido perclórico.

p228

p213

Finalmente, se observa un aumento del tiempo de vida del tautómero a valores de pH muy ácidos no explicable mediante la dependencia con la acidez del exponente β , ecuación (7.63), ya que según ésta el tiempo de vida debería disminuir con el aumento de acidez. Sin embargo, el aumento observado podría deberse a la mayor concentración del catión a valores de pH ácidos, ya que dicha especie en agua según la bibliografía presenta un tiempo de vida de 5.8 ns [Moriya 83]. También podría deberse a la contribución de anión, formado debido a la presencia de agua.

Capítulo 8

Comportamiento fotofísico de la 7-hidroxycumarina en tensioactivos

Una vez estudiado el comportamiento fotofísico de la 7-HC en agua y etanol, presentaremos en este apartado el estudio del comportamiento fotofísico de esta molécula en distintos tensioactivos, concretamente dos tensioactivos para cada tipo definido por la carga del grupo de cabeza. Sin embargo, sólo se midieron los decaimientos de fluorescencia de un tensioactivo de cada tipo. Las disoluciones de 7-HC estudiadas se acidificaron con el fin de que en el estado fundamental sólo hubiese 7-HC neutra. La asignación de bandas de fluorescencia es la indicada anteriormente para la 7-HC en agua.

8.1 Tensioactivos aniónicos

8.1.1 Resultados

Los tensioactivos aniónicos en los que se estudió el comportamiento fotofísico de la 7-HC fueron el dodecilsulfato sódico (SDS) y el decilsulfato sódico (SDeS).

7-HC en SDS.

La adición de SDS a una disolución acuosa de 7-HC (a pH 4.5) provoca que el espectro de absorción varíe ligeramente (figura 8.1). Se observa un punto isobéptico a 333 nm. Las variaciones observadas son pequeñas pero sistemáticas (ver gráfica insertada en esta figura).

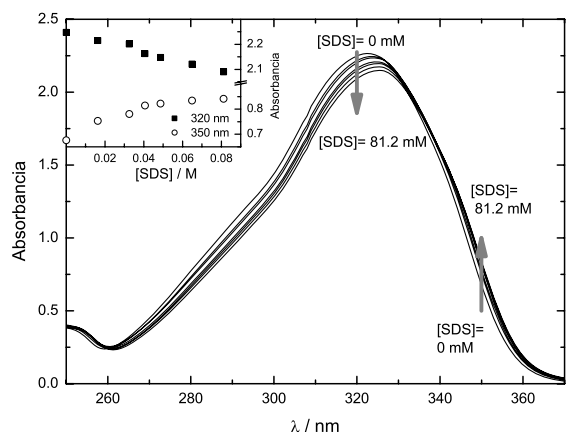


Figura 8.1: Espectros de absorción de la 7-HC ($1.82 \cdot 10^{-4}$ M, a pH 4.5 en ausencia de SDS) con diferentes concentraciones de SDS: de 0 a 0.0812 M. En la gráfica insertada se muestra la variación de absorbancia a las longitudes de onda indicadas con la concentración de SDS.

Al aumentar la concentración de SDS, manteniendo constante la concentración de 7-HC, se produce una disminución de la absorbancia y un pequeño desplazamiento del espectro de absorción hacia mayores longitudes de onda. Este desplazamiento es el responsable de que a 350 nm la absorbancia aumente con la concentración de SDS.

Los espectros de excitación de una disolución acuosa de 7-HC con una concentración de SDS 0.0810 M obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión, una vez normalizados en el máximo, son idénticos entre sí (véase figura 8.2). El espectro de excitación de la 7-HC con SDS 0.0812 M está ligeramente desplazado hacia el rojo respecto al espectro de excitación de la 7-HC sin SDS (ver gráfica insertada en esta figura). Este desplazamiento se produce en la misma dirección en que se producía el desplazamiento de los espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC con la adición de SDS.

A continuación se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas con concentración constante de 7-HC y distintas concentraciones de SDS (figuras 8.3 y 8.4). Se observó que el espectro de emisión de fluorescencia de la 7-HC no varía en presencia de SDS a concentraciones inferiores a la CMC del SDS. En las gráficas insertadas en estas figuras se observa que, por encima de la CMC, al aumentar la concentración de SDS la banda de fluorescencia en torno a 390 nm (asignada en agua a N*) aumenta de intensidad y aparece una banda en torno a 490 nm (donde aparecía en agua la banda del tautómero de la 7-HC). Se observa un punto isoemisivo a 416 nm. Además, se observó que al añadir SDS disminuye la acidez de las disoluciones, pasando de un valor de pH 4.4 a 5.6 cuando la concentración de SDS es 0.0754 M. Se comprobó que el SDS a esta longitud de onda de excitación no presenta emisión fluorescente en el intervalo de longitudes de onda en que se registró el espectro de emisión de la 7-HC.

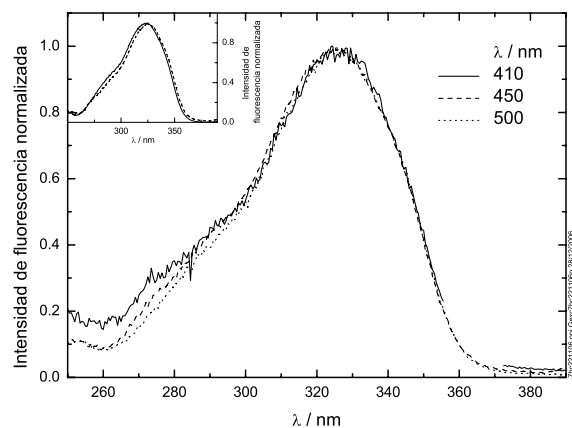


Figura 8.2: Espectros de excitación normalizados en el máximo obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión de la 7-HC ($4.30 \cdot 10^{-7}$ M) con una concentración de SDS de 0.0810 M a pH 5.8. En la gráfica insertada se compara el espectro de excitación de la 7-HC sin SDS (línea continua) con el obtenido para una disolución acuosa de 7-HC con una concentración de SDS de 0.0810 M (línea a trazos), ambos registrados a una longitud de onda de emisión de 450 nm y normalizados en el máximo.

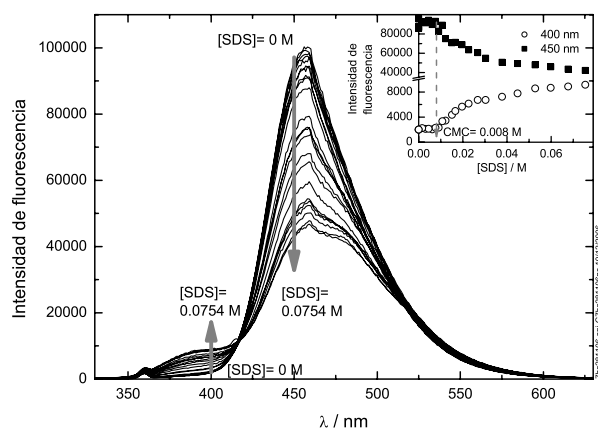


Figura 8.3: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC ($4.30 \cdot 10^{-7}$ M, pH 4.4 en ausencia de SDS) con distintas concentraciones de SDS: de 0 a 0.0754 M. Longitud de onda de excitación: 320 nm. La gráfica insertada muestra la variación de intensidad de fluorescencia a 400 y 450 nm con la concentración de SDS.

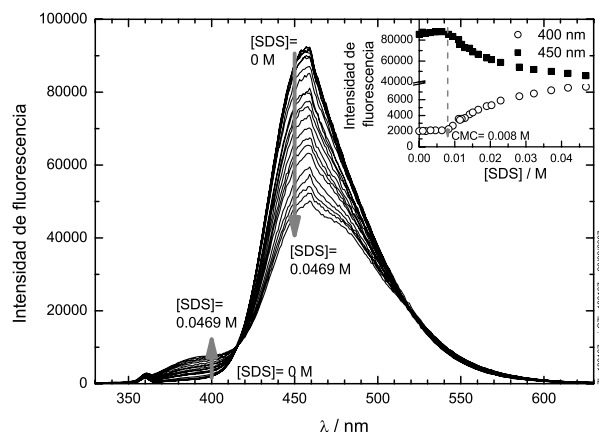


Figura 8.4: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC ($4.30 \cdot 10^{-7}$ M, pH 4.6 en ausencia de SDS) con distintas concentraciones de SDS de 0 a 0.0469 M. Longitud de onda de excitación: 320 nm. La gráfica insertada muestra la variación de intensidad de fluorescencia a 400 y 450 nm con la concentración de SDS.

Finalmente se midieron los tiempos de vida de la 7-HC en agua a distintas longitudes de onda de emisión y distintas concentraciones de SDS. El pH de las disoluciones fue de 4.5 para la disolución sin SDS. Los resultados de los ajustes individuales de los decaimientos se resumen en la tabla 8.1 y se representan en la figura 8.5. A 400 nm se obtienen decaimientos biexponenciales con un tiempo corto mayoritario cuyo valor aumenta al incrementar la concentración de SDS y un tiempo largo de baja contribución. Los decaimientos a 450 nm son biexponenciales hasta una concentración de SDS del orden de 20 mM, con un tiempo de formación corto y un tiempo de vida largo cuyo valor aumenta ligeramente al incrementar la concentración de SDS. Finalmente, a 500 nm, los decaimientos son monoexponenciales a concentraciones de SDS inferiores a 20 mM y biexponenciales a concentraciones mayores. Los tiempos de vida a esta longitud de onda coinciden con el τ_1 obtenido a 400 nm y con el τ_3 obtenido a 450 nm. Las variaciones de estos tiempos de vida con la concentración de SDS se representan en la figura 8.5. En esta figura no se representa la variación de τ_3 (400 nm) con la concentración de SDS ya que este tiempo de vida tiene mucho error porque su amplitud es muy pequeña a altas concentraciones de SDS. Tampoco se representa el tiempo de vida τ_2 (450 nm), que es aproximadamente constante.

[SDS] / mM	λ / nm	τ_1 / ns ($E_{n,1}$)	τ_2 / ns ($E_{n,2}$)	τ_3 / ns ($E_{n,3}$)	χ^2
3.06	400	0.15 ± 0.01 (0.52)		5.38 ± 0.02 (0.024)	1.01
	450		1.09 ± 0.08 (-0.022)	5.32 ± 0.01 (0.077)	1.07
	500			5.261 ± 0.008 (0.066)	1.13
5.03	400	0.11 ± 0.02 (0.59)		5.36 ± 0.01 (0.029)	1.05
	450		1.13 ± 0.08 (-0.024)	5.31 ± 0.01 (0.072)	1.13
	500			5.30 ± 0.01 (0.063)	1.02
10.1	400	0.41 ± 0.01 (0.209)		5.26 ± 0.02 (0.019)	1.20
	450		1.05 ± 0.09 (-0.015)	5.34 ± 0.01 (0.051)	1.07
	500			5.286 ± 0.007 (0.063)	1.04
10.2	400	0.32 ± 0.01 (0.263)		5.33 ± 0.02 (0.020)	1.04
	450		1.10 ± 0.09 (-0.020)	5.32 ± 0.01 (0.074)	1.07
	500			5.291 ± 0.008 (0.067)	1.13
15.3	400	0.544 ± 0.008 (0.191)		5.24 ± 0.03 (0.011)	1.12
	450		1.0 ± 0.1 (-0.013)	5.39 ± 0.01 (0.072)	1.06
	500			5.338 ± 0.008 (0.068)	1.10
20.1	400	0.51 ± 0.01 (0.199)		5.15 ± 0.03 (0.010)	1.23
	450		1.2 ± 0.3 (-0.008)	5.37 ± 0.01 (0.070)	1.14
	500	0.4 ± 0.1 (-0.017)		5.32 ± 0.01 (0.067)	1.15
25.0	400	0.581 ± 0.007 (0.190)		5.18 ± 0.05 (0.008)	1.08
	450			5.437 ± 0.008 (0.068)	1.19
	500	0.43 ± 0.09 (-0.027)		5.36 ± 0.01 (0.072)	0.98
30.6	400	0.602 ± 0.007 (0.189)		4.91 ± 0.05 (0.008)	1.23
	450			5.443 ± 0.008 (0.070)	1.10
	500	0.58 ± 0.07 (-0.030)		5.41 ± 0.01 (0.077)	1.09
34.8	400	0.622 ± 0.006 (0.189)		5.03 ± 0.05 (0.006)	1.19
	450			5.439 ± 0.008 (0.071)	1.13
	500	0.65 ± 0.07 (-0.027)		5.36 ± 0.01 (0.077)	1.16
40.2	400	0.62 ± 0.01 (0.179)		5.05 ± 0.04 (0.006)	1.10
	450			5.432 ± 0.008 (0.064)	1.03
	500	0.55 ± 0.07 (-0.030)		5.29 ± 0.01 (0.069)	1.20
44.5	400	0.639 ± 0.006 (0.186)		4.98 ± 0.05 (0.006)	1.17
	450		2.1 ± 0.2 (0.011)	5.59 ± 0.03 (0.063)	1.15
	500	0.62 ± 0.05 (-0.036)		5.37 ± 0.01 (0.081)	1.19
80.4	400	0.64 ± 0.01 (0.176)		5.01 ± 0.05 (0.005)	1.18
	450		1.6 ± 0.1 (0.015)	5.72 ± 0.02 (0.054)	1.05
	500	0.63 ± 0.06 (-0.033)		5.32 ± 0.01 (0.070)	1.06

Tabla 8.1: Tiempos de vida de la 7-HC ($4.30 \cdot 10^{-6}$ M) en presencia de diferentes concentraciones de SDS. El valor de pH de la disolución sin SDS fue 4.5. Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un valor fijo de cuentas en el máximo.

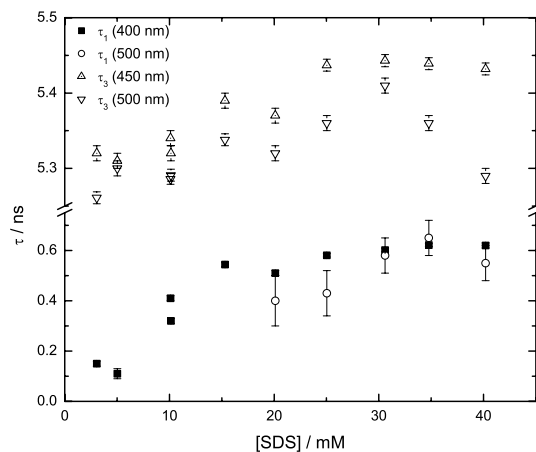


Figura 8.5: Representación de la variación de los tiempos de vida de la 7-HC ($4.30 \cdot 10^{-6}$ M) registrados a diferentes longitudes de onda de emisión con la concentración de SDS.

Además, se registraron los espectros resueltos en el tiempo (decaimientos en función de la longitud de onda) en el intervalo de 380 a 560 nm de una disolución de 7-HC con SDS en concentración 40.3 mM. Los resultados de los ajustes a estos decaimientos se muestran en la tabla 8.2. En el intervalo entre 380 y 460 nm se obtienen dos tiempos de vida, siendo el tiempo corto, de unos 0.6 ns, el mayoritario. A mayores longitudes de onda se obtienen decaimientos monoexponenciales con un tiempo largo, de unos 5.4 ns, hasta longitudes de onda superiores a 510 nm, donde aparece de nuevo el segundo tiempo de 0.6 ns con amplitud negativa.

λ / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	E_1	E_2	χ^2
380	0.61 ± 0.02	4.5 ± 0.3	0.043	0.001	1.04
390	0.64 ± 0.01	5.2 ± 0.3	0.050	0.001	1.09
400	0.65 ± 0.01	5.4 ± 0.2	0.051	0.001	1.11
410	0.61 ± 0.02	5.42 ± 0.09	0.050	0.004	1.22
420	0.59 ± 0.03	5.52 ± 0.03	0.043	0.010	1.13
430	0.76 ± 0.04	5.54 ± 0.02	0.025	0.021	1.15
440	1.1 ± 0.1	5.52 ± 0.02	0.012	0.034	1.15
450	0.6 (f)	5.46 ± 0.01	0.012	0.044	1.22
460	0.6 (f)	5.43 ± 0.01	0.006	0.047	1.22
470	-	5.437 ± 0.009	0.046		1.28
480	-	5.449 ± 0.009	0.042		1.22
490	-	5.42 ± 0.01	0.037		1.21
500	-	5.44 ± 0.01	0.030		1.37
510	0.52 ± 0.07	5.36 ± 0.02	-0.018	0.026	1.08
520	0.59 ± 0.09	5.36 ± 0.02	-0.012	0.020	1.27
530	0.7 ± 0.1	5.32 ± 0.03	-0.008	0.015	1.21
540	0.54 ± 0.06	5.36 ± 0.03	-0.014	0.012	1.06
550	0.5 ± 0.1	5.31 ± 0.04	-0.005	0.008	1.08
560	0.8 ± 0.2	5.33 ± 0.06	-0.002	0.005	1.05

Tabla 8.2: Tiempos de vida de la 7-HC ($4.30 \cdot 10^{-6}$ M) en presencia de SDS 40.3 mM. Se fijaron los valores de los parámetros indicados como (f). Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un tiempo de adquisición fijo.

Por último se hicieron medidas de conductividad de disoluciones acuosas con distintas concentraciones de SDS superiores a la CMC de este tensioactivo, véase la figura 8.6. No se midieron datos de conductividad a concentraciones de SDS menores que la CMC. Se observa que la variación de la conductividad con la concentración de SDS deja de ser lineal a partir de una concentración de surfactante del orden de 0.1 M.

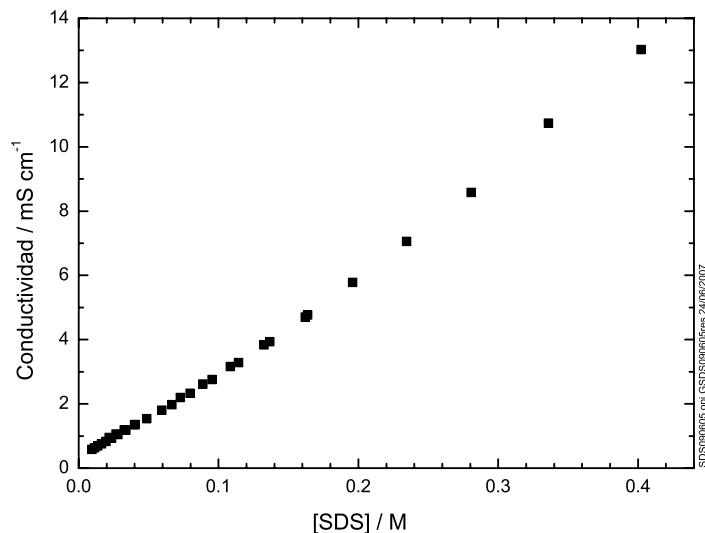


Figura 8.6: Representación de la conductividad de disoluciones acuosas de SDS frente a la concentración de SDS para disoluciones acuosas de concentración superior a la CMC del SDS.

7-HC en SDeS.

Las disoluciones acuosas de SDeS presentan absorción (posiblemente debido a alguna impureza de este surfactante), tal y como se indica en el espectro de absorción de una disolución acuosa de SDeS 0.328 M en la figura 8.7. Para corregir el efecto de dicha absorción en los espectros de la 7-HC, a los espectros de absorción de 7-HC con SDeS se les sustrajo la absorbancia debida al SDeS.

Las variaciones observadas en el espectro de absorción de una disolución acuosa de 7-HC a pH 4.5 tras la adición de SDeS son pequeñas pero sistemáticas (véase la figura 8.7). Al aumentar la concentración de SDeS se produce una disminución de la absorbancia (ver gráfica insertada en la misma figura) y un ligero desplazamiento del espectro de absorción hacia mayores longitudes de onda, responsable del aumento en la absorbancia con la concentración de SDeS observado a 350 nm. Se observa un punto isobéptico a 328 nm. La acidez de una disolución de 7-HC $1.01 \cdot 10^{-4}$ M disminuye al aumentar la concentración de SDeS y el valor de pH aumenta de 4.59 sin SDeS a un valor de 5.47 cuando la concentración es de 0.324 M.

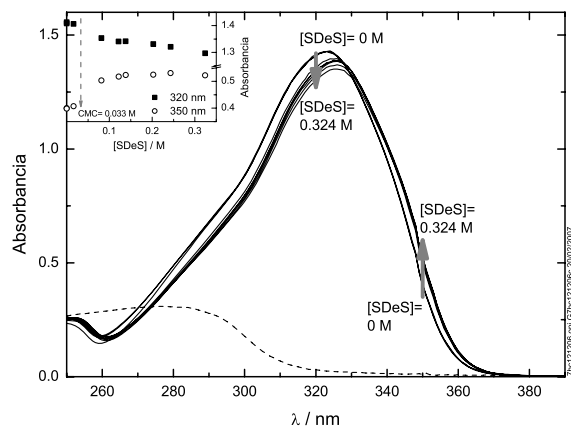


Figura 8.7: Espectros de absorción de la 7-HC ($1.01 \cdot 10^{-4}$ M) con diferentes concentraciones de SDeS de 0 a 0.324 M. El valor de pH de la disolución sin SDeS fue 4.59. El espectro de absorción que se representa con trazo discontinuo corresponde al espectro de una disolución acuosa de SDeS 0.328 M. En la gráfica insertada se muestra la dependencia de la absorbancia a 320 y 350 nm con la concentración de SDeS.

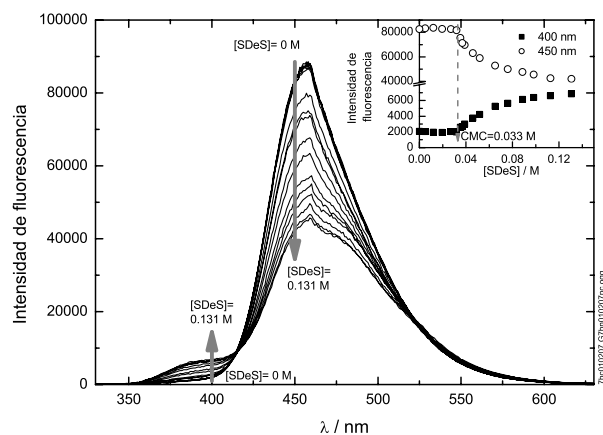


Figura 8.8: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC ($4.30 \cdot 10^{-7}$ M) con distintas concentraciones de SDeS: de 0 a 0.131 M, a pH 4.77 sin SDeS. Longitud de onda de excitación: 320 nm. La gráfica insertada muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda de emisión con la concentración de SDeS.

El espectro de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC excitando a 320 nm (figura 8.8) no varía en presencia de SDeS a concentraciones inferiores a la CMC del SDeS (véase la gráfica insertada en esta figura). Por encima de su CMC la banda debida a la especie neutra aumenta de intensidad y se ensancha la banda del anión debido a la aparición de la banda del tautómero. Al añadir SDeS aumenta ligeramente la basicidad

de las disoluciones y el valor de pH varía desde un valor de 4.77 sin SDeS hasta un valor de 5.20 cuando la concentración de SDeS es 0.131 M. Las disoluciones acuosas de SDeS a esta longitud de onda de excitación apenas presentan emisión en el intervalo de longitudes de emisión en que se midió el espectro de emisión de la 7-HC, si bien los espectros aquí presentados están corregidos restando la pequeña emisión debida a la impureza del SDeS.

8.1.2 Discusión

Podría pensarse que la presencia del fluoróforo modifica la CMC de los surfactantes. Para comprobarlo se ha determinado la CMC por conductividad de uno de los surfactantes iónicos (concretamente DTAB, ver este apartado) en ausencia y presencia de una concentración constante de 7-HC, comprobándose que la presencia de 7-HC en concentraciones del orden de las usadas en nuestras medidas, no influye en el valor de la CMC de los tensioactivos. Se comprobó también que la presencia de protones (para una disolución con pH 4.5) no modifica el valor de la CMC del surfactante (DTAB).

Sobre la base de esos resultados, es adecuado suponer que la presencia de 7-HC no modifica las propiedades de agregación de los tensioactivos objeto de estudio, lo que está de acuerdo con otros trabajos ya publicados, como aquél en el que se demuestra que el glicerol no afecta a la CMC de surfactantes como CTAB o Brij 58 a concentraciones de glicerol inferiores al 20 % en peso [D'Errico 05]. Por tanto, en este trabajo hemos usado el valor de CMC y número de agregación de la bibliografía para calcular la concentración de micelas de estos surfactantes. Los valores concretos se han indicado en el apartado 2.3.2.

7-HC en SDS.

En la figura 8.9 se muestran los resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de SDS mostrados en la figura 8.1. El análisis de PCA indica dos componentes en la representación de auto-vectores frente a concentración, en autovalores, en el error medio y en el Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas. Los otros dos criterios, autovectores frente a longitud de onda y Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a distintas longitudes de onda, indican más componentes por los comentados artefactos inherentes a esta técnica de medida. Los cambios observados en los espectros de absorción, con la existencia de un punto isobéptico, ponen de manifiesto que estos dos componentes deben ser dos especies químicas que se encuentran en equilibrio. El hecho de que los cambios sólo se produzcan a concentraciones superiores a la CMC indica que son las micelas las que intervienen en este equilibrio y no las moléculas individuales de tensioactivo.

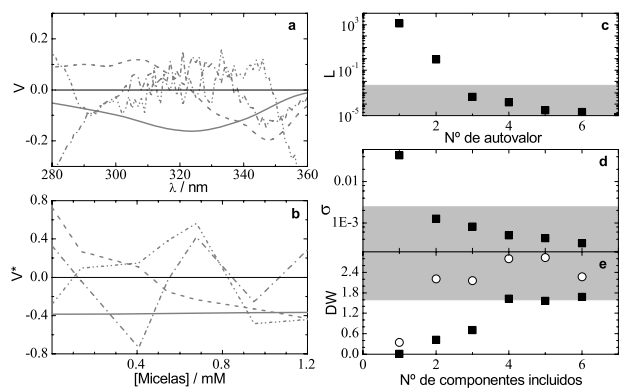


Figura 8.9: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de diferentes concentraciones de SDS (0 a 0.0812 M). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (-.-) y cuarto (·-·); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

La coincidencia entre los espectros de excitación de la 7-HC con SDS a distintas longitudes de onda de emisión una vez normalizados en el máximo (figura 8.2) indica que la emisión de fluorescencia proviene de la misma especie o especies en el estado fundamental. El hecho de que el espectro de excitación se desplace en presencia de SDS de la misma forma que el de absorción (gráfica insertada en figura 8.2) es reflejo, de nuevo, del equilibrio entre especies existente en el estado fundamental.

En la figura 8.10 se muestran los resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de SDS de la figura 8.3 hasta 0.0754 M de SDS. Este análisis indica tres componentes según todos los criterios. Sin embargo, el análisis de esta misma serie tomando los espectros de disoluciones hasta 40 mM de SDS indica dos componentes, al igual que el análisis de PCA de la serie de espectros de fluorescencia hasta 0.047 M de SDS (figura 8.4), cuyos resultados se muestran en la figura 8.11. La presencia de dos componentes está en concordancia con lo encontrado en los espectros de absorción, pero en ese caso no se observó la presencia de un tercer componente (figura 8.9). El tercer componente presente en los espectros de fluorescencia a altas concentraciones de surfactante puede ser debido a que en esas condiciones se formen micelas más grandes, con mayor número de agregación, como se ha demostrado en la bibliografía [Quina 95, Behera 99].

El aumento en el número de agregación de las micelas de SDS con la concentración de surfactante se estudió mediante medidas de conductividad de disoluciones acuosas de distintas concentraciones de SDS superiores a la CMC (figura 8.12). Se observa que la variación de

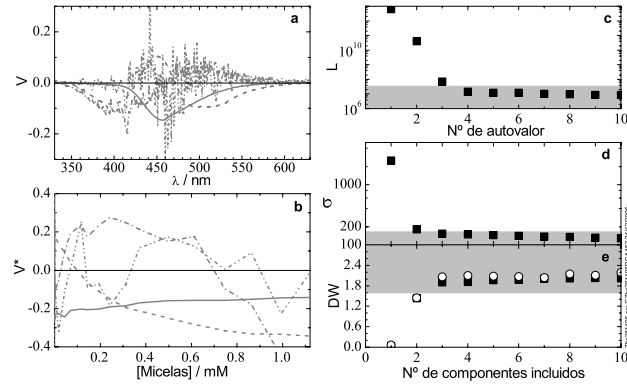


Figura 8.10: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de diferentes concentraciones de SDS (0 a 0.0754 M). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

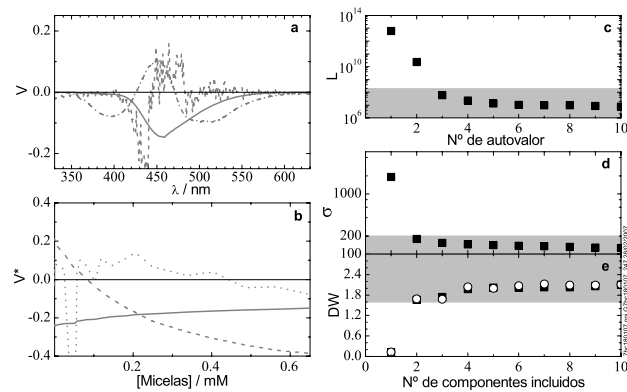


Figura 8.11: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de diferentes concentraciones de SDS (de 0 a 0.0469 M). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (- · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

la conductividad con la concentración de SDS deja de ser lineal a partir de una concentración de surfactante del orden de 0.1 M, tal como se pone de manifiesto en el ajuste lineal de esos datos mostrado en la figura 8.12. Esto puede ser debido a un aumento del tamaño de las micelas a ciertas concentraciones altas de SDS. En el gráfico insertado en esta misma figura se representa la variación de la conductividad con la concentración de micelas, calculada suponiendo una variación polinómica para el número de agregación con la concentración de SDS propuesta en la bibliografía [Quina 95]. Se observa que el considerar esta variación en el número de agregación no conduce a una variación lineal de la conductividad frente a la concentración de micelas a partir de una concentración de surfactante del orden de 0.065 M, como se esperaría de un aumento en el tamaño de las micelas. Nótese que este valor de concentración de SDS es más próximo que 0.1 M (valor de concentración de SDS en que la conductividad deja de ser lineal frente a la concentración si consideramos fijo el número de agregación) al valor a partir del cual PCA indica tres componentes (aproximadamente 0.045 M) pero superior a este valor. Por tanto, a concentraciones altas de surfactante es posible que no sólo sea variable el número de agregación del SDS sino que también las micelas de SDS presenten formas distintas y no sean perfectamente esféricas. En consecuencia, dadas las dificultades de modelizar las micelas a concentraciones elevadas de SDS, el análisis cuantitativo de los espectros de emisión se limitará al intervalo de concentraciones en el que el análisis de PCA muestra sólo dos componentes.

El tercer componente se observa en los espectros de emisión a concentraciones altas de SDS, pero no en los espectros de absorción, aún llegando a las mismas concentraciones. Esto

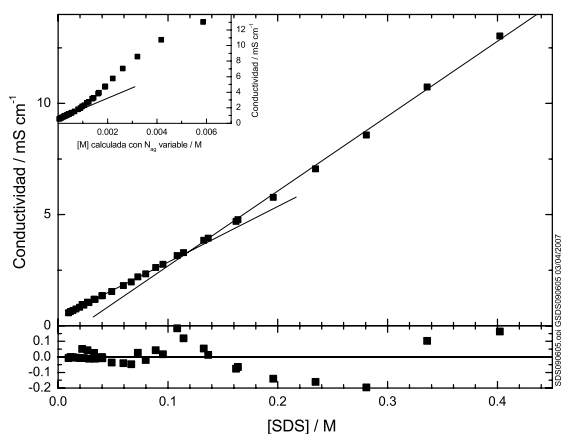


Figura 8.12: Ajuste de dos líneas rectas a la conductividad de disoluciones acuosas de SDS a concentraciones superiores a la CMC. No se representan los valores de conductividad por debajo de la CMC. En el gráfico insertado se representa la variación de la conductividad con la concentración de micelas calculada suponiendo una variación polinómica del número de agregación con la concentración de SDS descrita en la bibliografía.

puede ser debido a que las variaciones que ocasiona este componente en los espectros de absorción sean mínimas dentro de las ya pequeñas variaciones observadas, por lo que no se detecta dicho tercer componente en los espectros de absorción.

Como se discutió anteriormente, los dos componentes detectados en los análisis de PCA deben corresponder a dos especies presentes en el estado fundamental, en equilibrio entre sí y que resultan de la interacción de la 7-HC con las micelas y no con las moléculas de tensioactivo no agregado. Por tanto, se propone que estas especies son a la 7-HC libre y la 7-HC asociada a las micelas de SDS. Como modelo más sencillo se propone que una molécula de colorante se introduce en el interior de una micela formando un complejo de estequiometría 1:1 7-HC:micela, según el esquema de la figura 8.13. El equilibrio entre estas dos especies viene caracterizado por la constante de equilibrio de asociación K .

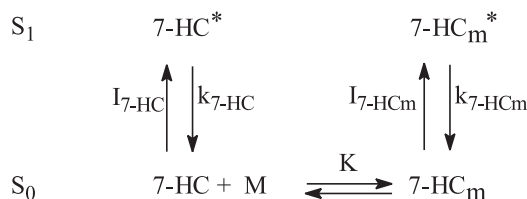


Figura 8.13: Modelo en el que un fluoróforo (7-HC) se introduce en el interior de una micela (M) (7-HC_m) dando lugar a un complejo de asociación fluoróforo:micela.

Las ecuaciones resultantes de este modelo, análogo al obtenido para dar cuenta de la variación de la absorbancia y de la intensidad de fluorescencia de una sonda fluorescente a diversas concentraciones de ciclodextrina cuando se forman complejos de tipo 1:1, han sido ya deducidas anteriormente y vienen dadas por las expresiones (5.6) y (5.15) para la absorbancia y la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de micelas, respectivamente.

p99
p101

El ajuste de este modelo a los espectros de absorción experimentales de la figura 8.1 es bueno (ver C8_Ajuste1_7HCSDS_absorcion.pdf en CD adjunto). Este ajuste permite obtener los espectros puros de la figura 8.14 y la constante de equilibrio de reparto, aunque con mucho error dada la pequeña variación observada: $900 \pm 600 \text{ M}^{-1}$. De acuerdo con las variaciones observadas en la serie de espectros de absorción, el espectro de la 7-HC dentro de las micelas de SDS tiene menor absorbancia y está desplazado hacia mayores longitudes de onda respecto al de la 7-HC en disolución acuosa.

p240

El análisis global con este modelo de las diferentes series de espectros de emisión de fluorescencia experimentales de 7-HC en función de la concentración de SDS hasta un máximo de 0.047 M de SDS es bueno en todos los casos (ver archivos C8_Ajuste2_7HCSDS_emision_Serie1.pdf, C8_Ajuste3_7HCSDS_emision_Serie2.pdf y C8_Ajuste4_7HCSDS_emision_Serie3.pdf en CD adjunto). Este análisis permite obte-

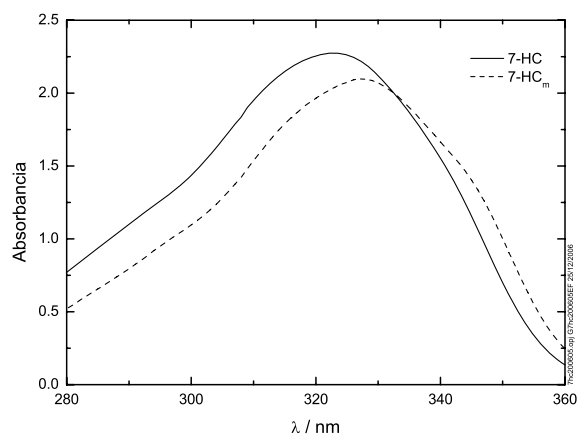


Figura 8.14: Espectros puros de absorción para la 7-HC en disolución acuosa y la 7-HC en el interior de las micelas de SDS obtenidos mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de la figura 8.7.

ner los espectros de fluorescencia puros y las constantes de equilibrio de asociación. En la figura 8.15 se presentan los espectros resultantes de la media de tres series con resultados concordantes, con valores de constantes de equilibrio de asociación indicadas en la tabla 8.3. El espectro puro de la 7-HC fuera de las micelas coincide con el observado a bajas concentraciones de protones en disolución acuosa (figura 7.17), como era de esperar. El segundo espectro puro pone de manifiesto que al introducirse la 7-HC en las micelas de SDS disminuye la intensidad de fluorescencia de la especie aniónica y que aumenta la intensidad de fluorescencia de la forma neutra y del tautómero. La constante de equilibrio que se obtiene del análisis global, media de tres series con los valores indicados en la tabla 8.3, es de $3700 \pm 500 \text{ M}^{-1}$. Con esta constante, que se considera más correcta que la obtenida a partir de las pequeñas variaciones observadas en los espectros de absorción, y asumiendo asociación aleatoria entre el fluoróforo y las micelas (según la estadística de Poisson) se calcularon las probabilidades de ocupación de las micelas (sin 7-HC, con una molécula de fluoróforo, con dos moléculas, etc.). Las expresiones para calcular estas probabilidades, $P(i)$, con i moléculas de fluoróforo por micela vienen dadas por:

$$P(i) = \frac{n^i}{i!} e^{-n} \quad (8.1)$$

En esta ecuación n es el número de ocupación medio, que se puede obtener a partir el valor de la constante de equilibrio K y de la concentración de 7-HC libre:

$$n = \frac{[7 - HC_m]}{[M]} = K \cdot [7 - HC] \quad (8.2)$$

Dicha concentración de 7-HC se calculó a partir de la concentración total de 7-HC, la concentración de micelas y la constante de equilibrio según la ecuación correspondiente a un equilibrio de asociación 1:1 (A1.4).

Los resultados obtenidos muestran que la probabilidad de que una micela esté ocupada por dos moléculas de fluoróforo es despreciable respecto a la probabilidad de que esté ocupada por una molécula de fluoróforo (menos de mil veces menor), lo cual confirma el modelo propuesto. Sin embargo, si se calcula la probabilidad de doble ocupación para las disoluciones utilizadas en las medidas de absorción, ésta es superior al 10 % debido a la muy superior concentración de 7-HC presente en dichas disoluciones. Esta puede ser la razón de que la constante obtenida a partir de los espectros de absorción ($K = 900 \pm 600 \text{ M}^{-1}$) no concuerde con la obtenida en medidas de emisión (tabla 8.3), ya que se puede tratar de una constante aparente con una importante contribución del proceso de asociación 2:1 o doble ocupación de las micelas por moléculas de 7-HC.

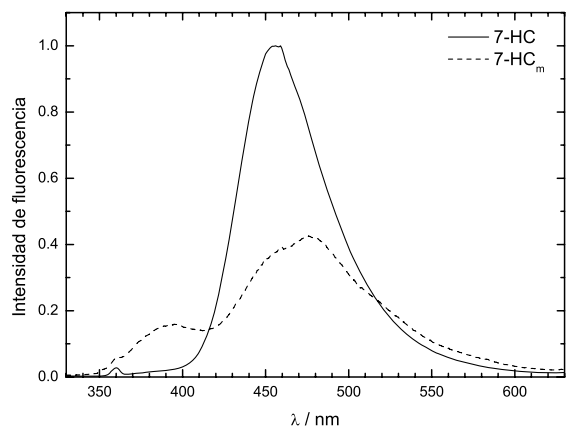


Figura 8.15: Espectros puros de emisión de fluorescencia corregidos de la 7-HC en SDS obtenidos a partir del análisis global de varias series de espectros de emisión.

El mecanismo propuesto para el comportamiento fotofísico en el estado excitado de la 7-HC fuera de las micelas es el mismo que el que hemos propuesto en disolución acuosa a este valor de pH, en el que la constante de velocidad del proceso $k_{AT}[H^+]$ es despreciable frente a la del proceso k_{TA} . El espectro puro obtenido para la 7-HC en disolución acuosa

Serie	$[SDS]_{max} / \text{mM}$	K / M^{-1}	Archivo
1	34	4100 ± 700	C8_Ajuste2_7HCSDS_emision_Serie1.pdf
2	38	3000 ± 2000	C8_Ajuste3_7HCSDS_emision_Serie2.pdf
3	47	3700 ± 300	C8_Ajuste4_7HCSDS_emision_Serie3.pdf
Media	-	3700 ± 500	

Tabla 8.3: Valores de la constante de equilibrio de asociación obtenidos para la 7-HC en micelas de SDS mediante análisis global de series de espectros de fluorescencia a distintas concentraciones de SDS, siendo $[SDS]_{max}$ la concentración de SDS máxima empleada. La columna archivo de esta tabla indica el archivo del CD adjunto donde se pueden ver los resultados del ajuste global.

coincide con el medido experimentalmente y es básicamente el espectro de emisión del anión A^* . El espectro puro de la 7-HC en el interior de las micelas de SDS sugiere que dentro de las micelas se ven favorecidos los procesos de formación de tautómero y especie neutra frente a los que dan lugar al anión. El mecanismo propuesto dentro de las micelas es el mismo que en disolución acuosa y por tanto el mecanismo general es el indicado en la figura 8.16, ya que en estas condiciones de pH, a más de dos unidades de pH por debajo del pK_a de la 7-HC en agua, sólo se excita la 7-HC neutra (esté dentro o fuera de las micelas). La banda del anión disminuye de intensidad dentro de las micelas y aumenta la banda de la especie neutra y aparece la banda del tautómero. Por tanto, en las micelas de SDS hay un alto contenido de moléculas de agua que actúan como dadores/aceptores de protones y que originan la formación de tautómero a partir de la excitación de la especie neutra que está dentro de las micelas.

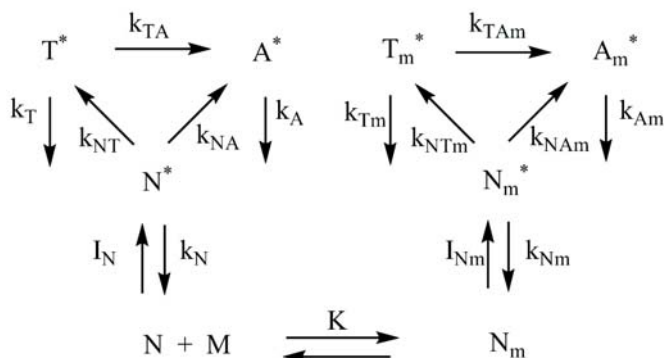


Figura 8.16: Esquema de los procesos de fotodisociación y fototautomerización fuera y dentro de las micelas (M) de SDS a bajas concentraciones de protones. Se propone un equilibrio de reparto de la forma neutra de la 7-HC que está fuera (N) y dentro de las micelas (N_m). Tanto fuera como dentro de las micelas se propuso para la 7-HC el mismo mecanismo que el propuesto para el comportamiento de la 7-HC en agua a pH 4.5.

Teniendo en cuenta que la 7-HC en el estado fundamental se encuentra como especie neutra N , la constante de equilibrio de reparto vendrá dada por la ecuación siguiente:

$$K = \frac{[N_m]}{[N][M]} \quad (8.3)$$

La concentración total de 7-HC en el estado fundamental será la suma de las concentraciones de 7-HC neutra fuera y dentro de las micelas, como se indica en la siguiente expresión:

$$[C]_0 = [N] + [N_m] \quad (8.4)$$

A partir de las dos ecuaciones anteriores se obtiene la concentración de la 7-HC neutra fuera y dentro de las micelas:

$$[N] = \frac{[C]_0}{1 + K[M]} \quad (8.5)$$

$$[N_m] = \frac{K[C]_0[M]}{1 + K[M]} \quad (8.6)$$

La intensidad de fluorescencia medida a cualquier longitud de onda λ , $F(\lambda)$, será la suma de las intensidades de fluorescencia de las especies que emiten fluorescencia según la ecuación:

$$F(\lambda) = \sigma_N(\lambda)k_{rN}[N^*]_{SS} + \sigma_A(\lambda)k_{rA}[A^*]_{SS} + \sigma_T(\lambda)k_{rT}[T^*]_{SS} + \sigma_{N_m}(\lambda)k_{rN_m}[N_m^*]_{SS} + \sigma_{A_m}(\lambda)k_{rA_m}[A_m^*]_{SS} + \sigma_{T_m}(\lambda)k_{rT_m}[T_m^*]_{SS} \quad (8.7)$$

Las concentraciones de estado estacionario de las especies existentes en el estado excitado serán:

$$[N^*]_{SS} = \frac{I_N}{k_N + k_{NA} + k_{NT}} \quad (8.8)$$

$$[A^*]_{SS} = \frac{k_{NA}[N^*]_{SS} + k_{TA}[T^*]_{SS}}{k_A} \quad (8.9)$$

$$[T^*]_{SS} = \frac{k_{NT}[N^*]_{SS}}{k_T + k_{TA}} \quad (8.10)$$

$$[N_m^*]_{SS} = \frac{I_{N_m}}{k_{N_m} + k_{NA_m} + k_{NT_m}} \quad (8.11)$$

$$[A_m^*]_{SS} = \frac{k_{NA_m}[N_m^*]_{SS} + k_{TA_m}[T_m^*]_{SS}}{k_{A_m}} \quad (8.12)$$

$$[T_m^*]_{SS} = \frac{k_{NT_m}[N_m^*]_{SS}}{k_{T_m} + k_{TA_m}} \quad (8.13)$$

Dado que la absorbancia a la longitud de onda de excitación de las disoluciones usadas fue suficientemente baja para que la intensidad de radiación absorbida en la unidad de tiempo para cada especie del estado fundamental se pueda considerar directamente proporcional a su absorbancia, se cumple:

$$I_N = I_i \varepsilon_N l [N] \quad (8.14)$$

$$I_{N_m} = I_i \varepsilon_{N_m} l [N_m] \quad (8.15)$$

En estas ecuaciones I_i es la intensidad de radiación incidente por unidad de tiempo, ε_N y ε_{N_m} son los coeficientes de absorptividad molar de N fuera y dentro de la micela a la longitud de onda de excitación y l es el espesor de la cubeta. Sustituyendo estas expresiones de I_N y

de I_{N_m} en las ecuaciones (8.8) a (8.13), posteriormente en la ecuación (8.7), y teniendo en cuenta las expresiones (8.5) y (8.6), se obtiene la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 F(\lambda) = & \left\{ \frac{\sigma_N(\lambda)k_{rN}}{k_N+k_{NA}+k_{NT}} + \frac{\sigma_A(\lambda)k_{rA} \left[k_{NA} + \frac{k_{TA}(k_{NT}k_A)}{k_{TA}k_A+k_{TKA}} \right]}{k_A(k_N+k_{NA}+k_{NT})} + \frac{\sigma_T(\lambda)k_{rT}k_{NT}k_A}{(k_{TA}k_A+k_{TKA})(k_N+k_{NA}+k_{NT})} \right\} \frac{I_{i \in N}[C]_0}{1+K[M]} \\
 & + \left\{ \frac{\sigma_{N_m}(\lambda)k_{rN_m}}{k_{N_m}+k_{NA_m}+k_{NT_m}} + \frac{\sigma_{A_m}(\lambda)k_{rA_m} \left[k_{NA_m} + \frac{k_{TA_m}k_{NT_m}k_{A_m}}{k_{TA_m}k_{A_m}+k_{TK_m}k_{A_m}} \right]}{k_{A_m}(k_{N_m}+k_{NA_m}+k_{NT_m})} + \right. \\
 & \left. + \frac{\sigma_{T_m}(\lambda)k_{rT_m}(k_{NT_m}k_{A_m})}{(k_{TA_m}k_{A_m}+k_{TK_m}k_{A_m})(k_{N_m}+k_{NA_m}+k_{NT_m})} \right\} \frac{I_{i \in N_m}[C]_0 K[M]}{1+K[M]}
 \end{aligned} \tag{8.16}$$

p101 Esta expresión, una vez simplificada, es igual a la utilizada anteriormente, ecuación (5.15),
p252 para el mecanismo indicado en la figura 8.13:

$$F(\lambda) = \frac{A_1(\lambda) + A_2(\lambda)K[M]}{1 + K[M]} \tag{8.17}$$

donde:

$$\begin{aligned}
 A_1(\lambda) = & \left\{ \frac{\sigma_N(\lambda)k_{rN}}{k_N+k_{NA}+k_{NT}} + \frac{\sigma_A(\lambda)k_{rA} \left[k_{NA} + \frac{k_{TA}(k_{NT}k_A)}{k_{TA}k_A+k_{TKA}} \right]}{k_A(k_N+k_{NA}+k_{NT})} + \frac{\sigma_T(\lambda)k_{rT}k_{NT}k_A}{(k_{TA}k_A+k_{TKA})(k_N+k_{NA}+k_{NT})} \right\} I_{i \in N}[C]_0
 \end{aligned} \tag{8.18}$$

$$\begin{aligned}
 A_2(\lambda) = & \left\{ \frac{\sigma_{N_m}(\lambda)k_{rN_m}}{k_{N_m}+k_{NA_m}+k_{NT_m}} + \frac{\sigma_{A_m}(\lambda)k_{rA_m} \left[k_{NA_m} + \frac{k_{TA_m}k_{NT_m}k_{A_m}}{k_{TA_m}k_{A_m}+k_{TK_m}k_{A_m}} \right]}{k_{A_m}(k_{N_m}+k_{NA_m}+k_{NT_m})} + \right. \\
 & \left. + \frac{\sigma_{T_m}(\lambda)k_{rT_m}(k_{NT_m}k_{A_m})}{(k_{TA_m}k_{A_m}+k_{TK_m}k_{A_m})(k_{N_m}+k_{NA_m}+k_{NT_m})} \right\} I_{i \in N_m}[C]_0
 \end{aligned} \tag{8.19}$$

y corresponden a las intensidades de fluorescencia de las diferentes especies de la 7-HC en disolución acuosa y en el interior de las micelas. Por tanto, aun a pesar de la complejidad del mecanismo propuesto con las diferentes especies presentes en el estado excitado, las variaciones de intensidad de fluorescencia con la concentración de micelas debe seguir el modelo sencillo dado por la expresión (8.17), ó (5.15), que fue el utilizado en el análisis de los datos experimentales.

Sin embargo, para el análisis de los resultados de medidas de tiempos de vida de fluorescencia sí que es necesario conocer las dependencias temporales de cada una de las especies

presentes en el estado excitado. Con el esquema indicado en la figura 8.16 se plantearon las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{d[N^*]}{dt} = -(k_N + k_{NA} + k_{NT})[N^*] \quad (8.20)$$

$$\frac{d[A^*]}{dt} = k_{NA}[N^*] + k_{TA}[T^*] - k_A[A^*] \quad (8.21)$$

$$\frac{d[T^*]}{dt} = k_{NT}[N^*] - (k_T + k_{TA})[T^*] \quad (8.22)$$

$$\frac{d[N_m^*]}{dt} = -(k_{N_m} + k_{NA_m} + k_{NT_m})[N_m^*] \quad (8.23)$$

$$\frac{d[A_m^*]}{dt} = k_{NA_m}[N_m^*] + k_{TA_m}[T_m^*] - k_{A_m}[A_m^*] \quad (8.24)$$

$$\frac{d[T_m^*]}{dt} = k_{NT_m}[N_m^*] - (k_{T_m} + k_{TA_m})[T_m^*] \quad (8.25)$$

Las condiciones iniciales empleadas para la resolución de las ecuaciones diferenciales fueron:

$$[N^*]_0 = [N^*]_0 \quad (8.26)$$

$$[A^*]_0 = 0 \quad (8.27)$$

$$[T^*]_0 = 0 \quad (8.28)$$

$$[N_m^*]_0 = [N_m^*]_0 \quad (8.29)$$

$$[A_m^*]_0 = 0 \quad (8.30)$$

$$[T_m^*]_0 = 0 \quad (8.31)$$

La resolución de estas ecuaciones diferenciales conduce a las siguientes ecuaciones:

$$[N^*] = [N^*]_0 e^{-\gamma t} \quad (8.32)$$

$$[A^*] = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} + C e^{-\gamma t} \quad (8.33)$$

$$[T^*] = D e^{-\alpha t} + E e^{-\beta t} + F e^{-\gamma t} \quad (8.34)$$

$$[N_m^*] = [N_m^*]_0 e^{-\gamma_m t} \quad (8.35)$$

$$[A_m^*] = A_m e^{-\alpha_m t} + B_m e^{-\beta_m t} + C_m e^{-\gamma_m t} \quad (8.36)$$

$$[T_m^*] = D_m e^{-\alpha_m t} + E_m e^{-\beta_m t} + F_m e^{-\gamma_m t} \quad (8.37)$$

donde los exponentes vienen dados por:

$$\alpha = k_A \quad (8.38)$$

$$\beta = k_{TA} + k_T \quad (8.39)$$

$$\gamma = k_N + k_{NA} + k_{NT} \quad (8.40)$$

$$\alpha_m = k_{A_m} \quad (8.41)$$

$$\beta_m = k_{TA_m} + k_{T_m} \quad (8.42)$$

$$\gamma_m = k_{N_m} + k_{NA_m} + k_{NT_m} \quad (8.43)$$

p243
p244

A continuación analizaremos los tiempos de vida obtenidos para la 7-HC a diferentes concentraciones de SDS y diferentes longitudes de onda de emisión mostrados en la tabla 8.1 y representados en la figura 8.5 en función de la concentración de SDS. Según el modelo propuesto, se deberían observar hasta seis tiempos de vida diferentes según la longitud de onda de emisión y la concentración de SDS. Sin embargo, todos los decaimientos pueden ser explicados convenientemente con modelos mono o biexponenciales. Esto es debido a que tiempos de vida muy similares o contribuciones pequeñas no se muestran como exponenciales adicionales, sino que dan lugar a tiempos de vida promedio con contribuciones dependientes de la concentración de SDS.

A 400 nm, según los espectros de fluorescencia en estado estacionario, debería observarse el tiempo de vida de la especie neutra en disolución acuosa por debajo de la CMC y de esta especie dentro de las micelas de SDS a concentraciones superiores a la CMC. Se observa, cuando la concentración de SDS es menor que la CMC, fundamentalmente la emisión de la especie neutra que está fuera de las micelas, con un tiempo de vida $\tau_1(400 \text{ nm})$ de aproximadamente 0.1 ns, que coincide con el que presenta la 7-HC en agua (dentro de la resolución de nuestro equipo de medida). A concentraciones de SDS superiores a la CMC el tiempo de vida mayoritario, $\tau_1(400 \text{ nm})$, aumenta al incrementarse la concentración de SDS, siendo en todos los casos superior al que tiene la especie neutra de la 7-HC en disolución acuosa (0.1 ns), pero inferior al que presenta en etanol a este pH (0.83 ns). La variación de este tiempo de vida con la concentración de SDS observada es la esperada para una complejación 1:1 de un fluoróforo. El hecho de que el tiempo de vida de la especie neutra aumente al aumentar la concentración de SDS, indica que el tiempo de vida de la especie neutra dentro de las micelas de SDS, $(k_{N_m} + k_{NT_m} + k_{NA_m})^{-1}$, es mayor que el que presenta en el seno de la disolución, $(k_N + k_{NT} + k_{NA})^{-1}$. Esto, unido al hecho de que el espectro puro de fluorescencia obtenido dentro de las micelas de SDS presenta poca contribución del anión, indica que las constantes cinéticas de formación de A_m^* tienen valores más pequeños que las de formación de A^* ($k_{TA_m} < k_{TA}$ y $k_{NA_m} < k_{NA}$).

Además, a 400 nm se observa una pequeña contribución de un tiempo de vida, $\tau_3(400 \text{ nm})$, que cuando la concentración de SDS es menor que la CMC coincide con el asignado al anión en disolución acuosa. Sin embargo, la amplitud de este tiempo de vida disminuye al aumentar la concentración de SDS y aumenta el error de su valor. La disminución de la amplitud de $\tau_3(400 \text{ nm})$ es razonable, ya que según los espectros de fluorescencia en estado estacionario, aumenta la emisión de fluorescencia de la especie neutra y disminuye la del anión.

Según los espectros de fluorescencia en estado estacionario, a 450 nm debería observarse fundamentalmente el tiempo de vida del anión que está fuera de las micelas cuando la concentración de SDS es menor que la CMC. Cuando la concentración de SDS está por debajo de la CMC se observa un tiempo de vida mayoritario, $\tau_3(450 \text{ nm})$, que coincide con el asignado al anión en disolución acuosa. Por encima de la CMC aumenta ligeramente este tiempo de vida al aumentar la concentración de SDS. En los espectros de fluorescencia en estado estacionario de la figura 8.15 se observa que dentro de las micelas de SDS se forma fundamentalmente tautómero, pero también algo de anión. Por tanto, el tiempo de vida del anión y/o del tautómero dentro de las micelas de SDS es mayor que el del anión fuera de las micelas, y mayor que el obtenido para el tautómero en disolución acuosa. Se observa a 450 nm una pequeña contribución de un tiempo de formación, $\tau_2(450 \text{ nm})$, de aproximadamente 1.1 ns hasta una concentración de SDS de aproximadamente 20 mM. El valor de este tiempo coincide con el asignado a $1/(k_{TA} + k_T)$ en disolución acuosa, cuya amplitud disminuye (en valor absoluto) al aumentar la concentración de SDS, a medida que la 7-HC se introduce en las micelas de SDS. Esto es lógico ya que, en el interior de las micelas, el proceso de formación de anión a partir del tautómero (k_{TA_m}) es menos efectivo. Además en las dos disoluciones medidas de concentración de SDS más alta (para una concentración de SDS mayor de 45 mM), a esta longitud de onda de emisión, se observa otro tiempo de vida $\tau_2(450 \text{ nm})$, que puede ser el responsable de la aparición de tres componentes en el análisis de los espectros de fluorescencia en estado estacionario a partir de esta concentración de SDS.

p254

A 500 nm la emisión de fluorescencia se debe fundamentalmente al anión cuando la concentración de SDS está por debajo de la CMC, al igual que en disolución acuosa. A concentraciones de SDS más altas la intensidad de fluorescencia registrada se debe, además, al anión y al tautómero en el interior de las micelas de SDS. El tiempo de vida observado, $\tau_3(500 \text{ nm})$, es aproximadamente constante. El hecho de que este tiempo de vida sea aproximadamente constante con la concentración de SDS se puede explicar si tenemos en cuenta que a esta longitud de onda de emisión a concentraciones de SDS por encima de la CMC se obtendría el tiempo de vida del anión en disolución acuosa, del anión dentro de las micelas (mayor que el del anión de fuera) y del tautómero dentro de las micelas (mayor que el del tautómero fuera, aunque no tanto como el del anión fuera). El menor aumento de este tiempo de vida a 500 nm que a 450 nm puede explicarse teniendo en cuenta que a 500 nm y dentro de las micelas emite menos anión (con un tiempo de vida mayor que el que presenta en disolución acuosa) y más tautómero (con un tiempo de vida mayor que el que presenta el tautómero en disolución acuosa pero menor al que presenta el anión en disolución acuosa, lo que explicaría el menor aumento del tiempo de vida a 500 nm que a 450 nm).

El tiempo de formación a esta longitud de onda de emisión, $\tau_1(500 \text{ nm})$, coincide con el tiempo de vida medido a 400 nm, $\tau_1(400 \text{ nm})$, es decir, es el tiempo de vida de la especie neutra fuera de las micelas cuando la concentración de SDS es inferior a la CMC y un tiempo de vida promedio del tiempo de vida de la especie neutra fuera y dentro de las micelas cuando la concentración de SDS es superior a la CMC.

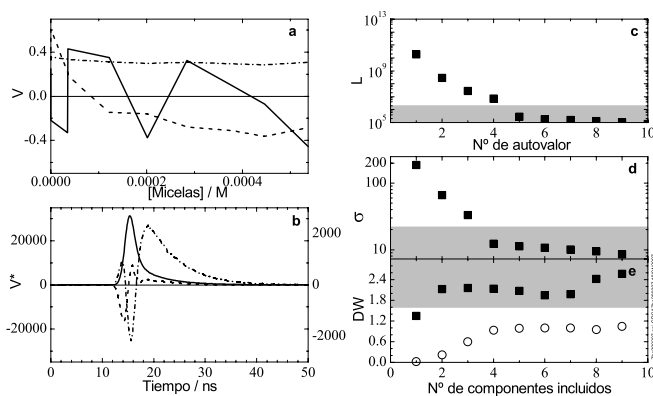


Figura 8.17: Resultados del análisis de PCA de los decaimientos de fluorescencia medidos a 400 nm de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de SDS. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al tiempo (b): primer autovector (—), segundo (— —) y tercero (· · ·) (el primero con el eje de ordenadas de la izquierda y los otros dos con el de la derecha); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de concentración de micelas (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes tiempos (círculos).

p243

El análisis de PCA de la serie de decaimientos de fluorescencia a 400 nm de la tabla 8.1 hasta 41 mM de SDS indica dos componentes según los criterios referidos a la concentración de micelas, como se muestra en la figura 8.17: autovectores frente a concentración de micelas y Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de concentraciones de micelas. Los criterios referidos al tiempo indican más componentes. Este es el mismo efecto que el observado en los espectros de absorción y es debido a artefactos instrumentales, como las variaciones de intensidad de la lámpara. El primero de estos dos componentes debe ser asignado a las especies existentes en disolución acuosa (N^* y algo de A^*) mientras que el segundo componente corresponde a las especies de la 7-HC que existen dentro de las micelas y emiten a 400 nm, que es básicamente la especie neutra N_m^* . Por encima de la CMC el tiempo de vida corto es una mezcla del de la especie neutra fuera y dentro de las micelas. El tiempo de vida largo tiene muy poca amplitud y debe ser una mezcla del tiempo de vida del anión fuera y dentro de las micelas.

p321

Por tanto, las variaciones sistemáticas observadas en el tiempo de vida menor de 1 ns con la concentración de micelas (figura 8.18) indican que este tiempo de vida es un tiempo de vida aparente, resultante del ajuste a un modelo monoexponencial cuando en realidad hay dos tiempos de vida: el de la especie neutra fuera y dentro de las micelas. Este tiempo de vida se ajusta bien al modelo dado por la ecuación (A2.8) obteniéndose una constante de complejación aparente $K_{ap} = 22000 \pm 5000 \text{ M}^{-1}$, que no corresponde a la constante de equilibrio de asociación de la 7-HC con las micelas de SDS (véase explicación en el apéndice 2).

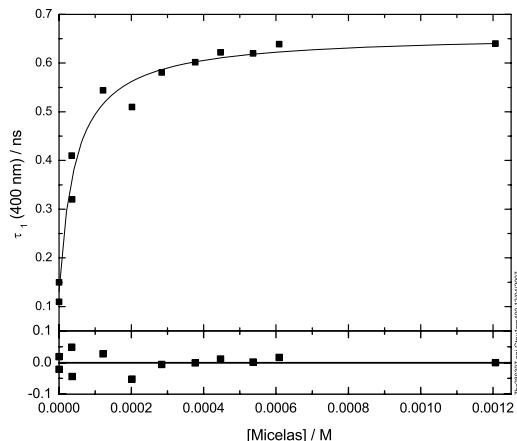


Figura 8.18: Variación del tiempo de vida experimental τ_1 a 400 nm indicado en la tabla 8.1 con la concentración de micelas. Esta variación se ajusta con el modelo indicado en el texto.

Con el fin de obtener los tiempos de vida de las especies implicadas, se acude a un análisis global. Dado que el tiempo de vida del anión tiene muy poca amplitud consideramos que no varía su valor con la concentración de SDS a la hora de hacer el análisis global (es igual su valor dentro y fuera de las micelas de SDS). El análisis global de los decaimientos de fluorescencia de la 7-HC en presencia de SDS registrados a 400 nm (con amplitudes normalizadas al haber sido medidos con un número fijo de cuentas en el máximo) con un modelo de tres exponenciales con amplitudes libres es perfectamente válido (ver resultados en *C₈Ajuste5_7HCSDS_tiemposdevida_conc.pdf* en el CD adjunto). En este análisis se obtienen los tiempos de vida siguientes: 0.0960 ± 0.0003 ns para la especie neutra fuera de las micelas, 0.647 ± 0.002 ns para la especie neutra dentro de las micelas y 5.336 ± 0.006 ns para el anión, así como las amplitudes mostradas en la figura 8.19. Se observa que los tiempos de vida obtenidos para las especies neutra y anión fuera de las micelas coinciden con los determinados experimentalmente para la 7-HC en disolución acuosa (ver capítulo 7). La amplitud del tiempo de vida más corto presenta bastante incertidumbre debido a la enorme imprecisión en el valor de este tiempo de vida por la baja resolución de nuestro equipo. La amplitud de este tiempo de vida disminuye al aumentar la concentración de micelas, lo que es razonable si tenemos en cuenta que corresponde al tiempo de vida de la 7-HC neutra fuera de las micelas, por lo que su amplitud disminuye porque la 7-HC se introduce en las micelas. La amplitud del tiempo de vida intermedio aumenta al aumentar la concentración de micelas, lo que también es explicable ya que corresponde al tiempo de vida de la 7-HC neutra dentro de las micelas. La amplitud correspondiente al tiempo de vida más largo es muy pequeña. Esta amplitud, correspondiente al anión de la 7-HC (que tiene poca emisión a 400 nm, lo que explica su baja amplitud), disminuye al aumentar la concentración de micelas porque dentro de las micelas disminuye la fluorescencia del anión. El ajuste de las

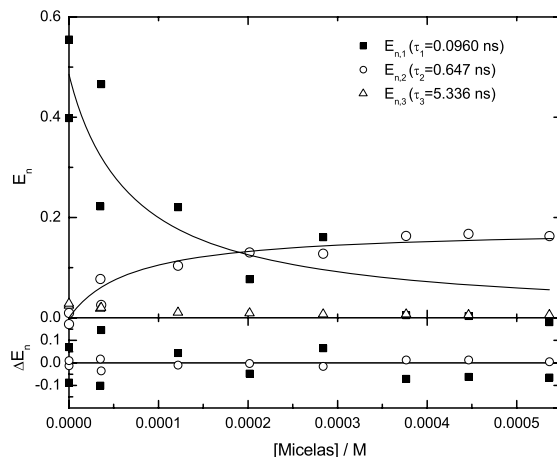


Figura 8.19: Amplitudes obtenidas a partir del análisis global con tres exponenciales de los decaimientos de fluorescencia a 400 nm de disoluciones acuosas de 7-HC con distintas concentraciones de SDS, hasta 41 mM. Estas amplitudes están normalizadas (han sido registrados los decaimientos con un número fijo de cuentas en el máximo) y corresponden a los tiempos de vida indicados en la figura.

amplitudes de la especie neutra de la 7-HC fuera de las micelas a una expresión dada por $E_1(\lambda)/(1 + Kq[M])$ y para las amplitudes de la especie neutra dentro de las micelas a una expresión $E_2(\lambda)Kq[M]/(1 + Kq[M])$ con la constante K como parámetro global (figura 8.19) conduce a un valor del parámetro Kq de 14000 ± 4000 (ver explicación en el apéndice 1). Para el parámetro q se estimó un valor de 4.0 a partir de los espectros puros de emisión de fluorescencia de la figura 8.15 teniendo en cuenta que esta constante es el cociente de amplitudes límite (ver demostración en el apéndice 1). Cada una de estas amplitudes se estimó del valor de la integral bajo el espectro puro de emisión de fluorescencia en un intervalo de longitudes de onda de 390 a 410 nm (intervalo centrado en 400 nm con rendija de emisión de unos 20 nm). Por tanto, utilizando ese valor de q , el valor de la constante de equilibrio K sería 3555 M^{-1} , que concuerda perfectamente con la constante de equilibrio obtenida a partir de las series de espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario (3700 ± 500). Es conviene resaltar que la constante aparente K_{ap} determinada anteriormente (22000 ± 5000) no está muy alejada de valor de Kq de 14000 ± 4000 , lo que indica que las amplitudes límite de las dos especies implicadas no son muy distintas.

Un análisis similar podría plantearse para el tiempo de vida largo, mayoritario a 450 nm y a 500 nm (ver tabla 8.1). Este tiempo es un promedio de los tiempos de vida del anión fuera de las micelas, del anión dentro de las micelas y del tautómero dentro de las micelas, cuyas contribuciones cambian con la concentración de SDS, por lo que su análisis cuantitativo es complejo, más aún teniendo en cuenta que las variaciones observadas en este tiempo son pequeñas (figura 8.5).

El análisis de PCA de los espectros resueltos en el tiempo (decaimientos en función de la longitud de onda) de una disolución de 7-HC con una concentración de SDS 40.3 mM de la tabla 8.2 indica dos componentes según todos los criterios, como se muestra en la figura 8.20. El ajuste global de estos espectros resueltos en el tiempo con un modelo biexponencial indica que este modelo es perfectamente aceptable (ver C8_Ajuste6_7HCSDS_TRES.pdf en CD adjunto). Se obtienen dos tiempos de vida: 0.57 ± 0.04 ns y 5.39 ± 0.08 ns y los espectros puros de la figura 8.21, que en la gráfica insertada se comparan con el espectro puro de fluorescencia obtenido para la 7-HC en el interior de las micelas de SDS, mediante análisis global de los espectros de fluorescencia (figura 8.15). Se observa que el espectro del primer componente, con un tiempo de vida de 0.57 ns, corresponde básicamente a la especie neutra dentro de las micelas y su espectro de emisión de fluorescencia coincide con la primera banda del espectro de emisión de estado estacionario. La parte negativa del espectro es debida a que este tiempo es un tiempo de formación a longitudes de onda altas. El segundo componente presenta un espectro que no coincide perfectamente la segunda banda del espectro puro obtenido dentro de las micelas de SDS en estado estacionario. Esto es lógico ya que, usando el valor de constante de equilibrio obtenida a partir de los espectros de fluorescencia en estado estacionario, 3700 M^{-1} , a la concentración de SDS empleada, 40.3 mM, todavía hay un 33 % de 7-HC fuera de las micelas. Por tanto, es razonable que la coincidencia de los espectros de fluorescencia no sea total ya que a 40.3 mM de SDS hay un porcentaje importante de 7-HC fuera de las micelas, que está fundamentalmente como anión. Por tanto, el espectro obtenido para el segundo componente es una combinación de los espectros del anión fuera

p245

p254

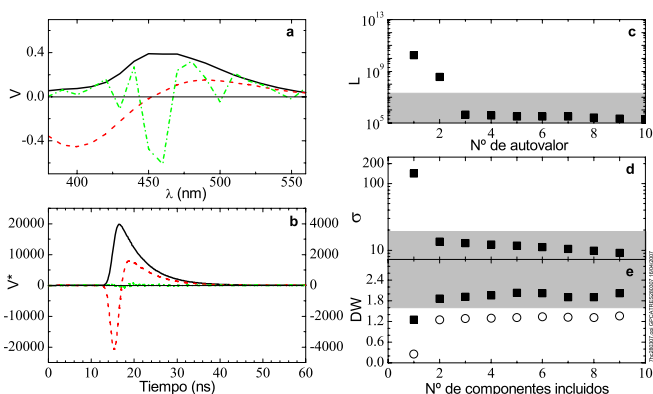


Figura 8.20: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros resueltos en el tiempo de una disolución de 7-HC en presencia de 40.3 mM de SDS. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente al tiempo (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (- · -) (el primero con la escala de la izquierda y los otros dos en la de la derecha); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes tiempos (círculos).

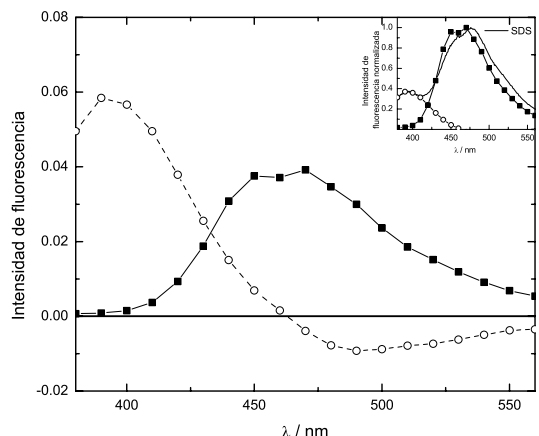


Figura 8.21: Espectros puros de emisión de fluorescencia corregidos obtenidos a partir del análisis global con dos exponenciales de la serie de espectros resueltos en el tiempo de una disolución acuosa de 7-HC con SDS 40.3 mM. En la gráfica insertada se comparan estos espectros con el espectro puro obtenido para la 7-HC dentro de las micelas de SDS.

de las micelas y del tautómero y el anión en el interior de las micelas, siendo el tiempo de vida correspondiente un promedio de los tiempos de vida de estas especies. La contribución del anión en disolución acuosa explica que este espectro esté algo desplazado hacia menores longitudes de onda respecto al espectro puro obtenido dentro de las micelas, donde hay fundamentalmente tautómero. En consecuencia, los valores de tiempos de vida obtenidos a partir de estos espectros resueltos en el tiempo no corresponden a los tiempos de vida límites que se obtendrían cuando toda la 7-HC estuviese totalmente micelizada.

7-HC en SDeS.

Los resultados que se obtuvieron para la 7-HC en presencia de SDeS son muy similares a los que presenta con SDS. Así, los resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de SDeS (figura 8.7) indica la existencia de dos componentes estructurales (figura 8.22), según los criterios no afectados por los artefactos instrumentales.

Como en el caso del SDS, esos componentes se asignan a la 7-HC fuera y dentro de las micelas de SDeS. Por tanto, se propuso el mismo modelo (figura 8.13) para realizar el análisis global de la serie de espectros de absorción de la figura 8.7 que el propuesto para el SDS, dado por la ecuación (5.6). El ajuste con este modelo es bueno según indican los residuos (ver C8_Ajuste7_7HCSDeS_absorcion.pdf en CD adjunto). Este ajuste permitió obtener los espectros puros de absorción de la figura 8.23 y la constante de equilibrio de

p247

p252

p247

p99

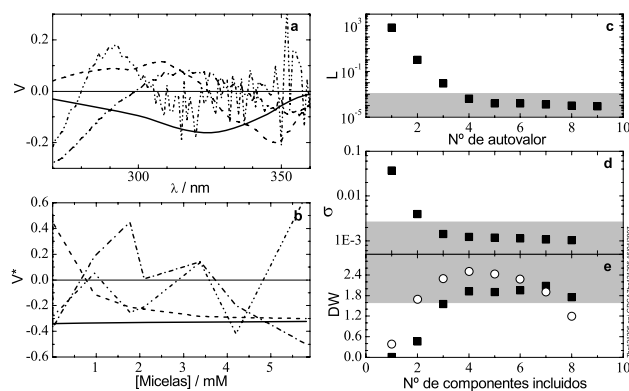


Figura 8.22: Resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de diferentes concentraciones de SDeS de 0 a 324 mM. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (---) y cuarto (·-·-); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

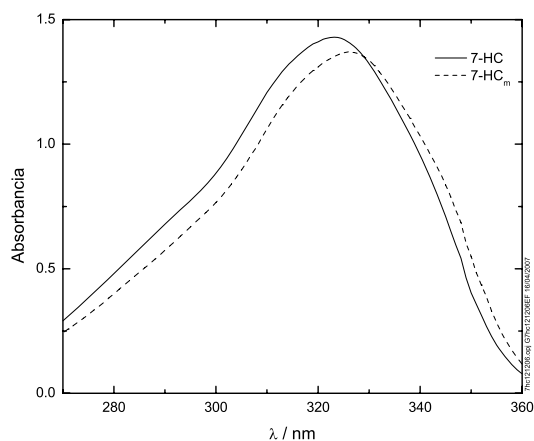


Figura 8.23: Espectros puros de absorción de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de SDeS obtenidos mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de la figura 8.7.

reparto ($1700 \pm 800 \text{ M}^{-1}$), aunque con mucho error debido a la pequeña variación observada en estos espectros. De acuerdo con las variaciones observadas en la serie de espectros de absorción, el espectro de la 7-HC dentro de las micelas de SDeS tiene menor absorbancia y está desplazado hacia mayores longitudes de onda respecto al de la 7-HC en disolución acuosa, al igual que ocurría en el caso del SDS.

p247

El análisis de PCA de todos los espectros de emisión de la figura 8.8, hasta 131 mM de SDeS, indica 3 componentes según todos los criterios, salvo el Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones (véase la figura 8.24). Sin embargo, el análisis de PCA de estos mismos espectros hasta una concentración de tensioactivo de 89 mM indica dos componentes (figura 8.25). Esta aparición de un tercer componente a altas concentraciones de SDeS es similar al que aparecía en el SDS a altas concentraciones de surfactante, y que se ha explicado por la presencia de micelas con distinto número de agregación o micelas de diferentes formas.

p252

p101

Para el análisis de esta serie de espectros de fluorescencia se propone el mismo modelo que el empleado para esta cumarina en presencia de SDS (figura 8.13), dado por la ecuación 5.15. Sin embargo, hay que señalar que el ajuste individual de los espectros hasta una concentración 89 mM de SDeS a 390 nm conduce a una constante de equilibrio diferente de la obtenida a 450 nm, lo que no sucedía para el SDS. La constante obtenida en los ajustes individuales aumenta al aumentar la longitud de onda de emisión ($1500 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ a 390 nm, $3700 \pm 400 \text{ M}^{-1}$ a 450 nm y $4600 \pm 500 \text{ M}^{-1}$ a 470 nm). En consecuencia el ajuste global con este modelo conduce a residuos sistemáticos (ver C8_Ajuste8_7HCSDeS_emision_C11). Por tanto, debe de haber algún proceso dependiente de la concentración de micelas en el estado excitado. Dado que este proceso tiene que depender de la concentración de micelas debe ser un proceso de entrada al interior de las micelas de una especie existente en el es-

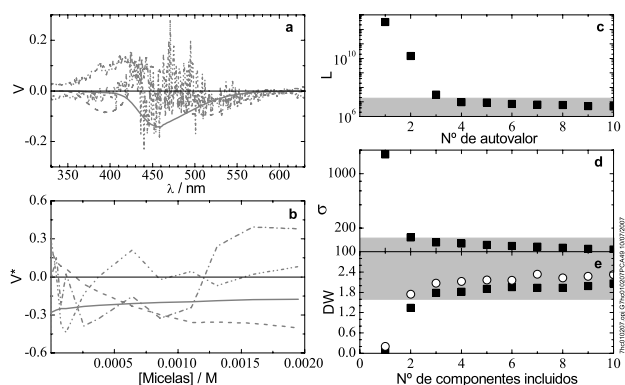


Figura 8.24: Resultados del PCA de datos obtenidos para una serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de SDeS hasta 131 mM de SDeS. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (- · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones (círculos).

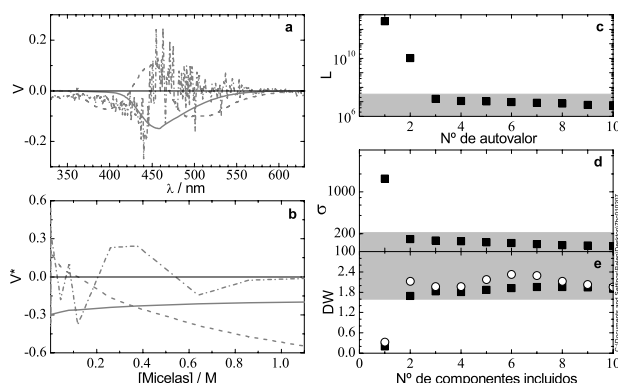


Figura 8.25: Resultados del PCA de datos obtenidos para una serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de SDeS hasta 89 mM de SDeS. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (- · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones (círculos).

tado excitado. Además, como el aumento de la constante obtenida es mayor donde emite el tautómero (470 nm), parece razonable pensar que ésta es la especie que se introduce en el interior de las micelas de SDeS. El modelo que se propone siguiendo estos argumentos es el indicado en la figura 8.26. Este modelo es el mostrado en la figura 8.16 con un proceso adicional que es la entrada de tautómero excitado al interior de las micelas.

p255

Se procede, pues, a deducir una expresión que relacione la intensidad de fluorescencia con la concentración de micelas sobre la base del nuevo modelo. La intensidad de fluorescencia medida a cualquier longitud de onda λ , $F(\lambda)$, será la suma de las intensidades de fluorescencia de las especies que emiten fluorescencia según la ecuación (8.44).

$$F(\lambda) = \sigma_N(\lambda)k_{rN}[N^*]_{SS} + \sigma_A(\lambda)k_{rA}[A^*]_{SS} + \sigma_T(\lambda)k_{rT}[T^*]_{SS} + \sigma_{N_m}(\lambda)k_{rN_m}[N_m^*]_{SS} + \sigma_{A_m}(\lambda)k_{rA_m}[A_m^*]_{SS} + \sigma_{T_m}(\lambda)k_{rT_m}[T_m^*]_{SS} \quad (8.44)$$

Las concentraciones de estado estacionario de las especies existentes en el estado excitado serán:

$$[N^*]_{SS} = \frac{I_N}{k_N + k_{NA} + k_{NT}} \quad (8.45)$$

$$[A^*]_{SS} = \frac{k_{NA}[N^*]_{SS} + k_{TA}[T^*]_{SS}}{k_A} \quad (8.46)$$

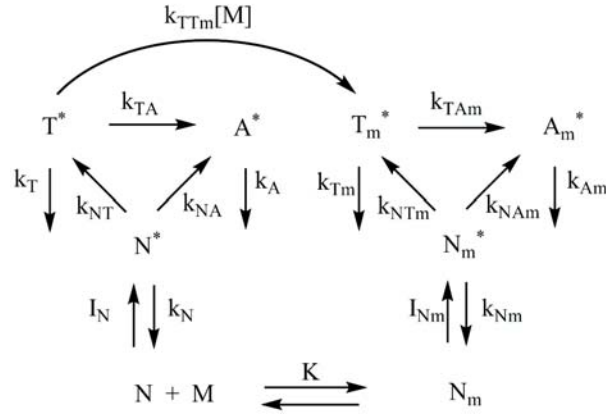


Figura 8.26: Esquema de los procesos de fotodisociación y fototautomerización de la 7-HC fuera y dentro de las micelas (M) de SDeS. Hay un equilibrio de reparto en el estado fundamental de la forma neutra de la 7-HC que está fuera (N) y dentro de las micelas (N_m).

$$[T^*]_{SS} = \frac{k_{NT}[N^*]_{SS}}{k_T + k_{TA} + k_{TTm}[M]} \quad (8.47)$$

$$[N_m^*]_{SS} = \frac{I_{N_m}}{k_{N_m} + k_{NA_m} + k_{NTm}} \quad (8.48)$$

$$[A_m^*]_{SS} = \frac{k_{NA_m}[N_m^*]_{SS} + k_{TA_m}[T_m^*]_{SS}}{k_{A_m}} \quad (8.49)$$

$$[T_m^*]_{SS} = \frac{k_{NTm}[N_m^*]_{SS} + k_{TTm}[M][T^*]_{SS}}{k_{T_m} + k_{TA_m}} \quad (8.50)$$

Dado que la absorbancia a la longitud de onda de excitación de las disoluciones empleadas fue suficientemente baja para que la intensidad de radiación absorbida en la unidad de tiempo para cada especie del estado fundamental se pueda considerar directamente proporcional a su absorbancia, se cumplen las ecuaciones (8.14) y (8.15). Sustituyendo estas expresiones de I_N y de I_{N_m} en las ecuaciones (8.45) a (8.50), posteriormente en la ecuación (8.44), y teniendo en cuenta las expresiones (8.5) y (8.6), se obtiene la siguiente ecuación:

p256
p256
p256
p256

$$\begin{aligned}
F(\lambda) = & \left[\sigma_N(\lambda)k_{rN} + \frac{\sigma_A(\lambda)k_{rA}k_{NA}}{k_A} \right] \frac{I_{i \in N}[C]_0}{(k_N+k_{NA}+k_{NT})} \frac{1}{(1+K[M])} + \\
& + \left[\sigma_{Nm}(\lambda)k_{rNm} + \frac{\sigma_{Am}(\lambda)k_{rAm}k_{NA_m}}{k_{Am}} + \frac{\sigma_{Tm}(\lambda)k_{rTm}k_{NTm}}{(k_{TAm}+k_{Tm})} + \frac{\sigma_{Am}(\lambda)k_{rAm}k_{TAm}k_{NTm}}{k_{Am}(k_{TAm}+k_{Tm})} \right] \cdot \\
& \frac{I_{i \in Nm}[C]_0}{(k_{Nm}+k_{NA_m}+k_{NTm})} \frac{K[M]}{(1+K[M])} + \\
& + \left[\sigma_T(\lambda)k_{rT}k_{NT} + \frac{\sigma_A(\lambda)k_{rA}k_{NT}k_{TA}}{k_A} \right] \frac{I_{i \in N}[C]_0}{(k_N+k_{NA}+k_{NT})(k_T+k_{TA})} \frac{1}{(1+E[M])(1+K[M])} + \\
& + \left[\frac{\sigma_{Tm}(\lambda)k_{rTm}k_{NT}}{(k_{TAm}+k_{Tm})} + \frac{\sigma_{Am}(\lambda)k_{rAm}k_{TAm}k_{NT}}{k_{Am}(k_{TAm}+k_{Tm})} \right] \frac{I_{i \in N}[C]_0}{(k_N+k_{NA}+k_{NT})} \frac{E[M]}{(1+E[M])(1+K[M])}
\end{aligned} \tag{8.51}$$

siendo:

$$E = \frac{k_{TTm}}{k_T + k_{TA}} \tag{8.52}$$

Esta expresión, agrupando los términos, es la indicada en la ecuación siguiente:

$$F(\lambda) = \frac{A_1(\lambda) + A_2(\lambda)E[M] + A_3(\lambda)(K[M] + KE[M]^2)}{1 + (K + E)[M] + KE[M]^2} \tag{8.53}$$

siendo:

$$A_1(\lambda) = \left[\sigma_N(\lambda)k_{rN} + \frac{\sigma_A(\lambda)k_{rA}k_{NA}}{k_A} + \frac{\sigma_T(\lambda)k_{rT}k_{NT}}{(k_T+k_{TA})} + \frac{\sigma_A(\lambda)k_{rA}k_{NT}k_{TA}}{k_A(k_T+k_{TA})} \right] \frac{I_{i \in N}[C]_0}{(k_N+k_{NA}+k_{NT})} \tag{8.54}$$

$$A_2(\lambda) =$$

$$\left[\sigma_N(\lambda)k_{rN} + \frac{\sigma_A(\lambda)k_{rA}k_{NA}}{k_A} + \frac{\sigma_{Tm}(\lambda)k_{rTm}k_{NT}}{(k_{Tm}+k_{TAm})} + \frac{\sigma_{Am}(\lambda)k_{rAm}k_{NT}k_{TAm}}{k_{Am}(k_{Tm}+k_{TAm})} \right] \frac{I_{i \in N}[C]_0}{(k_N+k_{NA}+k_{NT})} \tag{8.55}$$

$$\begin{aligned}
A_3(\lambda) = & \left[\sigma_{Nm}(\lambda)k_{rNm} + \frac{\sigma_{Am}(\lambda)k_{rAm}k_{NA_m}}{k_{Am}} + \frac{\sigma_{Tm}(\lambda)k_{rTm}k_{NTm}}{(k_{Tm}+k_{TAm})} + \frac{\sigma_{Am}(\lambda)k_{rAm}k_{NTm}k_{TAm}}{k_{Am}(k_{Tm}+k_{TAm})} \right] \\
& \frac{I_{i \in Nm}[C]_0}{(k_{Nm}+k_{NA_m}+k_{NTm})}
\end{aligned} \tag{8.56}$$

El modelo propuesto concuerda con el hecho de que el análisis de PCA de la serie de espectros de emisión hasta una concentración de 131 mM de SDeS indique tres componentes (figura 8.24). El ajuste global de la serie de espectros de emisión de fluorescencia hasta 131 mM de SDeS con este modelo es bueno según indican los residuos (ver C8_Ajuste9_7HCSDeS_emision.pdf en CD adjunto). Este ajuste permite obtener una constante K de $1500 \pm 500 \text{ M}^{-1}$, que no varía con la longitud de onda, un valor para la constante

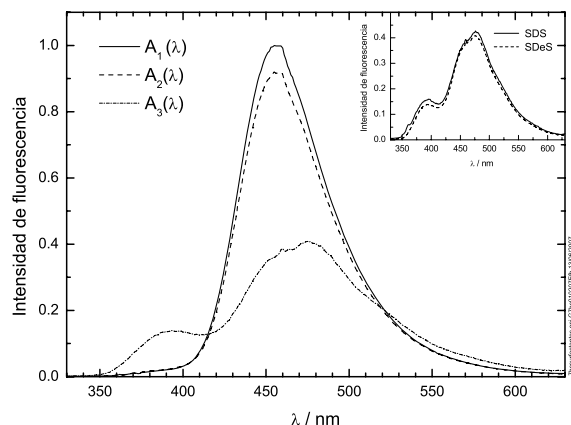


Figura 8.27: Espectros puros de emisión de fluorescencia corregidos de la 7-HC en SDeS obtenidos mediante el análisis global de la serie de espectros de emisión de la figura 8.8. En la gráfica insertada se comparan los espectros puros de la 7-HC en el interior de las micelas de SDeS $A_3(\lambda)$ con los obtenidos para la 7-HC en el interior de las micelas de SDS (figura 8.15).

E de $(1 \pm 3) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ y los espectros puros de la figura 8.27. El valor de esta constante E y la intensidad del espectro $A_2(\lambda)$ tienen mucho error ya que están muy correlacionados y a partir de este valor de E se obtendría para k_{TTm} un valor demasiado alto. El valor de la constante de equilibrio K es del orden de la obtenida a partir de la serie de espectros de absorción. Con esta constante de complejación para la concentración de SDeS más alta (de 0.0983 M) habría un 47% de 7-HC dentro de las micelas.

Los espectros puros obtenidos para los componentes $A_1(\lambda)$ y $A_2(\lambda)$ son muy similares y corresponden fundamentalmente al anión fuera de las micelas, especie de mayor contribución a la fluorescencia. El tercer espectro puro $A_3(\lambda)$, correspondiente a la 7-HC asociada a las micelas, indica que al introducirse la sonda en las micelas disminuye la intensidad de fluorescencia de la especie aniónica y que aumenta la intensidad de fluorescencia de la forma neutra y del tautómero, de forma análoga a lo que sucedía en el interior de las micelas de SDS. En la gráfica insertada en esta figura se comparan los espectros de emisión puros de la 7-HC en el interior de las micelas de SDeS, $A_3(\lambda)$, con los obtenidos para la 7-HC en el interior de las micelas de SDS. Se observa que ambos espectros de emisión son prácticamente idénticos, lo que pone de manifiesto una localización análoga de la 7-HC en las micelas de estos dos tensioactivos aniónicos y que los procesos de transferencia protónica fotoinducida que tienen lugar en el interior de las micelas son similares.

8.2 Tensioactivos catiónicos

Los tensioactivos catiónicos en los que se estudió el comportamiento fotofísico de la 7-HC fueron el DTAB y el CTAB.

8.2.1 Resultados

7-HC en DTAB.

Se midieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC con una concentración de cumarina constante en presencia de distintas concentraciones de DTAB, de 0 a 0.101 M, a pH 4.5 (figura 8.28). Se observa que la adición de DTAB produce sistemáticamente una disminución de la absorbancia a 320 nm (ver gráfica insertada en esta figura) y un desplazamiento del espectro hacia mayores longitudes de onda (responsable del aumento de la absorbancia a 360 nm con la concentración de DTAB). Sin embargo, a diferencia de los tensioactivos aniónicos, la adición de DTAB no modifica el valor de pH de la disolución de 7-HC.

Se registraron los espectros de excitación de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de una concentración de DTAB 0.148 M a diferentes longitudes de onda de emisión (figura 8.29). Se observa que estos espectros, una vez normalizados en el máximo, coinciden. En la gráfica insertada en esta figura se muestra que el espectro de excitación de la 7-HC en agua en

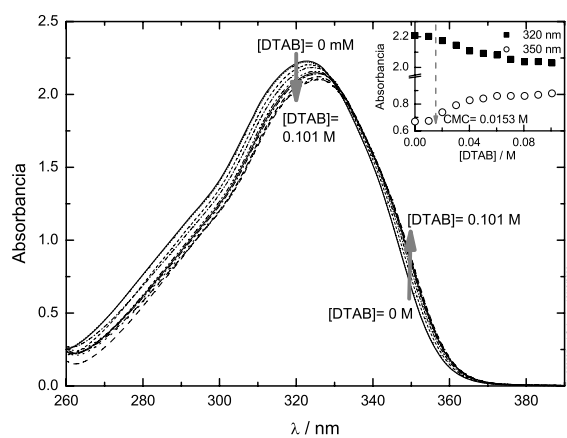


Figura 8.28: Espectros de absorción de la 7-HC ($1.85 \cdot 10^{-4}$ M) con DTAB de 0 a 0.101 M a pH 4.5. En la gráfica insertada se muestra la variación de la absorbancia con la concentración de DTAB a 320 y 360 nm.

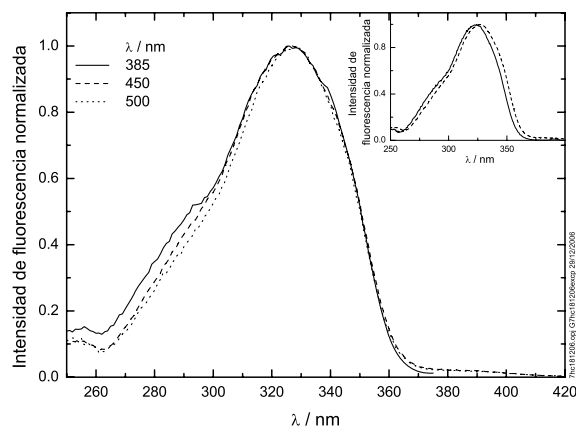


Figura 8.29: Espectros de excitación de la 7-HC ($4.46 \cdot 10^{-6}$ M) con una concentración de DTAB de 0.148 M a diferentes longitudes de onda de emisión normalizados en el máximo. En la gráfica insertada se comparan el espectro de excitación para una disolución acuosa de 7-HC con esta concentración de DTAB (línea discontinua) con el obtenido para una disolución de 7-HC en ausencia de DTAB (línea continua), ambos registrados a 450 nm y normalizados en el máximo.

presencia de DTAB está desplazado hacia mayor longitud de onda que el espectro obtenido en ausencia de DTAB. En los espectros de absorción de la 7-HC la presencia de DTAB producía el desplazamiento del espectro en esta misma dirección (figura 8.28).

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC a pH 4.5 en presencia de distintas concentraciones de DTAB, de 0 a 0.493 M (figura 8.30). Se observa que la banda del anión disminuye en intensidad y la de la especie neutra aumenta, pero no parece existir emisión debida al tautómero. En la gráfica insertada en esta figura se representa la variación de la intensidad de fluorescencia a 390 y 450 nm con la concentración de DTAB.

Se registró otra serie de espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de DTAB a pH 4.6 llegando a concentraciones de DTAB menos elevadas, de 0 a 0.104 M (figura 8.31). Para esta serie se observa claramente como, a concentraciones inferiores a la CMC del DTAB (0.0153 M), no se produce variación alguna en el espectro de emisión de la 7-HC.

También se registraron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de DTAB a distintas longitudes de onda de emisión (tablas 8.4 y 8.5). A 450 nm los ajustes son todos biexponenciales (tabla 8.4) con un tiempo corto (entre 1 y 0.8 ns) de amplitud negativa (tiempo de formación) y un tiempo largo cuyo

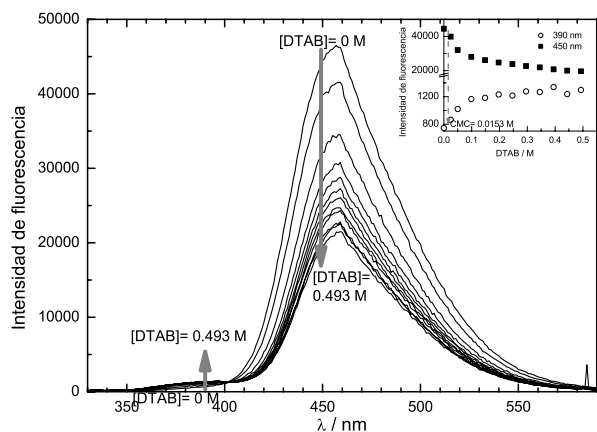


Figura 8.30: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC con concentraciones de DTAB de 0 a 0.493 M a pH 4.5. Longitud de onda de excitación: 320 nm. En la gráfica insertada se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a 390 y 450 nm con la concentración de DTAB.

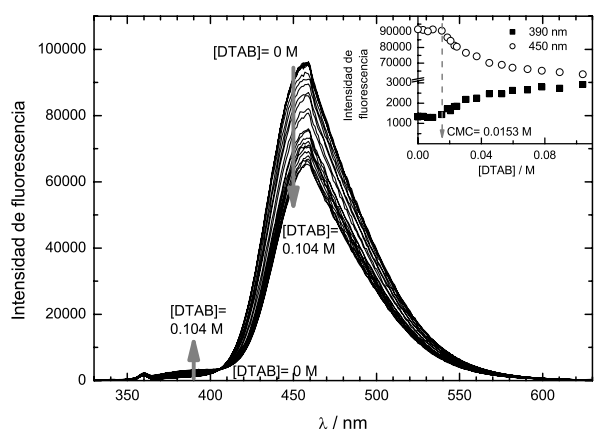


Figura 8.31: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC con concentraciones de DTAB de 0 a 0.104 M a pH 4.6. Longitud de onda de excitación: 320 nm. En la gráfica insertada se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a 390 y 450 nm con la concentración de DTAB.

valor aumenta a medida que se incrementa la concentración de DTAB. El valor del tiempo de formación parece disminuir ligeramente al aumentar la concentración de DTAB (tabla 8.5).

[DTAB] / mM	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$E_{n,1}$	$E_{n,2}$	χ^2
0	1.04±0.04	5.318±0.007	-0.007	0.020	1.04
20.3	0.96±0.04	5.426±0.007	-0.006	0.020	1.02
40.5	0.87±0.05	5.586±0.007	-0.005	0.019	1.00
49.3	0.92±0.05	5.626±0.007	-0.005	0.019	1.08
60.8	0.85±0.05	5.637±0.007	-0.005	0.019	1.07
81.0	0.83±0.06	5.679±0.007	-0.004	0.018	1.02
98.6	0.83±0.06	5.704±0.007	-0.004	0.019	1.03
101	0.81±0.06	5.710±0.007	-0.004	0.018	1.04
197	0.84±0.06	5.715±0.007	-0.004	0.019	0.927
296	0.90±0.07	5.666±0.007	-0.004	0.019	1.05
395	0.86±0.06	5.638±0.007	-0.004	0.019	1.06
493	1.1±0.1	5.607±0.008	-0.002	0.019	0.997

Tabla 8.4: Tiempos de vida disoluciones acuosas de 7-HC ($5.99 \cdot 10^{-6}$ M, pH 4.5) en presencia de distintas concentraciones de DTAB a la longitud de onda de emisión de 450 nm. Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un número fijo de cuentas en el máximo.

[DTAB] / mM	λ / nm	τ_1 / ns ($E_{n,1}$)	τ_2 / ns ($E_{n,2}$)	τ_3 / ns ($E_{n,3}$)	χ^2
10.27	390	0.227±0.007 (0.111)	0.99±0.05 (-0.013)	4.87±0.03 (0.002)	1.19
	450			5.364±0.008 (0.040)	1.09
	500			5.348±0.005 (0.035)	1.05
51.35	390	0.269±0.006 (0.193)	0.84±0.08 (-0.008)	4.80±0.06 (0.001)	1.09
	450			5.610±0.008 (0.036)	1.17
	500			5.646±0.006 (0.032)	1.13
102.7	390	0.264±0.004 (0.102)	0.63±0.06 (-0.010)	4.48±0.07 (0.000)	1.26
	450			5.696±0.008 (0.039)	1.13
	500			5.735±0.006 (0.037)	1.16

Tabla 8.5: Tiempos de vida de disoluciones acuosas de 7-HC ($5.99 \cdot 10^{-6}$ M, pH 4.5) en presencia de distintas concentraciones de DTAB a la longitud de onda de emisión λ . Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un valor fijo de cuentas en el máximo.

A 390 nm, además de un tiempo largo de muy pequeña contribución, se obtiene un tiempo corto mayoritario en torno a 0.2 ns. Cuando se mide la emisión a 500 nm, los decaimientos son monoexponenciales con un tiempo largo coincidente con el observado a 450 nm.

Por último se midió la conductividad de disoluciones acuosas de distintas concentraciones de DTAB (preparadas usando el método de dilución-extracción [Jover 90]), como se muestra en la figura 8.32. Se observa que la representación de la conductividad frente a la concentración de surfactante sigue una variación lineal hasta un valor de concentración de surfactante, a partir del cual la variación sigue siendo lineal pero con una recta con una pendiente menor. Se midió la conductividad de disoluciones de concentraciones de DTAB más altas, de hasta 0.5 M (ver gráfica insertada en esta figura) observándose una variación lineal de la conductividad con la concentración en todo el intervalo. En presencia de una concentración de 7-HC constante ($8.56 \cdot 10^{-5}$ M, similar a la empleada en las disoluciones de las que registramos los espectros de absorción) se observa el mismo comportamiento en la conductividad que sin 7-HC (véase la figura 8.32). Se comprobó también si la presencia de protones (a un valor de pH de 4.5) modifica la conductividad de disoluciones acuosas de este surfactante (DTAB), en presencia de la concentración de 7-HC indicada anteriormente, obteniéndose el mismo comportamiento en la conductividad (datos no presentados).

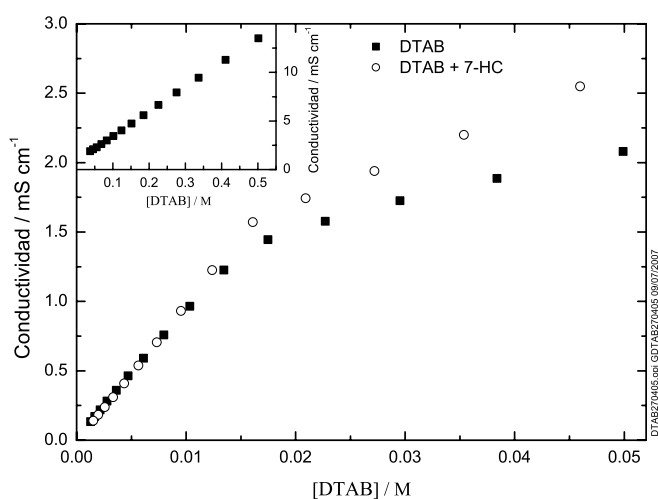


Figura 8.32: Representación de la conductividad de disoluciones acuosas de DTAB frente a la concentración de dicho tensioactivo (cuadrados). Los círculos representan la conductividad de disoluciones acuosas de DTAB frente a la concentración de dicho tensioactivo en presencia de una concentración de 7-HC constante, similar a la empleada en las disoluciones de las que registramos los espectros de absorción. En el gráfico insertado se muestra la variación de la conductividad de disoluciones acuosas con la concentración de DTAB hasta una concentración de DTAB de 0.501 M.

7-HC en CTAB.

Se registraron los espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de CTAB, de 0 a 0.202 M (figura 8.33). El valor de pH apenas varía con la adición de CTAB y pasa de un valor de 4.57 en ausencia de CTAB a un valor de 4.75 para la concentración de CTAB más alta. Al aumentar la concentración de CTAB se observa una disminución de la absorbancia a 320 nm (ver la gráfica insertada en la figura mencionada) y un desplazamiento del espectro hacia mayores longitudes de onda. También se produce un aumento de la absorbancia a 390 nm (donde en agua absorbe el anión de la 7-HC) hasta llegar a un máximo, a partir del cual la absorbancia disminuye lentamente.

También se registraron los espectros de excitación de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de una concentración de CTAB de 19.9 mM a diferentes longitudes de onda de emisión (figura 8.34) y se observó que, una vez normalizados en el máximo, coinciden. En la gráfica insertada en esta figura se observa que en presencia de CTAB se produce un ligero desplazamiento hacia mayores longitudes de onda del espectro de excitación respecto al obtenido para la 7-HC en disolución acuosa, así como la aparición de una pequeña banda a 390 nm.

Finalmente se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de CTAB, de 0 a 19.9 M (figura 8.35). El valor de pH de las disoluciones pasa de ser 4.59 sin CTAB a ser 4.81 a la concentración de CTAB máxima. Se observa que la banda de fluorescencia del anión disminuye en intensidad

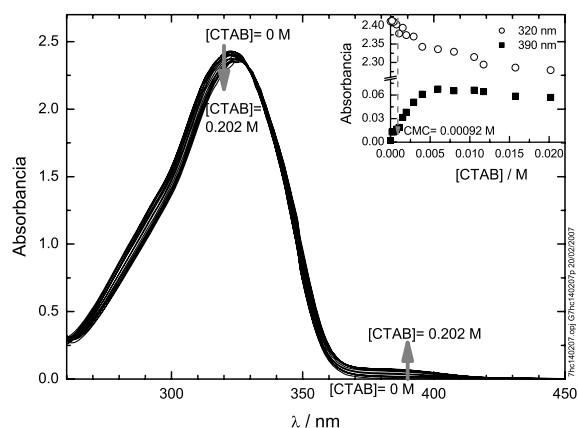


Figura 8.33: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC ($1.79 \cdot 10^{-4}$ M) con distintas concentraciones de CTAB de 0 a 0.202 M. La disolución sin CTAB tiene un valor de pH de 4.6. En la gráfica insertada se muestra la variación de la absorbancia con la concentración de CTAB a 320 y 390 nm.

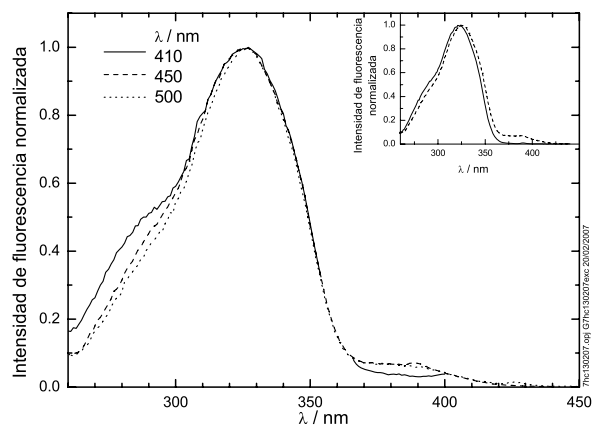


Figura 8.34: Espectros de excitación de disoluciones acuosas de 7-HC ($4.29 \cdot 10^{-7}$ M) con una concentración de CTAB de 19.9 mM a diferentes longitudes de onda de emisión normalizados en el máximo. El valor de pH de la disolución de 7-HC sin CTAB fue de 4.57. En la figura insertada se muestra a trazos el espectro de excitación de la 7-HC con CTAB 19.9 mM comparado con el espectro de excitación de la 7-HC en ausencia de CTAB, ambos registrados con 450 nm como longitud de onda de emisión y normalizados en el máximo.

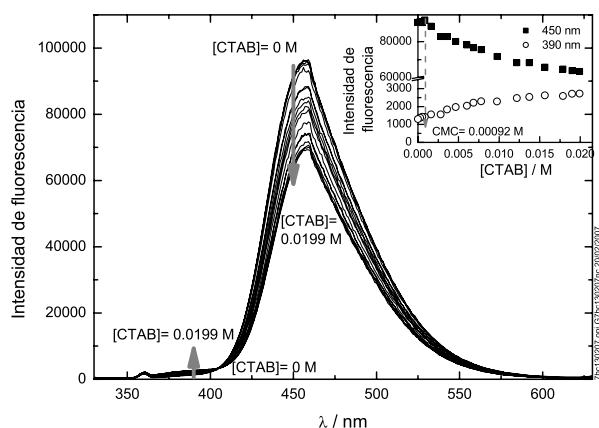


Figura 8.35: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC ($4.29 \cdot 10^{-7}$ M) con concentraciones de CTAB de 0 a 0.0199 M. El valor de pH fue de 4.59 para la disolución sin CTAB. Longitud de onda de excitación: 320 nm. En la gráfica insertada se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia de estos espectros a 380 y 450 nm frente a la concentración de CTAB.

y la de la especie neutra aumenta, pero no aparece emisión debida al tautómero. Tanto en absorción como en emisión, los cambios espectrales se observan a concentraciones superiores a la CMC del tensioactivo, de 0.92 mM.

8.2.2 Discusión

7-HC en DTAB.

p273

La coincidencia entre los espectros de excitación de la 7-HC con DTAB a distintas longitudes de onda de emisión (figura 8.29) indica que toda la fluorescencia de estas disoluciones proviene de la misma especie (o especies) en el estado fundamental. El desplazamiento hacia el rojo del espectro de excitación al añadir DTAB coincide con el observado en el espectro de absorción y puede ser atribuido, como en el caso de los tensioactivos aniónicos, a la asociación de la 7-HC con las micelas de DTAB.

p272

Así, los resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de la 7-HC a distintas concentraciones de DTAB (figura 8.28) indican la presencia de dos componentes (figura 8.36) en algunos de los criterios: autovectores frente a concentración de micelas, error medio, Durbin Watson obtenido como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas y residuos frente a la concentración de micelas. Sin embargo, los restantes criterios indican un mayor número de componentes debido a los artefactos inherentes a esta técnica de medida.

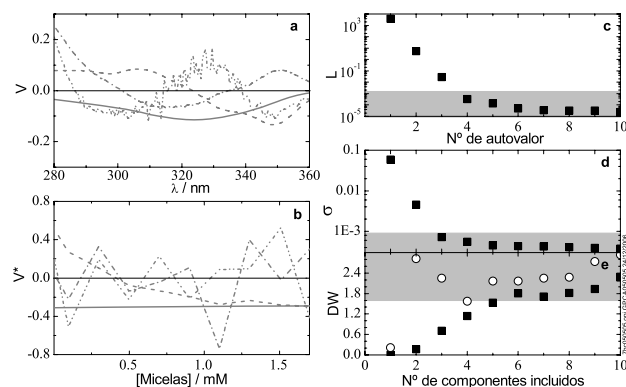


Figura 8.36: Resultados de PCA de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en disolución acuosa a distintas concentraciones de DTAB (de 0 a 0.101 M). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (— —), tercero (— · —) y cuarto (· · —); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

Por tanto, el modelo que se propone, al igual que para los surfactantes aniónicos, es un equilibrio de la 7-HC entre la forma libre y ésta en el interior de las micelas (figura 8.13), dado por la ecuación (5.6). El ajuste global de la serie de espectros de absorción con este modelo conduce a residuos aleatorios (ver C8_Ajuste10_7HCDTAB_absorcion.pdf en CD adjunto). Este ajuste permite obtener los espectros de absorción puros de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de DTAB, que se muestran en la figura 8.37. El valor de la constante de complejación obtenida fue $2000 \pm 600 \text{ M}^{-1}$.

p252

p99

El análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de 7-HC a diferentes concentraciones de DTAB hasta 0.493 M de DTAB es el mostrado en la figura 8.38. La representación del estadístico de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas indicaría dos componentes, si bien el valor de este parámetro aumenta aún al incluir el tercer componente. El gráfico de los autovalores, el del error medio y el Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda indican tres componentes. La representación de los autovectores frente a la longitud de onda indica al menos tres componentes y la representación de los autovectores frente a la concentración de micelas indica al menos cuatro componentes. Por tanto, no está claro el número de componentes presente hasta concentraciones de DTAB tan altas. A estos valores altos de concentración de tensioactivo podría producirse una variación del tipo de micelas respecto al obtenido a concentraciones bajas de surfactante, bien de tamaño o bien de forma, como se observaba en los tensioactivos aniónicos.

Sin embargo, el análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de 7-HC diferentes concentraciones de DTAB, llegando hasta concentraciones de DTAB no muy altas, concretamente hasta un valor de 0.104 M de DTAB (figura 8.31) indica dos

p274

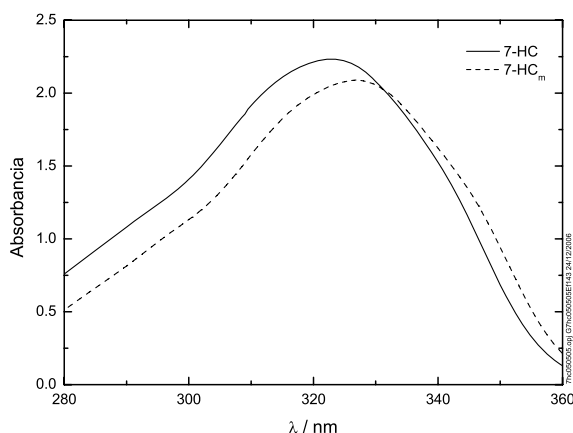


Figura 8.37: Espectros puros de absorción de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de DTAB, obtenidos mediante análisis global de la serie de espectros de absorción.

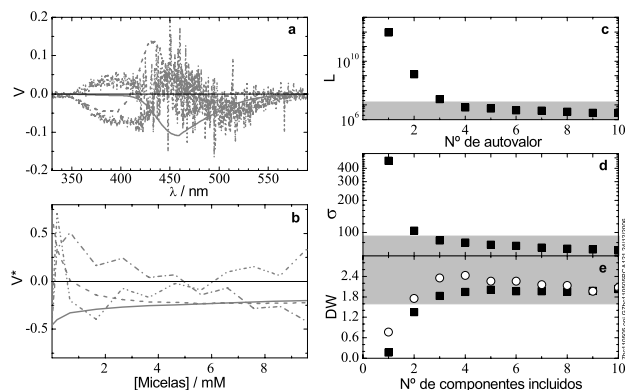


Figura 8.38: Resultados de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC en disolución acuosa a distintas concentraciones de DTAB: de 0 a 0.493 M de DTAB (figura 8.30). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

componentes, como se puede ver en las gráficas de la figura 8.39. La mayoría de los criterios indican dos componentes: autovalores, error medio y los dos estadísticos de Durbin Watson, aunque los autovectores, tanto frente a longitud de onda como frente a la concentración de micelas, podrían indicar todavía una pequeña contribución de un tercer componente.

Por tanto, se concluye que los cambios en el espectro de emisión de la 7-HC con la concentración de DTAB se pueden explicar mediante un equilibrio entre la 7-HC en disolución acuosa y la 7-HC en el interior de las micelas de DTAB en el estado fundamental (figura 8.13), siempre que se limite el intervalo de concentraciones analizado a aquél donde la concentración de micelas se puede obtener a partir de los valores de CMC y número de agregación de la bibliografía. La función de ajuste correspondiente a este modelo viene dado por la ecuación (5.15). Los ajustes globales de las series de espectros de emisión (hasta una concentración máxima de DTAB de 0.1 M) con este modelo son satisfactorios y conducen a residuos aleatorios (ver C8_Ajuste11_7HCDTAB_emision_Serie1.pdf y C8_Ajuste12_7HCDTAB_emision_Serie2.pdf en el CD adjunto). En la figura 8.40 se representan los espectros puros de emisión, obtenidos como media de los obtenidos en los ajustes de dos series concordantes de espectros de emisión que se muestran en los archivos indicados en la tabla 8.6. El espectro puro de la 7-HC libre coincide con el obtenido para la 7-HC en disolución acuosa, confirmando la validez del análisis realizado. El espectro correspondiente a la 7-HC en el interior de las micelas de DTAB indica que dentro de las micelas la banda

p252

p101

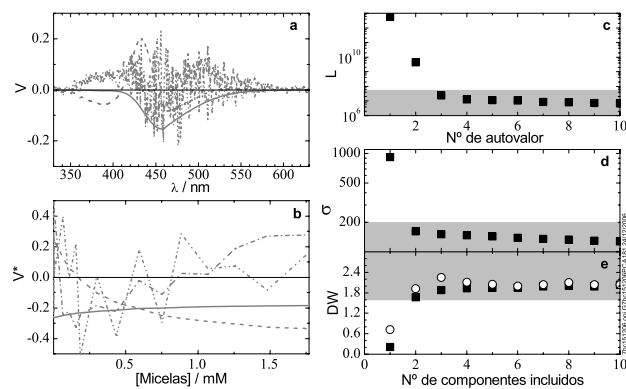


Figura 8.39: Resultados de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC en disolución acuosa a distintas concentraciones de DTAB: de 0 a 0.104 M (figura 8.31). Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (-·-) y cuarto (·-·-); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

Serie	K / M^{-1}	Archivo
1	2400 ± 200	C8_Ajuste11_7HCDTAB_emision_Serie1.pdf
2	2100 ± 200	C8_Ajuste12_7HCDTAB_emision_Serie2.pdf
Media	2300 ± 100	

Tabla 8.6: Valores de la constante de equilibrio obtenida para disoluciones acuosas de 7-HC en micelas de DTAB. Se obtuvo experimentalmente a partir del análisis global de series de espectros de fluorescencia a distintas concentraciones de DTAB, siendo la concentración de DTAB máxima empleada 0.10 M.

del anión disminuye de intensidad, aumentando en cambio la banda de la 7-HC neutra. Sin embargo, no parece formarse tautómero dentro de las micelas de DTAB. Los valores de la constante de equilibrio obtenidos para las dos series hasta 0.10 M de DTAB se muestran en la tabla 8.6, así como el valor medio de ambos. Se comprueba que este resultado concuerda con el obtenido a partir de los espectros de absorción ($K = 2000 \pm 600 M^{-1}$), lo cual apoya el modelo propuesto. Con esta constante de equilibrio y para una concentración de DTAB 0.1 M, un 80 % de la 7-HC estaría dentro de las micelas.

En cuanto a la interpretación de los tiempos de vida de la 7-HC con DTAB el modelo a aplicar es, a priori, el mismo que para la asociación de 7-HC con micelas de SDS, mostrado en la figura 8.16. Así, tanto en disolución acuosa como en el interior de las micelas se

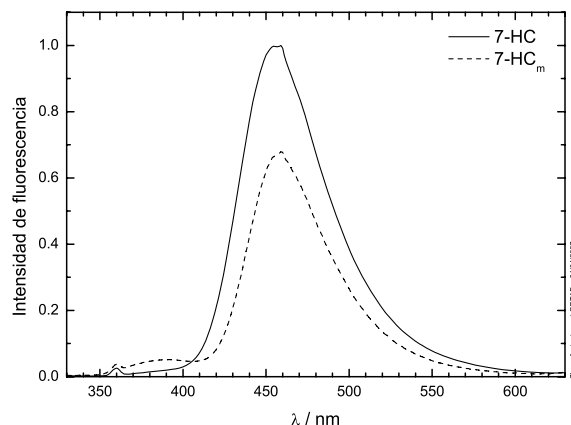


Figura 8.40: Espectros puros de emisión de fluorescencia corregidos de la 7-HC en disolución acuosa y dentro de las micelas de DTAB resultantes del análisis global analizando los datos obtenidos hasta una concentración de DTAB de 0.10 M para dos series de espectros de emisión.

proponen procesos de fototautomerización y de disociación de la especie neutra excitada y de disociación del tautómero para dar anión. Esto lleva a la existencia de seis tiempos de vida diferentes, ecuaciones (8.32) a (8.43), según la longitud de onda de emisión y la concentración de DTAB. Como en el caso del SDS, es obvio que estos tiempos no se pueden resolver teniendo en cuenta que pueden ser muy similares y que, en algunos caso, tienen muy poca contribución. De hecho, todos los decaimientos registrados pueden ajustarse satisfactoriamente con un modelo biexponencial.

p258
p259

Se observa que a 390 nm y por debajo de la CMC (dato de 10 mM de DTAB en la tabla 8.5) se obtiene mayoritariamente un tiempo de vida muy corto, $\tau_1(390 \text{ nm})$, de unos 0.2 ns, que debe asignarse al tiempo de vida de la especie neutra fuera de las micelas de DTAB al coincidir con los valores obtenidos para este tiempo en disolución acuosa (tabla 7.1). En presencia de micelas, este tiempo aumenta ligeramente a 0.26 ns debido a la contribución de la especie neutra en el interior de las micelas N_m^* , que debe tener un valor algo mayor que N^* . Sin embargo, el tiempo de vida de la especie neutra dentro de las micelas de DTAB debe ser menor que el que presenta dentro de las micelas de SDS, lo que indica que la suma de constantes de velocidad correspondiente a este tiempo ($k_{N_m} + k_{NT_m} + k_{NA_m}$) es mayor que la obtenida dentro de las micelas de SDS, lo que sería explicable con un mayor valor de k_{NA_m} en el caso de las micelas de DTAB. Es razonable pensar que esto es así ya que no se observa tautómero dentro de las micelas de DTAB, por lo que la constante de velocidad de tautomerización k_{NT_m} no debe ser responsable de este menor tiempo de vida. Se obtiene además a esta longitud de onda un tiempo de vida, $\tau_3(390 \text{ nm})$ de unos 5 ns con muy poca contribución, que debe corresponder al tiempo de vida del anión al tener éste una pequeña contribución a la emisión a esta longitud de onda.

p275
p195

A 450 nm (tabla 8.4 y figura 8.41) según los espectros puros de estado estacionario sería de esperar observar una combinación de la emisión del anión fuera y dentro de las micelas de DTAB, y sólo la del anión fuera de las micelas cuando la concentración de DTAB es inferior a la CMC. Por tanto, se espera obtener un tiempo de vida correspondiente al anión y un tiempo de formación debido al proceso de disociación del tautómero para dar anión. Experimentalmente se observa que el ajuste de los decaimientos a dos exponenciales es suficiente. Sin embargo, los tiempos de vida obtenidos no son constantes con la concentración de micelas, como se observa en la figura 8.41. En esta figura se representan sólo los datos obtenidos hasta 0.101 M de DTAB, ya que a partir de esta concentración la variación no obedece a la esperada para el mecanismo propuesto y en los datos de fluorescencia en estado estacionario se observaban tres componentes. El tiempo de formación disminuye de 1.1 ns fuera de las micelas hasta un valor de 0.8 ns a concentraciones altas de DTAB. El tiempo de vida del anión aumenta de unos 5.3 ns fuera de las micelas a un valor de unos 5.7 ns a concentraciones de DTAB cercanas a 0.10 M. La disminución del tiempo de formación al aumentar la concentración de DTAB indica que $(k_{TA} + k_T) < (k_{TA_m} + k_{T_m})$. Si el tiempo de vida del tautómero dentro de las micelas no varía respecto al obtenido en disolución acuosa o es mayor, como ocurre con los restantes tiempos de vida de la 7-HC en el interior de las micelas, se cumpliría que $(k_{T_m} \leq k_T)$ y entonces se deduce que $(k_{TA_m} > k_{TA})$. Esto indicaría que el proceso de formación de anión a partir de tautómero dentro de las micelas es más rápido que fuera de las micelas, lo que es razonable ya que no se observa tautómero dentro de las micelas de DTAB, por lo que rápidamente se forma anión.

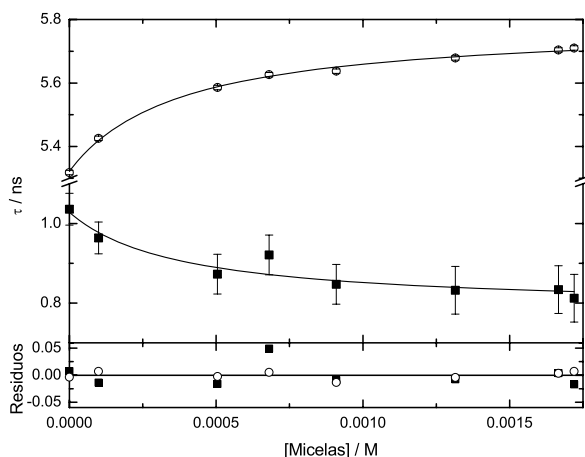


Figura 8.41: Representación de los tiempos de vida de fluorescencia registrados a 450 nm para disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de DTAB hasta 0.1 M (tabla 8.4). Las curvas resultan del ajuste global con la ecuación A2.8 como se indica en el texto. En la gráfica inferior se representan los residuos correspondientes a este ajuste.

Los tiempos de vida de fluorescencia experimentales registrados a 450 nm de disoluciones acuosas de una concentración constante de 7-HC y distintas concentraciones de DTAB hasta 0.101 M de DTAB indicados en la tabla 8.4 y representados en la figura 8.41 frente a la concentración de micelas de DTAB no son constantes. Cada uno de estos tiempos de vida es el promedio de dos tiempos de vida, los que presentan cada una de las dos especies de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de DTAB. Estos dos tiempos de vida se ajustaron globalmente con un modelo dado por la ecuación (A2.8), con una constante aparente K_{ap} como parámetro global (véase explicación en el apéndice 2) y ponderando los tiempos de vida por su error (figura 8.41). Este ajuste es bueno y el valor de la constante K_{ap} obtenido, $2700 \pm 300 \text{ M}^{-1}$, no es exactamente el valor de la constante de equilibrio, aunque es próximo en este caso. Los cuatro tiempos de vida límite obtenidos en este ajuste fueron: $\tau_1 = 1.03 \pm 0.03$, correspondiente al tiempo de formación en disolución acuosa $(k_{TA} + k_T)^{-1}$; $\tau_2 = 0.79 \pm 0.03$, correspondiente a este tiempo de formación en el interior de las micelas $(k_{TA_m} + k_{T_m})^{-1}$; $\tau_3 = 5.322 \pm 0.007$, correspondiente al tiempo de vida del anión en disolución acuosa; y $\tau_4 = 5.79 \pm 0.01$, correspondiente al tiempo de vida del anión dentro de las micelas de DTAB.

A continuación hemos realizado un ajuste global de los decaimientos de fluorescencia a 450 nm (con amplitudes normalizadas por haber sido medidos con un número fijo de cuentas en el máximo) a distintas concentraciones de DTAB fijando los cuatro tiempos de vida límites obtenidos en el ajuste anterior pero con amplitudes libres. Los residuos obtenidos indican que el ajuste con este modelo es bueno (ver C8_Ajuste13_7HCDTAB_tiemposdevida_conc.pdf en CD adjunto). En la figura 8.42 se muestran las amplitudes obtenidas en este ajuste para cada uno de los cuatro tiempos. Tomando las amplitudes correspondientes a los tiempos de vida del anión en agua y del anión en el interior de las micelas, se realizó un ajuste global con las ecuaciones (A1.26) y (A1.27) como funciones de ajuste (ya que las amplitudes obtenidas están normalizadas). El ajuste es satisfactorio, como se puede ver en la figura 8.42, y da como resultado un valor para Kq de $3500 \pm 600 \text{ M}^{-1}$ (no muy lejano al valor de K_{ap} obtenido $2700 \pm 300 \text{ M}^{-1}$). Teniendo en cuenta el valor de q estimado a partir de los espectros puros de estado estacionario de la figura 8.40 ($q = 1.31$), se estimó un valor para la constante de equilibrio K de 2600 M^{-1} . Este valor coincide bien con el valor de $2300 \pm 100 \text{ M}^{-1}$ determinado a partir de las series de espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario.

La tabla 8.5 muestra que a 500 nm y a concentraciones bajas de DTAB aparece el tiempo de vida cercano al del anión fuera de las micelas, que aumenta al aumentar la concentración de DTAB, lo que está en concordancia con los resultados anteriores de que el tiempo de vida del anión dentro de las micelas de DTAB es mayor que el que presenta esta especie en disolución acuosa. Los valores obtenidos ponen de manifiesto, además, que no hay emisión relevante del tautómero en el interior de las micelas de DTAB.

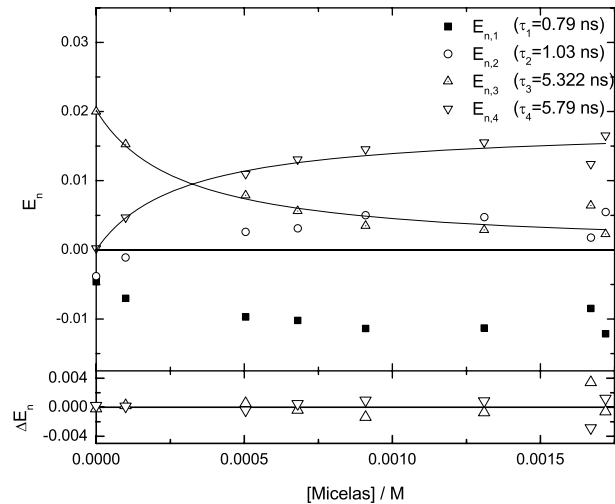


Figura 8.42: Representación frente a la concentración de micelas de las amplitudes de los tiempos de vida de fluorescencia resultantes del ajuste global con cuatro exponenciales de tiempos fijos a los decaimientos de fluorescencia registrados a 450 nm de la 7-HC en disolución acuosa de DTAB hasta 0.101 M de DTAB. Las curvas resultan del ajuste global de las ecuaciones A1.26 y A1.27 a los valores de las amplitudes del anión fuera y dentro de las micelas. La gráfica inferior muestra los residuos del ajuste.

Por último discutiremos los resultados de las medidas de conductividad de disoluciones acuosas con diferentes concentraciones de DTAB de la figura 8.32. Por debajo de la CMC del surfactante, la adición de éste causa un incremento en el número de transportadores de carga (iones bromuro y dodeciltrimetilamonio) y, en consecuencia, un aumento en la conductividad. Por encima de la CMC, la adición de surfactante aumenta la concentración micelar mientras que la concentración de monómero permanece aproximadamente constante (en el valor correspondiente a la CMC). Dado que una micela es mucho más grande que un monómero de surfactante, ésta se mueve más lentamente a través de la disolución a pesar de su mayor carga y, por tanto, es un transportador de carga menos eficiente. Por tanto, cabría esperar que la representación de la conductividad frente a la concentración de surfactante siguiese dos líneas rectas (donde la obtenida a concentraciones de surfactante menores que la CMC pasa por el origen de coordenadas, ya que la conductividad del agua desionizada empleada es prácticamente cero) que se cortan a una concentración de surfactante que corresponde a la CMC de éste, siendo la pendiente de la recta obtenida a concentraciones mayores que la CMC menor que la pendiente de la primera recta.

El comportamiento expuesto en el párrafo anterior se cumple para la conductividad de disoluciones acuosas de distintas concentraciones de DTAB, como se muestra en la figura 8.43. La CMC así obtenida para el DTAB es 0.0152 ± 0.0004 M, que está en muy buena concordancia

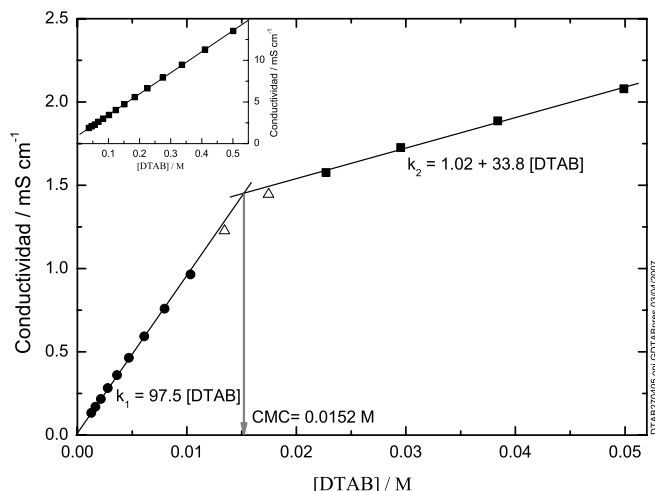


Figura 8.43: Determinación de la CMC por conductividad de un tensioactivo iónico (del DTAB). En el gráfico insertado se muestra que la variación de la conductividad por encima de la CMC es lineal al menos hasta una concentración de DTAB de 0.501 M.

cia con el valor de la bibliografía considerado en este trabajo, 0.0153 M según [Hiemenz 97]. Se comprobó que la variación de la conductividad con la concentración de DTAB por encima de la CMC es lineal, al menos hasta una concentración de DTAB de 0.5 M (véase la gráfica insertada en dicha figura), por lo que la posible variación de número de agregación y/o de forma de las micelas de DTAB a concentraciones superiores a 0.1 M, observada en las medidas de fluorescencia, no se pone de manifiesto en la conductividad. Este resultado lleva a plantear que el tercer componente detectado en los espectros de emisión a concentraciones altas de tensioactivo puede ser debido, más bien, a una impureza presente en dicho tensioactivo.

En presencia de una concentración de 7-HC constante se observó el mismo comportamiento en la conductividad de disoluciones acuosas de DTAB y la CMC obtenida, 0.0160 ± 0.0005 M, indica que la presencia de una concentración de 7-HC, similar a la empleada en las disoluciones de las que registramos los espectros de absorción no modifica el valor de la CMC del DTAB (datos no presentados) [Hiemenz 97].

Se comprobó también que la presencia de protones procedentes de ácido perclórico correspondientes a un pH de 4.5 no modifica la CMC de este surfactante (DTAB), en presencia de la misma concentración de 7-HC que antes, obteniéndose el mismo comportamiento en la conductividad que el indicado anteriormente y una CMC similar a las anteriores, de 0.0147 ± 0.0004 M (datos no presentados).

7-HC en CTAB.

Los espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de CTAB, de 0 a 0.0202 M, a pH 4.6 (figura 8.33) muestran que a altas concentraciones de CTAB aparece la banda de absorción del anión de la 7-HC, ya que se comprobó que el CTAB no absorbe en este intervalo de longitudes de onda. El hecho de que aparezca esta banda podría explicarse debido a la disminución del pK_a de la 7-HC en el interior de las micelas de CTAB, de modo similar al que se produce para un derivado de la 7-HC con una larga cadena parafínica en la posición 4 ($-C_{11}H_{23}$) [Fernández 77]. Comparado con los espectros de absorción de la 7-HC a diferentes valores de pH, el espectro de absorción de la 7-HC en presencia de una concentración de CTAB 20.2 mM tiene una proporción de anión similar al de pH 6.74 en disolución acuosa, que supone un porcentaje de 9.5% de anión en la muestra. Por tanto, la presencia del anión no se ha tenido en cuenta en el análisis de los datos, considerando además que, a la longitud de onda de excitación utilizada, la especie neutra absorbe mucho más que el anión.

p277

El análisis de PCA de los espectros de absorción en el intervalo hasta 350 nm, para evitar la banda del anión, indica dos componentes en los criterios frente a la concentración de micelas (figura 8.44): autovectores frente a la concentración de micelas y Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas.

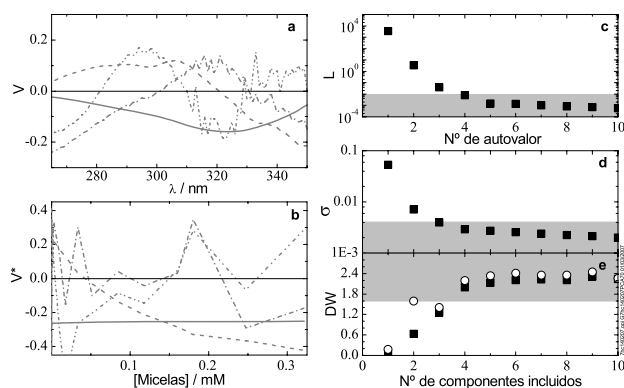


Figura 8.44: Resultados de PCA de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en disolución acuosa a distintas concentraciones de CTAB (de 0 a 20.19 mM) en el intervalo espectral de 265 a 350 nm. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (— —), tercero (— · —) y cuarto (· · —); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

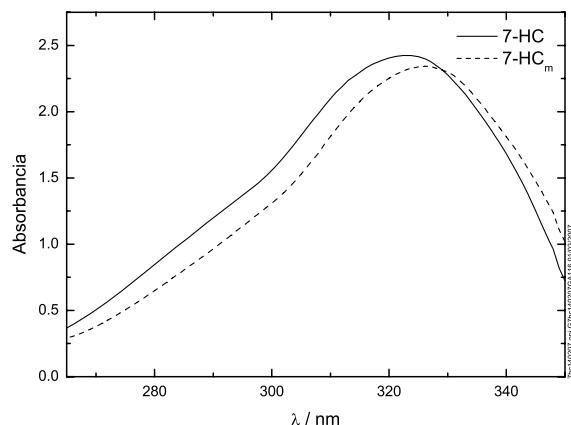


Figura 8.45: Espectros puros de absorción de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de CTAB obtenidos mediante ajuste global de la serie de espectros de absorción entre 265 y 350 nm.

Dado que el comportamiento es similar a los anteriores tensioactivos, se propone el mismo modelo para este sistema que el utilizado en el caso del DTAB (figura 8.13), dado por la ecuación (5.6). Los residuos del ajuste global con este modelo son totalmente aleatorios (ver C8_Ajuste14_7HCDTAB_absorcion.pdf en CD adjunto). Este ajuste permitió obtener los espectros de absorción de la 7-HC en disolución acuosa y dentro de las micelas de CTAB (figura 8.45) y un valor para la constante de equilibrio K de $11500 \pm 3000 \text{ M}^{-1}$.

El mismo comportamiento se observa en los espectros de emisión de fluorescencia. El análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de 7-HC a diferentes concentraciones de CTAB de la figura 8.35 es el mostrado en la figura 8.46. Todos los criterios de PCA indican dos componentes. Para esta serie de espectros de emisión se propuso también el modelo de la figura 8.13, dado por la ecuación (5.15). El ajuste global con este modelo conduce a residuos aleatorios para las dos series analizadas que indican que el ajuste es bueno (ver C8_Ajuste15_7HCCTAB_emision_Serie1.pdf y C8_Ajuste16_7HCCTAB_emision_Serie2.pdf en CD adjunto). Como resultado del ajuste se obtuvieron los espectros puros de emisión de fluorescencia de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de CTAB (en la figura 8.47 se muestran los espectros medios resultantes de las dos series analizadas que se presentaban con resultados concordantes. Se observa que dentro de las micelas de CTAB aumenta la fluorescencia de la 7-HC neutra y disminuye la fluorescencia del anión, pero no se observa formación del tautómero. Las constantes de equilibrio obtenidas para estas dos series se indican en la tabla 8.7, así como el valor medio de las mismas. El valor que se obtiene para esta constante no coincide con el obtenido a partir de los espectros de absorción, si bien éste estaba afectado de un gran error debido a las pequeñas variaciones registradas. Una de las posibles causas de esta falta de concordancia es no haber tenido la formación de anión en el estado fundamental cuando la 7-HC se introduce

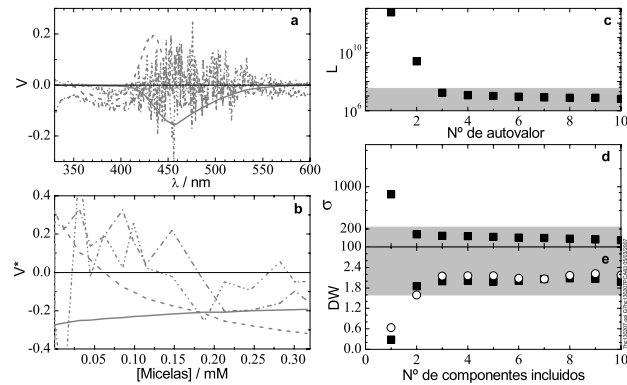


Figura 8.46: Resultados de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC en disolución acuosa a distintas concentraciones de CTAB, de 0 a 20.19 mM. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (---) y cuarto (---); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

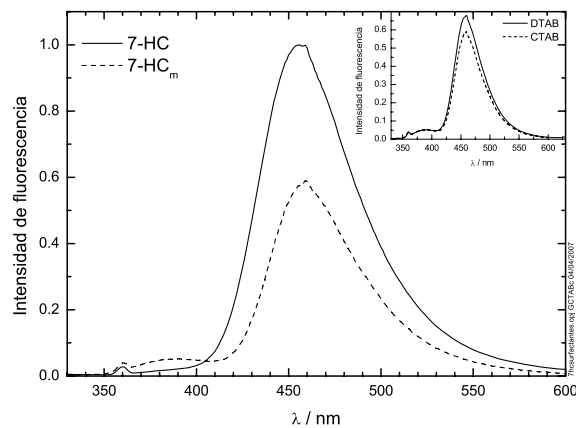


Figura 8.47: Espectros de emisión de fluorescencia corregidos de la 7-HC en disolución acuosa y dentro de las micelas de CTAB. En la gráfica insertada se compara el espectro puro de emisión de la 7-HC dentro de las micelas de CTAB con el obtenido dentro de las micelas de DTAB.

en el interior de las micelas. Para una concentración de CTAB de 15.3 mM y la constante de equilibrio obtenida como media de las dos series se calcula que el 57% de la 7-HC está dentro de las micelas. En el gráfico insertado en la figura 8.47 se compara el espectro de la 7-HC dentro de las micelas de CTAB con el obtenido dentro de las micelas de DTAB.

Serie	$[CTAB]_{max}$ (mM)	K (M ⁻¹)	Archivo
1	19.9	5300 ± 500	C8_Ajuste15_7HCCTAB_emision_Serie1.pdf
2	14.3	6000 ± 3000	C8_Ajuste16_7HCCTAB_emision_Serie2.pdf
Media	-	5000 ± 1000	

Tabla 8.7: Valores de la constante de equilibrio de asociación de la 7-HC con las micelas de CTAB. Se obtuvo experimentalmente a partir del análisis global de series de espectros de fluorescencia a distintas concentraciones de CTAB, siendo $[CTAB]_{max}$ la concentración de CTAB máxima empleada en cada serie de medidas. La columna indicada como archivo indica el archivo en el que se muestran los resultados del análisis global en el CD adjunto.

Se observa que el espectro de la 7-HC dentro de los dos tipos de micelas tiene la misma contribución de especie neutra, aunque hay un poco menos de anión dentro de las micelas de CTAB.

8.3 Tensioactivos no iónicos

Se estudió el comportamiento fotofísico de la 7-HC en presencia de dos tensioactivos de este tipo: el Brij 35 y el Triton X-100.

8.3.1 Resultados

7-HC en Brij 35.

En primer lugar se midieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas con una concentración constante de 7-HC y diferentes concentraciones de Brij 35, de 0 a 24.9 mM (véase la figura 8.48). Las variaciones producidas en el espectro de absorción son pequeñas pero sistemáticas con la concentración de tensioactivo (ver gráfica insertada en esta figura). Se produce una disminución de la absorbancia y un ligero desplazamiento del espectro de absorción hacia mayores longitudes de onda al aumentar la concentración de Brij 35 por encima del valor de su CMC (0.080 mM). En este caso la adición de Brij 35 no modifica el pH de la disolución.

Se midieron los espectros de excitación de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de una concentración de Brij 35 de 21.0 mM a pH 4.95 a distintas longitudes de onda de emisión (figura 8.49), obteniéndose espectros coincidentes una vez normalizados en el máximo. En la gráfica insertada en esta figura se comparan los espectros de excitación de la 7-HC obtenidos

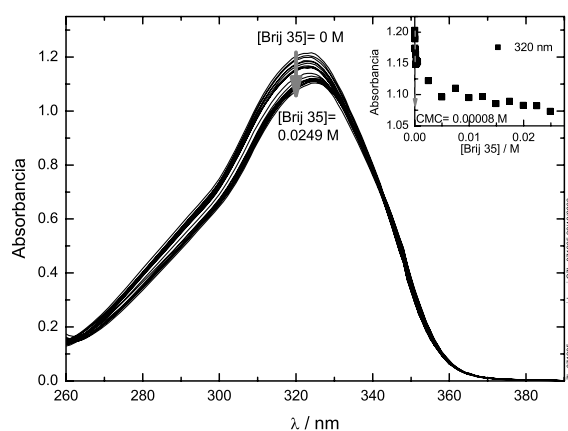


Figura 8.48: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC ($0.996 \cdot 10^{-4}$ M) a pH 4.5 con diferentes concentraciones de Brij 35, de 0 a 0.0249 M. En la gráfica insertada se muestra la variación de la absorbancia a 320 nm con la concentración de Brij 35.

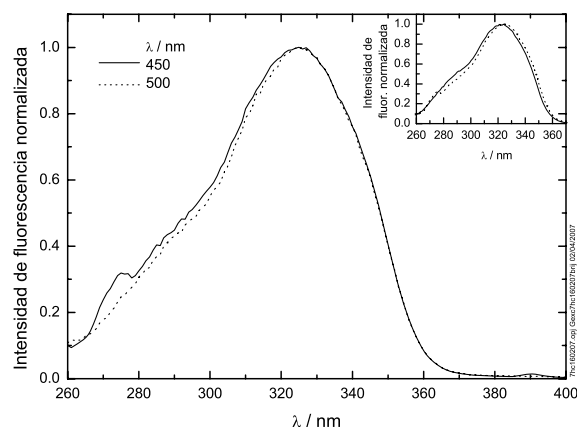


Figura 8.49: Espectros de excitación de disoluciones acuosas de 7-HC ($4.29 \cdot 10^{-7}$ M) a pH 4.95 a diferentes longitudes de onda de emisión con una concentración de Brij 35 de 21.0 mM. En la gráfica insertada se comparan los espectros de excitación de disoluciones acuosas de 7-HC obtenidos a 450 nm sin Brij 35 (línea continua) y con una concentración de Brij 35 de 21.0 mM (línea discontinua).

a 450 nm sin y con una concentración de Brij 35 de 21.0 mM. Se observa que este Brij produce un ligero desplazamiento del espectro de excitación hacia mayores longitudes de onda, es decir, en la misma dirección en que se desplaza el espectro de absorción de la 7-HC tras la adición de Brij 35. Este desplazamiento es inferior al registrado para los tensioactivos aniónicos y catiónicos.

También se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de Brij 35 (figura 8.50). En estos espectros (y en la gráfica inferior insertada en esta figura) se observa que al aumentar la concentración de Brij 35 por encima de la CMC disminuye la fluorescencia de la banda presente a 450 nm, pero aumenta la fluorescencia de la banda a 390 nm. En la gráfica superior insertada en esta figura se representan los espectros de emisión normalizados en el máximo y se observa que al aumentar la concentración de Brij 35 aumenta también la intensidad de fluorescencia relativa del tautómero (en la zona en torno a 500 nm).

Finalmente, se midieron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC en presencia de distintas concentraciones de Brij 35. Los resultados de los análisis individuales de estos decaimientos se resumen en la tabla 8.8 y se representan en la figura 8.51 en función de la concentración de Brij 35.

A 390 nm se obtiene un tiempo de vida corto mayoritario, τ_1 (390 nm), cuyo valor aumenta al incrementar la concentración de Brij 35. También aparece un tiempo de vida de unos 5.4 ns, τ_3 (390 nm), con muy poca contribución.

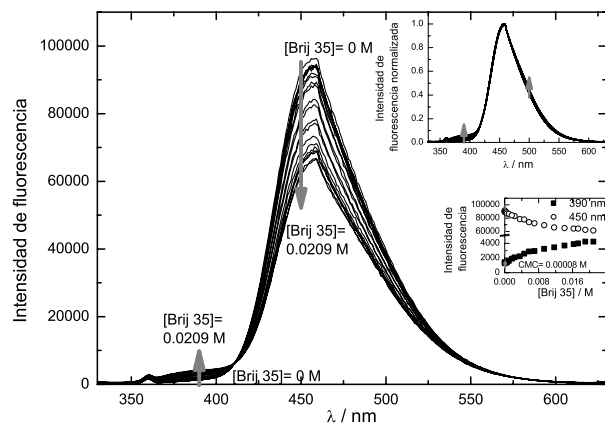


Figura 8.50: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC a pH 4.5 con diferentes concentraciones de Brij 35, de 0 a 0.0209 M. Longitud de onda de excitación: 320 nm. En la gráfica insertada superior se muestran los espectros de emisión normalizados en el máximo. En la gráfica insertada inferior se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de Brij 35 a 390 y 450 nm.

[Brij 35] / mM	λ / nm	τ_1 / ns ($E_{n,1}$)	τ_2 / ns ($E_{n,2}$)	τ_3 / ns ($E_{n,3}$)	χ^2
0.0306	390	0.274 ± 0.008 (0.089)		4.99 ± 0.03 (0.002)	1.13
	450		1.11 ± 0.04 (-0.006)	5.374 ± 0.008 (0.017)	1.01
	500			5.340 ± 0.005 (0.014)	1.02
2.55	390	0.459 ± 0.006 (0.057)		4.99 ± 0.04 (0.001)	1.08
	450		1.16 ± 0.04 (-0.005)	5.483 ± 0.009 (0.016)	1.09
	500			5.435 ± 0.006 (0.016)	1.10
5.12	450		1.29 ± 0.05 (-0.005)	5.556 ± 0.008 (0.017)	1.05
	500			5.470 ± 0.004 (0.431)	1.05
20.5	390	0.526 ± 0.003 (0.054)		4.83 ± 0.05 (0.000)	1.14
	450		1.81 ± 0.06 (-0.005)	5.75 ± 0.01 (0.018)	1.07
	500			5.626 ± 0.004 (0.016)	1.24

Tabla 8.8: Tiempos de vida de disoluciones acuosas de 7-HC ($7.68 \cdot 10^{-5}$ M) en presencia de distintas concentraciones de Brij 35, a pH 4.5 sin Brij 35. Longitud de onda de excitación: 320 nm. Los decaimientos fueron medidos con un valor fijo de cuentas en el máximo.

A 450 nm aparece el tiempo de vida de unos 5.4 ns, $\tau_3(450 \text{ nm})$, que aumenta su valor con la concentración de Brij 35. Se observa también un tiempo de formación, $\tau_2(450 \text{ nm})$, cuyo valor aumenta al aumentar la concentración de Brij 35.

Por último, a 500 nm aparece un único tiempo de vida de unos 5.4 ns, $\tau_3(500 \text{ nm})$, que también aumenta con la concentración de Brij 35.

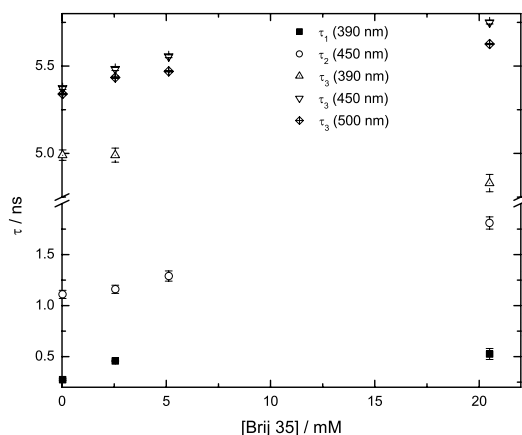


Figura 8.51: Representación frente a la concentración de Brij 35 de los tiempos de vida de la 7-HC ($7.68 \cdot 10^{-5}$ M) obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión y en presencia de diferentes concentraciones de Brij 35.

7-HC en Triton X-100.

Los espectros de absorción de disoluciones acuosas con una concentración constante de 7-HC a pH 4.5 y diferentes concentraciones de Triton X-100 hasta 20 mM de concentración de surfactante se muestran en la figura 8.52. Se observa que estos espectros se ven afectados por la fuerte absorción del Triton X-100, incluso usando una disolución acuosa de la misma concentración de Triton X-100 en la cubeta de referencia. Al aumentar la concentración de Triton X-100 se observa una pequeña disminución de la absorbancia de la 7-HC (ver gráfica insertada en esta figura) y un ligero desplazamiento del espectro hacia mayores longitudes de onda. al igual que ocurría con el Brij 35.

Los espectros de excitación a distintas longitudes de onda de emisión de disoluciones acuosas de 7-HC con Triton X-100 no se presentan debido a que no son comparables al estar afectados por la absorción de este tensioactivo, que también presenta emisión en la zona espectral analizada.

Los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas con concentración constante de 7-HC y distintas concentraciones de Triton X-100 se midieron excitando a 340 nm en vez de a 320 nm, para minimizar la fuerte absorción del Triton X-100. Los espectros de emisión se midieron para disoluciones con una concentración de Triton X-100 máxima de 30.8 mM (ver figura 8.53). El valor de pH de la disolución de 7-HC sin Triton X-100 pasa de 4.56 a ser 5.41 a concentración de Triton X-100 30.8 mM.

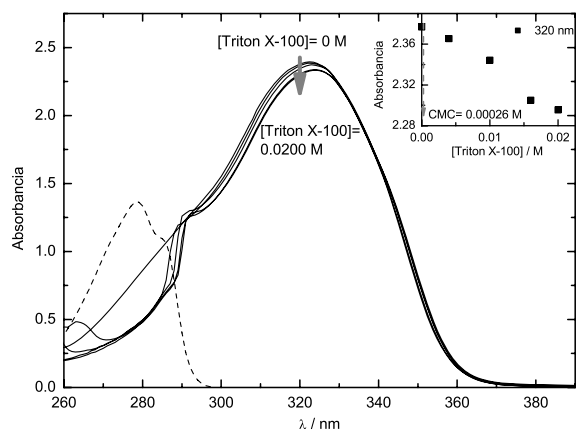


Figura 8.52: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC ($2.00 \cdot 10^{-4}$ M) con diferentes concentraciones de Triton X-100, de 0 a 20.0 mM. El valor de pH de las disolución sin Triton X-100 fue 4.5. El espectro con trazo discontinuo es el espectro de absorción de una disolución acuosa de Triton X-100 0.999 mM. En la figura insertada se muestra la variación de la absorbancia a 320 nm con la concentración de Triton X-100.

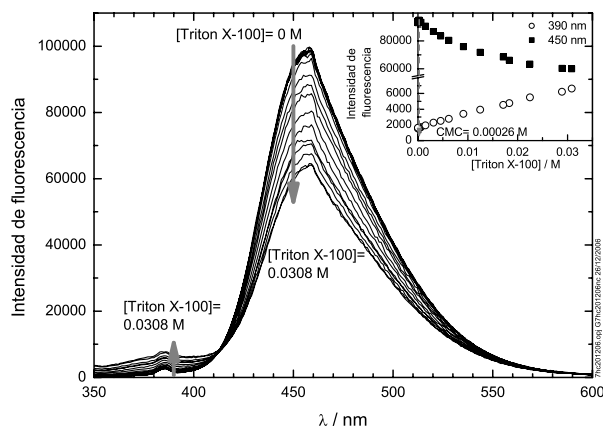


Figura 8.53: Espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de disoluciones acuosas de 7-HC ($4.32 \cdot 10^{-7}$ M) a diferentes concentraciones de Triton X-100, de 0 a 0.0308 M, siendo el pH 4.56 sin Triton X-100. Longitud de onda de excitación: 340 nm. En la gráfica insertada se representa la variación de la intensidad de fluorescencia a 390 y 450 nm con la concentración de Triton X-100.

8.3.2 Discusión

7-HC en Brij 35.

En primer lugar se presentan los resultados del análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de Brij 35. Este análisis indica la presencia de dos componentes estructurales (figura 8.54) según los criterios no afectados por los artefactos inherentes a esta técnica: autovectores frente a concentración de micelas, error medio y Durbin Watson obtenido como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas. Sin embargo, los restantes criterios indican un mayor número de componentes debido a estos artefactos.

Al igual que en los otros casos, se propone un modelo de equilibrio de reparto de la 7-HC entre la forma libre y ésta en el interior de las micelas (figura 8.13), dado por la ecuación (5.6). A pesar de las pequeñas variaciones registradas en el espectro de absorción de la 7-HC con la concentración de micelas de Brij 35, fue posible llevar a cabo un ajuste global de este modelo a los datos experimentales. Los residuos del ajuste global de la serie de espectros de absorción con este modelo indican que el ajuste es satisfactorio (ver C8_Ajuste17_7HCBrij35_absorcion.pdf en CD adjunto). Este ajuste permitió obtener los espectros priouros de absorción de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de Brij 35 (figura 8.55) y la constante de equilibrio de asociación K de $18000 \pm 900 \text{ M}^{-1}$.

p252
p99

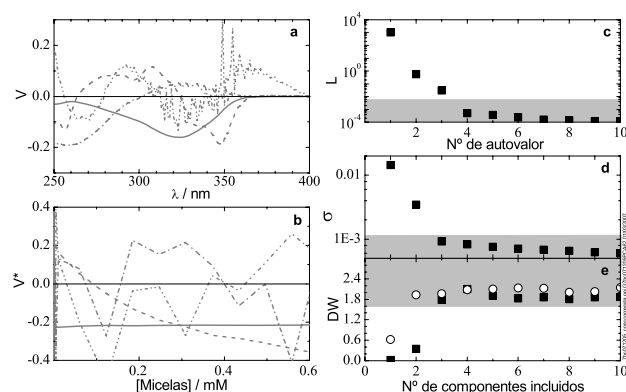


Figura 8.54: Resultados de PCA de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en disolución acuosa a distinta concentración de Brij 35: de 0 a 24.9 mM. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---), tercero (- · -) y cuarto (· · -); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

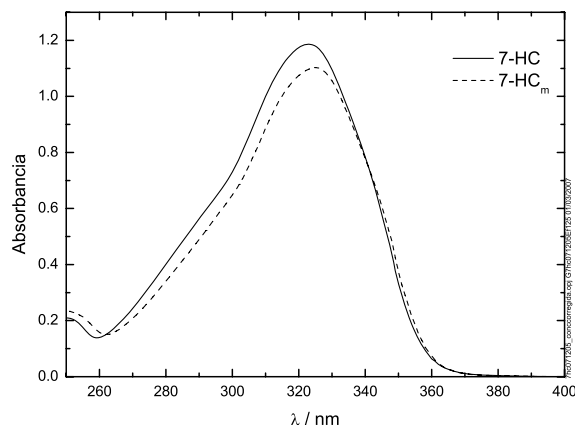


Figura 8.55: Espectros puros de absorción de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de Brij 35 obtenidos mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de la figura 8.48.

El análisis de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia de 7-HC a distintas concentraciones de Brij 35 de la figura 8.50 es el mostrado en la figura 8.56. Todos los criterios indican dos componentes. Para explicar las variaciones observadas en la serie de espectros de emisión de fluorescencia se propuso el mismo modelo que el planteado para el SDS, dado por la ecuación (5.15) o la ecuación (8.17). Los residuos de los ajustes globales con este modelo a las dos series de espectros de emisión en función de la concentración de micelas de Brij 35 indican ajustes buenos (ver C8_Ajuste18_7HCBrij35_emision_Serie1.pdf y C8_Ajuste19_7HCBrij35_emision_Serie2.pdf en CD adjunto). A partir de los resultados de estos análisis se obtuvieron los espectros medios de emisión de fluorescencia de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de Brij 35 mostrados en la figura 8.57. Se observa que dentro de las micelas de Brij 35 aumenta la intensidad de fluorescencia de la 7-HC neutra, disminuye la intensidad de anión y aparece algo de emisión del tautómero (aumento relativo de la intensidad de fluorescencia en la zona de 500 nm). Las constantes de equilibrio obtenidas se indican en la tabla 8.9. Con la constante de equilibrio media se calcula que para la concentración más alta utilizada de Brij 35 (20.9 mM) hay un 67.5 % de 7-HC dentro de las micelas.

p101
p257

Serie	K / M^{-1}	Archivo
1	4000 ± 500	C8_Ajuste18_7HCBrij35_emision_Serie1.pdf
2	4000 ± 600	C8_Ajuste19_7HCBrij35_emision_Serie2.pdf
Media	4000 ± 400	

Tabla 8.9: Constante de equilibrio obtenida para la 7-HC en micelas de Brij 35. Se obtuvo experimentalmente a partir del análisis global de series de espectros de fluorescencia a distintas concentraciones de Brij 35, siendo la concentración de Brij 35 máxima empleada 21 mM.

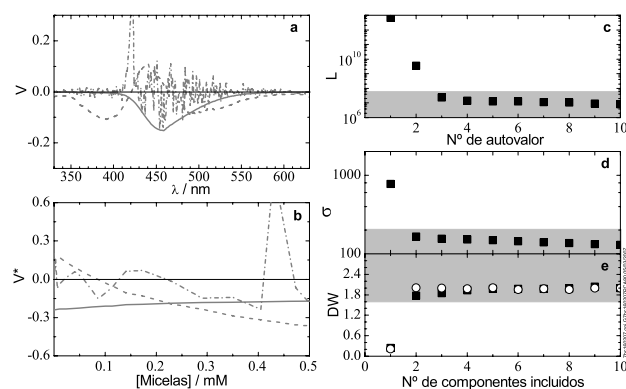


Figura 8.56: Resultados de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC en disolución acuosa a distintas concentraciones de Brij 35: de 0 a 20.9 mM. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (-.-.-); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama del Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

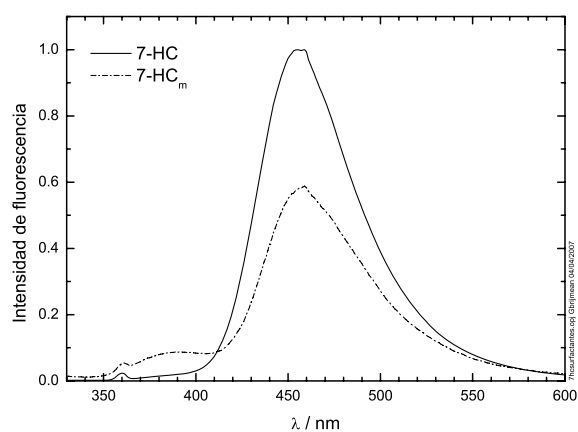


Figura 8.57: Espectros puros de emisión de fluorescencia corregidos de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de Brij 35, obtenidos mediante análisis global de las series de espectros de emisión de la 7-HC a diferentes concentraciones de Brij 35.

Para analizar los tiempos de vida de fluorescencia, se propone el mismo mecanismo que en los casos anteriores, en el que tanto dentro como fuera de las micelas, existen los procesos de fototautomerización de la especie neutra para dar tautómero, de fotodisociación del tautómero para dar anión y de fotodisociación de la especie neutra para dar anión

(figura 8.16). La tabla 8.8 y la figura 8.51 muestran que a 390 nm se obtiene un tiempo de vida corto mayoritario, $\tau_1(390 \text{ nm})$, con un valor de unos 0.2 ns a concentraciones inferiores a la CMC y cuyo valor aumenta al aumentar la concentración de micelas de Brij 35. Este tiempo corresponde al tiempo de vida de la especie neutra, que varía entre el valor corto que presenta en disolución acuosa y un valor mayor dentro de las micelas de Brij 35, al igual que lo hacía en las micelas de SDS. También aparece un tiempo de vida de unos 5.4 ns, $\tau_3(390 \text{ nm})$, con muy poca contribución, que se atribuye al anión con escasa emisión a esta longitud de onda.

p255

p294

A 450 nm aparece el tiempo de vida del anión como mayoritario, $\tau_3(450 \text{ nm})$, y su valor aumenta al incrementar la concentración de micelas de Brij 35, lo que indica que el tiempo de vida de fluorescencia del anión aumenta en el interior de las micelas de Brij 35. Se observa también un tiempo de formación, $\tau_2(450 \text{ nm})$, cuyo valor aumenta dentro de las micelas de Brij 35. Este tiempo de formación corresponde al tiempo de vida del tautómero en estas condiciones, determinado por la constante de velocidad de desactivación de esta especie y la constante de disociación para dar anión (ver mecanismo en la figura 8.16). Dado que este tiempo de formación aumenta dentro de las micelas, se cumple que $(k_{TA} + k_T)^{-1} < (k_{TA_m} + k_{T_m})^{-1}$. Esto se puede deber a un aumento del tiempo de vida del tautómero en el interior de las micelas ($k_{T_m} < k_T$), como sucede con los tiempos de vida de las demás especies de la 7-HC, o a una disminución de la velocidad de disociación en el interior de las micelas respecto a la disolución acuosa ($k_{TA_m} < k_{TA}$), o más probablemente a ambos efectos.

p255

A 500 nm se obtiene un único tiempo de vida, $\tau_3(500 \text{ nm})$, que parece corresponder al anión de la 7-HC, aunque su valor es algo menor, por lo que puede estar influido por la contribución a la fluorescencia del tautómero formado en el interior de las micelas (tal como se dedujo del espectro puro de la figura 8.57). El valor de este tiempo aumenta al incrementar la concentración de micelas de Brij 35, lo cual se atribuye al aumento de los tiempos de vida de las dos especies, anión y tautómero, en el interior de las micelas de Brij 35. Dado que se trata de un tiempo de vida promedio de tres especies fluorescentes y su variación es pequeña, no se procedió a un análisis cuantitativo de este tiempo de vida.

En la figura 8.58 se representa el tiempo de vida resultante de los ajustes individuales para el anión a 450 nm. Este tiempo de vida procede del ajuste de una exponencial donde en realidad hay dos tiempos de vida: el del anión dentro de las micelas y el del anión en disolución acuosa. Se realizó un ajuste del tiempo de vida aparente del anión (que depende de los valores de las amplitudes de los tiempos de vida del anión fuera y dentro de las micelas) frente a la concentración de micelas con el modelo dado por la ecuación (A2.8). Los resultados del ajuste se muestran en la figura 8.58. El valor de la constante aparente así obtenida es $3700 \pm 100 \text{ M}^{-1}$, no muy lejana al valor de la constante de complejación obtenida a partir de la serie de espectros de emisión en estado estacionario, lo cual indica que los dos tiempos de vida, de resolverse, tendrían amplitudes similares (ver apéndice 2).

p321

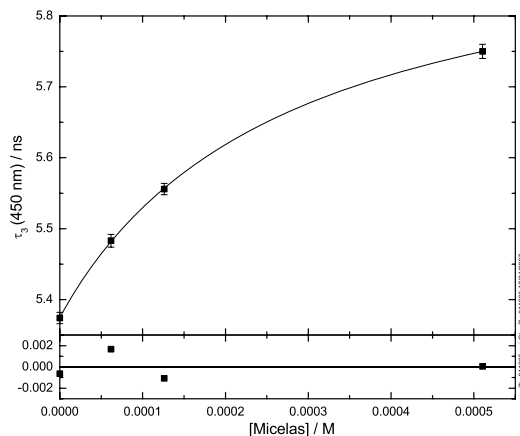


Figura 8.58: Tiempos de vida promedio a 450 nm del anión de la 7-HC en función de la concentración de micelas de Brij 35. Las curvas resultan del ajuste global de la ecuación A2.8 a los datos experimentales. La gráfica inferior muestra los residuos del ajuste.

Se observa que los datos experimentales pueden ser explicados satisfactoriamente el modelo propuesto. Sin embargo, por ser pocos datos, no se realizaron los correspondientes análisis globales con dos tiempos de vida (del anión fuera y dentro de las micelas).

7-HC en Triton X-100.

Los resultados obtenidos para la interacción de la 7-HC con las micelas de Triton X-100 son similares a los obtenidos para el otro tensioactivo neutro, el Brij 35. No obstante, la absorción y la emisión debidas a la propia molécula del tensioactivo Triton X-100, dificultan el análisis de los datos experimentales y limitan los intervalos espectrales a considerar en el mismo.

El análisis de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de Triton X-100 de la figura 8.52, eliminando la zona espectral en la que absorbe el Triton X-100, indica dos componentes en los criterios frente a la concentración de micelas (autovectores frente a concentración de micelas y Durbin Watson promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas), véase la figura 8.59. El ajuste global con el mismo modelo de equilibrio de reparto que el empleado para la 7-HC en los otros tensioactivos (figura 8.13), dado por la ecuación (5.6), conduce a residuos aleatorios que indican que el ajuste es satisfactorio (ver C8_Ajuste20_7HCTritonX100_absorcion.pdf en CD adjunto). Los espectros de absorción de la 7-HC libre y en el interior de las micelas de Triton X-100 obtenidos en dicho ajuste global en el intervalo de longitudes de onda donde no absorbe el Triton X-100 se representan en la figura 8.60. Merece la pena destacar que el

p296

p252

p99

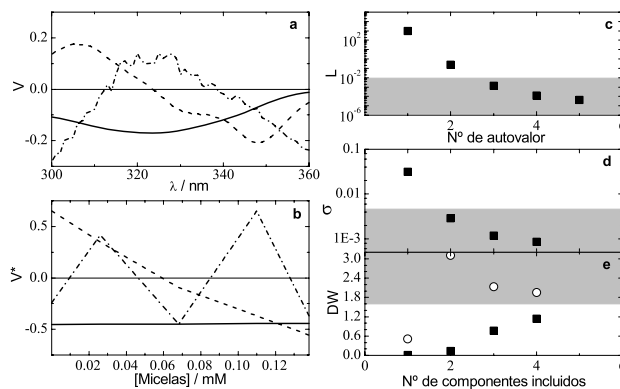


Figura 8.59: Resultados de PCA de la serie de espectros de absorción de disoluciones acuosas de 7-HC con diferentes concentraciones de Triton X-100, de 0 a 20 mM. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (-.-.); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama de Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

espectro de absorción de la 7-HC dentro de las micelas de Triton X-100 es raro y presenta mucha variación respecto a la pequeña variación observada en los espectros de absorción experimentales de la figura 8.52. Esto puede ser debido a que el espectro que se mostró para la 7-HC dentro de las micelas de Triton X-100 se obtuvo a partir de medidas de espectros de absorción de disoluciones de concentración de Triton X-100 no demasiado altas con el fin de minimizar la absorción del Triton X-100. Pero esto implica la extrapolación de este espectro a partir de espectros de absorción de concentración lejana a la que sería necesaria para que la 7-HC estuviese por completo dentro de las micelas de Triton X-100. Otra posible explicación de que este espectro sea raro es que, a pesar de haber limitado el intervalo de ajuste, todavía haya una cierta contribución a la absorción del Triton X-100. La constante de complejación obtenida es $2000 \pm 4000 \text{ M}^{-1}$, que presenta un error enorme debido a que las variaciones espectrales son pequeñas y se dispone de pocos datos experimentales.

p296

Los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de 7-HC a distintas concentraciones de Triton X-100 de la figura 8.53 muestran que, a bajas longitudes de onda, estos espectros están afectados por la emisión del Triton X-100. Por ello, se presenta el análisis de PCA de la serie de espectros de emisión a partir de 440 nm (figura 8.61), evitando así el intervalo espectral de emisión del Triton X-100. Todos los criterios indican dos componentes, sugiriendo de nuevo un modelo de equilibrio de reparto de la 7-HC entre la disolución acuosa y el interior de las micelas de Triton X-100.

p296

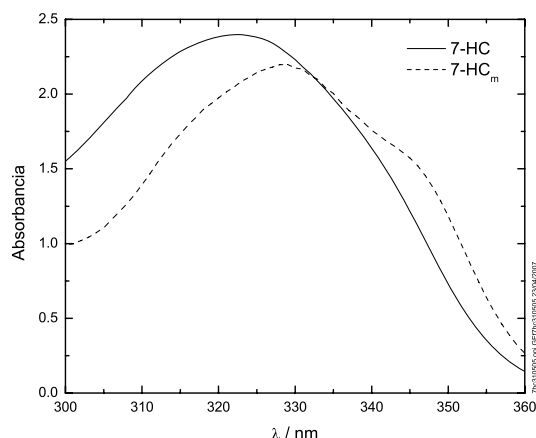


Figura 8.60: Espectros puros de absorción de la 7-HC en fuera y dentro de las micelas de Triton X-100 obtenidos mediante el análisis global de la serie de espectros de absorción de la figura 8.52.

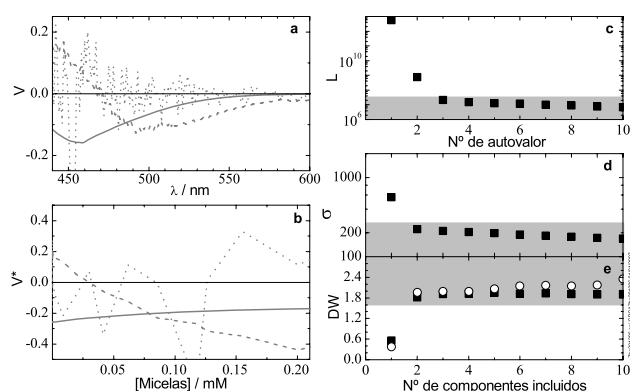


Figura 8.61: Resultados de PCA de la serie de espectros de emisión de fluorescencia no corregidos de la 7-HC en disolución acuosa a distintas concentraciones de Triton X-100: de 0 a 31 mM. Diagrama de autovectores frente a la longitud de onda (a) y frente a la concentración de micelas (b): primer autovector (—), segundo (---) y tercero (-·-·); c: diagrama logarítmico de autovalores; d: diagrama del error medio; e: diagrama del Durbin Watson calculado como el promedio de los obtenidos a diferentes valores de longitud de onda (cuadrados) y como el promedio de los obtenidos a diferentes concentraciones de micelas (círculos).

Por tanto, se realizó el análisis global de los espectros de emisión de fluorescencia con dicho modelo, ecuación (5.15) ó (8.17), en el intervalo espectral indicado, el cual presenta unos residuos indicadores de un buen ajuste (ver fichero C8_Ajuste21_7HCTritonX100_emision.pdf en CD adjunto). Este análisis permite obtener los espectros puros mostrados en la figura 8.62. Estos espectros puros indican que en el

interior de las micelas de Triton X-100 la emisión de fluorescencia del anión de la 7-HC disminuye y aparece algo de emisión del tautómero, ya que la intensidad relativa en la zona de 500 nm aumenta respecto a la 7-HC en disolución acuosa. La emisión de fluorescencia de la 7-HC neutra dentro de las micelas de Triton X-100 no se puede analizar ya que se ve afectada por la emisión del Triton X-100. Sin embargo, la representación de la intensidad de fluorescencia a 390 nm frente a la concentración de Triton X-100 (gráfica insertada en la figura 8.53) sugiere, debido a que la variación no es perfectamente lineal, que la intensidad de fluorescencia de la 7-HC aumenta en el interior de las micelas de Triton X-100. La constante de equilibrio obtenida del ajuste global anteriormente descrito es de $7600 \pm 600 \text{ M}^{-1}$, bastante superior a la obtenida a partir de los espectros de absorción, aunque ésta presentaba una enorme incertidumbre. Con esta constante de complejación se calcula que a una concentración de Triton X-100 de 30.8 mM (la concentración más alta utilizada) hay un 61.8 % de 7-HC dentro de las micelas. La gráfica insertada en la figura 8.62 muestra el espectro puro de la 7-HC obtenido dentro de las micelas de Triton X-100 y el obtenido dentro de las micelas de Brij 35. Se observa que la intensidad de fluorescencia del anión dentro de las micelas de Triton X-100 es menor que la obtenida dentro de las micelas de Brij 35.

p296

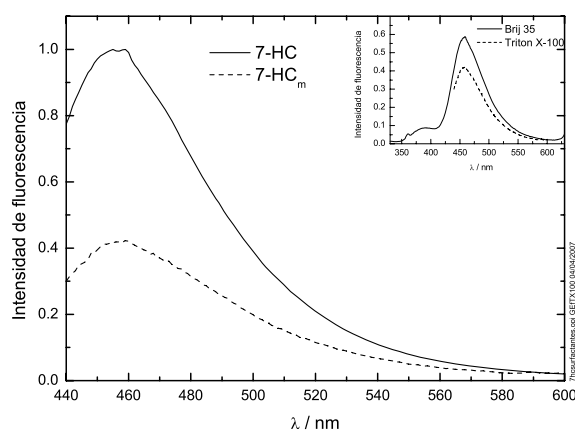


Figura 8.62: Espectros puros de emisión corregidos de la 7-HC fuera y dentro de las micelas de Triton X-100 obtenidos mediante análisis global de la serie de espectros de emisión a diferentes concentraciones de Triton X-100. La gráfica insertada muestra el espectro puro de la 7-HC obtenido dentro de las micelas de Triton X-100 y el obtenido dentro de las micelas de Brij 35.

8.4 Comparación de la interacción de la 7-HC con las micelas de los distintos tensioactivos

Cabe destacar que, para todos los tensioactivos estudiados, sólo se producen variaciones en los espectros de absorción o emisión de fluorescencia de la 7-HC con la adición de concentraciones de tensioactivo superiores al valor de la CMC correspondiente. Esto indica que la interacción de la 7-HC no se produce con el tensioactivo sino con las micelas formadas por éste. En otros casos, por ejemplo la interacción de la rodamina 123 o la rodamina B con SDS, se han observado variaciones en la absorbancia o en la intensidad de fluorescencia a concentraciones de surfactante menores que la CMC, lo que se ha atribuido a la formación de agregados en una etapa previa a la formación de micelas [Deumié 93, Moure Santamarina 05, Rodríguez Fraga 06].

Una característica común a todos los surfactantes estudiados es el desplazamiento del espectro de absorción de la 7-HC en el interior de las micelas hacia mayor longitud de onda, así como la disminución de la absorbancia. Este desplazamiento hacia el rojo indica que la diferencia de energía existente entre el estado fundamental y el excitado es menor cuando la molécula de fluoróforo está dentro de las micelas. Si suponemos que no varía la energía del estado fundamental debido a la presencia de las micelas, se deduce que es más estable el estado excitado de la 7-HC cuando se encuentra asociada a la micela. Algunos autores atribuyen el desplazamiento hacia el rojo (como el que se produce en el espectro de la 3,3'-dietiltiacarbocianina en el interior de micelas) al aumento del índice de refracción de las micelas [Vinogradov 01]. Sin embargo, este desplazamiento hacia el rojo no se observa en la banda de fluorescencia del anión en el interior de las micelas de 7-HC, por lo que no debe ser esta la causa del desplazamiento observado.

En la figura 8.63 se comparan los espectros de absorción de la 7-HC en las diferentes micelas. Los cambios que se observan en los espectros de absorción son mayores para los tensioactivos aniónicos y catiónicos que para los neutros (cabe destacar que el espectro dentro de las micelas de Triton X-100 es raro debido a los efectos ya comentados).

Los espectros puros de emisión de fluorescencia de la 7-HC dentro de las micelas de los diferentes tensioactivos estudiados se muestran en la figura 8.64. Todos estos espectros están referidos a un espectro normalizado de la 7-HC en disolución acuosa, de manera que no sólo las formas de los espectros son comparables sino también sus intensidades relativas. Los espectros de la 7-HC libre no se muestran en esta figura ya que son iguales entre sí y coincidentes con el obtenido experimentalmente en agua. En la gráfica insertada en esta figura, donde se representan los espectros normalizados en sus máximos respectivos, se observa que los espectros de emisión de la 7-HC en las micelas de estos tensioactivos tienen la misma forma cuando se trata de tensioactivos del mismo tipo (SDS y SDeS; DTAB y CTAB; Brij 35 y Triton X-100). Se observa también que en las micelas de tensioactivos aniónicos (SDS y

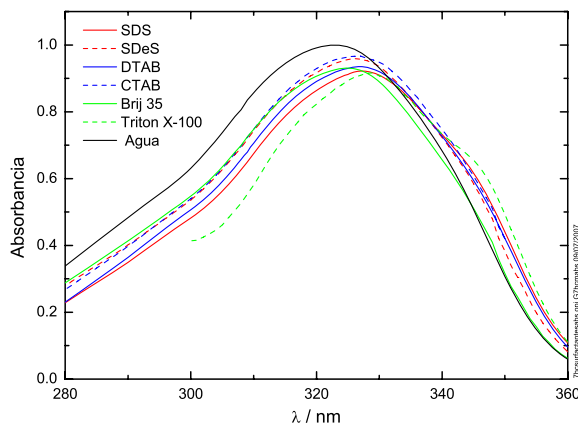


Figura 8.63: Espectros puros de absorción de la 7-HC dentro de las micelas de diferentes tensioactivos y en agua.

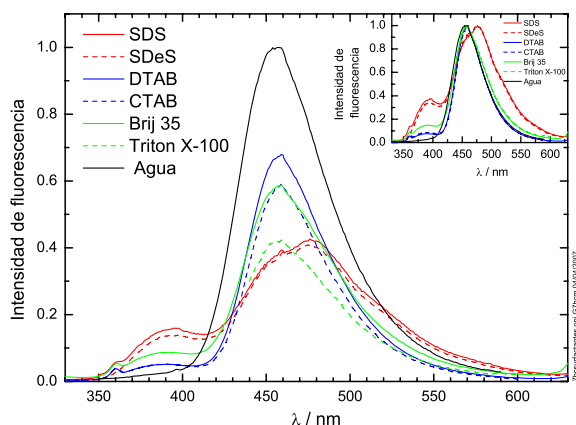


Figura 8.64: Espectros puros de emisión de fluorescencia corregidos de la 7-HC dentro de las micelas de diferentes tensioactivos y en agua. En el gráfico insertado se comparan estos espectros normalizados a la unidad en el máximo entre sí y con el obtenido para la 7-HC en agua.

SDeS) es donde se forma mayor proporción de tautómero y de 7-HC neutra. Por el contrario, en las micelas de los tensioactivos catiónicos estudiados no aparece formación de tautómero y la emisión de fluorescencia de la especie neutra es menor que en los restantes tensioactivos. El comportamiento de la 7-HC en los tensioactivos neutros es intermedio al observado para las micelas de tensioactivos aniónicos y catiónicos, con una pequeña proporción de emisión del tautómero y mayor proporción de especie neutra que en las micelas de tensioactivos catiónicos. Estos resultados sugieren que los cambios observados en los espectros de emisión se deben a las interacciones electrostáticas que se establecen entre la sonda y las cabezas

polares de los surfactantes, y que afectan directamente a los procesos de disociación en el estado excitado.

Dado que el proceso de disociación es un proceso de separación de cargas, el carácter iónico del entorno alrededor de la sonda debe afectar a las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado de la 7-HC. Así, cabe pensar que la formación del anión se ve favorecida en el interior de las micelas con superficies cargadas positivamente (DTAB y CTAB), mientras que estaría desfavorecida en el interior de las micelas cargadas negativamente (SDS y SDeS). En el caso de la 7-HC en las micelas aniónicas, la disminución de la disociación es más acusada y el proceso de disociación es prácticamente despreciable (se observa una mayor emisión del tautómero en el interior de las micelas de estos surfactantes) debido a la carga de la micela (repulsión electrostática entre la micela y el anión). En las micelas neutras no habría este tipo de efectos electrostáticos, pero los grupos cabeza tipo alcohol de los tensioactivos neutros estudiados, podrían dar lugar a interacciones con la 7-HC similares a las existentes en el etanol, llevando a una mayor proporción de la especie neutra y del tautómero respecto a la disolución acuosa. Esto sugiere la carga superficial de las micelas determina el proceso de fotodisociación. Las interacciones electrostáticas entre la sonda y la superficie de la micela producen cambios en las constantes de velocidad de los procesos de disociación y fototautomerización de la 7-HC respecto a los valores que presentan en disolución acuosa, dando lugar a diferentes proporciones de las especies excitadas. Conviene incidir en el hecho de que, en ninguno de los casos analizados, ni siquiera en las micelas neutras con grupos cabeza $-OH$, se observa un comportamiento semejante al de la 7-HC en etanol, donde la fluorescencia provenía únicamente de la especie neutra y del tautómero. Es más, en todos los casos se observa emisión del anión. Esto sugiere una localización superficial de la 7-HC en todos los tipos de micelas estudiados, estando presentes moléculas de agua en el entorno inmediato de la sonda, que facilitan los procesos de fototautomerización y fotodisociación.

Las variaciones de los espectros de absorción y de emisión con la concentración de micelas se pueden explicar mediante un equilibrio de reparto del colorante fuera y dentro de las micelas con una constante de equilibrio K . En la tabla 8.10 se muestran las constantes de equilibrio de la 7-HC con los distintos tensioactivos estudiados obtenidas a partir de los análisis globales de las series de espectros de emisión de fluorescencia. Se considera que esta constante es más correcta que la obtenida a partir de los espectros de absorción, donde las variaciones observadas son más pequeñas y la constante obtenida tiene mayor error.

El estudio comparativo de las constantes de equilibrio de los tensioactivos que sólo se diferencian en la longitud de la cadena hidrocarbonada (SDS, con 12 átomos de carbono, y SDeS, con 10 átomos de carbono; y DTAB, con 12 átomos de carbono, y CTAB, con 16 átomos de carbono) indica que los tensioactivos con cadena hidrocarbonada más larga presentan una mayor constante de equilibrio de complejación. La constante es mayor para el SDS que para el SDeS y para el CTAB que para el DTAB. Esto podría ser debido al mayor

Tensioactivo	K / M ⁻¹	ϕ_{7-HC_m}
SDS	3700 ± 500	0.62
SDeS	1500 ± 500	(0.55)
DTAB	2300 ± 100	0.59
CTAB	5000 ± 1000	0.49
Brij 35	4000 ± 400	0.60
Triton X-100	7600 ± 600	(0.45)

Tabla 8.10: Constantes de equilibrio de asociación de la 7-HC con las micelas de distintos tensioactivos obtenidas a partir de los análisis globales de las series de espectros de emisión de fluorescencia. Rendimientos cuánticos de fluorescencia de la 7-HC en el interior de las micelas de los distintos tensioactivos calculados usando la 7-HC en disolución acuosa como referencia ($\phi = 0.78$).

carácter hidrofóbico de la micela al aumentar la longitud de la cadena, con el consecuente incremento de la afinidad de la sonda por la micela. La comparación de las constantes obtenidas en Brij 35 y Triton X-100 es más compleja porque en este caso cambia, además de la cadena hidrocarbonada, la longitud de la cadena polietilénica. Sin embargo, el mayor carácter hidrofóbico de las micelas de Triton X-100 frente a las de Brij 35, se ha puesto de manifiesto en estudios realizados con otras sondas fluorescentes [Novo 07] y podrían ser la explicación de la mayor constante de reparto obtenida para este tensioactivo.

En la tabla 8.10 se muestran también los rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos en el interior de las micelas de los distintos tensioactivos tomando como referencia el rendimiento cuántico experimental de la 7-HC en disolución acuosa ligeramente ácida, $\phi = 0.78$. Ha de tenerse en cuenta que el rendimiento cuántico presentado para la 7-HC dentro de las micelas de Triton X-100 puede tener un error importante y estar infravalorado al no tenerse en cuenta para su cálculo todo el espectro de emisión y consecuentemente la posible emisión de la 7-HC neutra dentro de las micelas de Triton X-100 (no se pudo analizar todo el espectro ya que en la zona de bajas longitudes de onda emite el propio Triton X-100). El rendimiento cuántico de la 7-HC dentro de las micelas de SDeS se estimó utilizando el espectro $A_3(\lambda)$ respecto al de la 7-HC en disolución acuosa, espectro $A_1(\lambda)$. Sin embargo, el rendimiento cuántico así estimado puede estar infravalorado debido a que puede faltar la contribución de tautómero que se introduce en el estado excitado. Por tanto, los rendimientos cuánticos obtenidos para la 7-HC dentro de las micelas de los distintos tensioactivos son del mismo orden (0.5-0.6) si tenemos en cuenta que los rendimientos cuánticos de la 7-HC en las micelas de Triton X-100 y en las de SDeS están infravalorados. En todos los casos existe una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia de la 7-HC en el interior de las micelas respecto a la disolución acuosa, debida a la disminución de la proporción de anión (debido a la menor disociación tanto de la especie neutra como de la especie tautomérica) en el estado excitado, con un rendimiento cuántico superior al del tautómero y al de la especie neutra.

Cabe destacar que para todos los surfactantes estudiados se produce un aumento del tiempo de vida de las distintas especies excitadas en el interior de las micelas respecto al observado en agua. Algunos autores atribuyen el aumento del tiempo de vida, como el que se produce para la 3,3'-dietiltiacarbocianina en el interior de las micelas, a la mayor microviscosidad micelar que lleva a la supresión de los procesos de desactivación no radiantes [Vinogradov 01]. Sin embargo, y a diferencia de estos autores, en nuestro caso no se observa un aumento del rendimiento cuántico en el interior de las micelas, sino una disminución. Hay que decir que, debido a los procesos de interconversión en el estado excitado que llevan a la formación de diferentes especies excitadas, no existe una relación sencilla y un paralelismo entre rendimiento cuántico y tiempo de vida. Umoto y colaboradores proponen que la cavidad menos hidrofílica de la β -CD respecto a la disolución acuosa aumenta el tiempo de vida del anión de la 7-hidroxi-4-metilcumarina, lo que permite predecir el mayor tiempo de vida en fase micelar respecto a la acuosa [Umoto 03]. Otra posible explicación del aumento del tiempo de vida en el interior de las micelas es la mayor protección del fluoróforo frente a la entrada de oxígeno o de agua a las moléculas de 7-HC, produciéndose un proceso de desactivación de fluorescencia menos efectivo, de forma análoga a la menor desactivación de fluorescencia de fluoróforos con un tiempo de vida mucho mayor, como por ejemplo la menor desactivación del pireno dentro de las micelas de Triton X-100 [Diaz-Fernandez 04].

Capítulo 9

Conclusiones

En este capítulo se exponen las conclusiones principales que se extraen del trabajo descrito en la presente memoria.

A. Estudio de la complejación de pironinas por ciclodextrinas:

1- Las pironinas Y y B forman complejos de inclusión de estequiometría 1:1 con la β -CD, mientras que con la γ -CD (ciclodextrina con un tamaño de cavidad mayor) se observa, además de la complejación 1:1, la dimerización de las pironinas en el interior de la cavidad de la γ -CD que conduce a la formación de complejos 2:1 (P_2 :CD). El análisis de la forma de los espectros de absorción de los dímeros de las pironinas sobre la base del modelo del excitón sugiere que la estructura del dímero de la PY libre (PY_2) y de los dos complejos P: γ -CD es tipo emparedado (tipo H), mientras que para el dímero de la PB libre (PB_2) esta estructura es tipo cabeza-cola (tipo J).

2- Las constantes de estabilidad de los complejos pironina:ciclodextrina estudiados tienen valores aproximadamente diez veces mayores para los complejos pironina: β -CD que para los complejos pironina: γ -CD. Por tanto, la fortaleza de los complejos que forman la PY y PB con la β -CD es mayor que la de los complejos que forman estas dos pironinas con la γ -CD. Por otra parte, el valor de las constantes de equilibrio de asociación de los complejos que forma la pironina B con estas ciclodextrinas es unas 5 veces mayor que el que presentan los complejos de la pironina Y. Esto indica una mayor estabilidad de los complejos PB:CD respecto a la que presentan los complejos PY:CD. Por otra parte, las dos pironinas presentan una gran tendencia a la dimerización en el interior de la cavidad de γ -CD, siendo este proceso más efectivo para la PY.

3- Los tiempos de vida y los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las dos pironinas estudiadas en disolución acuosa disminuyen significativamente cuando estas moléculas se

introducen en la cavidad de una de estas ciclodextrinas. Las constantes de velocidad de desactivación radiante presentan valores muy parecidos en los complejos P:CD y en los distintos disolventes en concordancia con la poca sensibilidad de este tipo de procesos al medio circundante. Por el contrario, la constante de velocidad de desactivación no radiante varía mucho con la complejación, siendo el valor de esta constante dos veces mayor para los complejos PY:CD que para la PY en disolución acuosa y de dos a tres veces mayor para los complejos PB:CD que para la PB. Esto indica que la complejación favorece los procesos de desactivación no radiantes de estas pironinas. En 1,4-dioxano también se observó un aumento en el valor de la constante de velocidad de desactivación no radiante respecto al que presenta en otros disolventes más polares. Este aumento de la constante de velocidad de desactivación no radiante, tanto en los complejos como en el 1,4-dioxano, podría explicarse mediante la existencia de interacciones específicas del anillo xanténico de las pironinas con los oxígenos ricos en electrones de las cavidades de las ciclodextrinas o de las moléculas de dioxano. Estas interacciones parecen ser mucho más fuertes en el caso de la PB.

4- Se estudió la dinámica del proceso de complejación de cada una de estas pironinas con las dos ciclodextrinas mencionadas utilizando por primera vez la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS). Se comprobó que el método de FCS es válido para el estudio de la dinámica difusional y de asociación-disociación. Concretamente, se obtuvieron valores para los coeficientes de difusión de los complejos en concordancia con los esperados según los datos de la bibliografía. También se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad de asociación y de disociación para los sistemas pironina:ciclodextrina estudiados. Las constantes de velocidad de asociación obtenidas son mucho menores que las constantes de velocidad que se obtendrían si el proceso de complejación estuviese solamente controlado por la difusión. El tiempo total necesario para la formación de un complejo está determinado fundamentalmente, no por el tiempo de difusión de las moléculas implicadas, sino por el tiempo necesario para que las moléculas de pironina tengan una orientación adecuada para que puedan introducirse en la cavidad de ciclodextrina. Las constantes de velocidad de asociación para estos sistemas son del mismo orden para las dos pironinas con cada una de las ciclodextrinas estudiadas. Sin embargo, la constante de velocidad de disociación de los complejos PB:CD es mucho menor que la de los complejos PY:CD, lo que confirma que la PB interactúa mucho más fuertemente que la PY con el interior de la cavidad de la β -CD y de la γ -CD. Esto ya se había propuesto previamente en base a los estudios de fluorescencia de estado estacionario y resueltos en el tiempo pero no pudo confirmarse hasta obtener información de la dinámica de complejación. Por tanto, la constante de velocidad de disociación depende de interacciones específicas sustrato-ligando y determina la estabilidad termodinámica de estos complejos supramoleculares. Simulaciones realizadas en nuestro grupo de investigación indican que la reorientación geométrica puede ser un paso determinante en el proceso de formación de complejos de inclusión y que la velocidad del proceso de complejación de las pironinas con las ciclodextrinas puede estar determinada por efectos estéricos [Al-Soufi 05]. Con la γ -CD aumenta mucho la probabilidad de reacción respecto a

la obtenida con la β -CD, lo que confirma la influencia del impedimento estérico en el proceso de complejación.

B. Estudio de la 7-hidroxycumarina como sonda fluorescente de sistemas micelares:

5- Se estudió el comportamiento fotofísico de la 7-HC en disolución acuosa en función del pH y se propuso un mecanismo para explicar dicho comportamiento. La 7-HC es una molécula que sufre un proceso de fotodisociación muy eficiente a valores de pH neutros o ligeramente ácidos en disolución acuosa, mientras que la fototautomerización es el proceso predominante a valores de pH más ácidos.

6- En etanol el comportamiento fotofísico de la 7-HC es muy distinto ya que no se observa formación del anión por fotodisociación. En el estado excitado se observan fundamentalmente la especie neutra y el tautómero. Esta gran diferencia de comportamiento en dos disolventes próticos de propiedades similares demuestra que esta cumarina es una sonda potencial para estudiar sistemas organizados, dada la alta sensibilidad de esta molécula al microentorno.

7- El estudio del comportamiento fotofísico de la 7-HC en disoluciones acuosas de diferentes tensioactivos (aniónicos, catiónicos y neutros) pone de manifiesto una interacción de la 7-HC con las micelas de tensioactivo, estableciéndose un equilibrio de reparto de la sonda en el estado fundamental entre la fase acuosa y la pseudofase micelar, caracterizado por una constante de equilibrio K . El estudio comparativo de las constantes de equilibrio de los tensioactivos que sólo se diferencian en la longitud de la cadena hidrocarbonada (SDS y SDeS; y DTAB y CTAB) indica que los tensioactivos con cadena hidrocarbonada más larga presentan una mayor constante de equilibrio de complejación. En todos los tensioactivos estudiados, la fotodisociación está menos favorecida en el interior de las micelas que en disolución acuosa, y por esto disminuye la concentración de la especie aniónica en el estado excitado y aumenta la concentración de la especie neutra. En el interior de las micelas catiónicas no se detecta tautómero, mientras que en las micelas neutras se observa algo de emisión de esta especie y en las micelas aniónicas hay mayor emisión del tautómero que del anión. Dado que el proceso de disociación es un proceso de separación de cargas, el carácter iónico del entorno alrededor de la sonda afecta a las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado de la 7-HC. Así, la formación del anión se ve favorecida en el interior de las micelas con superficies cargadas positivamente (DTAB y CTAB), mientras que está desfavorecida en el interior de las micelas cargadas negativamente (SDS y SDeS). En las micelas neutras la situación es intermedia a la de las micelas catiónicas y aniónicas. Esto sugiere que la carga superficial de las micelas determina la velocidad de los procesos de transferencia protónica. Las interacciones electrostáticas entre la sonda y la superficie de la micela producen cambios en las constantes de velocidad de los procesos de disociación y fototautomerización de la 7-HC respecto a los valores que presentan en disolución acuosa, dando lugar a diferentes proporciones de las especies excitadas. Estos resultados muestran la gran sensibilidad de la 7-HC a los cambios estructurales de las micelas de tensioactivos a través de sus procesos de transferencia protónica fotoinducida asistidos por el agua.

8- Para todos los surfactantes estudiados se produce un aumento de los tiempos de vida de las distintas especies excitadas de la 7-HC en el interior de las micelas respecto al observado en agua, lo cual puede ser debido a la menor desactivación de la fluorescencia de la 7-HC en el interior de las micelas o a la mayor hidrofobicidad del interior de las micelas respecto a la disolución acuosa. Se observa también una disminución general del rendimiento cuántico de fluorescencia de la 7-HC en el interior de las micelas respecto al observado en agua debido a la disminución de la proporción de anión en el estado excitado, con un rendimiento cuántico superior al del tautómero y al de la especie neutra.

Apéndices

Apéndice 1: Factores preexponenciales de decaimientos de fluorescencia de especies ligadas mediante un equilibrio de complejación

La asociación de un sustrato fluorescente, A, y un ligando no fluorescente, H (que podría ser una ciclodextrina o una micela), que forman un complejo, B, puede tratarse como un equilibrio químico con una constante de equilibrio K :



$$K = \frac{[B]}{[A][H]} \Rightarrow [B] = K[H][A] \quad (\text{A1.2})$$

El balance de materia se aplica al fluoróforo, donde $[A]_0$ es la concentración total de fluoróforo que, en presencia del ligando H, está libre (A) o complejoado (B):

$$[A]_0 = [A] + [B] \quad (\text{A1.3})$$

Usando las ecuaciones (A1.2) y (A1.3) se obtienen expresiones para las concentraciones de equilibrio del fluoróforo libre, A, y del complejo, B, en el estado fundamental en función de las concentraciones iniciales y la constante de equilibrio:

$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + K[H]} \approx \frac{[A]_0}{1 + K[H]_0} \quad (\text{A1.4})$$

$$[B] = \frac{K[H]_0[A]_0}{1 + K[H]} \approx \frac{K[H]_0[A]_0}{1 + K[H]_0} \quad (\text{A1.5})$$

En estas ecuaciones se ha utilizado la aproximación de que la concentración de H de equilibrio, $[H]$, coincide con la total, $[H]_0$, al ser ésta mucho mayor que la concentración total de fluoróforo en la mayoría de los experimentos de complejación.

La fracción molar de fluoróforo libre (X_A) puede expresarse en función de la constante de equilibrio y de la concentración de H usando las ecuaciones (A1.4) y (A1.5):

$$X_A = \frac{[A]}{[A] + [B]} = \frac{1}{1 + K[H]_0} \quad (\text{A1.6})$$

La fracción molar de colorante fluoróforo (X_B) sería:

$$X_B = \frac{[B]}{[A] + [B]} = \frac{K[H]_0}{1 + K[H]_0} = (1 - X_A) \quad (\text{A1.7})$$

Para este caso de un equilibrio entre un fluoróforo libre y complejoado en ausencia de procesos de interconversión en el estado excitado, la intensidad de fluorescencia total viene dada por la suma de intensidades de fluorescencia del fluoróforo libre y del complejoado:

$$F(t, X_A) = F_A(t, X_A) + F_B(t, X_A) \quad (\text{A1.8})$$

Estas intensidades de fluorescencia dependen de las fracciones molares de fluoróforo libre y complejoado y de las intensidades de fluorescencia límite si todo el fluoróforo estuviese libre, $F_A(t, 1)$, o complejoado, $F_B(t, 0)$, como indica la siguiente expresión:

$$F(t, X_A) = X_A \cdot F_A(t, 1) + (1 - X_A) \cdot F_B(t, 0) \quad (\text{A1.9})$$

Supongamos que el fluoróforo libre tiene un decaimiento monoexponencial con un tiempo de vida característico, τ_A y una amplitud límite a tiempo cero si todo el fluoróforo estuviese libre ($X_A = 1$), α_A^0 . Entonces podemos escribir la ecuación siguiente:

$$F_A(t, 1) = \alpha_A^0 \cdot e^{-t/\tau_A} \quad (\text{A1.10})$$

Si para el fluoróforo complejoado suponemos un tiempo de vida τ_B y una amplitud límite a tiempo cero si todo el fluoróforo estuviese complejoado ($X_B = 1$), α_B^0 , se puede escribir una expresión análoga a la anterior:

$$F_B(t, 0) = \alpha_B^0 \cdot e^{-t/\tau_B} \quad (\text{A1.11})$$

Sustituyendo en la ecuación (A1.9) las ecuaciones (A1.10) y (A1.11) se obtiene:

$$F(t, X_A) = X_A \cdot \alpha_A^0 \cdot e^{-t/\tau_A} + (1 - X_A) \cdot \alpha_B^0 \cdot e^{-t/\tau_B} \quad (\text{A1.12})$$

Esta ecuación para $t=0$ sería:

$$F(0, X_A) = X_A \cdot \alpha_A^0 + (1 - X_A) \cdot \alpha_B^0 \quad (\text{A1.13})$$

Usando las ecuaciones (A1.6) y (A1.7) para las fracciones molares, la intensidad de fluorescencia total de la ecuación (A1.12) puede escribirse en función de la constante de complejación y de la concentración total de ligando H :

$$F(t, [H]_0) = \frac{1}{1 + K[H]_0} \alpha_A^0 \cdot e^{-t/\tau_A} + \frac{K[H]_0}{1 + K[H]_0} \alpha_B^0 \cdot e^{-t/\tau_B} \quad (\text{A1.14})$$

Para obtener intensidades absolutas en las medidas de decaimientos de fluorescencia deben cumplirse algunas condiciones básicas:

1- La concentración total de fluoróforo libre debe conocerse en cada muestra con exactitud e idealmente debe ser exactamente la misma para una serie de decaimientos con diferentes concentraciones de ligando.

2- La intensidad de excitación (pulso de excitación) tiene que ser constante, dado que los algoritmos de deconvolución propagan variaciones no lineales a las amplitudes.

3- El recuento de fotones debería detenerse para los distintos decaimientos a un valor de tiempo de adquisición fijo y no a un determinado número de cuentas en el máximo.

Sólo de esta forma se cumple la ecuación (A1.14) y los factores preexponenciales correspondientes al fluoróforo libre y complejo son proporcionales a las concentraciones de equilibrio de dichas especies en el estado fundamental. El registrar decaimientos hasta un número de cuentas fijo en el máximo (por ejemplo 10000) normaliza las amplitudes y supone la pérdida de información de la intensidad absoluta. Alternativamente a medir los decaimientos con un tiempo de adquisición fijo, es posible registrar los decaimientos hasta un número fijo de cuentas en el máximo y luego dividir los decaimientos entre su tiempo de adquisición (t_{adq}) para obtener decaimientos con intensidades absolutas:

$$F(t, [H]_0) = \frac{F_n(t, [H]_0)}{t_{adq}} \quad (\text{A1.15})$$

Además, el efecto de las posibles variaciones en la intensidad de la lámpara se puede corregir en parte usando el valor del tiempo de adquisición del pulso de referencia ($t_{adq, lamp}$), según la expresión siguiente:

$$F(t, [H]_0) = \frac{F_n(t, [H]_0)}{t_{adq}} t_{adq, lamp} \quad (\text{A1.16})$$

Por último, también se deben corregir los decaimientos por las pequeñas variaciones observadas en el número de cuentas en el máximo, F_{max} (ya que no son exactamente las mismas en todos los casos). Con esas tres correcciones, el decaimiento de intensidad absoluta se obtendrá mediante la expresión siguiente:

$$F(t, [H]_0) = \frac{F_n(t, [H]_0)}{t_{adq} F_{max}} t_{adq, lamp} \quad (\text{A1.17})$$

Es posible normalizar el conjunto de todos los decaimientos, una vez corregidos por estos tres efectos, de forma que el que es más intenso, en general el del fluoróforo sólo, tenga 10000 cuentas en el máximo.

Decaimientos con intensidades normalizadas.

En el caso de que las medidas de los decaimientos de fluorescencia a diferentes concentraciones de H se hayan realizado con un número fijo de cuentas en el máximo, se obtienen decaimientos cuya intensidad está normalizada, F_n . Este efecto es el mismo que si se normaliza cada decaimiento a 1 a tiempo 0 o se divide cada decaimiento por la suma de las amplitudes.

El efecto de la normalización de intensidades que se produce cuando todos los decaimientos se miden a un número fijo de cuentas en el máximo se puede ver matemáticamente dividiendo cada decaimiento entre la intensidad obtenida a tiempo cero, $F(0, X_A)$. Por tanto, la intensidad normalizada se obtiene dividiendo la ecuación (A1.12) entre la ecuación (A1.13):

$$F_n(t, X_A) = \frac{F(t, X_A)}{F(0, X_A)} = \frac{X_A \cdot \alpha_A^0 \cdot e^{-t/\tau_A} + (1 - X_A) \cdot \alpha_B^0 \cdot e^{-t/\tau_B}}{X_A \cdot \alpha_A^0 + (1 - X_A) \cdot \alpha_B^0} \quad (\text{A1.18})$$

Esta ecuación puede escribirse como suma de dos exponenciales con factores preexponenciales normalizados $E_{n,i}$ que indican la contribución a la fluorescencia de cada una de las exponenciales:

$$F_n(t, X_A) = \frac{F(t, X_A)}{F(0, X_A)} = E_{n,A}(X_A) \cdot e^{-t/\tau_A} + E_{n,B}(X_A) \cdot e^{-t/\tau_B} \quad (\text{A1.19})$$

En esta ecuación los factores preexponenciales normalizados son:

$$E_{n,A}(X_A) = \frac{X_A \cdot \alpha_A^0}{X_A \cdot \alpha_A^0 + (1 - X_A) \cdot \alpha_B^0} \quad (\text{A1.20})$$

$$E_{n,B}(X_A) = \frac{(1 - X_A) \cdot \alpha_B^0}{X_A \cdot \alpha_A^0 + (1 - X_A) \cdot \alpha_B^0} \quad (\text{A1.21})$$

Es, por tanto, importante señalar que las amplitudes normalizadas ($E_{n,A}$ y $E_{n,B}$) de cada una de las especies no son iguales a las fracciones molares de concentración X_A y X_B . Estas amplitudes normalizadas dependen, además de las fracciones molares, de las amplitudes límite de fluorescencia α_A^0 , α_B^0 . Concretamente, estas amplitudes normalizadas dependen de la razón de las amplitudes límite. Definimos la constante q como la razón entre la amplitud límite del fluoróforo complejoado, α_B^0 , y la del fluoróforo libre, α_A^0 :

$$q = \frac{\alpha_B^0}{\alpha_A^0} \quad (\text{A1.22})$$

Esta constante nos permite expresar las ecuaciones (A1.20) y (A1.21) en función de q y de la fracción molar de fluoróforo:

$$E_{n,A}(X_A) = \frac{X_A}{X_A + (1 - X_A)q} \quad (\text{A1.23})$$

$$E_{n,B}(X_A) = \frac{(1 - X_A)q}{X_A + (1 - X_A)q} \quad (\text{A1.24})$$

La dependencia de la intensidad de fluorescencia de un decaimiento con la constante de equilibrio y la concentración de H , cuando las amplitudes están normalizadas se puede obtener a partir de la ecuación siguiente, análoga a la (A1.19):

$$F_n(t, [H]_0) = \frac{F(t, [H]_0)}{F(0, [H]_0)} = E_{n,A}([H]_0) \cdot e^{-t/\tau_A} + E_{n,B}([H]_0) \cdot e^{-t/\tau_B} \quad (\text{A1.25})$$

Las amplitudes normalizadas de las ecuaciones (A1.23) y (A1.24) pueden expresarse en función de q , de la constante de equilibrio y de la concentración de H , empleando la fracción molar de fluoróforo libre dada por la ecuación (A1.6):

$$E_{n,A}([H]_0) = \frac{1}{1 + Kq[H]_0} \quad (\text{A1.26})$$

$$E_{n,B}([H]_0) = \frac{Kq[H]_0}{1 + Kq[H]_0} \quad (\text{A1.27})$$

Por tanto, estas amplitudes no son proporcionales a las concentraciones de equilibrio, como ocurría con las amplitudes de los decaimientos de intensidades absolutas (ecuación (A1.14)), si bien las variaciones que presentan frente a la concentración de H son similares. Del ajuste no lineal de estas fracciones de amplitudes normalizadas frente a la concentración de $[H]$ se podría obtener el producto de las constantes Kq , pero no la constante de equilibrio sola.

El cociente de amplitudes normalizadas del fluoróforo complejado, dado por la ecuación (A1.27), entre el libre, dado por la ecuación (A1.26), viene dado por la siguiente ecuación:

$$\frac{E_{n,B}}{E_{n,A}}([H]_0) = \frac{E_{n,B}([H]_0)}{E_{n,A}([H]_0)} = Kq[H]_0 \quad (\text{A1.28})$$

Según esta ecuación y este modelo, la representación del cociente de amplitudes de cada decaimiento, aunque estén normalizados, frente a la concentración de H total debe ser una línea recta que pasa por el origen de coordenadas de pendiente Kq .

Apéndice 2: Ajuste de un decaimiento biexponencial con un modelo monoexponencial aparente

En este apéndice se discuten los resultados de un ajuste monoexponencial a un decaimiento de fluorescencia cuando éste en realidad es biexponencial. Esta situación se produce frecuentemente en los ajustes individuales de decaimientos de fluorescencia de dos especies químicas que tienen tiempos de vida muy parecidos. En este caso los residuos del ajuste monoexponencial indican con frecuencia que el ajuste es perfectamente válido, si bien se observa que el tiempo de vida obtenido no es constante sino que varía con la concentración en una serie de decaimientos medidos a distintos valores de una variable (pH, o concentración de ligando: surfactante o CD en este trabajo). Por tanto, el ajuste monoexponencial conduce a un tiempo de vida aparente que depende de los dos tiempos de vida existentes y de sus amplitudes. En este apéndice presentamos cómo son estas dependencias.

Nos centraremos en el estudio de series de decaimientos de fluorescencia registrados a distintos valores de concentración de un ligando $[H]$ para dos especies en equilibrio (A y B). Por tanto, las fracciones molares de dichas especies dependen del valor de la concentración de dichas especies y de la constante de equilibrio como se indicó en el apéndice 1 mediante las ecuaciones (A1.6) y (A1.7). Las dos especies tienen tiempos de vida constantes pero ligeramente diferentes y los factores preexponenciales dependen de la fracción molar de dichas especies como indica la ecuación (A1.12). Dado que este caso se presenta muchas veces en esta tesis nos planteamos si es posible determinar el valor de la constante de equilibrio partiendo del análisis de los datos de tiempo de vida aparente, que en muchos casos son los únicos de los que disponemos dada la baja resolución temporal de nuestro equipo de medida.

p316

p316

p316

Definimos un decaimiento biexponencial, $F_2(t)$, con las amplitudes E_A , E_B y los tiempos de vida τ_A y τ_B mediante una expresión análoga a la de la ecuación (A1.14):

$$F_2(t) = E_A \cdot e^{-t/\tau_A} + E_B \cdot e^{-t/\tau_B} \quad (\text{A2.1})$$

Si consideramos este mismo decaimiento como monoexponencial, $F_1(t)$, éste tendría una amplitud aparente E y un tiempo de vida aparente τ , como se indica en la ecuación siguiente:

$$F_1(t) = E \cdot e^{-t/\tau} \quad (\text{A2.2})$$

Los valores del tiempo de vida del modelo monoexponencial y de su amplitud resultan de una minimización de mínimos cuadrados a los datos experimentales, que asumimos que son los del decaimiento biexponencial $F_2(t)$ dado por la ecuación (A2.1). Para resolver la minimización de forma analítica habría que seleccionar un intervalo de ajuste, es decir los valores de tiempos registrados (o al menos la resolución temporal de los datos). Para evitar la necesidad de fijar el intervalo y la resolución temporal se sustituye la suma discreta de diferencias al cuadrado en la minimización χ^2 , dadas en las ecuaciones (4.15) y (4.16), por

p86

p87

una integral definida desde tiempo cero a tiempo infinito, consiguiéndose de esta forma la ventaja adicional de que en esta expresión del χ^2 no obtenemos las funciones exponenciales sino la siguiente expresión analítica simple:

$$\begin{aligned} \chi^2(\tau, E) &= \int_0^\infty (F_2(t) - F_1(t))^2 = \\ &= \frac{1}{2} \left\{ \tau E^2 - \frac{4\tau E}{(\tau + \tau_A)(\tau + \tau_B)} [(\tau + \tau_A)\tau_B E_B + (\tau + \tau_B)\tau_A E_A] \right\} + \\ &+ \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{\tau_A + \tau_B} [4\tau_A \tau_B E_A E_B + \tau_A E_A^2 (\tau_A + \tau_B) + E_B^2 \tau_B (\tau_A + \tau_B)] \right\} \end{aligned} \quad (\text{A2.3})$$

Para encontrar los valores de E y τ que hacen que esta expresión sea mínima, la primera derivada de esta ecuación respecto a cada uno de estos dos parámetros debe ser cero:

$$\frac{\partial \chi^2(\tau, E)}{\partial \tau} = 0 \quad (\text{A2.4})$$

$$\frac{\partial \chi^2(\tau, E)}{\partial E} = 0 \quad (\text{A2.5})$$

Resolviendo este sistema de ecuaciones se obtienen dos expresiones analíticas polinómicas largas (una para E y otra para τ) en función de E_A , E_B , τ_A y τ_B que no presentamos aquí. Para simplificar estas soluciones expresamos las amplitudes en función de la razón de amplitudes $E_B = E_A$) y los tiempos de vida en función de la razón de tiempos de vida ($\tau_B = \tau_A$) y expandimos la solución mediante series de potencias de primer orden en q_τ y q alrededor de $q_\tau = 1$ y $q=1$. De esta forma se obtienen expresiones muy simples para el tiempo de vida aparente y la amplitud aparente:

$$\tau \approx \frac{1}{4}(3 - q + q_\tau + qq_\tau)\tau_A \quad (\text{A2.6})$$

$$E \approx (1 + q)E_A \quad (\text{A2.7})$$

Dependencia del tiempo de vida aparente de la fracción molar.

Experimentalmente se observó que la variación del tiempo de vida experimental aparente τ resultante de un ajuste con un modelo monoexponencial de un decaimiento con dos tiempos de vida (τ_A y τ_B) de dos especies A y B en un equilibrio según la ecuación (A1.1) en función de la concentración de ligando $[H]$ puede ajustarse con un modelo de un equilibrio que incluye una constante que denominaremos K_{ap} :

$$\tau = \frac{1}{1 + K_{ap}[H]}\tau_A + \frac{K_{ap}[H]}{1 + K_{ap}[H]}\tau_B \quad (\text{A2.8})$$

Sin embargo, se observa que esta constante aparente no siempre coincide con la determinada a partir de las series de espectros de fluorescencia en estado estacionario para el mismo equilibrio y que hemos denominado K , véase definición en la ecuación (A1.2). Es importante señalar que según este modelo en ausencia de ligando, $[H] = 0$, el tiempo de vida obtenido experimentalmente τ coincide con el del fluoróforo libre τ_A y cuando la concentración de ligando es muy alta, experimentalmente se obtiene el tiempo de vida del complejo B, τ_B .

Por ello, hemos procedido a mostrar matemáticamente cuál es el significado físico de esta constante aparente K_{ap} y si existe alguna relación entre esta constante, fácil de determinar a partir de los datos de tiempos de vida experimentales, y la constante real de equilibrio K .

Como se ha deducido en el apartado anterior, el tiempo de vida aparente τ determinado experimentalmente por un ajuste monoexponencial al decaimiento biexponencial depende, además de los valores de los dos tiempos de vida reales, de las amplitudes de estos tiempos de vida, y por tanto, en el caso concreto de un equilibrio químico entre dos especies (A y B), depende de la fracción molar de dichas especies (X_A y $1 - X_A$).

Igualando la expresión del tiempo de vida del ajuste con un modelo monoexponencial y la ecuación del tiempo de vida aparente resultante de la ecuación analítica se obtuvo la expresión para la constante de equilibrio aparente K_{ap} . La expresión de esta constante de equilibrio aparente se puede simplificar si expresamos las amplitudes en función de la razón de amplitudes límite (q , ya definida en el apéndice 1) y los tiempos de vida en función de la razón de tiempos de vida (q_τ):

$$q = \frac{\alpha_B^0}{\alpha_A^0} \quad (\text{A2.9})$$

$$q_\tau = \frac{\tau_B}{\tau_A} \quad (\text{A2.10})$$

La expansión mediante potencias de primer orden en q_τ y de segundo orden en q resulta en una expresión para la constante aparente en función de la razón de amplitudes muy sencilla:

$$K_{ap} \approx Kq \quad (\text{A2.11})$$

Esta aproximación es suficiente en el caso de que las amplitudes límite y los tiempos de vida no sean muy diferentes. La expansión de segundo orden tanto en q como en q_τ conduce a una expresión más compleja para la constante de equilibrio aparente:

$$K_{ap} \approx K + (q - 1)K + \frac{K}{4(1 + K)^3} [K^3q + (3q - 2)(q_\tau - 1)^2K^2 + (2q - 3)Kq - q] \quad (\text{A2.12})$$

Por tanto, en el caso más sencillo la constante aparente K_{ap} podría estimarse de modo aproximado a partir del valor de la razón de amplitudes q .

Apéndice 3: Obtención de modelos

En este apéndice se muestran algunos de los modelos que fueron utilizados en el análisis de datos de las pironinas con la γ -CD. Concretamente se deducen las expresiones para las concentraciones de equilibrio de las especies implicadas.

1- Modelo de dimerización:

El proceso de dimerización de una pironina se representa mediante la siguiente ecuación química:



siendo K_D la constante de equilibrio de dimerización, que se define como sigue:

$$K_D = \frac{[P_2]}{[P][P]} \quad (\text{A3.2})$$

El balance de materia aplicado a la concentración de pironina sería:

$$[P]_0 = 2[P_2] + [P] \quad (\text{A3.3})$$

La resolución del sistema formado por las dos ecuaciones anteriores nos permite obtener las concentraciones de pironina y de dímero en función de la concentración total de pironina $[P]_0$:

$$[P] = \frac{-1 + \sqrt{1 + 8K_D[P]_0}}{4K_D} \quad (\text{A3.4})$$

$$[P_2] = \frac{[P]_0}{2} + \frac{1 - \sqrt{1 + 8K_D[P]_0}}{8K_D} \quad (\text{A3.5})$$

2- Modelo de equilibrios interrelacionados de dimerización, complejación 1:1 y complejación 2:1:

En este caso el sistema considerado es un conjunto de cuatro equilibrios cíclicos, caracterizados por la constante de dimerización (K_D), la constante de formación del complejo de estequiometría 1:1 P:CD (K_1), la constante de formación del complejo de estequiometría 2:1 (P_2 :CD) a partir del complejo P:CD (K_2) y la constante de formación del complejo P_2 :CD a partir del dímero P_2 (K_D^C) tal como se indica en la figura 9.1.

Las constantes de equilibrio de este sistema se definen como sigue:

$$K_D = \frac{[P_2]}{[P][P]} \quad (\text{A3.6})$$

$$K_D^C = \frac{[P_2 : CD]}{[P][P : CD]} \quad (\text{A3.7})$$

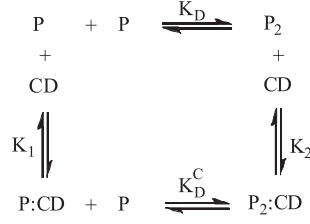


Figura 9.1: Modelo de equilibrios interrelacionados entre el monómero P, su dímero P₂, los complejos de estequiometrías 1:1 P:CD y 2:1 P₂:CD, y la CD libre.

$$K_1 = \frac{[P : CD]}{[P][CD]} \quad (\text{A3.8})$$

$$K_2 = \frac{[P_2 : CD]}{[P_2][CD]} \quad (\text{A3.9})$$

Los balances de materia aplicados a la concentración de CD y de P son:

$$[CD]_0 = [CD] + [P : CD] + [P_2 : CD] \quad (\text{A3.10})$$

$$[P]_0 = [P] + 2[P_2] + [P : CD] + 2[P_2 : CD] \quad (\text{A3.11})$$

En este tipo de sistemas cíclicos una de las constantes siempre queda determinada por los valores de las otras tres. Así, en nuestro caso, la constante K_D^C se calculará a partir de las otras tres constantes mediante la siguiente expresión:

$$K_D^C = \frac{K_2 K_D}{K_1} \quad (\text{A3.12})$$

Combinando las expresiones de las constantes de equilibrio con las de balances de materia, se pueden obtener expresiones para las concentraciones de equilibrio de las cuatro especies implicadas. A continuación se muestran las ecuaciones para las concentraciones de las distintas especies teniendo en cuenta la aproximación de que la concentración de equilibrio de ligando coincide con su concentración total ($[CD] \approx [CD]_0$), aproximación que se cumple siempre que la concentración total de ligando $[CD]_0$ es mucho mayor que la de sustrato $[P]_0$ ($[CD]_0 \gg [P]_0$), como es el caso en las medidas de absorción y de emisión.

$$[P] = \frac{-(1 + K_1[CD]_0) + \sqrt{(1 + K_1[CD]_0)^2 + 8K_D(1 + K_2[CD]_0)[P]_0}}{4K_D(1 + K_2[CD]_0)} \quad (\text{A3.13})$$

$$[P_2] = K_D[P]^2 \quad (\text{A3.14})$$

$$[P : CD] = K_1[CD]_0[P] \quad (\text{A3.15})$$

$$[P_2 : CD] = K_D K_2 [CD]_0 [P]^2 \quad (\text{A3.16})$$

Índice del contenido del CD adjunto

En este apartado se presenta el índice de los análisis globales cuyos resultados se utilizaron en este trabajo y que se incluyen en el CD adjunto, si bien estos se presentan tal y como se obtuvieron con el programa de ajuste de datos:

A- Ajustes globales de las series de las pironinas Y y B con ciclodextrinas (capítulo 5):

- C5_Ajuste1_PYbetaCD_absorcion.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de absorción de la PY con diferentes concentraciones de β -CD.
- C5_Ajuste2_PYbetaCD_emision.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la PY con diferentes concentraciones de β -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm.
- C5_Ajuste3_PYbetaCD_tiemposdevida.pdf: Ajuste global de un modelo biexponencial a los decaimientos de fluorescencia de la PY con diferentes concentraciones de β -CD. Longitud de onda de excitación: 310 nm.
- C5_Ajuste4_PYbetaCD_absorcion.pdf Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de absorción de la PY con diferentes concentraciones de β -CD.
- C5_Ajuste5_PYbetaCD_emision.pdf Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la PY con diferentes concentraciones de β -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm.
- C5_Ajuste6_PYbetaCD_tiemposdevida.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de decaimientos de fluorescencia de la PY con diferentes concentraciones de β -CD. Longitud de onda de excitación: 310 nm.

- C5_Ajuste7_PY_absorcion_dimerizacion_KD3.pdf: Ajuste global de un modelo de dimerización a la serie de espectros de absorción de diferentes concentraciones de PY fijando un valor de 3.0 mM^{-1} para K_D .
- C5_Ajuste8_PY_absorcion_dimerizacion_KD2.pdf: Ajuste global de un modelo de dimerización a la serie de espectros de absorción de diferentes concentraciones de PY fijando un valor de 2.5 mM^{-1} para K_D .
- C5_Ajuste9_PY_absorcion_dimerizacion_KD4.pdf: Ajuste global de un modelo de dimerización a la serie de espectros de absorción de diferentes concentraciones de PY fijando un valor de 3.5 mM^{-1} para K_D .
- C5_Ajuste10_PYgammaCD_emision_Serie1.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la PY con diferentes concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm.
- C5_Ajuste11_PYgammaCD_emision_Serie2.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la PY con diferentes concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm.
- C5_Ajuste12_PYgammaCD_absorcion_PY2CD.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación de la PY con γ -CD en el que dos moléculas de pironina se introducen en la cavidad de esta CD a la serie de espectros de absorción de la PY con diferentes concentraciones de γ -CD a concentraciones de γ -CD mayores de 1.5 mM.
- C5_Ajuste13_PYgammaCD_absorcion_cuatroequilibrios.pdf: Ajuste global de un modelo de modelo completo de cuatro equilibrios de complejación de la PY con γ -CD.
- C5_Ajuste14_PYgammaCD_tiemposdevida.pdf: Ajuste global de un modelo triexponencial a los decaimientos de fluorescencia de la PY con diferentes concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 310 nm.
- C5_Ajuste15_PB_absorcion_dimerizacion.pdf: Ajuste global de un modelo de dimerización a la serie de espectros de absorción con diferentes concentraciones de PB.
- C5_Ajuste16_PBgammaCD_emision_Serie1.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la PB con diferentes concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm.
- C5_Ajuste17_PBgammaCD_emision_Serie2.pdf: Ajuste global de un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la PB con diferentes concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 515 nm.
- C5_Ajuste18_PBgammaCD_absorcion_cuatroequilibrios_K186.pdf: Ajuste global de un modelo completo de cuatro equilibrios, indicado en la figura 5.31, a la serie de

espectros de emisión de la PB con γ -CD fijando el valor de la constante de complejación $K = 186 \text{ mM}^{-1}$.

p126

- C5_Ajuste19_PBgamaCD_absorcion_cuatroequilibrios_K156.pdf: Ajuste global de un modelo completo de cuatro equilibrios, indicado en la figura 5.31, a la serie de espectros de emisión de la PB con γ -CD fijando el valor de la constante de complejación $K = 156 \text{ mM}^{-1}$.

p126

- C5_Ajuste20_PBgamaCD_absorcion_cuatroequilibrios_K216.pdf: Ajuste global de un modelo completo de cuatro equilibrios, indicado en la figura 5.31, a la serie de espectros de emisión de la PB con γ -CD fijando el valor de la constante de complejación $K = 216 \text{ mM}^{-1}$.

- C5_Ajuste21_PBgamaCD_tiemposdevida.pdf: Ajuste global de un modelo triexponencial a la serie de decaimientos de fluorescencia de la PB con diferentes concentraciones de γ -CD. Longitud de onda de excitación: 310 nm.

B- Ajustes globales de las series de la 7-HC en disolventes próticos (capítulo 7):

p199

- C7_Ajuste1_7HCagua_pKaabsorcion.pdf: Ajuste global de un modelo dado por la ecuación ecuación (7.7) a la serie de espectros de absorción de la 7-HC en agua a diferentes valores de pH.

p202

- C7_Ajuste2_7HCagua_emision_exc390nm.pdf: Ajuste global de un modelo dado por la ecuación ecuación (7.10) a la serie de espectros de emisión de la 7-HC en agua a diferentes valores de pH. Longitud de onda de excitación: 390 nm.

p206

- C7_Ajuste3_7HCagua_emision_exc320nm.pdf: Ajuste global de un modelo dado por la ecuación ecuación (7.16) a la serie de espectros de emisión de la 7-HC en agua a diferentes valores de pH. Longitud de onda de excitación: 320 nm.

- C7_Ajuste4_7HCagua_TRES_pH4.pdf: Ajuste global de un modelo biexponencial a la serie de espectros resueltos en el tiempo de la 7-HC en agua a un valor de pH de 4.50. Longitud de onda de excitación: 320 nm.

- C7_Ajuste5_7HCagua_TRES_pH0.pdf: Ajuste global de un modelo biexponencial a la serie de espectros resueltos en el tiempo de la 7-HC en agua a un valor de pH de 0.50. Longitud de onda de excitación: 320 nm.

p228

- C7_Ajuste6_7HCetanol_emision_pHcte_concagua.pdf: Ajuste global de un modelo dado por la ecuación ecuación (7.41) a la serie de espectros de emisión de la 7-HC en etanol a pH 4.1 con diferentes concentraciones de agua: de $1.91 \cdot 10^{-4}$ a 0.716 M. Longitud de onda de excitación: 320 nm.

p231

- C7_Ajuste7_7HCetanol_emision_aguacte_pH.pdf: Ajuste global de un modelo dado por la ecuación (7.53) a la serie de espectros de emisión de la 7-HC en etanol a concentración de agua de 0.217 M y valores de pH en el intervalo de 1.04 a 4.06. Longitud de onda de excitación: 320 nm.

C- Ajustes globales de las series de la 7-HC en tensioactivos (capítulo 8):

- C8_Ajuste1_7HCSDS_absorcion.pdf: Ajuste global de un modelo un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de absorción de la 7-HC en SDS a diferentes concentraciones de SDS.
- C8_Ajuste2_7HCSDS_emision_Serie1.pdf: Ajuste global de un modelo un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de SDS. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste3_7HCSDS_emision_Serie2.pdf: Ajuste global de un modelo un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de SDS. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste4_7HCSDS_emision_Serie3.pdf: Ajuste global de un modelo un modelo de complejación 1:1 a la serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de SDS. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste5_7HCSDS_tiemposdevida_conc.pdf: Ajuste global de los decaimientos de fluorescencia de la 7-HC en presencia de SDS registrados a 400 nm (con amplitudes normalizadas) con un modelo de tres exponenciales con amplitudes libres. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste6_7HCSDS_TRES.pdf: Ajuste global de los espectros TRES de la 7-HC en presencia de SDS 40.3 mM con un modelo biexponencial. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste7_7HCSDeS_absorcion.pdf: Ajuste global de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de SDeS con un modelo de complejación 1:1.
- C8_Ajuste8_7HCSDeS_emision_C11: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de SDeS con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste9_7HCSDeS_emision.pdf: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de SDeS con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.

- C8_Ajuste10_7HCDTAB_absorcion.pdf: Ajuste global de la serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de DTAB con un modelo de complejación 1:1.
- C8_Ajuste11_7HCDTAB_emision_Serie1.pdf: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de DTAB con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste12_7HCDTAB_emision_Serie2.pdf: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de DTAB con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste13_7HCDTAB_tiemposdevida_conc.pdf: Ajuste global de los decaimientos de fluorescencia de la 7-HC en presencia de DTAB registrados a 450 nm (con amplitudes normalizadas) con un modelo de cuatro exponenciales con amplitudes libres. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste14_7HCCTAB_absorcion.pdf: Ajuste global de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de CTAB con un modelo de complejación 1:1.
- C8_Ajuste15_7HCCTAB_emision_Serie1.pdf: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de CTAB con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste16_7HCCTAB_emision_Serie2.pdf: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de DTAB con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste17_7HCBrij35_absorcion.pdf: Ajuste global de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de Brij 35 con un modelo de complejación 1:1.
- C8_Ajuste18_7HCBrij35_emision_Serie1.pdf: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de Brij 35 con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste19_7HCBrij35_emision_Serie2.pdf: Ajuste global de una serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de Brij 35 con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 320 nm.
- C8_Ajuste20_7HCTritonX100_absorcion.pdf: Ajuste global de la serie de espectros de absorción de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100 con un modelo de complejación 1:1.

- C8_Ajuste21_7HCTritonX100_emision.pdf: Ajuste global de la serie de espectros de emisión de la 7-HC en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100 con un modelo de complejación 1:1. Longitud de onda de excitación: 340 nm.

Abreviaturas

7-HC : 7-Hidroxycumarina.

\mathcal{A}^λ : Absorbancia a la longitud de onda λ .

A_x : Amplitud del término x (R : reacción, T : triplete) en una curva de autocorrelación.

C11 : Complejo de inclusión 1:1.

CD : Ciclodextrina.

CMC : Concentración micelar crítica.

CTAB : Bromuro de cetiltrimetilamonio.

D : Coeficiente de difusión traslacional.

\mathbf{D} : Matriz ($n_s \times n_c$) de perfiles que indica la dependencia según el modelo teórico de la matriz de datos \mathbf{Y} con respecto a la variable indicada en las filas de la matriz de datos experimentales (n_s).

DTAB : Bromuro de dodeciltrimetilamonio.

DW : Test de Durbin Watson.

\mathbf{E} : Matriz ($n_c \times n_w$) de espectros puros que indica la dependencia de la matriz de datos \mathbf{Y} con respecto a la variable indicada en las columnas de ésta (n_w).

$E_T(30)$: Parámetro para la polaridad del disolvente propuesto por Dimroth y Reichardt.

FCS : Espectroscopia de correlación de fluorescencia, "Fluorescence Correlation Spectroscopy".

GA : "Global Analysis", Análisis global.

$G(\tau_C)$: Función de autocorrelación de fluorescencia normalizada.

H : Ligando (“host”).

I : Intensidad de emisión de fluorescencia.

I_i : Intensidad de radiación incidente por unidad de tiempo.

IC : Conversión interna.

ISC : Cruce intersistemas.

k_{nr} : constante de velocidad de desactivación no radiante.

k_r : constante de velocidad de desactivación radiante.

k_r^F : constante de velocidad de desactivación radiante calculada teóricamente según la ecuación de Förster.

k_r^{SB} : constante de velocidad de desactivación radiante calculada teóricamente según la ecuación de Strickler-Berg.

n : Índice de refracción del disolvente.

N : Número medio de moléculas fluorescentes.

N_{ag} : Número de agregación.

n_c : Número de componentes en la muestra.

n_s : Número de filas de la matriz de datos \mathbf{Y} (número de muestras o espectros, “samples”).

n_w : Número de columnas de \mathbf{Y} (tiempo o longitud de onda, “wavelength”).

PCA : Análisis de componentes principales.

PCGA : Análisis de componentes principales y análisis global.

P : Pironina (B o Y).

PB : Pironina B o cloruro de 3,6-bis(dietilamino) de xantilo.

PY : Pironina Y, G, J, ZH o cloruro de 3,6-bis(dimetilamino) de xantilo.

Q : Razón entre las luminosidades del complejo B y del huésped libre A.

S_0 : Estado electrónico singlete fundamental.

S_1 : Estado electrónico singlete excitado de menor energía.

SDeS : Decilsulfato sódico.

SDS : Dodecilsulfato sódico.

- T_1 : Estado electrónico triplete excitado de menor energía.
- TCSPC : “*Time Correlated Single Photon Counting*”, recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente.
- TRES : “*Time Resolved Emission Spectra*”, espectros de emisión resueltos en el tiempo.
- \mathbf{V} : Matriz de autovectores ($n_w \times n_w$).
- \mathbf{Y} : Matriz de datos experimentales ($n_s \times n_w$).
- $\hat{\mathbf{Y}}$: Matriz de datos calculados ($n_s \times n_w$).
- w : Radio del foco en las medidas de FCS.
- \mathbf{Z} : Matriz de coeficientes de los autovalores ($n_s \times n_w$).
- ε^λ : Coeficiente de absorptividad molar a la longitud de onda λ .
- ε_r : Constante dieléctrica.
- $\mathbf{\Lambda}$: Matriz de autovalores ($n_s \times n_s$).
- μ : Momento dipolar.
- $\tilde{\nu}_F$: número de onda de un espectro de emisión.
- $\tilde{\nu}$: número de onda de un espectro de absorción.
- $\tilde{\nu}_0$: número de onda de la transición electrónica entre niveles vibracionales fundamentales (transición $0 \rightarrow 0$)
- σ : Error medio residual.
- τ : Tiempo de vida de fluorescencia.
- τ_C : Tiempo de correlación de fluorescencia.
- τ_D : Tiempo de difusión traslacional en una curva de autocorrelación.
- τ_F : Tiempo de vida de fluorescencia radiante.
- τ_R : Tiempo de relajación del término de reacción en una curva de autocorrelación.
- ϕ : Rendimiento cuántico de fluorescencia.

Bibliografía

- [Acemioglu 02] Bilal Acemioglu, Mustafa Arik y Yavuz Onganer. *Solvent effect on nonradiative process of pyronin B in protic and aprotic solvent systems*. J. Lumin., vol. 97, no. 3-4, páginas 153–160, 2002.
- [Al-Soufi 01] W. Al-Soufi, M. Novo y M. Mosquera. *Principal component global analysis of fluorescence and absorption spectra of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole*. Appl. Spectrosc., vol. 55, no. 5, páginas 630–636, 2001.
- [Al-Soufi 05] Wajih Al-Soufi, Belén Reija, Mercedes Novo, Suren Felekyan, Ralf Kühnemuth y Claus A. M. Seidel. *Fluorescence Correlation Spectroscopy, a Tool to investigate Supramolecular Dynamics: Inclusion Complexes of Pyronines with Cyclodextrin*. J. Am. Chem. Soc., vol. 127, no. 24, páginas 8775–8784, 2005.
- [Alargova 98] R. G. Alargova, I. I. Kochijashky, M. L. Sierra y R. Zana. *Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: a Comparison Between the Results From Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching*. Langmuir, vol. 14, no. 19, páginas 5412–5418, 1998.
- [Álvarez-Parrilla 00] Emilio Álvarez-Parrilla, Pedro Ramos Cabrer, Wajih Al-Soufi, Francisco Meijide, Eugenio Rodríguez Núñez y José Vázquez Tato. *Dendritic growth of a supramolecular complex*. Angew. Chem., Int. Ed. Engl., vol. 39, no. 16, páginas 2856–2858, 2000.
- [Álvarez-Parrilla 01] E. Álvarez-Parrilla, W. Al-Soufi, P. Ramos Cabrer, M. Novo y J. Vázquez Tato. *Resolution of the Association Equilibria of 2-(P-Toluidinyl)-Naphthalene-6-Sulfonate (Tns) With Beta-Cyclodextrin and a Charged Derivative*. J. Phys. Chem. B, vol. 105, no. 25, páginas 5994–6003, 2001.

- [Arik 03] Mustafa Arik y Yavuz Onganer. *Molecular excitons of Pyronin B and Pyronin Y in colloidal silica suspension*. Chem. Phys. Lett., vol. 375, no. 1,2, páginas 126–133, 2003.
- [Arnaut 93] Luis G. Arnaut y Sebastiao J Formosinho. *Excited-state proton transfer reactions. I. Fundamentals and intermolecular reactions*. J. Photochem. Photobiol., A, vol. 75, no. 1, páginas 1–20, 1993.
- [Arora 82] Harish Kumar Arora, Rani Aggarwal y R. P Singh. *Acid dissociation constants in ethanol water mixture: some hydroxycoumarins*. J. Indian Chem. Soc., vol. 59, no. 3, páginas 347–8, 1982.
- [Attwood 83] D. Attwood y A. T. Florence. *Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology*. Chapman and Hall, New York, 3 edition, 1983.
- [Azuma 03] Kentaro Azuma, Sachiko Suzuki, Seiichi Uchiyama, Toshi Kajiro, Tomofumi Santa y Kazuhiro Imai. *A study of the relationship between the chemical structures and the fluorescence quantum yields of coumarins, quinoxalinones and benzoxazinones for the development of sensitive fluorescent derivatization reagents*. Photochem. Photobiol. Sci., vol. 2, no. 4, páginas 443–449, 2003.
- [Bacia 03] K. Bacia y P. Schwille. *A Dynamic View of Cellular Processes by in Vivo Fluorescence Auto- and Cross-Correlation Spectroscopy*. Methods, vol. 29, no. 1, páginas 74–85, 2003.
- [Bales 98] Barney L. Bales, Luis Messina, Arwen Vidal, Miroslav Peric y Otaciro R. Nascimento. *Precision relative aggregation number determinations of SDS micelles using a spin probe. A model of micelle surface hydration*. J. Phys. Chem. B, vol. 102, páginas 10347–10358, 1998.
- [Ballew 96] R. M. Ballew, J. Sabelko, C. Reiner y M. Gruebele. *A single-sweep, nanosecond time resolution laser temperature-jump apparatus*. Rev. Sci. Instrum., vol. 67, no. 10, páginas 3694–3699, 1996.
- [Baraka 92] Mohamed Baraka, Michel Dumie y Pierre Viallet. *Kinetics of the hydrolysis of cytotoxic pyronins in micellar systems*. J. Photochem. Photobiol., A, vol. 75, páginas 75–90, 1992.
- [Bardez 84] Elisabeth Bardez, Bich Thui Goguillon, Erlend Keh y Bernard Valeur. *Dynamics of excited-state reactions in reversed micelles. 1. Proton transfer involving a hydrophilic fluorescent probe*. J. Phys. Chem., vol. 88, no. 9, páginas 1909–13, 1984.

- [Bardez 92] Elisabeth Bardez, Patrick Boutin y Bernard Valeur. *Photoinduced biprotonic transfer in 4-methylumbelliferone*. Chem. Phys. Lett., vol. 191, no. 1-2, páginas 142–8, 1992.
- [Beechem 85] Joseph M. Beechem, Marcel Ameloot y Ludwig Brand. *Global analysis of fluorescence decay surfaces: excited-state reactions*. Chem. Phys. Lett., vol. 120, no. 4-5, páginas 466–72, 1985.
- [Beechem 86] Joseph M. Beechem y Ludwig Brand. *Global analysis of fluorescence decay: applications to some unusual experimental and theoretical studies*. Photochem. Photobiol., vol. 44, no. 3, páginas 323–9, 1986.
- [Beechem 92] Joseph M. Beechem. *Global Analysis of Biochemical and Biophysical Data*. Methods Enzymol., vol. 210, páginas 37–54, 1992.
- [Behera 99] G. B. Behera, B. K. Mishra, P. K. Behera y M. Panda. *Fluorescent Probes for Structural and Distance Effect Studies in Micelles, Reversed Micelles and Microemulsions*. Adv. Colloid Interface Sci., vol. 82, no. 1-3, páginas 1–42, 1999.
- [Bender 78] M. L. Bender y M. Komiyama. *Cyclodextrin Chemistry*. Springer-Verlag, 1978.
- [Benesi 49] H. A. Benesi y J. H. Hildebrand. *A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons*. J. Am. Chem. Soc., vol. 71, páginas 2703–2707, 1949.
- [Berne 90] Bruce J. Berne y Robert Pecora. *Dynamic Light Scattering*. Robert E. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, 1990.
- [Bevington 03] Philip R. Bevington y Keith D. Robinson. *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*. McGraw-Hill Higher Education, USA, 2003.
- [Bhattacharyya 03] K. Bhattacharyya. *Solvation Dynamics and Proton Transfer in Supramolecular Assemblies*. Acc. Chem. Res., vol. 36, no. 2, páginas 95–101, 2003.
- [Bo 02] Li Bo, Wu Ying y Gao Xiao-Ming. *Pyronin Y as a fluorescent stain for paraffin sections*. Histochem. J., vol. 34, no. 6-7, páginas 299–303., 2002.
- [Bohne 00] Cornelia Bohne. *Supramolecular dynamics of guest complexation to cyclodextrins*. The Spectrum, vol. 13, no. 3, páginas 14–19, 2000.

- [Bohne 06] C. Bohne. *Supramolecular Dynamics Studied Using Photophysics*. Langmuir, vol. 22, no. 22, páginas 9100–9111, 2006.
- [Bortolus 96] Pietro Bortolus y Sandra Monti. *Photochemistry in cyclodextrin cavities*. In Photochemistry in cyclodextrin cavities, volume 21 of *Advances in Photochemistry*, páginas 1–133. John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- [Breslow 98] R. Breslow. *Bioorganic Chemistry: A Natural and Unnatural Science*. J. Chem. Ed., vol. 75, no. 6, páginas 705–717, 1998.
- [Breslow 00] R. Breslow, S. Belvedere, L. Gershell y D. Leung. *The chelate effect in binding, catalysis, and chemotherapy*. Pure Appl. Chem., vol. 72, no. 3, páginas 333–342, 2000.
- [Brooks 88] Stephen H. Brooks, Alain Berthod, Barbara A. Kirsch y John G Dorsey. *Flow-injection system for determination of critical micelle concentrations of ionic and nonionic surfactants*. Anal. Chim. Acta, vol. 209, no. 1-2, páginas 111–21, 1988.
- [Burchard 94] W. Burchard. *Light Scattering*. In S. B. Ross-Murphy, editor, Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers, páginas 151–213. Blackie Academic & Professional, London, 1994.
- [Caldin 01] E. F. Caldin. The mechanisms of fast reactions in solution. IOS Press, Amsterdam, 2001.
- [Cameron 02] Kenneth S. Cameron y Lee Fielding. *NMR diffusion coefficient study of steroid-cyclodextrin inclusion complexes*. Magn. Reson. Chem., vol. 40, no. Spec. Issue, páginas S106–S109, 2002.
- [Cantor 80] Charles R. Cantor y Paul R. Schimmel. Biophysical Chemistry: The Behavior of Biological Macromolecules, volume 3. W.H. Freeman & Company, 1980.
- [Carnero Ruiz 94] Cristóbal Carnero Ruiz y Francisco García Sánchez. *Effect of urea on aggregation behavior of Triton X-100 micellar solutions: a photophysical study*. J. Colloid Interface Sci., vol. 165, no. 1, páginas 110–15, 1994.
- [Carrazana 04] Jorge Carrazana, Belén Reija, Pedro Ramos Cabrer, Wajih Al-Soufi, Mercedes Novo y José Vázquez Tato. *Complexation of Methyl Orange with beta-cyclodextrin: Detailed Analysis and Application to Quantification of Polymer-bound Cyclodextrin*. Supramol. Chem., vol. 16, no. 8, páginas 549–559, 2004.

- [Chakrabarty 04] Debdeep Chakrabarty, Partha Hazra, Anjan Chakraborty y Nilmoni Sarkar. *Dynamics of solvation and rotational relaxation in neutral Brij 35 and Brij 58 micelles*. Chem. Phys. Lett., vol. 392, no. 4-6, páginas 340–347, 2004.
- [Cohen 01] Boiko Cohen y Dan Huppert. *Excited State Proton-Transfer Reactions of Coumarin 4 in Protic Solvents*. J. Phys. Chem. A, vol. 105, no. 30, páginas 7157–7164, 2001.
- [Cramer 67] F. Cramer, W. Saenger y H.-Ch. Spatz. *Inclusion Compounds. XIX. The Formation of Inclusion Compounds of α -Cyclodextrin in Aqueous Solutions. Thermodynamics and Kinetics*. J. Am. Chem. Soc., vol. 89:1, páginas 14–20, 1967.
- [De Vendittis 81] E. De Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato y V. Bocchini. *A fluorimetric method for the estimation of the critical micelle concentration of surfactants*. Anal. Biochem., vol. 115, no. 2, páginas 278–86., 1981.
- [Demas 71] J. N. Demas y G. A. Crosby. *The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review*. J. Phys. Chem., vol. 75, no. 8, páginas 991–1024, 1971.
- [D'Errico 05] Gerardino D'Errico, Donato Ciccarelli y Ornella Ortona. *Effect of glycerol on micelle formation by ionic and nonionic surfactants at 25 DegC*. J. Colloid Interface Sci., vol. 286, no. 2, páginas 747–754, 2005.
- [Deumié 93] Michel Deumié y Mohamed El Baraka. *Self-aggregation of R110 and R123 rhodamines with surfactants and phospholipid vesicles of negative charge: a qualitative fluorescence study*. J. Photochem. Photobiol., A, vol. 74, páginas 255–266, 1993.
- [Diaz-Fernandez 04] Y. Diaz-Fernandez, A. Perez-Gramatges, S. Rodriguez-Calvo, C. Mangano y P Pallavicini. *Structure and dynamics of micelle-based fluorescent sensor for transition metals*. Chem. Phys. Lett., vol. 398, no. 1-3, páginas 245–249, 2004.
- [Duynstee 59] E. F. J. Duynstee y Ernest Grunwald. *Organic reactions occurring in or on micelles. I. Reaction rate studies of the alkaline fading of triphenylmethane dyes and sulfonephthalein indicators in the presence of detergent salts*. J. Am. Chem. Soc., vol. 81, páginas 4540–2, 1959.

- [Dyck 03] Andria S. M. Dyck, Ursula Kisiel y Cornelia Bohne. *Dynamics for the Assembly of Pyrene-g-Cyclodextrin Host-Guest Complexes*. J. Phys. Chem. B, vol. 107, no. 42, páginas 11652–11659, 2003.
- [Ebersson 82] Lennart Ebersson. *Electron-transfer Reactions in Organic Chemistry*. In V. Gold y D. Bethell, editores, *Advances in Physical Organic Chemistry*, volume 18, páginas 79–185. Academic Press, London, 1982.
- [Eggeling 98] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler y C. A. M. Seidel. *Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: evidence of two-step photolysis*. Anal. Chem., vol. 70, no. 13, páginas 2651–2659, 1998.
- [Eggeling 01] C. Eggeling, S. Berger, L. Brand, J. R. Fries, J. Schaffer, A. Volkmer y C. A. M. Seidel. *Data Registration and Selective Single-Molecule Analysis Using Multi-Parameter Fluorescence Detection*. J. Biotechnol., vol. 86, no. 3, páginas 163–180, 2001.
- [Eigen 54] M. Eigen. *Über die Kinetik sehr schnell verlaufender Ionenreaktionen in wässriger Lösung*. Z. Phys. Chem. (Leipzig), vol. NF1, página 176, 1954.
- [Eigen 94] Manfred Eigen y Rudolf Rigler. *Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 91, no. 13, páginas 5740–7, 1994.
- [El Baraka 91] Mohamed El Baraka, Michel Deumie, Pierre Viallet y Theodor J. Lampidis. *Fluorimetric studies of solutions of pyronin dyes: equilibrium constants in water and partition coefficients in organic-solvent-water systems*. J. Photochem. Photobiol., A, vol. 56, páginas 295–311, 1991.
- [Elson 74] Elliot L. Elson y Douglas Magde. *Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, vol. 13, no. 1, páginas 1–27, 1974.
- [Enderlein 04] Joerg Enderlein, Ingo Gregor, Digambara Patra y Joerg Fitter. *Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy*. Current Pharmaceutical Biotechnology, vol. 5, no. 2, páginas 155–161, 2004.
- [Felekyan 05] S. Felekyan, R. Kühnemuth, V. Kudryavtsev, C. Sandhagen, W. Becker y Seidel C. A. M. *Full correlation from picoseconds*

- to seconds by time-correlated single photon detection.* Rev. Sci. Instrum., vol. 76, no. 8, página 083104, 2005.
- [Fernández 77] Marta S. Fernández y Peter Fromherz. *Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles.* J. Phys. Chem., vol. 81, no. 18, páginas 1755–1761, 1977.
- [Ferrante 93] Camilla Ferrante, Uwe Kensy y Bernhard Dick. *Does diphenylacetylene (tolan) fluoresce from its second excited singlet state? Semiempirical MO calculations and fluorescence quantum yield measurements.* J. Phys. Chem., vol. 97, no. 51, páginas 13457–63, 1993.
- [Fink 70] David W. Fink y Walter R Koehler. *pH Effects on fluorescence of umbelliferone.* Anal. Chem., vol. 42, no. 9, páginas 990–3, 1970.
- [Formosinho 93] Sebastiao J. Formosinho y Luis G Arnaut. *Excited-state proton transfer reactions. II. Intramolecular reactions.* J. Photochem. Photobiol., A, vol. 75, no. 1, páginas 21–48, 1993.
- [Freitas 06] Adilson A. Freitas, Luisa Paulo, Antonio L. Macanita y Frank H Quina. *Acid-Base Equilibria and Dynamics in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles: Geminate Recombination and Effect of Charge Stabilization.* Langmuir, vol. 22, no. 19, páginas 7986–7993, 2006.
- [Fries 98] Joachim Richard Fries. *Charakterisierung einzelner Moleküle in Lösung mit Rhodamin-Farbstoffen.* Phd thesis, Universität-Gesamthochschule Siegen, Cuvillier, Göttingen, 1998.
- [Fujiji 62] Konosuke Fujiji, Chieko Iwanaga y Masao Koizumi. *Some spectral studies of the aqueous solution of pyronine.* Bull. Chem. Soc. Jpn., vol. 35, no. 2, páginas 185–193, 1962.
- [Gell 01] Chris Gell, David J. Brockwell, Godfrey S. Beddard, Sheena E. Radford, Arnout P. Kalverda y D. Alastair Smith. *Accurate use of single molecule fluorescence correlation spectroscopy to determine molecular diffusion times.* Single Molecules, vol. 2, no. 3, páginas 177–181, 2001.
- [Gianneschi 74] L. P. Gianneschi y T. Kurucsev. *Derivation and interpretation of the spectra of aggregates. Part 3 Prediction analytical study of the spectrum of pyronine Y in aqueous solution.* J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, vol. 70, no. 7, páginas 1334–42, 1974.

- [Gianneschi 77] Leon P. Gianneschi, Anthony Cant y Tomas Kurucsev. *Derivation and interpretation of the spectra of aggregates. Part 5. Dimers of some xanthene dyes.* J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, vol. 73, no. 5, páginas 664–8, 1977.
- [Glushko 81] V. Glushko, M. S. Thaler y C. D. Karp. *Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions: behavior in model solvents.* Arch. Biochem. Biophys., vol. 210, no. 1, páginas 33–42., 1981.
- [Granadero Rey 06] Daniel Granadero Rey. *Análisis Global de Curvas de Correlación de Fluorescencia.* Proyecto fin de carrera, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, 25/09/2006.
- [Grzywacz 77] Jerzy Grzywacz y Stanislaw Taszner. *Ionic forms of umbelliferone.* Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Serie des Sciences, Mathematiques, Astronomiques et Physiques, vol. 25, no. 4, páginas 447–53, 1977.
- [Grzywacz 78] Jerzy Grzywacz, Stanislaw Taszner y Jerzy Kruszewski. *Further study on the forms of umbelliferone in excited state.* Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil A: Astrophysik, Physik und Physikalische Chemie, vol. 33A, no. 11, páginas 1307–11, 1978.
- [Harada 93] A. Harada, J. Li y M. Kamachi. *Synthesis of a tubular polymer from threaded cyclodextrins.* Nature, vol. 364, página 516, 1993.
- [Hess 02] Samuel T. Hess, Shaohui Huang, Ahmed A. Heikal y Watt W. Webb. *Biological and Chemical Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review.* Biochemistry, vol. 41, no. 3, páginas 697–705, 2002.
- [Hiemenz 97] Paul C. Hiemenz y Raj Rajagopalan. *Principles of colloid and surface chemistry.* Marcel Dekker, New York, 1997.
- [Hirayama 99] F. Hirayama y K. Uekama. *Cyclodextrin-based controlled drug release system.* Adv. Drug Delivery Rev., vol. 36, no. 1, páginas 125–141, 1999.
- [Ireland 76] J. F. Ireland y P. A. H Wyatt. *Acid-base properties of electronically excited states of organic molecules.* Adv. Phys. Org. Chem., vol. 12, páginas 131–221, 1976.
- [Jones 94] G. H. Jones y M. A Rahman. *Fluorescence properties of coumarin laser dyes in aqueous polymer media. Chromophore isolation in*

- poly(methacrylic acid) hypercoils*. J. Phys. Chem., vol. 98, páginas 13028–13037, 1994.
- [Jover 90] A. Jover, F. Meijide, V. Mosquera y J. Vázquez Tato. *A Step-by-Step Dilution Extraction Method for Laboratory Experiments*. J. Chem. Educ., vol. 67, no. 6, páginas 530–532, 1990.
- [Kalyanasundaram 87] K. Kalyanasundaram. *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*. Academic Press, New York, 1987.
- [Kasha 65] M. Kasha, R. Rawls y M. Ashraf. *The exciton model in molecular spectroscopy*. Pure Applied Chemistry, vol. 11, páginas 371–392, 1965.
- [Kasha 86] M. Kasha. *Proton-Transfer Spectroscopy - Perturbation of the Tautomerization Potential*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II, vol. 82, páginas 2379–2392, 1986.
- [Kask 85] P. Kask, P. Piksarv y Ü. Mets. *Fluorescence correlation spectroscopy in the nanosecond time range: photon antibunching in dye fluorescence*. European Biophysics Journal, vol. 12, no. 3, páginas 163–6, 1985.
- [Kleinman 97] Mark H. Kleinman y Cornelia Bohne. *Use of photophysical probes to study dynamic processes in supramolecular structures*. In V. Ramamurthy y K.S. Schanze, editores, *Organic Photochemistry*, volume 1, páginas 391–466. Marcel Dekker Inc., New York, 1997.
- [Koenig 06] Marcelle Koenig. *Multi-parameter-fluorescence-spectroscopic investigations of molecular dynamics on single biomolecules*. PhD thesis, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2006.
- [Kotz 82] Samuel Kotz, Johnson Norman L. y Read Campbell B. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1982.
- [Krichevsky 02] Oleg Krichevsky y Grégoire Bonnet. *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications*. Rep. Prog. Phys., vol. 65, páginas 251–297, 2002.
- [Krouglova 04] Tatiana Krouglova, Jo Vercaammen y Yves Engelborghs. *Correct Diffusion Coefficients of Proteins in Fluorescence Correlation Spectroscopy. Application to Tubulin Oligomers Induced by Mg²⁺ and Paclitaxel*. Biophys. J., vol. 87, no. 4, páginas 2635–2646, 2004.

- [Kruglova 01] E. B. Kruglova. *Comparison of binding of active cationic dyes to DNA in visible and UV ranges*. Visnik Kharkivs'kogo Nacional'nogo Universitetu im. V. N. Karazina, vol. 525, páginas 27–33, 2001.
- [Kühnemuth 01] Ralf Kühnemuth y Claus A. M. Seidel. *Principles of single molecule multiparameter fluorescence spectroscopy*. Single Molecules, vol. 2, no. 4, páginas 251–254, 2001.
- [Lakowicz 91] Joseph R. Lakowicz. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Principles. Plenum Press, New York, 1991.
- [Lakowicz 99] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic, USA, 1999.
- [Lakowicz 06] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, USA, 2006.
- [Lehn 95] J. M. Lehn. *Supramolecular Chemistry*. VCH, Weinheim, 1995.
- [Lezcano 02] Minerva Lezcano, Wajih Al-Soufi, Mercedes Novo, Eugenio Rodríguez-Núñez y José Vázquez Tato. *Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins*. J. Agric. Food Chem., vol. 50, no. 1, páginas 108–112, 2002.
- [Loftsson 96] T. Loftsson y M. E. Brewster. *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization*. J. Pharm. Sci., vol. 85, no. 10, páginas 1017–1025, 1996.
- [López Arbeloa 91] F. López Arbeloa, T. López Arbeloa, M. J. Tapia Estévez y I. López Arbeloa. *Photophysics of Rhodamines. Molecular Structure and Solvent Effects*. J. Phys. Chem., vol. 95, páginas 2203–2208, 1991.
- [López Arbeloa 92] T. López Arbeloa, F. López Arbeloa, P. Hernández Bartolome y I. López Arbeloa. *On the mechanism of radiationless deactivation of rhodamines*. Chem. Phys., vol. 160, no. 1, páginas 123–30, 1992.
- [López Hortas 06] Maria Inmaculada López Hortas. *Análisis global de series de espectros de fluorescencia. Determinación de intervalos de confianza de parámetros fisicoquímicos mediante simulaciones de Monte Carlo*. Proyecto fin de carrera, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, 25/09/2006.

- [Magde 74] Douglas Magde, Elliot L. Elson y Watt W Webb. *Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization*. Biopolymers, vol. 13, no. 1, páginas 29–61, 1974.
- [Malvezzi-Campeggi 01] Flaminia Malvezzi-Campeggi, Michael Jahnz, Katrin G. Heinze, Petra Dittrich y Petra Schwille. *Light-induced flickering of DsRed provides evidence for distinct and interconvertible fluorescent states*. Biophys. J., vol. 81, no. 3, páginas 1776–1785, 2001.
- [Martínez Martínez 04] V. Martínez Martínez, F. López Arbeloa, J. Prieto Bañuelos, T. López Arbeloa y I. López Arbeloa. *Characterization of Rhodamine 6G Aggregates Intercalated in Solid Thin Films of Laponite Clay. 1. Absorption Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B, vol. 108, no. 52, páginas 20030–20037, 2004.
- [Martínez Martínez 05] V. Martínez Martínez, F. López Arbeloa, J. Prieto Bañuelos y I. López Arbeloa. *Characterization of Rhodamine 6G Aggregates Intercalated in Solid Thin Films of Laponite Clay. 2 - Fluorescence Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B, vol. 109, no. 15, páginas 7443–7450, 2005.
- [Maucher 94] A. Maucher y E von Angerer. *Antitumor activity of coumarin and 7-hydroxycoumarin against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary carcinomas*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, vol. 120, no. 8, páginas 502–4, 1994.
- [McRae 64] E. G. McRae y M. Kasha. *The molecular exciton model*. In Physical process in radiation biology, páginas 23–42. Academic Press, New York, 1964.
- [Mets 01] Ülo Mets. *Antibunching and Rotational Diffusion in FCS*. In R. Rigler y E. S. Elson, editores, Fluorescence correlation spectroscopy: theory and applications, volume 65, páginas 346–359. Springer Verlag, Berlin, 2001.
- [Moriya 83] Tetsuo Moriya. *Excited-state reactions of coumarins in aqueous solutions. I. The phototautomerization of 7-hydroxycoumarin and its derivative*. Bull. Chem. Soc. Jpn., vol. 56, no. 1, páginas 6–14, 1983.
- [Moriya 88] Tetsuo Moriya. *Excited-State Reactions of Coumarins, VII. The Solvent-Dependent Fluorescence of 7-hydroxycoumarins*. Bull. Chem. Soc. Jpn., vol. 61, páginas 1873–1886, 1988.

- [Moure Santamarina 05] María Esperanza Moure Santamarina. *Caracterización de la rodamina B como sonda fluorescente de sistemas micelares*. Proyecto fin de carrera, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, 07/2005.
- [Nepogodiev 98] Sergey A. Nepogodiev y J. Fraser Stoddart. *Cyclodextrin-Based Catenanes and Rotaxanes*. Chem. Rev., vol. 98, no. 5, páginas 1959–1976, 1998.
- [Novo 07] Mercedes Novo, Suren Felekyan, Claus A. M Seidel y Wajih Al-Soufi. *Dye-Exchange Dynamics in Micellar Solutions Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B, vol. 111, no. 14, páginas 3614–3624, 2007.
- [O'Connor 84] D. V. O'Connor y David Phillips. *Time Correlated Single Photon Counting*. Academic Press, London, 1984.
- [O'Kennedy 97] Richard O'Kennedy y R. Douglas Thornes. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
- [Onganer 92] Yavuz Onganer y Edward L. Quitevis. *Effect of solvent on non-radiative processes in xanthene dyes: pyronin B in alcohols and alcohol-water mixtures*. J. Phys. Chem., vol. 96, páginas 7996–8001, 1992.
- [Ormsom 94] S. M. Ormsom y R. G Brown. *Excited state intramolecular proton transfer part 1: ES IPT to nitrogen*. Prog. React. Kinet., vol. 19, no. 1, páginas 45–91, 1994.
- [Palmer III 87] Arthur G. Palmer III y Nancy L. Thompson. *Theory of Sample Translation in Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Biophys. J., vol. 51, páginas 339–343, 1987.
- [Patist 00] A. Patist, S. S. Bhagwat, K. W. Penfield, P. Aikens y D. O Shah. *On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants*. Journal of Surfactants and Detergents, vol. 3, no. 1, páginas 53–58, 2000.
- [Pawley 95] James B. Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, New York, 2 edition, 1995.
- [Phillies 93] G. D. J. Phillies, J. Stott y S. Z. Ren. *Probe Diffusion in the Presence of Nonionic Amphiphiles - Triton X-100*. J. Phys. Chem., vol. 97, no. 44, páginas 11563–11568, 1993.

- [Phillies 95] George D. J. Phillies, R. H. Hunt, K. Strang y N Sushkin. *Aggregation Number and Hydrodynamic Hydration Levels of Brij-35 Micelles from Optical Probe Studies*. Langmuir, vol. 11, no. 9, páginas 3408–16, 1995.
- [Phillies 96] G. D. J. Phillies y J. E. Yambert. *Solvent and Solute Effects on Hydration and Aggregation Numbers of Triton X-100 Micelles*. Langmuir, vol. 12, no. 14, páginas 3431–3436, 1996.
- [Pina 01] Fernando Pina, Maria Joao Melo, Sergio Alves, Roberto Ballardini, Mauro Maestri y Paolo Passaniti. *Micelle effect on ground and excited state proton transfer reactions involving the 4-methyl-7-hydroxyflavylium cation*. New J. Chem., vol. 25, no. 5, páginas 747–752, 2001.
- [Prento 03] P. Prento y H. O. Lyon. *Methyl green-pyronin Y staining of nucleic acids: studies on the effects of staining time, dye composition and diffusion rates*. Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission, vol. 78, no. 1, páginas 27–33., 2003.
- [Preu 99] Harald Preu, Abdellah Zradba, Sebastian Rast, Werner Kunz, Edme H. Hardy y Manfred D Zeidler. *Small angle neutron scattering of D2O-Brij 35 and D2O-alcohol-Brij 35 solutions and their modelling using the Percus-Yevick integral equation*. Physical Chemistry Chemical Physics, vol. 1, no. 14, páginas 3321–3329, 1999.
- [Priev 02] Aba Priev, Samuel Zalipsky, Rivka Cohen y Yechezkel Barenholz. *Determination of critical micelle concentration of lipopolymers and other amphiphiles: comparison of sound velocity and fluorescent measurements*. Langmuir, vol. 18, no. 3, páginas 612–617, 2002.
- [Quina 95] F. H. Quina, P. M. Nassar, J. B. S. Bonilha y B. L. Bales. *Growth of Sodium Dodecyl-Sulfate Micelles With Detergent Concentration*. J. Phys. Chem., vol. 99, no. 46, páginas 17028–17031, 1995.
- [Regev 99] Oren Regev y Raoul Zana. *Aggregation behavior of Tyloxapol, a nonionic surfactant oligomer, in aqueous solution*. J. Colloid Interface Sci., vol. 210, no. 1, páginas 8–17, 1999.
- [Reichardt 88] Christian Reichardt. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, 1988.

- [Reija 03] Belén Reija. *Análisis avanzado de espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo*. Tesina de licenciatura, Santiago de Compostela, Lugo, 2003.
- [Reija 05] Belén Reija, Wajih Al-Soufi, Mercedes Novo y José Vázquez Tato. *Specific interactions in the inclusion complexes of Pyronines Y and B with beta-cyclodextrin*. *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 4, páginas 1364–1370, 2005.
- [Rharbi 99] Y. Rharbi, M. A. Winnik y K. G. Hahn. *Kinetics of Fusion and Fragmentation Nonionic Micelles: Triton X-100*. *Langmuir*, vol. 15, no. 14, páginas 4697–4700, 1999.
- [Rharbi 01] Y. Rharbi y M. A. Winnik. *Solute Exchange Between Surfactant Micelles by Micelle Fragmentation and Fusion*. *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 89, páginas 25–46, 2001.
- [Rigler 93] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren y P. Kask. *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: Analysis of translational diffusion*. *European Biophysics Journal*, vol. 22, no. 3, páginas 169–75, 1993.
- [Rigler 01] R. Rigler y E. S. Elson. *Fluorescence correlation spectroscopy: theory and applications*. Springer Verlag, Berlin, 2001.
- [Ríos Rodríguez 90] María del Carmen Ríos Rodríguez. *Procesos de transferencia protónica fotoinducida en (7 y 4) hidroxicumarinas*. Master thesis, Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1990.
- [Ritter 02] H. Ritter y M. Tabatabai. *Cyclodextrin in Polymer Synthesis: A Green Way to Polymers*. *Prog. Polym. Sci.*, vol. 27, páginas 1713–1720, 2002.
- [Robl 26] R. Robl. *Umbelliferone as a fluorescing indicator*. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [Abteilung] B: Abhandlungen*, vol. 59B, páginas 1725–6, 1926.
- [Robson 77] Robert J. Robson y Edward A Dennis. *The size, shape, and hydration of nonionic surfactant micelles. Triton X-100*. *J. Phys. Chem.*, vol. 81, no. 11, páginas 1075–8, 1977.
- [Rodríguez Fraga 06] David Rodríguez Fraga. *Estudio de la Rodamina 123 como sonda fluorescente para el estudio de sistemas micelares*. Proyecto fin de carrera, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, 12/2006.

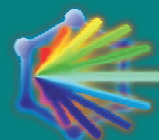
- [Rohrbach 77] R. P. Rohrbach, L. J. Rodríguez, Edward M. Eyring y J. F. Wojcik. *An equilibrium and kinetic investigation of salt-cycloamylose complexes*. J. Phys. Chem., vol. 81, no. 10, páginas 944–8, 1977.
- [Romero Ale 02] C. Romero Ale, A. I. Olives, M. A. Martín, B. Del Castillo, A. M. Agnese, M. G. Ortega, S. Núñez-Montoya y J. L. Cabrera. *Study of the solvatochromic effect on natural phenolic compounds*. Ars Pharmaceutica, vol. 43, no. 1-2, páginas 57–71, 2002.
- [Roque 99] Ana Roque, Fernando Pina, Sergio Alves, Roberto Ballardini, Mauro Maestri y Vincenzo Balzani. *Micelle effect on the 'write-lock-read-unlock-erase' cycle of 4'-hydroxyflavylium ion*. J. Mater. Chem., vol. 9, no. 9, páginas 2265–2269, 1999.
- [Rothwell 03] P. J. Rothwell, S. Berger, O. Kensch, S. Felekyan, M. Antonik, B. M. Wohrl, T. Restle, R. S. Goody y C. A. M. Seidel. *Multiparameter Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy Reveals Heterogeneity of Hiv-1 Reverse Transcriptase: Primer/Template Complexes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 100, no. 4, páginas 1655–1660, 2003.
- [Saenger 96] W. Saenger. *Cyclodextrins: Structures, Functions, Hydrogen Bonding*. In L. Kaifer A. E. Echegoyen, editor, Physical Supramolecular Chemistry, páginas 273–288. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1996.
- [Schiller 86] Robert L. Schiller, Stephen F. Lincoln y John H. Coates. *A kinetic and equilibrium study of the inclusion of pyronine B by beta- and gamma-cyclodextrin*. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, vol. 82, páginas 2123–2132, 1986.
- [Schiller 87a] Robert L. Schiller, Stephen F. Lincoln y John H. Coates. *The inclusion of pyronine B and pyronine Y by beta- and gamma-cyclodextrins. A kinetic and equilibrium study*. J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem., vol. 5, páginas 59–63, 1987.
- [Schiller 87b] Robert L. Schiller, Stephen F. Lincoln y John H. Coates. *The inclusion of pyronine Y by beta- and gamma-cyclodextrin*. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, vol. 83, no. 11, páginas 3237–3248, 1987.
- [Seixas de Melo 93] J. Seixas de Melo y A. L. Macanita. *Three interconverting excited species: experimental study and solution of the general photokinetic triangle by time-resolved fluorescence*. Chem. Phys. Lett., vol. 204, no. 5-6, páginas 556–62, 1993.

- [Steed 00] Jonathan W. Steed y Jerry L. Atwood. *Supramolecular Chemistry*. Wiley, London, 2000.
- [Straume 92] M. Straume y M. L. Johnson. *Analysis of residuals: criteria for determining goodness-of-fit*. *Methods Enzymol.*, vol. 210, páginas 87–105, 1992.
- [Streletzky 95] K. Streletzky y G. D. J. Phillies. *Temperature-Dependence of Triton X-100 Micelle Size and Hydration*. *Langmuir*, vol. 11, no. 1, páginas 42–47, 1995.
- [Strickler 62] S. J. Strickler y Robert A. Berg. *Relation between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules*. *J. Chem. Phys.*, vol. 37, páginas 814–22, 1962.
- [Szejtli 96] Jozsef Szejtli, Tetsuo Osa y Jerry L. Atwood. *Cyclodextrins*. In *Cyclodextrins*, volume 3 of *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. Pergamon, Oxford, 1996.
- [Szejtli 98] József Szejtli. *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. *Chem. Rev.*, vol. 98, no. 5, páginas 1743–1754, 1998.
- [Tanford 74] Charles Tanford. *Thermodynamics of micelle formation. Prediction of micelle size and size distribution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 71, no. 5, páginas 1811–15, 1974.
- [Tellinghuisen 05] J. Tellinghuisen. *Understanding Least Squares Through Monte Carlo Calculations*. *J. Chem. Educ.*, vol. 82, no. 1, páginas 157–166, 2005.
- [Thompson 91] N. L. Thompson. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*. In Joseph R. Lakowicz, editor, *Topics in Fluorescence Spectroscopy. Techniques*, páginas 337–378. Plenum Press, New York, 1991.
- [Tomsic 04] M. Tomsic, M. Bester-Rogac, A. Jamnik, W. Kunz, D. Touraud, A. Bergmann y O. Glatter. *Nonionic Surfactant Brij 35 in Water and in Various Simple Alcohols: Structural Investigations by Small-Angle X-ray Scattering and Dynamic Light Scattering*. *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 22, páginas 7021–7032, 2004.
- [Toth 06] Gergely Toth y Adam Madarasz. *Structure of BRIJ-35 Nonionic Surfactant in Water: A Reverse Monte Carlo Study*. *Langmuir*, vol. 22, no. 2, páginas 590–597, 2006.

- [Tsukube 96] H. Tsukube, H. Furuta, A. Odani, Y. Takeda, Y. Kudo, Y. Inoue, Y. Liu, H. Sakamoto y K. Kimura. *Chapter 10. Determination of Stability Constants*. In J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. Macnicol y F. Vögtle, editores, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, volume 8 . 10, página 425. Pergamon, Oxford, 1996.
- [Turro 91] Nicholas J. Turro. *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, USA, 1991.
- [Turro 05] Nicholas J. Turro. *Supramolecular Structure and Dynamics Special Feature: Molecular structure as a blueprint for supramolecular structure chemistry in confined spaces*. PNAS, vol. 102, no. 31, páginas 10766–10770, 2005.
- [Umeto 03] Hirohide Umeto, Keisuke Abe, Chisako Kawasaki, Tetsutaro Igarashi y Tadimitsu Sakurai. *Cationic micellar effects on the proton transfer reactions of N-substituted 2-(7-hydroxycoumarin-4-yl)acetamides and related compound in the ground and excited singlet states*. J. Photochem. Photobiol., A, vol. 156, no. 1-3, páginas 127–137, 2003.
- [Valdés-Aguilera 89] Óscar Valdés-Aguilera y D. C Neckers. *Aggregation phenomena in xanthene dyes*. Acc. Chem. Res., vol. 22, no. 5, páginas 171–7, 1989.
- [Valeur 02] Bernard Valeur. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, Germany, 2002.
- [Vinogradov 01] Alexander M. Vinogradov, Alexander S. Tatikolov y Silvia M. B Costa. *The effect of anionic, cationic and neutral surfactants on the photophysics and isomerization of 3,3'-diethylthiacarbocyanine*. Physical Chemistry Chemical Physics, vol. 3, no. 19, páginas 4325–4332, 2001.
- [Ware 73] William R. Ware, Laurence J. Doemeny y Thomas L. Nemzek. *Deconvolution of Fluorescence and Phosphorescence Decay Curves. A Least-Squares Method*. J. Phys. Chem., vol. 77, no. 17, páginas 2038–2048, 1973.
- [Weast 86] Robert C. Weast. *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.
- [Weller 60] A. Weller. *Investigation of rapid reactions of excited molecules by fluorescence measurements*. Zeitschrift fuer Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie, vol. 64, páginas 55–9, 1960.

- [Widengren 97] Jerker Widengren, Johannes Dapprich y Rudolf Rigler. *Fast interactions between Rh6G and dGTP in water studied by fluorescence correlation spectroscopy*. Chem. Phys., vol. 216, no. 3, páginas 417–426, 1997.
- [Widengren 98] Jerker Widengren y Rudolf Rigler. *Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces*. Cell. Mol. Biol., vol. 44, no. 5, páginas 857–879, 1998.
- [Widengren 99] Jerker Widengren, Bob Terry y Rudolf Rigler. *Protonation kinetics of GFP and FITC investigated by FCS - aspects of the use of fluorescent indicators for measuring pH*. Chem. Phys., vol. 249, no. 2-3, páginas 259–271, 1999.
- [Widengren 01] Jerker Widengren. *Photophysical aspects of FCS measurements*. In R. Rigler y E. S. Elson, editores, Fluorescence correlation spectroscopy: theory and applications, volume 65, páginas 276–301. Springer Verlag, Berlin, 2001.
- [Wolfbeis 93] O. S. Wolfbeis. Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications. Springer, cop., Berlin, 1993.
- [Wong 99] J. E. Wong, T. M. Duchscherer, G. Pietraru y D. T. Cramb. *Novel Fluorescence Spectral Deconvolution Method for determination of critical micelle concentrations using the fluorescence probe PRO-DAN*. Langmuir, vol. 15, páginas 6181–6186, 1999.
- [Yoshida 90] N. Yoshida, A. Seiyama y M. Fujimoto. *Dynamic Aspects in Host-Guest Interactions. Mechanism for Molecular Recognition by alpha-Cyclodextrin of Alkyl-Substituted Hydroxyphenylazo Derivatives of Sulfanilic Acid*. J. Phys. Chem., vol. 94, página 4246, 1990.
- [Yoshida 94] Noboru Yoshida y Katura Hayashi. *Dynamics aspects in host-guest interactions. Part 2. Directional inclusion reactions of some azo guest molecules with α -cyclodextrin*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, no. 6, páginas 1285–90, 1994.
- [Zana 87] Raoul Zana. Surfactant solutions. New methods of investigation. Marcel Dekker, New York, 1987.
- [Zana 05] R. Zana. Dynamics of Surfactant Self-assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases. Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, 2005.

- [Zander 02] Christoph Zander, Jörg Enderlein y Richard A. Keller. *Single-Molecule Detection in Solution - Methods and Applications*. VCH-Wiley, Berlin/New York, 2002.
- [Zhang 02] X. Zhang, G. Gramlich, X. Wang y W. M. Nau. *A Joint Structural, Kinetic, and Thermodynamic Investigation of Substituent Effects on Host-Guest Complexation of Bicyclic Azoalkanes by β -Cyclodextrin*. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 2, páginas 254–263, 2002.
- [Zinsli 75] P. E. Zinsli. *Investigation of rate parameters in chemical reactions of excited hydroxycoumarins in different solvents*. *Journal of Photochemistry*, vol. 3, páginas 55–69, 1974-1975.



Grupo de Fotofísica y
Fotoquímica Molecular



Tesis Doctoral
Grupo de Fotoquímica y Fotofísica Molecular
Departamento de Química Física
Universidad de Santiago de Compostela

Belén Reija Otero

Tesis
Doctoral
2007