



# ESTUDIO ESTRUCTURAL Y DINÁMICO DE PROCESOS DE ASOCIACIÓN SUPRAMOLECULAR



**Lucas Piñeiro Maseda**

Tesis Doctoral, 2015

Departamento de Química-Física

Universidad de Santiago de Compostela



LOS DOCTORES **MARÍA DE LA MERCED NOVO RODRÍGUEZ** Y **WAJIB AL-SOUFI**, PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

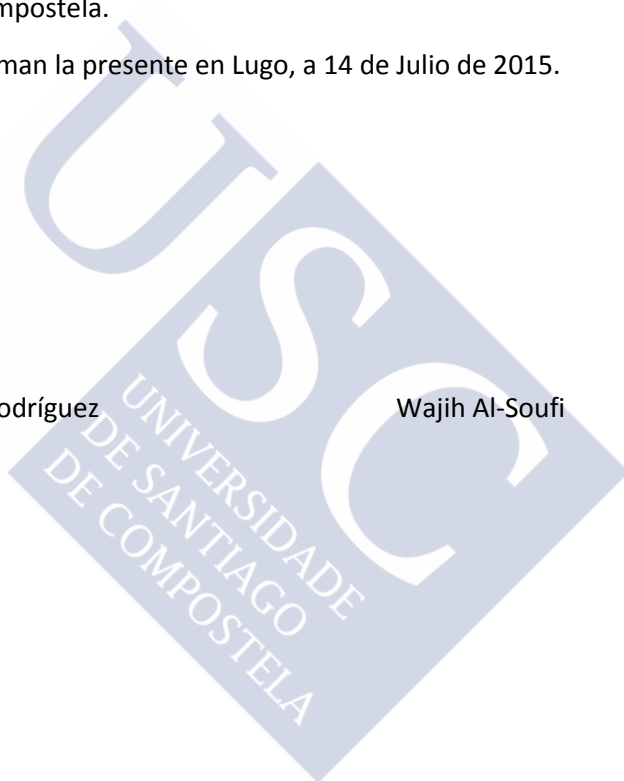
CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, con el título **“ESTUDIO ESTRUCTURAL Y DINÁMICO DE PROCESOS DE ASOCIACIÓN SUPRAMOLECULAR”**, que presenta el Licenciado en Química **LUCAS PIÑEIRO MASEDA** para optar al **Título de Doctor** por la **Universidad de Santiago de Compostela**, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química-Física de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, a 14 de Julio de 2015.

M<sup>a</sup> de la Merced Novo Rodríguez

Wajih Al-Soufi





## Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela, en la Facultad de Ciencias de Lugo, bajo la dirección de los profesores Wajih Al-Soufi y M<sup>a</sup> de la Merced Novo Rodríguez, a los que quisiera hacer constar mi más profundo agradecimiento por su incondicional y constante apoyo.

No podría olvidarme de mis compañeros durante todos estos años, Belén, Carlos, Csilla, Dani Jorge y Sonia, a los que debo muchos momentos inolvidables y que hicieron que esta etapa pasase, quizás, demasiado rápido. Agradecer a Franziska, Iria y Paula por compartir cientos horas en el laboratorio y hacer que parecieran minutos.

Gracias a mis amigos por aguantar los horarios intempestivos, los días de malhumor y la desaparición durante semanas encerrado en el laboratorio. Gracias Adrián, Alfonso, Ana, Antoni, Gustavo, Jota, Soraya M., Soraya V, Tomás.

Gracias a mis padres y a toda mi familia por su gran apoyo y compasión; sin ellos no habría podido ser posible.

Gracias en definitiva a todas esas personas con las que he compartido estos años, muchas de las cuales no aparecen aquí citadas y sin las cuales esto no habría sido lo mismo.

Para finalizar, agradecer a la Xunta de Galicia la concesión de la ayuda predoctoral del programa I2C, y a la Fundación Segundo Gil Dávila; sin las cuales no habría sido posible la realización de este trabajo.



# Tabla de contenido

Capítulo 1. Introducción y objetivos.....	1
1.1 Introducción .....	1
1.2 Justificación razonada de la unidad y coherencia temática y metodológica .....	6
1.3 Objetivos.....	7
Capítulo 2. Metodología .....	9
2.1 Preparación y medida de muestras.....	9
2.1.1 Reactivos.....	9
2.1.2 Muestras de pireno. ....	9
2.1.3 Preparación de muestras para FCS.....	18
2.1.4 Medidas de FCS. ....	18
2.2 Aparatos de medida .....	20
2.2.1 Espectrofotómetro Visible-Ultravioleta .....	20
2.2.2 Espectrofluorímetro con resolución temporal.....	21
2.2.3 Equipo de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia .....	22
2.2.4 Técnicas de Conductividad .....	25
2.3 Análisis de Datos.....	26
2.3.1 Series de espectros de emisión de fluorescencia.....	26
2.3.2 Decaimientos de emisión de fluorescencia.....	27
Capítulo 3. Modelo para concentraciones de monómeros y micelas en disoluciones de tensioactivos .....	29
3.1 Artículo original .....	29
3.2 Supplementary Information .....	50
Capítulo 4. Intercambio de colorante en sistemas micelares.....	57
4.1 Artículo original .....	57

4.2	Supplementary Information .....	81
Capítulo 5.	Emisión de fluorescencia de pireno en disoluciones de tensioactivos .....	95
5.1	Artículo original .....	95
5.2	Supplementary Information .....	124
Capítulo 6.	Determinación de la <i>cmc</i> usando pireno como sonda fluorescente.....	147
6.1	Introducción. ....	147
6.2	Teoría.....	148
6.2.1	Equilibrio de reparto .....	149
6.2.2	Quenching entre el pireno y el surfactante monomérico.....	150
6.2.3	Fluorescencia del estado estacionario .....	150
6.2.4	Relación de intensidades absolutas de emisión de fluorescencia .....	150
6.2.5	Conductividad eléctrica de disoluciones de surfactantes iónicas.....	151
6.2.6	Relación de absorbancias en el espectro de absorción.....	152
6.3	Propiedades de los surfactantes estudiados.....	153
6.3.1	Tensioactivos neutros.....	153
6.3.2	Tensioactivos iónicos.....	155
6.3.3	Resumen de datos bibliográficos de los tensioactivos.....	157
6.4	Resultados .....	159
6.4.1	Surfactantes neutros.....	159
6.4.2	Surfactantes iónicos.....	167
6.5	Discusión.....	173
6.6	Conclusiones.....	187
Capítulo 7.	Conclusiones globales .....	189
Bibliografía	.....	191
Resúmenes	.....	197
Artículos de investigación	.....	201

# Capítulo 1. Introducción y objetivos

## 1.1 Introducción

Los *tensioactivos*, también denominados *surfactantes*, son sustancias ampliamente utilizadas en múltiples aplicaciones comerciales, industriales y de investigación. Propiedades como la detergencia, la capacidad de solubilización de lípidos o la reducción de la tensión superficial hacen de los tensioactivos elementos esenciales en áreas como la petroquímica, la industria farmacéutica, la cosmética, los detergentes o la bioquímica. Hoy en día siguen siendo utilizados en una gran variedad de formas en aplicaciones modernas.

Los tensioactivos no iónicos son esenciales en la industria farmacéutica, en análisis bioquímicos, o en exámenes bioanalíticos como ELISAs. En estos procedimientos los tensioactivos son usados como agentes bloqueantes contra enlaces no específicos y para renaturalizar las proteínas. Se utilizan para la protección de las proteínas frente a la agregación y para evitar el daño superficial. También pueden ser empleados para incrementar la solubilidad y la estabilidad de las disoluciones proteicas.

Teniendo en cuenta que las micelas son consideradas como sistemas miméticos de membranas biológicas sencillas, durante los últimos años se han estudiado la interacción y la localización de ciertos metabolitos en un amplio número de sistemas micelares modelos de sistemas biológicos.

Las propiedades de las disoluciones acuosas de tensioactivos vienen determinadas por su estructura molecular. Los tensioactivos son moléculas anfifílicas que se orientan o agregan minimizando la exposición de su parte hidrófoba a la fase acuosa (Holmberg 2001, Tadros 2005). A concentraciones de tensioactivo mayores que la *concentración micelar crítica (cmc)* las moléculas se alinean espontáneamente en agregados supramoleculares globulares denominados *micelas*, protegiendo la parte hidrófoba en su interior y orientando su parte hidrófila hacia el agua. Tanto la *cmc* como el número medio de moléculas de tensioactivo por micela, el *número de agregación (n)*, dependen de la estructura y carga del tensioactivo y de las condiciones del entorno como pH, temperatura, aditivos, presión, fuerza iónica, presencia de contraiones, etc.

La elección de un tensioactivo adecuado para cada uso se basa en sus propiedades, especialmente la *cmc* y el número de agregación.

La presencia de tensioactivos afecta en general a las propiedades fisicoquímicas de disoluciones, como la conductividad eléctrica, la tensión superficial, la difusión de luz, la capacidad de solubilización o la difusión traslacional, existiendo una fuerte dependencia de dichas propiedades

## 1.1 Introducción

con la concentración total de surfactante. También perturban las propiedades de solutos presentes en la disolución, como por ejemplo la absorción UV-Vis o la fluorescencia de colorantes. Además, las propiedades fisicoquímicas del tensioactivo, como es el desplazamiento de RMN, se ve en general muy afectado por la concentración.

Para un análisis cuantitativo de las propiedades fisicoquímicas de disoluciones de tensioactivos es necesario el conocimiento de la concentración de cada especie (monómeros de tensioactivos y micelas), de la  $cmc$ , de  $n$  y de una multitud de otras propiedades como el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico.

Tanto las propiedades de los agregados de tensioactivos como sistemas supramoleculares como las propiedades interfaciales de las disoluciones de tensioactivos han sido estudiadas ampliamente (Zana 2005, Israelachvili 2010). Sin embargo, no existen modelos satisfactorios que describan de forma adecuada estos fenómenos de forma general.

### *Determinación de la $cmc$*

La concentración micelar crítica ( $cmc$ ) de un tensioactivo puede ser determinada por numerosos métodos que utilizan las diferencias entre las propiedades físicoquímicas de monómeros y micelas. Muchos de esos métodos analizan directamente propiedades de la disolución de tensioactivo como la tensión superficial, la conductividad, la dispersión de luz, la presión osmótica, la presión de vapor, el desplazamiento de RMN, o el punto de congelación. Otros son métodos indirectos que se basan en cambios en las propiedades de solutos, típicamente de colorantes, para los que se analizan las variaciones en el espectro de absorción o de emisión de fluorescencia o en la curva de correlación de fluorescencia. En este caso es necesario tener en cuenta la interacción entre el soluto y los tensioactivos y especialmente sus coeficientes de partición.

La  $cmc$  se determina a partir de los datos experimentales en la mayoría de los casos por métodos gráficos. Los datos presentan en general una dependencia lineal con la concentración, tanto por debajo de la  $cmc$  como por encima. La  $cmc$  se define como el punto de corte de las dos rectas trazadas a través de las dos zonas lineales de los datos (Mukerjee 1971). No siempre se da la linealidad o se pueden tomar suficientes datos en ambos intervalos. Esto introduce un importante factor subjetivo. Este método tampoco permite tener en cuenta el equilibrio de partición de un soluto o sonda entre la fase acuosa y la pseudofase micelar. Y además no es fácil automatizar el método o aplicar ajustes globales de diferentes series de medidas, o incluso de datos obtenidos con técnicas distintas.

Estos problemas son los principales responsables de que los valores de la  $cmc$  de un tensioactivo sean en muchos casos muy diferentes según la propiedad experimental empleada.

Dada la gran importancia que tienen los tensioactivos hoy en día parece muy sorprendente que un parámetro tan esencial como la  $cmc$  siga siendo determinado por este tipo de métodos gráficos. Existen métodos analíticos para determinadas propiedades, especialmente la conductividad eléctrica y la fluorescencia de pireno (véanse citas en la introducción del artículo 1, Capítulo 3), pero que se limitan a una sola propiedad y no son aplicables a datos obtenidos con otras técnicas.

Según nuestro conocimiento, en este momento no existe ningún método de análisis para la determinación de la *cmc* que sea sistemático y común para diferentes propiedades de disoluciones de tensioactivos.

*Concentración de especies de tensioactivos*

Para el análisis cuantitativo de datos experimentales de disoluciones de tensioactivos es necesario disponer de un modelo para las concentraciones de las especies de tensioactivos presentes en la disolución. El modelo aplicado en prácticamente la totalidad de los trabajos experimentales asume que a concentraciones de tensioactivos menores que la *cmc* solamente existen tensioactivos monoméricos, mientras que por encima de la *cmc* todo el tensioactivo añadido forma micelas, manteniéndose la concentración de monómeros constante e igual a la *cmc*.

Entonces para una concentración total de surfactante  $[S]_0$ , la concentración de tensioactivo monomérico,  $[S_1]$  y la concentración de tensioactivo micelizado,  $[S_m]$  vendrían dados por

$$\begin{aligned} [S]_0 < cmc: & \quad [S_1] \approx [S]_0, \quad [S_m] \approx 0 \\ [S]_0 \geq cmc: & \quad [S_1] \approx cmc, \quad [S_m] \approx [S]_0 - cmc \end{aligned} \quad (1.1)$$

La concentración de micelas  $[M]$  se estima entonces en base del número de agregación  $n$  (Turro 1978, Freire 2010):

$$[M] = \frac{[S_m]}{n} \approx \frac{[S]_0 - cmc}{n} \quad (1.2)$$

Estas aproximaciones son adecuadas a concentraciones por debajo o por encima de la *cmc* pero no describen adecuadamente la transición entre estas dos regiones, que es precisamente el intervalo más relevante para la definición de la *cmc*.

Las propiedades experimentales de una disolución de tensioactivos no presentan discontinuidades en la *cmc* sino un intervalo de transición más o menos amplio en el cual se observa una influencia gradual de la formación de las micelas. La micelización no es un proceso estrictamente crítico sino que ocurre en un intervalo de concentraciones cuyo valor central define la *cmc* (Lindman 1980).

A pesar de un tratamiento teórico muy extenso de la agregación de tensioactivos (Zana 2005, Israelachvili 2010, Blankschtein 1997, Stephenson 2006, Hadgiivanova 2007, Sammalkorpi 2011, Gezae Daful 2011) no disponemos actualmente de un modelo cuantitativo para las concentraciones de tensioactivo monomérico y micelizado cerca de la *cmc*.

Para avanzar con este problema desarrollaremos en el capítulo 3 un nuevo modelo de concentraciones de tensioactivos. Este modelo de concentraciones nos servirá entonces como base para una descripción sistemática y general de cualquier propiedad experimental que dependa de estas concentraciones.

*Uso de sondas fluorescentes para el estudio de disoluciones micelares*

Las sustancias cromóforas actuando como sondas son útiles para detectar cambios en las propiedades fisicoquímicas de las disoluciones utilizando concentraciones muy bajas debido a su

## 1.1 Introducción

elevada sensibilidad. Las variaciones en los espectros de absorción o de fluorescencia de sustancias cromóforas se relacionan con cambios en las propiedades del entorno en las disoluciones de tensioactivos (Ananthapadmanabhan 1985, Matsuki 1997). Desde hace muchos años se han utilizado las moléculas fluorescentes para determinar la *cmc* de tensioactivos además de otras propiedades fundamentales de las micelas. Se pueden analizar los espectros de excitación o de emisión de fluorescencia, las relaciones de intensidades en diferentes bandas vibrónicas, el quenching de la fluorescencia, los tiempos de vida en el estado excitado, o la formación de especies en el estado excitado como los excímeros.

Una sustancia cromófora adecuada para estos estudios suele presentar una solubilidad en agua relativamente baja y un cambio en alguna de sus propiedades espectroscópicas al pasar de la fase acuosa al interior de las micelas a concentraciones cerca de la *cmc*. Estos cambios son, en general, fácilmente detectables lo cual explica el uso frecuente de sustancias cromóforas para determinar la *cmc*, típicamente aplicando métodos de análisis gráficos como los mencionados anteriormente.

Sin embargo, el uso de sustancias cromóforas para la determinación de la *cmc* de tensioactivos introduce una complicación adicional frente a los métodos directos, analizados en el capítulo 3 de esta tesis, que no se tiene en cuenta en la mayoría de los casos: la fracción de moléculas cromóforas solubilizadas en las micelas depende del equilibrio de reparto entre la fase acuosa y la pseudofase micelar. El cambio observado en una propiedad del colorante no refleja directamente el cambio en la concentración de micelas, sino en su propia fracción micelizada que puede estar significativamente desplazada frente a la primera. El error en la determinación de la *cmc* puede ser importante en el caso de colorantes muy solubles en agua, como el frecuentemente utilizado fluoróforo ANS (Ácido 2-anilinaftaleno-6-sulfónico), pero incluso también para sustancias altamente hidrofóbicas como el pireno.

En el capítulo 4 aplicaremos el modelo de concentraciones presentado en el capítulo 3 al equilibrio de reparto de sondas fluorescentes en sistemas micelares. Presentaremos las ecuaciones correspondientes y analizaremos en detalle la influencia del equilibrio en la determinación de la *cmc* de medidas de intensidades de fluorescencia y de curvas de correlación de fluorescencia.

### *El pireno como sonda fluorescente para la caracterización de tensioactivos*

La elección de una sonda fluorescente cargada supone ciertos problemas cuando trabajamos con tensioactivos iónicos. Por esta razón es conveniente trabajar con fluoróforos neutros. El pireno es uno de los fluoróforos neutros más utilizados para la caracterización de medios microheterogéneos debido a las numerosas posibilidades que proporcionan sus propiedades espectrales y cinéticas tales como su largo tiempo de vida, su elevado rendimiento cuántico y la sensibilidad que presenta su espectro de emisión a diferencias de la polaridad de su microentorno (Förster 1964, Graetzel 1976, Kalyanasundaram 1977, Almgren 1979, Infelta 1979, Singer 1982, De Schryver 1984, Malliaris 1988, Rharbi 2001, Capek 2002, Mohr 2007, Mitsionis 2012, Topel 2013). Además, cuando la concentración local de pireno es alta, una molécula de pireno excitada puede interaccionar con otra molécula de pireno en el estado fundamental y así formar un dímero excitado (excímero) con una banda de emisión ancha.

El pireno tiene un tiempo de vida de fluorescencia característico bastante largo que proporciona un decaimiento que es muy sensible al entorno cercano de la molécula. El tiempo de vida del pireno en ausencia de oxígeno en micelas de un tensioactivo típico como el SDS es mayor de 300 ns pero menor de 200 ns en ausencia de las mismas.

Una desventaja de marcadores fluorescentes con baja solubilidad como el pireno es la necesidad de un procedimiento de preparación de las disoluciones muy cuidadoso para evitar la precipitación o la agregación del colorante.

La emisión de fluorescencia del pireno presenta varias bandas vibrónicas, denominadas como  $I_I$  –  $I_V$ . La relación de intensidades de estas bandas, típicamente la relación  $I_{III}/I_I$ , es sensible a la polaridad del entorno del pireno. Esta variación característica define la denominada escala “py” de la polaridad del entorno (Glushko 1981, Karpovich 1995). El cambio de polaridad entre la fase acuosa y las micelas provoca un cambio significativo en la relación  $I_{III}/I_I$  que es muy frecuentemente usado para determinar la *cmc* de sistemas de tensioactivos (Ananthapadmanabhan 1985, Kalyanasundaram 1977, Mitsionis 2012, Topel 2013, Dorrance 1972, Kalyanasundaram 1987, Anthony 1994, Regev 1999, Caetano 2000, Aguiar 2003).

Por otra parte, la formación de excímeros por parte del pireno está relacionada con su distribución en las micelas, que a su vez depende del equilibrio de reparto del pireno en la disolución. Teniendo en cuenta que la emisión de fluorescencia del excímero requiere que tenga lugar la dimerización durante el tiempo de vida del estado excitado del pireno, un mínimo de dos moléculas de pireno por micela es requerido para que el pireno solubilizado produzca emisión de excímero. Se observa un aumento característico de la emisión de excímero cerca de la *cmc*, que refleja la alta ocupación con pireno de las primeras micelas formadas. Sin embargo, el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia del excímero es un problema notoriamente difícil ya que depende sensiblemente de la distribución del pireno en las micelas.

En el capítulo 5 aplicamos el modelo de concentraciones de tensioactivos del capítulo 3 y las ecuaciones del equilibrio de reparto derivadas en el capítulo 4 a las propiedades fotofísicas del pireno en disoluciones micelares. Presentamos un conjunto completo de ecuaciones para la dependencia de la concentración total de tensioactivo de la intensidad de fluorescencia, el tiempo de vida de fluorescencia y la relación de intensidades de las bandas vibrónicas, tanto para el pireno monomérico como para el excímero. Demostramos que estas ecuaciones junto con el modelo de concentraciones reproduce satisfactoriamente los datos experimentales de la fluorescencia de pireno en diferentes tensioactivos.

Como se ha indicado anteriormente, el análisis gráfico de la curva sigmoideal de la relación de bandas vibrónicas  $I_{III}/I_I$  del pireno constituye uno de los métodos más utilizados para la determinación de la *cmc* de tensioactivos. Sin embargo, se observa que la posición relativa del valor de la *cmc* con respecto a la curva de  $I_{III}/I_I$  depende del tipo de tensioactivo estudiado. Para un tensioactivo dado, la *cmc* determinada por conductividad u otras técnicas corresponde en unos casos con el punto de inflexión y en otros con el valor del inicio de la meseta de la curva de  $I_{III}/I_I$  del pireno (Zana 1998, Anthony 1994, Regev 1999, Frindi 1992). Existen intentos de establecer una clasificación

## 1.2 Justificación razonada de la unidad y coherencia temática y metodológica

empírica de esta posición relativa según el tipo de tensioactivo (Aguar 2003), pero no se ha podido relacionar con las propiedades físicoquímicas del colorante y del tensioactivo.

En el capítulo 6 presentamos datos experimentales de la intensidad de fluorescencia de pireno en un amplio número de tensioactivos iónicos y neutros y analizamos en detalle la influencia del equilibrio de reparto sobre la relación de las bandas vibrónicas  $I_{III}/I_I$  y su posición relativa con respecto a la *cmc*. Discutimos las limitaciones del método de relación de bandas  $I_{III}/I_I$  y como mejorar la determinación de la *cmc* con pireno como sonda. Aunque estos resultados no se encuentran publicados en el momento de redacción de esta memoria, se dispone ya de un borrador de la futura publicación que se enviará a una revista especializada de alto nivel.

## 1.2 Justificación razonada de la unidad y coherencia temática y metodológica

Esta tesis se presenta en el formato de “compendio de artículos de investigación”. Como complemento a esta introducción general y descripción de objetivos, se incluye un capítulo de metodología (capítulo 2) en el que se describen los aspectos técnicos más relevantes relacionados con la preparación y medida de las muestras y con el análisis de los datos experimentales, ya que aquí es posible hacer una exposición más detallada de los mismos que en las publicaciones.

Los capítulos 3, 4, y 5 son copias literales de tres publicaciones originales junto con su información complementaria (*supplementary information*), reformateadas para su mejor legibilidad. Las publicaciones en su formato original están incluidas en el apéndice de la tesis impresa. El capítulo 6 presenta datos y análisis preliminares que están pendientes de publicación. Siendo la presente tesis doctoral un conjunto de trabajos publicados, cada uno de los capítulos 3 a 6 contiene su propia introducción, antecedentes bibliográficos, parte experimental, resultados, discusión y bibliografía. Finalmente, se incluye un capítulo de las conclusiones generales de la tesis y una bibliografía completa.

La tesis es coherente tanto en su temática como la metodología empleada. Parte de una idea original de modelar la concentración de tensioactivos cerca de la *cmc*, la desarrolla y la aplica en sucesivos trabajos a sistemas y propiedades de tensioactivos de creciente complejidad. En todos los casos se analizan titulaciones de propiedades de disoluciones de tensioactivos como la conductividad, la absorción y emisión de luz o la traslación difusional, con ecuaciones de ajuste basados en el modelo de concentraciones propuesto. Siempre se procura encontrar características comunes generalizables y presentar procedimientos prácticos aplicables a otros sistemas de tensioactivos. Todas las funciones de ajuste se ponen a disposición en los apéndices de las publicaciones y en la página web de los autores.

### 1.3 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es la obtención de un modelo empírico para las concentraciones de las especies que están presentes en la formación de micelas: tanto las propias micelas como los tensioactivos monoméricos. Se busca encontrar un modelo cuantitativo para poder reproducir datos proporcionados por diferentes técnicas experimentales de diferentes tipos de tensioactivos (iónicos y neutros).

La micelización es un proceso dinámico de agregación supramolecular donde existe una etapa de transición entre la presencia dominante de surfactante monomérico y la formación de micelas. A pesar de su nombre, la concentración micelar crítica no describe un proceso abrupto sino un intervalo relativamente ancho de transición. Un modelo capaz de describir esta transición deberá explicar la existencia de micelas cuando la especie predominante sea aún el surfactante monomérico y de igual forma deberá responder de forma eficaz cuando existan monómeros una vez que la concentración de micelas sea la más abundante (expresado en ambos casos como fracción molar de cada especie). Este modelo serviría para definir la *cmc* de una forma precisa y coherente entre diferentes técnicas experimentales.

Deberemos comprobar la validez del modelo propuesto con resultados obtenidos con diferentes técnicas como son la conductividad, tensión superficial, desplazamiento químico de RMN, coeficientes de difusión, etc. Los resultados proporcionados tanto para describir la concentración de cada especie como para la determinación de la *cmc* deberán ser concordantes para cada tensioactivo independientemente de la técnica experimental utilizada.

Otro objetivo es utilizar el modelo de concentraciones desarrollado para deducir expresiones para otros parámetros como las constantes de equilibrio o la cantidad de contraiones de una micela. El modelo propuesto nos permitirá evitar la utilización de procedimientos gráficos subjetivos y así proporcionar un método robusto para obtener valores reproducibles de la *cmc* independientes de la técnica experimental utilizada (en idénticas condiciones experimentales de temperatura, polaridad del medio o pH).

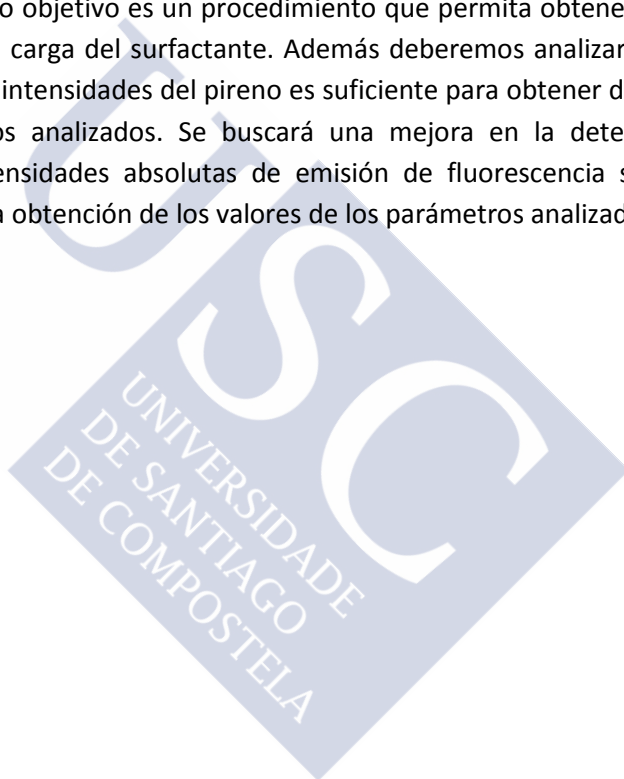
Una vez que se haya comprobado la validez del modelo para determinar la concentración de cada especie, lo aplicaremos a las propiedades espectroscópicas de absorción, de emisión de fluorescencia o de correlación de fluorescencia de cromóforos utilizados como sondas. Se elaborarán los modelos para poder obtener parámetros clave como son la constante de equilibrio de reparto, la *cmc*, los coeficientes de difusión y los radios hidrodinámicos tanto de los huéspedes como los hospedadores (micelas). Se estudiarán diferentes colorantes con diferentes hidrofobicidades interaccionando con micelas. Realizaremos un estudio sistemático de hasta que punto la presencia de diferentes colorantes influyen en la determinación de la *cmc* comparando los resultados con técnicas directas como la absorción del anillo fenólico de algunos tensioactivos o la conductividad eléctrica de tensioactivos iónicos.

También comprobamos cómo influye la diferente afinidad de cada colorante con las micelas en los parámetros determinados. Además se deberá determinar cuán fiable es el procedimiento y con qué tipo de datos experimentales obtendremos una mejor calidad de resultados.

### 1.3 Objetivos

Otro objetivo fundamental de esta tesis es describir la fotofísica compleja del fluoróforo pireno en presencia de disoluciones de surfactantes, aplicando para ello el modelo que hemos obtenido para sistemas micelares. Utilizaremos este modelo para reproducir tanto los resultados de fluorescencia de estado estacionario como de medidas de tiempos de vida. Se desarrollarán las ecuaciones adecuadas para analizar el pireno en sus dos formas, monómero y excímero, en presencia del surfactante monomérico y micelado. Estudiaremos los efectos del “quenching” de la intensidad de fluorescencia, el equilibrio de reparto con las micelas y la interacción del excímero con las especies que aparecen en la formación de las micelas. Discutiremos la particular estructura vibracional del espectro del pireno para analizar de una forma más robusta los fenómenos anteriormente mencionados.

El análisis de la relación de intensidades de dos bandas del pireno es el procedimiento más habitual para determinar la *cmc* en diferentes surfactantes. Tradicionalmente se han utilizado procedimientos gráficos que en cada caso dependían de la apreciación subjetiva del investigador y del tipo de surfactante. Nuestro objetivo es un procedimiento que permita obtener la *cmc* de forma objetiva e independiente de la carga del surfactante. Además deberemos analizar si la información que proporciona la relación de intensidades del pireno es suficiente para obtener de forma precisa la *cmc* y el resto de parámetros analizados. Se buscará una mejora en la determinación de los parámetros utilizando las intensidades absolutas de emisión de fluorescencia sin que para ello perdamos facilidad de uso en la obtención de los valores de los parámetros analizados.



## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Preparación y medida de muestras

#### 2.1.1 Reactivos

Los reactivos y disolventes empleados en este trabajo se citan a continuación:

- Pireno (99%, Aldrich)
- Dodecil Sulfato Sódico (SDS, 99%, Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (TX-100, Fluka)
- Tricosaetilenglicol Dodecil Éter (Brij35, Fluka)
- Eicosaetilenglicol Hexadecil Éter (Brij58, Fluka)
- Decaetilenglicol Hexadecil Éter (Brij56, Fluka)
- Decaetilenglicol Octadecil Éter (BrijS10, Fluka)
- Ácido alquilbenceno sulfónico lineal (LAB, 96%, Henkel®)
- Heptaetilenglicol Monodecil Éter (C12E7, Henkel®)
- Decaetilenglicol Monodecil Éter (C12E10, Sigma-Aldrich)
- Disolución acuosa de Lauriléter Sulfato Sódico (SLES, 27%w/w, Henkel®)
- Bromuro de Dodeciltrimetilamonio (DTAB, 98%, Sigma)
- Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 98%, Aldrich)
- Octadecil Sulfato Sódico (SOS, 93%, Aldrich)
- Tetradecil Sulfato Sódico (STS, 95%, Aldrich)
- Etanol (99%, Panreac)
- Hidróxido Sódico (NaOH, Sigma)
- Agua Milli-Q

#### 2.1.2 Muestras de pireno.

El pireno presenta muy baja solubilidad en agua. Por ello, para la preparación de disoluciones acuosas, se parte de una disolución de pireno en etanol de concentración conocida.

Una vez comprobada la buena estabilidad de las disoluciones de pireno en etanol a través de sus espectros de absorción, se prepararon disoluciones de pireno en etanol de concentraciones del orden de  $10^{-4}$  M, a partir de las cuales se obtuvieron las disoluciones de pireno en disolución acuosa

## 2.1 Preparación y medida de muestras

con los diferentes tensioactivos. Las disoluciones de pireno en etanol se conservaron protegidas de la luz a temperatura ambiente.

Para facilitar la solubilización del pireno y conseguir una buena estabilidad de las disoluciones acuosas es necesario añadir una cierta cantidad del tensioactivo objeto de estudio a la disolución madre de pireno. De esta forma se pueden obtener disoluciones estables de pireno de concentración hasta  $10^{-5}$  M, dependiendo de la concentración de tensioactivo añadida.

Para la preparación de las muestras, en primer lugar se calculan las cantidades de pireno y de tensioactivo necesarias para preparar la disolución madre, que contiene pireno más una cierta concentración del tensioactivo algo por encima de su concentración micelar crítica (*cmc*). Así, por ejemplo, en el caso del TX100 se usó una concentración del tensioactivo del orden de 0.5 mM siendo su *cmc* de 0.245 mM, mientras que para el SDS se utilizó una concentración del orden de 12 mM, ya que su *cmc* es de 8.2 mM (Kalyanasundaram 1977).

Una vez pesada la cantidad de disolución de pireno en etanol necesaria, se aplica una corriente de  $N_2$  para eliminar todo el etanol presente en la disolución (véase la influencia del etanol más adelante). El siguiente paso es añadir la cantidad adecuada de disolución de tensioactivo para obtener una disolución madre con concentración de pireno entre  $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M y una concentración de tensioactivo algo mayor que su *cmc*. La disolución madre se agita usando un Vortex durante 2 h a una velocidad de agitación media. Con este procedimiento se consigue la disolución total del pireno por lo que se puede conocer la concentración de pireno de la disolución madre de forma precisa.

Posteriormente se preparan disoluciones finales denominadas muestras, que se utilizarán en las medidas. Para su preparación se añade una cantidad constante adecuada de la disolución madre (con pireno y tensioactivo), diferentes cantidades de una disolución concentrada del tensioactivo y agua desionizada Milli-Q hasta obtener un volumen final de muestra constante. Aunque esas cantidades se miden con pipetas adecuadas, también se pesan para tener valores más precisos y poder corregir los datos experimentales por las pequeñas diferencias entre muestras de la concentración de pireno. Generalmente la disolución madre se diluye diez o más veces, de manera que se obtienen muestras de concentración de tensioactivo muy inferior a su *cmc*.

Ha de tenerse especial cuidado de preparar suficientes disoluciones que permitan examinar de forma completa el proceso de la formación de micelas y el cambio en la concentración de especies en el estado excitado, especialmente en el intervalo de concentraciones alrededor de la *cmc*.

El procedimiento descrito se basa en estudios previos en los que se examinó el proceso de solubilización del pireno con el fin de obtener disoluciones madre estables y de concentración bien conocida. También se analizó la influencia sobre los espectros de emisión de diversos factores, tanto relacionados con la preparación de las muestras como con las condiciones de medida. Estos estudios se resumen a continuación.

### *Estabilidad de las disoluciones acuosas de pireno*

Tradicionalmente se utiliza etanol como disolvente para preparar las disoluciones madre de pireno, ya que su solubilidad es mucho mayor en este disolvente que en agua. Por ello, previamente al estudio de la estabilidad de las disoluciones acuosas, se analiza la solubilización y la estabilidad de las disoluciones madre de pireno en etanol.

La Figura 2.1 presenta espectros de absorción de pireno en etanol con distintos factores de dilución de la disolución madre de partida. Se comprueba que al aumentar la dilución disminuye la absorción en una relación que sigue la ley de Lambert-Beer. El ajuste lineal de los datos permite obtener el coeficiente de absorptividad molar del pireno en etanol a diferentes longitudes de onda. En la Tabla 2.1 se muestran los valores obtenidos para longitudes de onda que están muy cercanas a las de los datos de la bibliografía (Singh 1982). La concordancia es buena teniendo en cuenta que el espectro del pireno presenta bandas muy estrechas, por lo que un pequeño cambio en la longitud de onda puede llevar a variaciones significativas de absorbancia.

Se concluye, por tanto, que el pireno se disuelve en su totalidad en etanol y que no forma agregados, por lo que se trata de un buen disolvente para la preparación de disoluciones madre. Además, mediante la medida de la absorbancia de dichas disoluciones madre se comprueba que éstas son estables en un largo período de tiempo a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

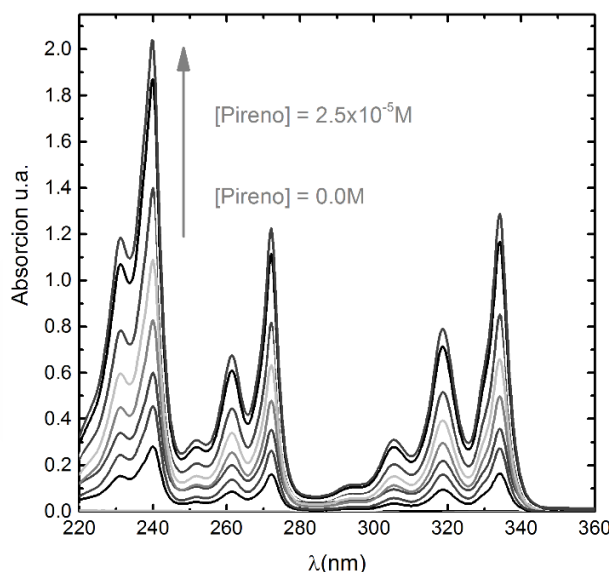


Figura 2.1. Espectros de absorción del pireno en etanol a distintas concentraciones hasta  $2.5 \cdot 10^{-5} M$ , medidos en una cubeta de paso de luz de 10 mm y a  $25^{\circ}C$ .

Tabla 2.1 Comparación de los coeficientes de absorptividad molar del pireno en etanol a diferentes longitudes de onda determinados en este trabajo con los publicados en la bibliografía (Singh 1982).

Fuente	Longitud de onda/nm	$\epsilon^{\lambda}/M^{-1}cm^{-1}$
Bibliografía	240.5	78500
Bibliografía	335.0	49400
Experimental	240.6	$(77.5 \pm 0.9) \cdot 10^3$
Experimental	335.1	$(45.9 \pm 0.3) \cdot 10^3$

Una vez que hemos comprobado la estabilidad del pireno en etanol procedemos a comprobar su estabilidad en presencia de agua o disoluciones acuosas de un surfactante dado. Debido a su baja solubilidad en agua se procede a preparar una disolución de pireno de concentración intermedia entre la de la disolución madre en etanol y la de las muestras de medida, que además contiene una

## 2.1 Preparación y medida de muestras

concentración de surfactante suficientemente elevada para asegurarnos la presencia de micelas. Una vez preparada comprobaremos su estabilidad con el tiempo para así poder decidir si podrá ser usada como disolución madre para la preparación de las muestras. Para ello se toma el volumen necesario de la disolución de pireno en etanol, se elimina el etanol por evaporación (véase la influencia del etanol más adelante) y se añade la cantidad adecuada de surfactante y de agua para obtener la disolución deseada. Se agita la disolución y se miden sus espectros al cabo de diferentes tiempos, manteniendo siempre la agitación.

Se puede observar que dos muestras de pireno preparadas de forma independiente pero con el mismo procedimiento con una concentración de SDS de 12.3 mM (concentración muy por encima de la *cmc* de 8.1mM) proporcionan espectros prácticamente sin ninguna diferencia como se muestra en la Figura 2.2 con los espectros representados en líneas negras continua (muestra 1) y discontinua (muestra 2).

Se observa que las mismas muestras al cabo de una hora, en la que se mantienen la agitación y la termostatación, no disminuyen en intensidad de fluorescencia sino que ésta incluso aumenta (líneas grises continua (muestra 1) y discontinua (muestra 2)). Esto nos indica que aún no se ha disuelto todo el pireno dentro de las micelas. Se comprueba que las muestras a elevada concentración de pireno deben mantenerse bajo agitación durante al menos 2 h para asegurar que el pireno se encuentre totalmente disuelto. Siguiendo este procedimiento se obtienen disoluciones madre reproducibles y estables durante 24 h.

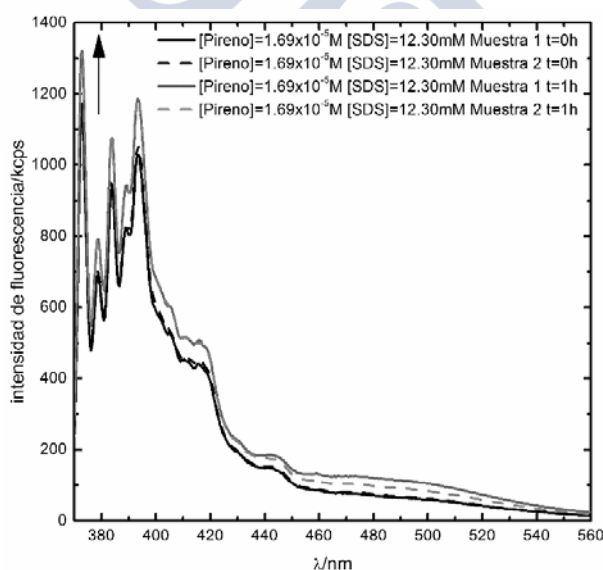


Figura 2.2 Espectros de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones acuosas de SDS a pH 7 de dos disoluciones madre preparadas de forma independiente con [SDS]=12.3 mM: muestra 1 (líneas continuas negra y gris para tiempos 0 y 1 h tras la preparación de la muestra) y muestra 2 (líneas discontinuas negra y gris para tiempos 0 y 1 h tras la preparación de la muestra). [Pireno]= $1.65 \cdot 10^{-5}$  M,  $\lambda_{exc}$ =320 nm.

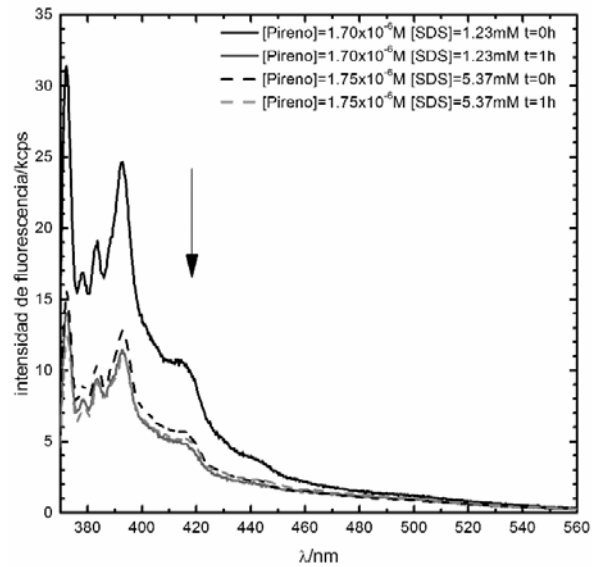


Figura 2.3 Espectros de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones acuosas de SDS a pH 7 de dos muestras preparadas de forma independiente con [SDS]=1.23mM (líneas continuas negra y gris para tiempos 0 y 1 h tras la preparación de la muestra) y con [SDS]=5.37mM (líneas discontinuas negra y gris para tiempos 0 y 1 h tras la preparación de la muestra). [Pireno]=  $1.7 \cdot 10^{-6}$  M.  $\lambda_{exc}=320$  nm.

Sin embargo, cuando la disolución madre se diluye para preparar las muestras de medida, con concentraciones de pireno del orden de  $10^{-6}$  M o menores, también se reduce la concentración del surfactante, disminuyendo en consecuencia la estabilidad de las disoluciones a pesar de la menor concentración de pireno. En la Figura 2.3 se muestran los espectros de emisión de pireno a la misma concentración en disoluciones que contienen dos concentraciones distintas del surfactante SDS: 1.23 mM (línea negra continua) y 5.37mM (línea negra discontinua). Estos espectros fueron registrados inmediatamente después de la preparación de las muestras. Si se dejan estas muestras durante 1 h con agitación, se observa una fuerte disminución de intensidad para la muestra de menor concentración de SDS (línea gris continua, [SDS]=1.23mM), mientras que la variación es pequeña para la que contiene más surfactante (línea gris discontinua, [SDS]=5.37mM). Esta observación se explica porque cuanto mayor es la cantidad de micelas presentes, más estable se mantiene el pireno en la disolución, de hecho en el caso de 12.30 mM incluso se solubiliza una mayor cantidad de pireno ( $1.7 \cdot 10^{-5}$  M) sin que precipite. Por tanto, para evitar en la medida de lo posible la desestabilización de las disoluciones acuosas de pireno, se decide medir los espectros de las muestras tras un tiempo corto de agitación (5-6 min) y controlar el tiempo de preparación para que éste sea idéntico o al menos lo más cercano posible entre las diferentes muestras.

#### *Selección de la longitud de onda de excitación*

Uno de los parámetros que debemos analizar es la longitud de onda de excitación en los espectros de emisión de fluorescencia. En la revisión bibliográfica que hemos realizado se ha puesto de manifiesto que la longitud de onda más utilizada ha sido la de 337 nm, situada en la banda de absorción de

## 2.1 Preparación y medida de muestras

mayor intensidad del pireno, aunque no corresponde a la absorción máxima. Sin embargo, para una buena elección de la longitud de onda de excitación, existen otros parámetros a considerar.

La luz de excitación da lugar inevitablemente a la luz dispersa de la banda Raman. Esta luz dispersa se torna en un parámetro a tener en cuenta en estas medidas, debido a que provoca una modificación del espectro del pireno en forma y en intensidad. Tanto la intensidad como la posición espectral de la banda Raman dependen de la longitud de onda de excitación y, a concentraciones bajas de pireno, tiene una influencia importante sobre la relación de picos del espectro de emisión del pireno.

Utilizando condiciones experimentales idénticas y cambiando sólo la longitud de onda de excitación, se obtienen los siguientes resultados para la emisión del pireno en disolución acuosa (Figura 2.4):

- Excitación en la banda 1 de absorción, centrada a 319 nm: lleva a una banda Raman situada a 358.1 nm y una intensidad de fluorescencia del pireno de  $1.1 \cdot 10^5$  cuentas.
- Excitación en la banda 2 de absorción: si se excita en el máximo, a 334 nm, la banda Raman aparece a 378.4nm y la intensidad de fluorescencia es de  $1.8 \cdot 10^5$  cuentas, mientras que a la longitud de onda habitual de 337 nm, la banda Raman se sitúa a 381 nm y la intensidad de emisión del pireno es de  $1.0 \cdot 10^5$  cuentas.

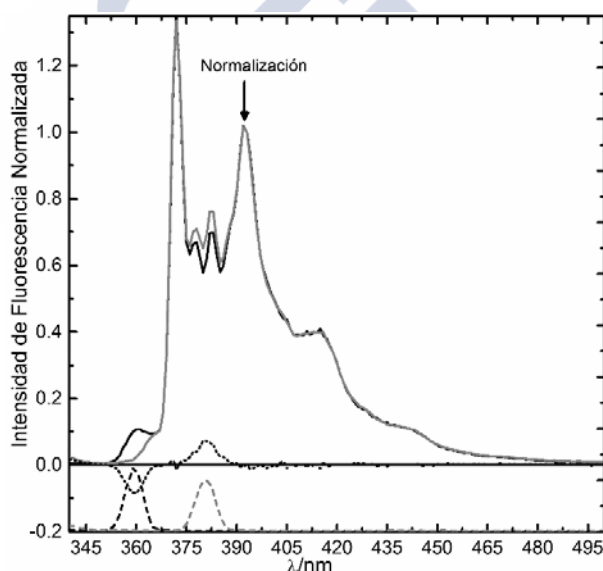


Figura 2.4 Espectros de emisión normalizados del pireno en disolución acuosa, obtenidos mediante excitación a 320 nm (línea negra) y a 337 nm (línea gris). La línea a puntos representa el espectro diferencia de los anteriores. La línea negra discontinua muestra la banda Raman del disolvente obtenida excitando a 320 nm y la línea gris discontinua la correspondiente a una longitud de onda de excitación de 337 nm.  $[\text{Pireno}] = 2.7 \cdot 10^{-7}$  M.

En la Figura 2.4 podemos observar los espectros de emisión del pireno y la banda Raman para dos longitudes de onda de excitación. La intensidad de fluorescencia es aproximadamente la misma en ambos casos, por lo que esa no es una razón para elegir la longitud de onda de 337 nm en vez de 320 nm como la más adecuada. Tradicionalmente se utiliza la longitud de onda de excitación de

337 nm, que no corresponde con el máximo de absorción, y esta condición de medida promueve la aparición de la banda Raman en la misma posición que la banda 3 del espectro de emisión del pireno. Si realizamos una comparación entre la excitación a 320 nm y a 337 nm, vemos que la primera desplaza la banda Raman lo suficiente para no afectar al espectro de emisión del pireno. Podemos observar que las diferencias llegan a ser importantes, especialmente en presencia de tensioactivo en concentración cercana a la *cmc* (Figura 2.5 ), donde observamos un cambio muy importante en la banda 3 porque es el lugar crítico de influencia de la banda Raman para la longitud de onda de excitación tradicionalmente utilizada.

Sobre la base de estos resultados hemos elegido la longitud de onda de excitación de 319 nm como la más adecuada a pesar de que la intensidad de fluorescencia obtenida al excitar fuera del máximo de absorción es menor.

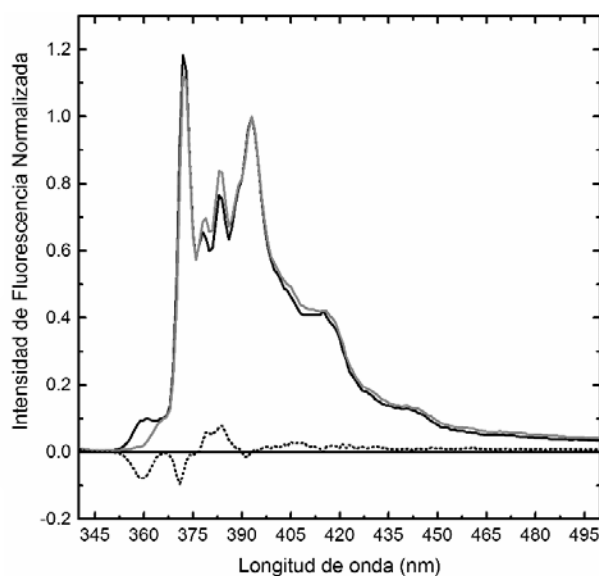


Figura 2.5 Espectros de emisión normalizados del pireno en disolución acuosa con una concentración de SDS de 8.0 mM, obtenidos mediante excitación a 320 nm (línea negra) y a 337 nm (línea gris). La línea a puntos representa el espectro diferencia de los anteriores.  $[\text{Pireno}] = 2.7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ .

#### *Influencia de concentración y disolvente en el espectro de emisión*

Un parámetro muy importante en el estudio de la interacción del pireno con tensioactivos es la concentración de pireno, ya que influye en la formación del excímero del pireno. Para entender qué es un excímero y cómo influye su formación en el estudio de la interacción del pireno con las micelas de un tensioactivo dado, vamos a explicar cómo tiene lugar su formación.

La formación del excímero de pireno ha sido descrita por varios autores (Hauser 1973, Selinger 1982). Primeramente, cuando el monómero del colorante pireno ( $D_m$ ) es excitado da lugar al colorante monomérico excitado  $D_m^*$ , que puede desactivarse por vías radiantes y no radiantes volviendo al estado fundamental monomérico  $D_m$ , o puede formar un dímero excitado  $D_e^*$  al interaccionar con un colorante monomérico no excitado  $D_m$ , tal y como se describe en la Figura 2.6

## 2.1 Preparación y medida de muestras

Este excímero se desactiva también mediante procesos radiantes y no radiantes, siendo su emisión de menor energía que la del monómero.

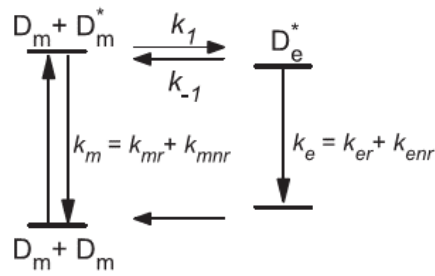


Figura 2.6 Esquema de los procesos de interconversión entre la forma monomérica y el excímero del pireno.

En presencia de micelas de un tensioactivo, tanto el pireno libre ( $D_f$ ) como el pireno micelizado ( $D_b$ ) contribuyen a la intensidad de fluorescencia observada. Sin embargo, el pireno libre apenas forma excímero, por lo que se encuentra fundamentalmente en forma monomérica ( $D_{fm}$ ), mientras que el pireno unido a las micelas puede encontrarse como monómero ( $D_{bm}$ ) o como excímero ( $D_{be}$ ). Por ello, la intensidad de fluorescencia medida a una cierta longitud de onda es la suma de las contribuciones de esas tres especies, tal como se describe en la siguiente ecuación:

$$I^{(\lambda)} = F_{fm}^{(\lambda)} [D_{fm}] + F_{bm}^{(\lambda)} [D_{bm}] + F_{be}^{(\lambda)} [D_{be}] \quad (2.1)$$

Dependiendo de la longitud de onda analizada las contribuciones variarán según nos encontremos en las bandas propias del monómero (370-400 nm), donde las especies predominantes serán  $D_{fm}$  y  $D_{bm}$ , con sus contribuciones  $F_{fm}$  y  $F_{bm}$ , respectivamente, o nos encontremos en la banda de excímero, donde la contribución de  $D_{be}$  será fuerte y se denomina como  $F_{be}$ .

Para poder observar cómo influye la concentración de pireno en nuestros estudios y por ende la concentración del excímero deberemos conocer cómo son los perfiles de la concentración para cada especie que acabamos de presentar ( $[D_f]$ ,  $[D_{bm}]$ ,  $[D_{be}]$ ) en función de la concentración de tensioactivo total ( $[S_0]$ ). Dicha descripción ha sido dada por algún autor para concentraciones superiores a la *cmc* (Infelta 1979). Uno de los objetivos de este trabajo ha sido explicar, utilizando el modelo desarrollado para la concentración de tensioactivo micelizado, la interacción entre el pireno y los diferentes tensioactivos objeto de estudio para la determinación precisa de la *cmc* (Al-Soufi 2012).

Para evitar la presencia de excímero, que complica el análisis de los espectros de emisión del pireno, es necesario reducir la concentración de pireno. Sin embargo, la utilización de una concentración baja de pireno puede ser problemática. Si la disolución de tensioactivos no está suficientemente limpia y contiene pequeñas cantidades de impurezas fluorescentes con propiedades espectroscópicas similares al pireno (posición espectral e intensidad de emisión de fluorescencia) se pueden observar distorsiones en el espectro del pireno. Además, la presencia de tensioactivos que puedan presentar emisión y/o absorción propia pueden alterar también los espectros experimentales. En ambas situaciones se deberá aplicar correcciones para obtener los espectros

reales. En algunos casos la solución adoptada fue obtener los espectros para la sustancia extraña o para el tensioactivo y restarlos de los espectros de emisión experimentales. En otros casos, en los experimentos en que fue posible, se aumentó la concentración del pireno de forma que el efecto de las impurezas fuera despreciable, aunque siempre dentro de su límite de solubilidad.

Otro parámetro a estudiar es la presencia de etanol en las disoluciones acuosas de pireno. Tradicionalmente y debido a la baja solubilidad del pireno en medio acuoso se utilizan disoluciones madre de pireno en etanol, por lo que este disolvente aparece en las disoluciones finales si no es previamente eliminado. Generalmente son bajos porcentajes, del orden de 0.5-1%, pero nuestros estudios muestran que la presencia de estas pequeñas cantidades de etanol es suficiente para provocar modificaciones en el espectro del pireno considerables, sobre todo en la banda del excímero.

Hemos estudiado los efectos de la presencia de un 1% de etanol en las disoluciones acuosas de pireno, que incrementa su solubilidad y su estabilidad (Figura 2.7). Observamos que, en presencia de etanol, la intensidad total disminuye un 10% en la banda del monómero. En cuanto a la banda del excímero, que apenas existe en ausencia de etanol, se incrementa de una forma muy apreciable con ese pequeño porcentaje de etanol. Es decir, en idénticas condiciones de concentración de pireno, la presencia de etanol incrementa la concentración de pireno en forma de excímero.

Por tanto, a la vista de estos resultados, se hace necesario eliminar el etanol por evaporación previamente a la preparación de las disoluciones acuosas de pireno. La presencia de pequeñas cantidades de este disolvente produce alteraciones en el espectro de emisión del pireno que pueden llevar a resultados erróneos en el estudio del comportamiento con tensioactivos.

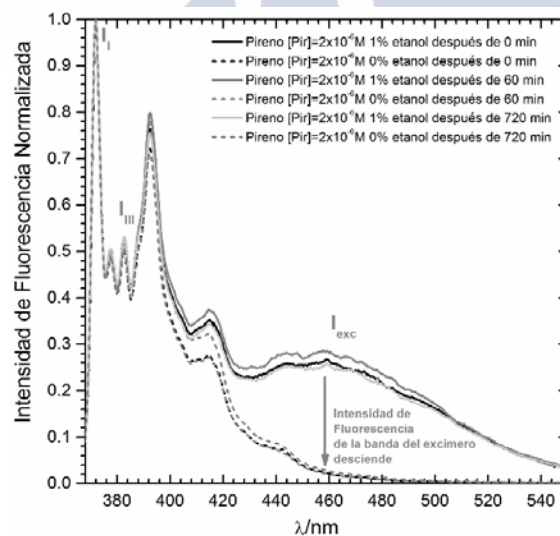


Figura 2.7 Espectros de emisión del pireno en disolución acuosa en ausencia (líneas discontinuas) y en presencia de un 1% de etanol (líneas continuas) a distintos tiempos (0, 60 y 720 min, líneas negras, grises oscuras y grises claras, respectivamente) después de la preparación de las muestras.  $[Pireno]=2.0 \cdot 10^{-7}$  M,  $\lambda_{exc}=319$  nm.

## 2.1 Preparación y medida de muestras

### 2.1.3 Preparación de muestras para FCS

El procedimiento que vamos a describir en este apartado se refiere a la preparación de las muestras utilizadas para la titración de la Rodamina 123 con el Triton X-100 mediante la técnica de FCS. Para las muestras de otros fluoróforos y tensioactivos se siguió un proceso análogo.

Para la preparación utilizamos una disolución madre del fluoróforo de concentración elevada ( $10^{-4}$  M aprox.), que se diluye para obtener una disolución madre de concentración intermedia ( $10^{-6}$  M aprox.). A partir de esta disolución prepararemos las muestras necesarias para el estudio. Primeramente comprobaremos qué concentración de Rodamina 123 es la adecuada para el experimento. Teniendo en cuenta el tamaño del foco y mediante un procedimiento iterativo para determinar la dilución más adecuada, escogeremos una concentración que nos permita tener en el foco un número de moléculas adecuado comprendido entre 1 y 10. Una vez determinada la concentración del fluoróforo, deberemos elegir el rango de concentraciones de tensioactivo que permita obtener los mejores resultados tanto para la determinación de la constante de equilibrio como de los coeficientes de difusión. Para ello nos valdremos de la información obtenida mediante las medidas de fluorescencia. Definidas las concentraciones de fluoróforo y de tensioactivo, se procede a la preparación de las muestras. Utilizaremos eppendorfs de 1.5 mL, ya que necesitaremos poca cantidad de muestra para la medida. Se añade la cantidad adecuada de la disolución madre de fluoróforo, que es constante en todas las muestras, y las cantidades de agua y de tensioactivo necesarias para variar la concentración de tensioactivo a lo largo de la titración. Las muestras se agitan durante unos 10 segundos en el Vortex y, una vez que se han homogeneizado, se puede realizar la medida añadiendo la cantidad de 50  $\mu$ L de cada muestra sobre el cubreobjetos.

Finalmente hay que indicar que, cuando el fluoróforo es poco soluble en agua, como ocurre con la cumarina 152, la disolución madre se prepara adicionado una concentración dada de tensioactivo superior a su *cmc*. Por ello, la disolución madre de fluoróforo ya contiene tensioactivo y no se podrá medir la curva de correlación del fluoróforo en ausencia total de tensioactivo.

### 2.1.4 Medidas de FCS.

Para la realización de las series de medida en FCS de los fluoróforos que hemos analizado en este trabajo se han realizado estudios preliminares para asegurar una correcta evaluación de los resultados y una mejor interpretación de los mismos.

Primeramente deberemos escoger que procedimiento vamos a emplear, y la decisión más importante es elegir dónde vamos a depositar las muestras para registrar la emisión de las moléculas fluorescentes. En nuestro grupo hemos realizado estudios empleando dos diferentes tipos de soportes: pocillos (*wellplates*) y cubreobjetos (*cover glasses*), que se muestran en la Figura 2.8. Cada uno de ellos presenta ciertas ventajas frente al otro. Teniendo en cuenta las propiedades de los tensioactivos de reducir fuertemente la tensión superficial, elegiríamos los pocillos para depositar la muestra puesto que al ser recintos “cerrados” la gota no podrá esparcirse de forma no controlada por la superficie del mismo. Así conseguiríamos un mejor confinamiento de la muestra. El problema surge al analizar los resultados. Observamos que la intensidad de emisión de la muestra varía con el tiempo dentro del pocillo y de forma bastante aleatoria, independientemente de si el tensioactivo se

encuentra en forma monomérica o micelar. También observamos que existe cierta dependencia con el volumen de muestra en el pocillo, pero los resultados que obtenemos no son concluyentes. Hay que indicar que este efecto se observa con el sistema de la Rodamina 123 pero no con otros fluoróforos, y posiblemente es debido a la fuerte adsorción que presenta este colorante. Por esta razón hemos decidido utilizar los cubreobjetos que nos han proporcionado buenos resultados en cuanto a la estabilidad de la señal con el tiempo.

En cambio, para otros usos pueden ser más adecuados los pocillos. Otra posibilidad puede ser que el procedimiento que utilizamos para su medida requiere su uso pero no implica que no se obtengan los mismos resultados con cubreobjetos.

Las características de los dos soportes utilizados se muestran a continuación:

- Cubreobjetos de 24 x 60 mm de vidrio de borosilicato de Schott, D 263 M, (Menzel-Gläser, Nº 1, grosor entre 0.13 - 0.16 mm).
- Pocillos de poliestireno con fondo de vidrio (Whatman, 96 pocillos, 300  $\mu$ l).

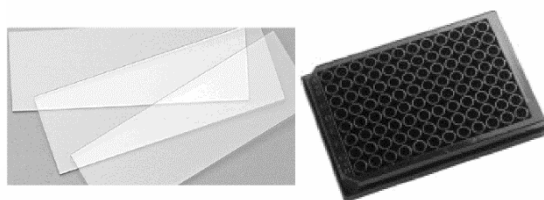


Figura 2.8 Placa de 96 pocillos para fluorescencia de Whatman (derecha) y cubreobjetos de Schott (izquierda).

Otro aspecto a tener en cuenta es la eliminación de toda sustancia no deseada de las muestras que pueda interferir tanto a nivel emisoro como a nivel físico (obstrucción). Los estudios se han realizado con reactivos y disolventes de elevada pureza por lo que no ha sido necesario utilizar ningún tipo de purificación. Sin embargo los disolventes pueden presentar algún tipo de partícula en suspensión que podrían distorsionar las curvas de correlación. Para evitar esta situación se han realizado microfiltraciones de los disolventes empleados (agua Milli-Q) utilizando filtros Spartan 30/0,20 RC.

Otra consideración clave es la potencia que va a ser utilizada en las medidas. Para elegirla se lleva a cabo la medida de una serie de potencia en la que se determina la potencia que proporciona los mejores resultados evitando que el fotoblanqueo sea significativo y afecte a los resultados finales de tiempos de difusión. El valor ideal de potencia es aquel que proporciona un tiempo de difusión máximo y, para asegurar el cumplimiento de esa condición, se ha utilizado una potencia inferior. Con este procedimiento conseguimos unos resultados reproducibles y de mejor calidad. Conviene indicar que la serie de potencia se realizó para diferentes muestras correspondientes a distintas situaciones del sistema en estudio: fluoróforo libre, fluoróforo en el interior de micelas y fluoróforo en el momento en que aparecen las primeras micelas (en torno a la *cmc*). Los resultados de la serie de potencia realizada para la Cumarina 152 se muestran en la Figura 2.9.

## 2.2 Aparatos de medida

La potencia se mide en el foco del objetivo del microscopio mediante un medidor de potencia (Thorlabs, PM30-120, US). Para analizar que potencia es la más adecuada se utiliza la expresión de la irradiancia que expresa la potencia añadiendo para ello la información del tamaño del foco dada en la ecuación (2.2), donde se asume que existe una distribución gaussiana de la intensidad a lo largo del eje óptico.  $P$  es la potencia de excitación en la muestra. Para explicar cómo tiene lugar el análisis de los datos representamos un ejemplo utilizado para los estudios de la Cumarina 152.

$$\frac{I_0}{2} = \frac{P}{\pi \cdot \omega_{xy}^2} \quad (2.2)$$

Se han realizado más estudios que han ayudado a la puesta a punto de la técnica como medidas utilizando láseres pulsados para estudiar el tiempo de vida de las especies analizadas, pero que no son objetivo de este trabajo.

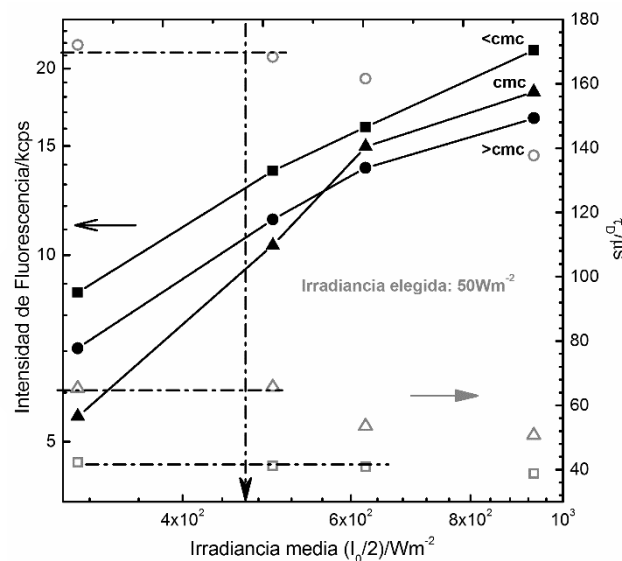


Figura 2.9 Resultados de la serie de Potencia de la Cumarina C152 en presencia del tensioactivo SDS: intensidad de fluorescencia proporcionada por la técnica de FCS (escala izquierda, símbolos rellenos) y tiempos de difusión (escala derecha y símbolos abiertos). Los diferentes símbolos corresponden a las siguientes muestras: C152 en presencia del tensioactivo a concentración inferior a la  $cmc$  (cuadrados), C152 en presencia del tensioactivo a concentración igual a la  $cmc$  (triángulos), y C152 en presencia de tensioactivo a concentración superior a la  $cmc$  (círculos).

## 2.2 Aparatos de medida

### 2.2.1 Espectrofotómetro Visible-Ultravioleta.

Los espectros de absorción se midieron con un espectrofotómetro Vis-UV de doble haz Cary 100 de Varian, Figura 2.10. Se usaron 2 cubetas (la de la muestra y la de la referencia) de cuarzo prismáticas. La temperatura se mantuvo constante mediante un termostato VWR con recirculación de agua.

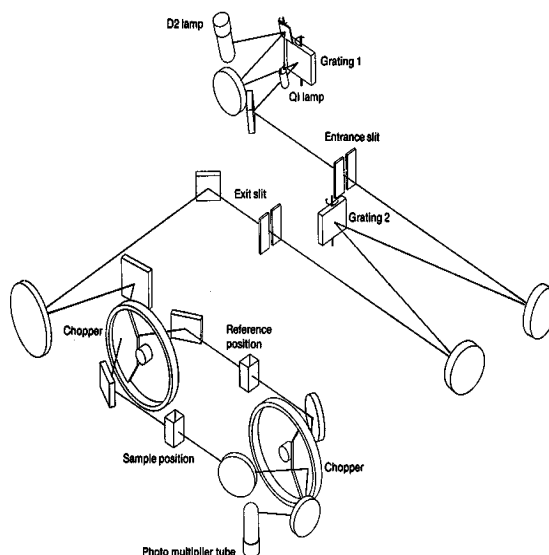


Figura 2.10 Esquema óptico del espectrómetro de Varian.

Tras encender el equipo se espera unos 20 minutos y se mide la línea base introduciendo el disolvente adecuado en cada caso en las dos cubetas. Se repite la medida de la línea base cada vez que se varía el disolvente en el que se encuentra nuestra sustancia a estudiar, y cada vez que se enciende el equipo.

Se realiza una medida del disolvente para comprobar la línea base, en todo el rango de medida. Una vez realizada esta comprobación se procede a realizar la medida del espectro de absorción de la disolución, introduciéndola en la cubeta de la muestra. En las medidas con absorbancia elevadas se diluye la muestra para evitar desviaciones de la linealidad de la medida debido a la luz de difusa explicada en el punto siguiente.

### 2.2.2 Espectrofluorímetro con resolución temporal.

Las medidas de fluorescencia se realizan en un espectrofotómetro de *Edinburgh Analytical Instruments*, modelo F900, en cubetas prismáticas de fluorescencia. La temperatura se mantuvo constante con un termostato criostato Haake con recirculación de agua. El espectrofotómetro 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 2.11 se muestra el esquema óptico del aparato con sus componentes más importantes.

## 2.2 Aparatos de medida

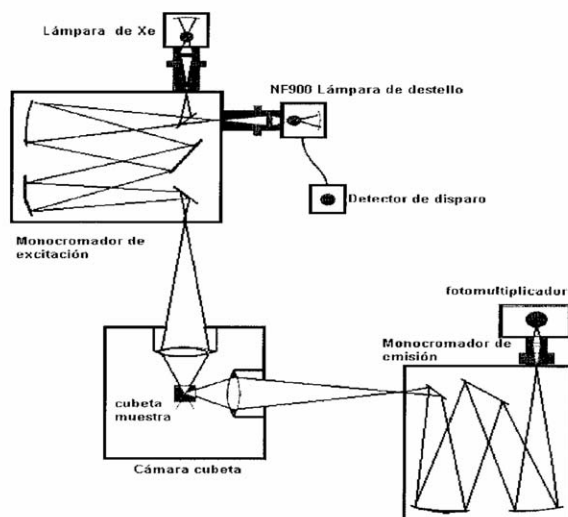


Figura 2.11 Esquema óptico del espectrofluorímetro de *Edinburgh Analytical Instruments*. Modelo F900.

Para las medidas de fluorescencia de estado estacionario se utiliza una lámpara de Xenon de 450W como fuente de excitación. El rango espectral de esta lámpara es de 200 a 2600 nm pero está restringido por el rango espectral del monocromador de excitación, que va de 200 a 900nm. Los monocromadores de excitación y emisión (Czery-Turner, red de difracción 1800 g/mm) poseen rendijas variables de forma continua entre 10  $\mu\text{m}$  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  $1,5 \cdot 10^6$  cuentas por segundo y se mantuvieron constantes durante las medidas. Para evitar la reabsorción se emplearon disoluciones lo suficientemente diluidas (se puso de condición que en absorción, el valor de la absorbancia no supere el valor de 0,1 a la longitud de onda donde se excita para obtener los espectros de emisión de fluorescencia sin el efecto de reabsorción no deseado).

En todas las medidas explicadas en este documento, sean de emisión de fluorescencia, decaimientos, espectroscopia de correlación de fluorescencia o absorción, se utiliza una termostatación para mantener la temperatura de las disoluciones a 25°C.

### 2.2.3 Equipo de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia

A continuación se describe brevemente el equipo de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia (FCS) empleado en el desarrollo del trabajo experimental. En la Figura 2.12 se muestra un esquema del mismo y en la Figura 2.13 podemos ver una foto del equipo donde también se indican sus diferentes componentes.

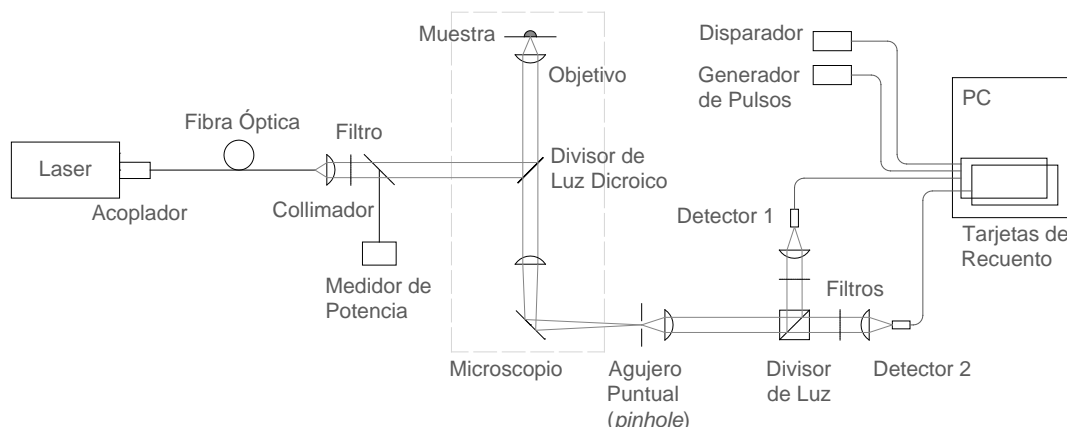


Figura 2.12 Esquema del equipo de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia.

El centro del equipo es un microscopio invertido confocal (*Olympus, IX-71*) montado encima de un tablero óptico aislado ante vibraciones.

La luz monocromática y polarizada de un láser de diodo (*Becker&Hickl, BDL-485-SMC o BDM-405-SMC, dependiendo del fluoróforo estudiado*), pasa a través de una fibra óptica monomódica (*Point-Source, kineFLEX*), de un colimador (*Schäfter&Kirchhoff, 60FC*) y de un filtro de paso de banda (*Semrock, Maxdiode FF01-482/18 o LD01-405/10*) para generar un haz circular paralelo con una distribución radial de intensidad gaussiana bien definida. El haz se dirige mediante un divisor de luz dicroico (*AHF Analysentechnik, DI01-R488 o z405 RDC*) hacia un objetivo de gran apertura (*Olympus, UPLSAPO 60xW/1.20*) con el cual se enfoca al interior de una gota de la muestra situada en un pocillo de una placa de 96 pocillos (*well plate*) de poliestireno con fondo de vidrio (*Whatman 7706-2370, 96 pocillos, 300  $\mu$ l*). La luz emitida por la muestra es recogida por el mismo objetivo (epi-iluminación) y enfocada encima de una agujero puntual (*pinhole, Thorlabs,  $\varnothing=50 \mu$ m*) en el plano de la imagen.

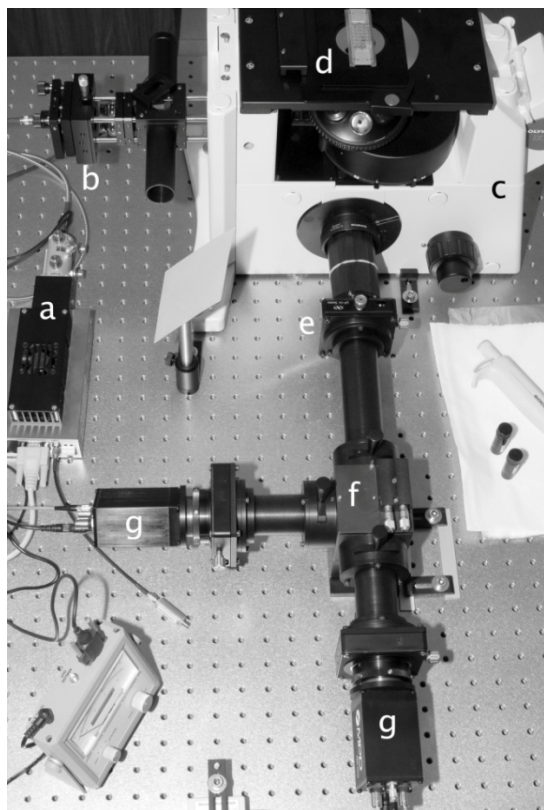
Un sistema de detección con sensibilidad de fotones individuales registra la luz que atraviesa el agujero puntual en dos canales. Para esto se vuelve a colimar el haz de luz y se divide con un divisor de luz (*Newport, 05BC17MB.1*). Cada componente atraviesa un filtro óptico de paso de banda intercambiable e incide sobre los detectores (*Diodos de avalancha, MPD-50CTC Single Photon Counting APD,  $\varnothing=50 \mu$ m*). En este trabajo se emplean filtros *Semrock, HC 525/45* frente a los detectores para eliminar la fluorescencia procedente de la luz dispersada del láser.

Los pulsos eléctricos que generan los fotones incidentes en los dos detectores se analizan mediante dos tarjetas de recuento de fotones de alta velocidad (*Becker&Hickl GmbH, SPC-132*) y se almacenan en la memoria de un ordenador. La sincronización temporal entre las dos tarjetas se garantiza mediante un generador de pulsos (*Becker&Hickl*) y un disparador de medida.

La potencia del haz del láser se cambia modificando el ajuste del acoplador de la fibra óptica y se determina con un medidor de potencia (*Thorlabs, PM30-120*). Los elementos, desde el agujero puntual hasta los detectores, forman parte de una unidad optomecánica rígida y hermética a la luz ambiental de diseño propio que facilita el posicionamiento preciso.

## 2.2 Aparatos de medida

Las medidas fueron realizadas a una temperatura de  $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , depositando las muestras en los pocillos con un volumen de disolución de  $100\ \mu\text{l}$  o superior.



Sistema confocal de medida de FCS:

- a) láser de diodo
- b) fibra óptica monomódica y óptica de colimación
- c) microscopio invertido con objetivo y filtro dicróico
- d) muestra
- e) agujero puntual, "pinhole"
- f) módulo optomecánico con ópticas de colimación, divisor de luz polarizada, filtros de interferencia y posicionadores micrométricos para el "pinhole" y los detectores
- g) detectores

No se muestra en la imagen:

- tarjetas de recuento de fotones
- generador de pulsos de sincronización
- ordenador PC de altas prestaciones para la adquisición de datos y el cálculo de las curvas de correlación.

Figura 2.13 Fotografía del equipo de FCS y sus componentes principales

Para la puesta a punto del equipo se comienza cada medida con la calibración del tamaño del foco utilizando para ello la determinación del tiempo de difusión promedio de una molécula de colorante con un coeficiente de difusión bien determinado. Para la configuración de se usa la excitación a  $488\ \text{nm}$  se empleó Rodamina 123, en disolución acuosa, cuyo coeficiente de difusión a  $25^\circ\text{C}$  es conocido e igual a  $(4.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-10}\ \text{m}^2\ \text{s}^{-1}$  (Kapusta 2010). Para la configuración de se usa la excitación a  $405\ \text{nm}$  se empleó cumarina 152, en disolución acuosa, cuyo coeficiente de difusión a  $25^\circ\text{C}$  es conocido e igual a  $(5.2 \pm 0.6) \cdot 10^{-10}\ \text{m}^2\ \text{s}^{-1}$  (Bordello 2010). Una vez obtenido el valor del tiempo de difusión de la molécula, la obtención de las dimensiones del foco se realiza mediante la expresión (2.3). Se utiliza un foco con un radio relativamente pequeño en todas las experiencias realizadas en este trabajo debido a ciertas ventajas como el aumento de la señal proveniente de las moléculas de fluoróforo con respecto al disolvente y la reducción de los tiempos de difusión (de forma que la saturación óptica sea menor), entre otras. El aumento del tamaño del foco puede ser necesario si se quiere aumentar el tiempo de difusión de la molécula, para poder separar este

término de otros procesos, como el término de reacción. Este tamaño de foco es un valor crítico en FCS si las moléculas a estudiar son muy grandes con relación al mismo, debido a que los modelos de ajuste consideran a las moléculas como partículas puntuales.

$$\tau_D = \frac{w_{xy}^2}{4 \cdot D} \quad (2.3)$$

#### 2.2.4 Técnicas de Conductividad

Para llevar a cabo una valoración conductimétrica del tensioactivo se emplea el método de concentraciones crecientes, muy utilizado, que se describe en (Athawale 2007). El procedimiento a seguir es: partiendo de un volumen inicial de disolvente (50 mL de agua) en un vaso encamisado se añaden desde una bureta volúmenes determinados de una disolución concentrada del tensioactivo (50 mM para las medidas de SDS). Después de someter a agitación durante aproximadamente 30 s se obtiene el valor de la lectura de la conductividad de la muestra.

El equipo utilizado estaba compuesto de los siguientes elementos:

- Vaso encamisado de 500 mL.
- Conductímetro, Basic 30 (Crison Instruments).
- Sistema de agitación magnética.
- Sensor de temperatura PT100.
- Bureta de 50mL
- Termostato de elevada sensibilidad VWR Cryostat modelo 1166D con circuito de recirculación de agua conectado al vaso.
- Pinzas y demás piezas de sujeción.

El montaje se muestra en la Figura 2.14.

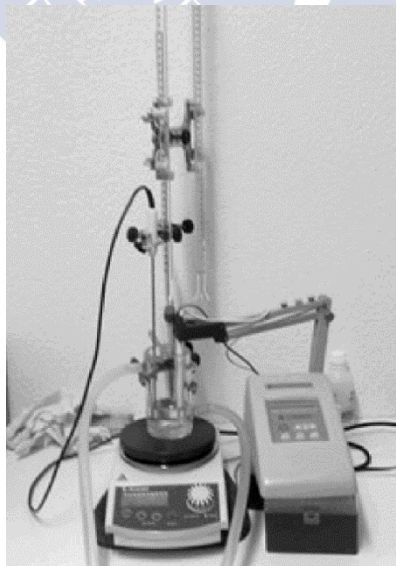


Figura 2.14 Fotografía del montaje utilizado para las medidas de conductividad eléctrica.

## 2.3 Análisis de Datos

Se explican las técnicas matemáticas y estadísticas aplicadas para el análisis de los datos con el fin de obtener la máxima información posible.

### 2.3.1 Series de espectros de emisión de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia de una disolución de un fluoróforo depende de una serie de variables. Se estudia la variación de los espectros de emisión de fluorescencia (variación con la longitud de onda de emisión) en función de una variable externa que en este caso la concentración de hospedador (micelas). Este procedimiento es el que nos proporciona los llamados series de espectros de emisión de fluorescencia. Para poder analizar de forma rigurosa los datos se utiliza el procedimiento denominado como PCGA programado en Mathematica®.

Los 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 intensidad de fluorescencia corregida por la no-linealidad del detector  $F_{C1}(\lambda)$  será:

$$F_{C1}(\lambda) = \frac{F_{exp}(\lambda)}{1 - F_{exp}(\lambda)t_d} \quad (2.4)$$

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.

El software de nuestro equipo permite llevar a cabo la corrección por las variaciones de la intensidad de luz emitida por la lámpara de forma automática.

Otra fuente de error en los espectros de emisión son las variaciones en la intensidad de la lámpara de excitación. Estos pueden corregirse si la intensidad de la lámpara se registra simultáneamente con la medida del espectro. El programa comercial usado corrige cada espectro por la intensidad de la lámpara (señal de referencia) determinada durante un tiempo corto justo antes de medida del espectro. Se comprobó que la corrección por esta señal de referencia es lo suficientemente efectiva para corregir las variaciones de la lámpara pero que se aplica de una forma errónea resultando en un espectro de un tercio de la intensidad real. Se ha visto que este factor es constante durante varias titulaciones y dentro de las mismas. Finalmente podemos indicar que la expresión que aplica el programa comercial para obtener el espectro corregido por la señal de referencia es la siguiente:

$$F_{C2}(\lambda) = \frac{F_{C1}(\lambda)F_{ref}^m(\lambda)}{3 \cdot F_{ref}(\lambda)} \quad (2.5)$$

Siendo:

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

Finalmente, para comparar los espectros de emisión de fluorescencia con los medidos en otros equipos 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 propios del equipo. En este trabajo se hablará de espectros de *emisión* corregidos o no corregidos según se haya aplicado o no esta corrección. Por el contrario, todos los espectros de *excitación* que se presentan han sido corregidos, por lo que para estos casos ya no se explica si se aplica o no la corrección.

### 2.3.2 Decaimientos de emisión de fluorescencia.

Los decaimientos de fluorescencia de un determinado fluoróforo pueden ser estudiados en función de una variable externa, la concentración o la longitud de onda.

Aplicamos distintos métodos de análisis a estos decaimientos:

- Los *análisis individuales* de decaimientos de emisión de fluorescencia se realizaron con el software de análisis de datos suministrado por *Edinburgh Instruments* con el algoritmo de Marquardt-Levenberg. Este análisis permite el ajuste óptimo de hasta 4 exponenciales a un decaimiento, aplicando una deconvolución del pulso de excitación correspondiente. Este análisis permite obtener tiempos de vida, amplitudes y desplazamiento temporal de los decaimientos. EL valor del parámetro del  $\chi^2$  nos permite definir la bondad del ajuste.
- El *análisis global* de los decaimientos se ha implementado con Matlab® en nuestro grupo. Utilizando PCGA podemos distinguir especies emisoras no identificadas en los espectros estáticos con la condición de que presenten tiempos de vida diferentes. Nos permite estudiar también diferentes tiempos de vida donde la variable externa concentración es un parámetro fijo del análisis.



## Capítulo 3. Modelo para concentraciones de monómeros y micelas en disoluciones de tensioactivos

### 3.1 Artículo original

#### **A Model for Monomer and Micellar Concentrations in Surfactant Solutions. Application to Conductivity, NMR, Diffusion and Surface Tension data.**

Wajih Al-Soufi\*, [Lucas Piñeiro](#), and Mercedes Novo

**Journal of Colloid and Interface Science** 2012, **370**, 102–110

DOI: [10.1016/j.jcis.2011.12.037](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.037)

Submitted manuscript of the article (final version of the article in the appendix).

**Abstract:** An empiric model for the concentrations of monomeric and micellized surfactants in solution is presented as a useful tool for the quantitative analysis of data obtained with different experimental techniques from surfactant solutions. The concentration model provides an objective definition of the critical micelle concentration (*cmc*) and yields precise and well defined values of derived physical parameters. The use of a general concentration model eliminates subjective graphical procedures, reduces methodological differences, and thus allows one to compare directly the results of different techniques or to perform global fits. The application and validity of the model is demonstrated with electrical conductivity, surface tension, NMR chemical shift and self-diffusion coefficient data of the surfactants SDS, CTAB, DTAB, and LAS. The derived models reproduce in all cases perfectly the data. It is also shown that there is no need to assume the existence of different pre-micellar species in order to explain the chemical shifts and self-diffusion coefficients of SDS as claimed recently by some authors.

**Keywords:** Surfactants, Micelles, Critical Micelle Concentration, Concentration Model, Data Analysis

#### **1. Introduction**

Because of their unique solution properties surfactants are an essential component of many industrial, pharmaceutical, and environmental applications [1, 2].

### 3.1 Artículo original

Although surfactant self-aggregation has been extensively treated theoretically [3-9], none of the elaborate thermodynamic models nor the increasingly complex numeric simulations has provided so far a manageable quantitative description of the micellization process which could be used for the analysis of experimental surfactant data.

The quantitative description of the properties of surfactant solutions, such as conductivity, NMR-shift, surface tension, translational diffusion, light scattering or solute partition constants, requires knowledge of the concentrations of monomeric  $[S_1]$  and micellized  $[S_m]$  surfactants in solution, which in turn depend mainly on the critical micelle concentration ( $cmc$ ) of the surfactant system.

For the analysis of experimental data it is often assumed that the no micelles are formed below the  $cmc$  and that above it all additional surfactant forms micelles. With the total surfactant concentration  $[S]_0$ , the concentrations of monomeric  $[S_1]$  and micellized  $[S_m]$  surfactants in solution are then obtained by the following approximation: [10, 11]

$$\begin{aligned} [S]_0 < cmc : [S_1] &\approx [S]_0, [S_m] \approx 0 \\ [S]_0 \geq cmc : [S_1] &\approx cmc, [S_m] \approx [S]_0 - cmc \end{aligned} \quad (1)$$

This simplification, although widely used, presents several problems: it introduces a discontinuity in the concentrations at the  $cmc$  and requires that the value of the  $cmc$  is determined separately. It is further generally accepted that the  $cmc$  has no strict meaning and that the transition from monomeric to micellized surfactant does not occur at a sharply defined concentration but within a concentration interval around the  $cmc$  [12].

It would be therefore desirable to have a continuous and well defined mathematical model of the concentrations of the surfactant species in solution which includes a definition of the  $cmc$  itself.

The characteristic concentration taken as  $cmc$  can be defined in different ways. A plot of the monomer concentration  $[S_1]$  or a physical property,  $\phi = a[S_1] + b[S_m]$ , which depends linearly on  $[S_1]$  and  $[S_m]$ , versus  $[S]_0$  typically yields two straight lines with a more or less abrupt change in their slope at the onset of the aggregation of free surfactant monomers to micelles. The  $cmc$  can be defined as the concentration at the point of intersection of the two straight lines [13]. However, the choice of the two linear intervals which define the straight lines is subjective and, in cases of very small changes in the slopes or of wide transition region between them, this definition can be practically inoperable. Furthermore, strong methodological differences in the determination of the  $cmc$  can be found, depending on the type of experiment, the way the data are processed, and how they are plotted and then analyzed [13, 14].

A generally accepted criterion for the  $cmc$  was given by Phillips [15], who defined the  $cmc$  as the concentration that corresponds to the maximum change in the gradient of a plot of the magnitude  $\phi$  against  $[S]_0$ , given by a zero third derivative of  $\phi$ :

$$\phi'''(cmc) = \left( \frac{d^3 \phi}{d[S]_0^3} \right)_{[S]_0=cmc} = 0 \quad (2)$$

This “Phillips-condition” is the basis of more objective methods for the determination of the *cmc*, mostly developed for electrical conductivity data of ionic surfactants [16-19].

Based on the phase separation model [20, 21], and probabilistic arguments García-Mateos et al. [16] propose that the second derivative of  $\phi$  with respect to  $[S]_0$  (the curvature of  $\phi$ ) is well described by a Gauss function (eq (3)) centered at the *cmc*, with amplitude  $H$  and a width  $\sigma$  of the transition region around the *cmc*.

$$\phi'' = \frac{d^2\phi}{d[S]_0^2} = -H \cdot e^{-\frac{([S]_0 - cmc)^2}{2\sigma^2}} \quad (3)$$

The determination of the *cmc* from conductivity measurements is based on the consecutive double numerical integration of  $\phi''$  of eq (3) by the Euler method combined with a least squares iterative grid search for the best fitting parameters (*cmc*,  $\sigma$ , and  $H$ ) [16]. This method is based on the phase separation model, which best describes pure micellar systems having high aggregation numbers. Nevertheless, the authors applied it successfully to conductivity data of binary mixtures of ionic surfactants [16] and to micelles with low aggregation numbers [22]. This method has been modified by Pérez-Rodríguez et al. [18] using the Runge-Kutta method for the numerical integration of the Gaussian function and the Levenberg-Marquardt algorithm for the least squares fitting. Both methods describe specifically conductivity data and special programming effort is required for their application to experimental data.

Carnero Ruiz et al. presented a model for the conductivity  $\kappa$  of ionic surfactants as a function of total surfactant concentration  $[S]_0$  based on the observation that the first derivative of the conductivity data can be adequately described by a Boltzmann type sigmoidal function [19]. By analytical integration of this sigmoidal function they obtain a function for the dependence of the conductivity  $\kappa$  on  $[S]_0$ . Although this model has some similarities to the one presented here, it was derived specifically for conductivity data and has different mathematical properties.

A model-free nonparametric approach to estimate *cmc* values based on local polynomial regression has been proposed by López Fontán et al. [23] It determines *cmc* values from plots of properties with an abrupt change in the slope at the *cmc* such as conductivity or osmotic coefficients and allows for an exploratory data analysis without the rigidity of parametric models. However, the complex algorithm requires a specific software-tool and the results seem to depend slightly on the chosen parameters of the regression (bandwidth). Being nonparametric it does not yield physical parameters other than the *cmc* itself.

Shanks and Franses presented conductivity models which are based on mass action micellization thermodynamics and on the Debye-Hückel-Onsager theory. Their detailed model requires numeric integration combined with a maximum likelihood method in order to obtain the best fit parameters [17]. Jalšenjak and Težak propose a model for the first derivative of conductivity versus total surfactant concentration derived from the mass action model and different conductivity models [24]. Both models are specific to conductivity data.

Starting from these definitions of the *cmc* it is now our task to find a compact analytical model of surfactant concentrations and derived properties which is suitable for the routine analysis of

### 3.1 Artículo original

experimental data from surfactant solutions without the need for further treatment or specialized algorithms. We limit this empiric model to surfactant concentrations not too far away from the *cmc* and we will concentrate here on the derivation and discussion of the concentration model and its application to physical properties which are direct functions of monomer and micellar concentrations, such as conductivity, surface tension, NMR and diffusion coefficient. In a forthcoming contribution we will deal with experiments involving additional solutes, such as fluorescent dyes, which require a more detailed analysis of the partition of the solute between the aqueous phase and the micellar pseudophase and its distribution among the micelles. The empiric concentration model does not pretend to compete with elaborate thermodynamic theories or simulations of surfactant self-assembly but to improve the empiric methods used so far.

## 2. Material and methods

**Materials.** Sodium dodecyl sulfate (SDS), Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) and Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) of purity higher than 99% were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Linear alkylbenzene sulfonic acid (LAB) was kindly supplied by Henkel AG (Düsseldorf, Germany) with a purity of 96%. This surfactant, commonly used in the laundry industry, is a complex mixture of homologues and isomers with a mean chain length of 11.6. To avoid pH changes, the corresponding sodium salt (Linear alkylbenzene sulfonate, LAS) was obtained by neutralization of the LAB solutions with NaOH (Sigma-Aldrich).  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  from Fluka were used to prepare a phosphate solution of ionic strength 0.01 M.

**Conductivity Measurements.** An electrical conductivity meter Basic 30 from Crison Instruments (Barcelona, Spain) provided with a standard conductivity cell and temperature sensor Pt 1000 was used to measure the conductivity of surfactant solutions of different concentrations. The measuring solutions were prepared by dilution of stock solutions of the surfactants using two methods: (i) step-by-step dilution-extraction method [25] starting with the surfactant stock solution (titrations with less data points as for DTAB and CTAB); (ii) addition with a burette of small volumes of the surfactant stock solution to a precise, much larger volume of water, which allows to measure a high number of data points (titrations of SDS and LAS). In both cases the temperature of the measuring solutions was controlled by circulating water through a jacketed beaker thermostated with a VWR Cryostat model 1166D with a precision of  $\pm 0.05\text{K}$ .

**Data Analysis.** All data were analyzed with OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, US). All given uncertainties correspond to one standard deviation from the fits and do not include calibration errors. The Origin functions of the concentration model and all derived magnitudes used are given ready to use in the supplementary data.

## 3. Theory

### 3.1 Empiric Model for the Surfactant Concentrations

In a simplified picture, below the *cmc* all surfactant molecules are monomeric, whereas above the *cmc* all additional surfactant molecules self-assemble and form micelles with a mean size given by the aggregation number  $n$  with a relatively narrow size distribution [1, 3, 26, 27]. As a result, the

concentration of monomeric surfactant  $[S_1]$  is equal to the total surfactant concentration  $[S]_0$  below the  $cmc$  and stabilizes then at the value of the  $cmc$  itself:

$$[S_1] = \begin{cases} [S]_0, & [S]_0 \ll cmc \\ cmc, & [S]_0 \gg cmc \end{cases} \quad (4)$$

The concentration of aggregated (micellized) surfactants,  $[S_m]$ , is the difference between the total concentration and that of monomeric surfactants:

$$[S_m] = [S]_0 - [S_1] \quad (5)$$

The concentration of micelles,  $[M]$ , depends on the mean aggregation number,  $n$ , which can itself depend on the surfactant concentration  $[S]_0$ :

$$[M] = [S_m] / n \quad (6)$$

The “degree of micellization” can be measured either as molar fraction of micellized surfactant molecules  $\alpha_m$ : [28, 29]

$$\alpha_m = X_m = \frac{n \cdot [M]}{[S]_0} = \frac{[S_m]}{[S]_0} \quad (7)$$

or based on the differential change in the micellized surfactant concentration  $\gamma_m$ : [16]

$$\gamma_m = \frac{d[S_m]}{d[S]_0} = 1 - \frac{d[S_1]}{d[S]_0} \quad (8)$$

Our starting point are the empiric descriptions of Phillips (eq (2)) and Garcia-Mateos (eq (3)). In contrast to other authors [16, 18] we apply eqs (2) and (3) directly to the monomer concentration  $\phi = [S_1]$  (and not to conductivity) and integrate  $[S_1]''$  in the following analytically, eliminating the need for numerical integrations during the application of the model. Then the second derivative of  $[S_1]$  is described by a Gauss function centered at the  $cmc$  and with width  $\sigma$  as given in eq (9).

$$[S_1]'' = \frac{d^2[S_1]}{d[S]_0^2} = -A \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{([S]_0 - cmc)^2}{2\sigma^2}} = -\frac{A}{cmc} \frac{1}{\sqrt{2\pi}r} e^{-\frac{(s_0 - 1)^2}{2r^2}} \quad (9)$$

The amplitude  $A > 0$  is determined later as a normalization constant. The width  $\sigma$  of the Gaussian is a measure of the concentration range of the transition region. The smaller  $\sigma$  is, the sharper is the transition between the two linear regions below and above the  $cmc$ . In order to facilitate the comparison of widths  $\sigma$  of surfactants with different  $cmc$  values, we define the *relative transition width*  $r$  as given in eq (10).

$$r = \sigma / cmc \quad (10)$$

Note: The “transition width”  $\sigma$  (and  $r$ ) is the width of the Gaussian used to describe the second derivative  $[S_1]''$  around the  $cmc$ . The width  $\sigma$  is proportional to the mathematical “radius of

### 3.1 Artículo original

curvature" [59]  $R$  of  $[S_1]$ ,  $R([S_1]) = (1 + [S_1]')^2)^{3/2} / [S_1]''$ , ( $R(cmc) \approx 3.50 \cdot \sigma$ ), and is inversely proportional to the curvature  $K=1/R$  and to the second derivative at the  $cmc$ :  $[S_1]''(cmc) \approx -(2\pi)^{-1/2} \sigma^{-1}$ . It is interesting that, because  $K([S_1])$  depends on both,  $[S_1]''$  and  $[S_1]'$ , the maximum of the mathematical curvature  $K$  is found at a slightly higher concentration than the  $cmc$ , which is defined by the maximum of  $[S_1]''$  alone according to the Phillips condition (eq (2)) ( $[S_1]_0(K_{max}) \approx cmc + 0.36 \cdot \sigma$ ).

Only to simplify the expressions, we also define a *relative total surfactant concentration*  $s_0$  as ratio between  $[S]_0$  and the  $cmc$ :

$$s_0 = [S]_0 / cmc \quad (11)$$

Integration of  $[S_1]''$  in eq (9) gives the slope  $[S_1]'$ :

$$[S_1]' = \int [S_1]'' d[S]_0 = -\frac{A}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{s_0 - 1}{\sqrt{2}r}\right) + C_1 = \frac{A}{2} \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{s_0 - 1}{\sqrt{2}r}\right)\right) \quad (12)$$

The error function  $\operatorname{erf}(x)$  is a sigmoid type function centered at  $x=0$  (in this case at the  $cmc$  where  $s_0=1$ ) with limiting values:  $\operatorname{erf}(0)=0$ ,  $\operatorname{erf}(-\infty)=-1$ , and  $\operatorname{erf}(\infty)=1$ .

The integration constant  $C_1$  in eq (12) is determined by the condition that at high surfactant concentration the monomer concentration is constant ( $[S_1] = cmc$ ) so that its slope  $[S_1]'$  approaches zero:

$$\lim_{s_0 \rightarrow \infty} [S_1]' = 0 \Rightarrow C_1 = \frac{A}{2} \quad (13)$$

A second integration already gives the concentration  $[S_1]$  itself:

$$[S_1] = \int [S_1]' d[S]_0 = cmc \frac{A}{2} \left( s_0 - e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} \sqrt{\frac{2}{\pi}} r - (s_0 - 1) \operatorname{erf}\left(\frac{s_0 - 1}{\sqrt{2}r}\right) \right) + C \quad (14)$$

Now we choose the integration constant  $C$  so that  $[S_1]$  is zero at  $s_0=0$ :

$$[S_1](0) = 0 \Rightarrow C = cmc \frac{A}{2} \left( e^{-\frac{1}{2r^2}} \sqrt{\frac{2}{\pi}} r + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}r}\right) \right) \quad (15)$$

As last step we select the normalization constant  $A$  so that  $\lim_{s_0 \rightarrow \infty} [S_1] = cmc$ :

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}r}\right)} \quad (16)$$

After some rearrangement we finally get the correctly normalized model (eq (17)) for the monomer concentration  $[S_1]$  with the properties we were looking for.

$$[S_1] = cmc \left[ 1 - \frac{A}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} + (s_0 - 1) \left( \operatorname{erf} \left( \frac{s_0 - 1}{\sqrt{2}r} \right) - 1 \right) \right) \right] \quad (17)$$

As long as the width  $r$  is not too big (see below) the monomer concentration  $[S_1]$  is linear at low concentrations with an initial slope  $[S_1]'$  of one. The straight line  $[S_1] = s_0$  at low  $s_0$  always intersects with the line  $[S_1]=cmc$  at the  $cmc$  ( $s_0 = 1$ ) itself.

For small values of  $r$  the amplitude  $A$  of eq (16) is approximately  $A \approx 1$ . Although this is an excellent approximation for values of  $r$  below 0.5 it leads to strong deviations in  $[S_1]$  for higher values of  $r$  and we strongly recommend to use the full eq (16).

Figure 1 shows plots of the correctly normalized functions  $[S_1]$ ,  $[S_1]'$  and  $[S_1]''$ , as given by eqs (17), (12), and (9), respectively, for different values of  $r$  and  $cmc = 1$ . The model function for the monomeric surfactant concentration has the expected properties. It also fulfills the criteria for the  $cmc$  mentioned above: the value of the  $cmc$  coincides with the concentration of maximum curvature [15] and the limiting straight lines intersect exactly at the  $cmc$  [30, 31]. A change in the relative transition width  $r$  does not affect the position of the  $cmc$  or the limiting slopes of  $[S_1]$ .

The position of the  $cmc$  coincides with the inflection point of the (differential) degree of micellization  $\gamma_m(cmc) = 0.5$  (eq (8)). The value of the (fractional) degree of micellization  $\alpha_m$  or molar fraction of micellized surfactant  $X_m$  (eq (7)) at the  $cmc$  is given by

$$\alpha_m(cmc) = \left( \frac{[S_m]}{[S]_0} \right)_{cmc} = \frac{\sqrt{\frac{2}{\pi}} r}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf} \left( \frac{1}{\sqrt{2}r} \right)} \approx \frac{r}{\sqrt{2\pi}} \approx 0.4 \times r \quad (18)$$

For a typical value of  $r = 0.1$  the degree of micellization  $\alpha_m(cmc)$  is 0.04, which means that at the  $cmc$  only 4% of the surfactants form micelles (See Figure 1, d). This approximately linear relation between  $\alpha_m(cmc)$  and  $r$  is valid up to quite high values of  $r$ , with an error of less than 0.5% at  $r = 0.5$ .

In order to determine the concentration of micelles  $[M] = [S_m] / n$  we have to make further assumptions about the aggregation number  $n$  and its dependence on  $[S]_0$ . We assume as the simplest case that the micelles have constant size  $n = \text{const.}$  at all (not too high) concentrations  $[S]_0$ , especially also around the  $cmc$ . This simplifying assumption of a very steep increase of  $n$  around the  $cmc$  is supported by thermodynamic descriptions of the micellization process, which show that amphiphiles can only decrease their free energies significantly by forming large aggregates [31]. Simulations [32] and thermodynamic models [7] seem to be in line with this assumption. Small deviations from the ideal behavior around the  $cmc$  would affect mainly the value of the width  $r$ . More complex models for the dependence of  $n$  on  $[S]_0$  can of course be introduced.

Care has to be taken with too high values of the relative transition width  $r$ . In a surfactant solution with a well-defined  $cmc$  no micelles are present at very dilute solutions so that the initial slope of  $[S_1]$  in eq (17) should be one (eq (4)). However, the higher the width  $r$ , the broader the transition region around the  $cmc$  (Figure 1). For relative widths  $r$  above approximately 0.5 the surfactant concentrations  $[S_1]$  and  $[S_m]$  show no initial linear region anymore and a significant fraction of micellized surfactant  $[S_m]$  is predicted even in very dilute solutions. As we see in the

following such high values of  $r$  correspond to surfactant mixtures or very weakly associating molecules which cannot be described by a single  $cmc$ .

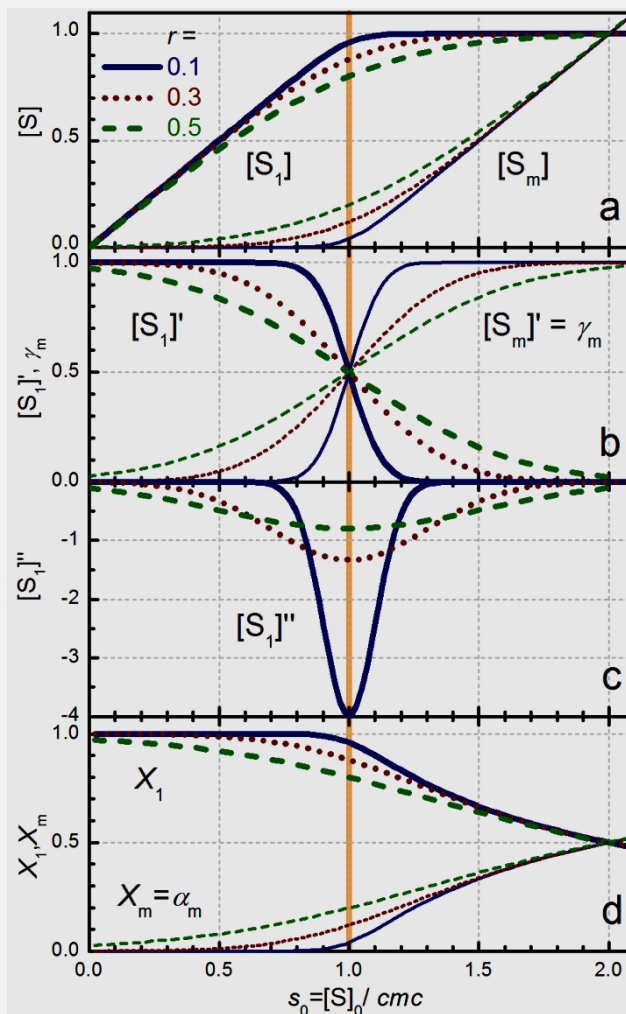


Figure 1: Different representations of the model for the concentration of monomeric surfactant  $[S_1]$  as function of relative total surfactant concentration  $s_0 = [S]_0 / cmc$  (eq (17)) with  $cmc = 1$  and three values of the relative transition width  $r$  (solid:  $r = 0.1$ , dot:  $r = 0.3$ , dash:  $r = 0.5$ ). (a)  $[S_1]$  and  $[S_m]$ . (b) First derivative  $d[S_1]/d[S]_0$  (eq (12)) and (differential) degree of micellization  $\gamma_m = d[S_m]/d[S]_0$  (eq (8)). (c) Second derivative  $d^2[S_1]/d[S]_0^2$  (eq (9)). (d) Molar fractions  $X_1$  and  $X_m$  and degree of micellization  $\alpha_m$  (eq (7)). The vertical thick line indicates the  $cmc$ .

As next step we use the concentration model to derive specific equations for different physical properties: conductivity, surface tension, NMR shifts and self-diffusion coefficients. It is not our aim to give an exhaustive or critical review of each of the properties, but we mainly illustrate the use and validity of the model.

### 3.2 Electrical conductivity of ionic surfactant solutions

The conductivity (specific conductance) of a solution of an anionic surfactant of concentration  $[S]_0$  with monomer concentration  $[S_1]$  and micelle concentration  $[M]$  is given by [33]

$$\begin{aligned}\kappa &= \underbrace{(\lambda_{C^+} + \lambda_{S^-})}_{a} [S_1] + \underbrace{(\lambda_{M^{z-}} + z\lambda_{C^+})}_{b'} [M] + \kappa_s \\ &= a[S_1] + b'[M] + \kappa_s\end{aligned}\quad (19)$$

with the molar conductivities of monomeric surfactant anions  $\lambda_{S^-}$ , of counter-cations  $\lambda_{C^+}$ , and of micelles  $\lambda_{M^{z-}}$ . Each micelle of net charge  $z \cdot e$  and aggregation number  $n$  incorporates  $(n - z)$  counterions, and leaves  $z$  counterions free in solution.  $\kappa_s$  is the residual conductivity of the solvent without surfactant. With  $[M] = [S_m] / n$  and  $b = b'/n$  we get

$$\kappa = a[S_1] + b'[S_m] / n + \kappa_s = a[S_1] + b[S_m] + \kappa_s \quad (20)$$

The parameters  $a$ ,  $b$  and  $\kappa_s$  can be determined by fits of eq (20) to conductivity data using eqs (17) and (5) in order to calculate the concentrations  $[S_1]$  and  $[S_m]$  as function of total surfactant concentration  $[S]_0$ .

The parameters  $a$  and  $b$  have units of molar conductivity and are the slopes of the limiting straight lines  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  observed at low and high concentration of surfactant, respectively.  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  are given by:

$$\begin{aligned}\kappa_1 &= a[S]_0 + \kappa_s \\ \kappa_2 &= a \cdot cmc + b \cdot ([S]_0 - cmc) + \kappa_s\end{aligned}\quad (21)$$

The degree of ionization  $\alpha = (n - z) / n$  of the micelle can be calculated according to Evans [34-37] as

$$\alpha = -\frac{\lambda_{C^+} - \sqrt{4bn^{2/3}(a - \lambda_{C^+}) + \lambda_{C^+}^2}}{2n^{2/3}(a - \lambda_{C^+})} \quad (22)$$

The molar conductivity (equivalent conductance)  $\Lambda_m$  is given by:

$$\Lambda_m = (\kappa - \kappa_s) / [S]_0 = a[S_1] / [S]_0 + b[S_m] / [S]_0 \quad (23)$$

The molar conductivities of monomeric surfactant anions  $\lambda_{S^-}$ , and of micelles  $\lambda_{M^{z-}}$  are given by:

$$\begin{aligned}\lambda_{S^-} &= a - \lambda_{C^+} \\ \lambda_{M^{z-}} &= n(1 - \alpha)\lambda_{C^+} - b\end{aligned}\quad (24)$$

The equations for cationic surfactants are analogous.

### 3.3 Surface Tension

The surface tension of a surfactant solution can be approximately described by the Szyszkowski equation:

$$\gamma = \gamma_0 - a \ln(1 + K_{ad} \cdot [S_1]) \quad (25)$$

with the adsorption equilibrium constant  $K_{ad}$ , the surface tension of the solvent  $\gamma_0$ , and the constant  $a = RT/\omega$ ,  $\omega$  being the cross sectional area of the surfactant molecule at the surface per mol [38-40]. In contrast to monomers, micelles are not surface active. Therefore we use the monomer concentration  $[S_1]$  as concentration which defines the surface tension.

### 3.4 Chemical Shift in NMR Experiments

Due to the fast exchange [4, 41] of a surfactant molecule between the aqueous and the micellar pseudo-phase, the chemical shift  $\delta_{obs}$  of the resonance peak of the surfactant observed in NMR spectra can be expressed as weighted mean of the chemical shifts  $\delta_1$  and  $\delta_m$  of monomeric and micellized surfactant, respectively: [42]

$$\delta_{obs} = \delta_1 \cdot \frac{[S_1]}{[S]_0} + \delta_m \cdot \frac{[S_m]}{[S]_0} = (\delta_1 - \delta_m) \cdot \frac{[S_1]}{[S]_0} + \delta_m \quad (26)$$

Since each of the surfactants in a micelle contributes to the signal the shift is weighted by the concentration of micellized surfactants  $[S_m]$  and not by  $[M]$ . Shifts of several nuclei can of course be fitted globally.

### 3.5 Diffusion Coefficient

Self-Diffusion coefficients as measured by NMR or Taylor dispersion are average diffusion coefficients, weighted with the concentration of monomeric and micellized surfactants: [43]

$$D_{obs} = D_1 \cdot \frac{[S_1]}{[S]_0} + D_m \cdot \frac{[S_m]}{[S]_0} \quad (27)$$

The weighting is specific to each technique and care has to be taken to apply a correct expression. Light scattering measures mutual diffusion coefficients [44], whereas PGSE-NMR yields self-diffusion coefficients [43].

Eqs (26) and (27) are of the same type, where the observed property  $\phi_{obs}$  is the sum of the individual properties of monomeric  $\phi_1$  and micellized  $\phi_m$  surfactants weighted with their molar fractions  $X_1$  and  $X_m$ . As for the chemical shifts, these self-diffusion coefficients depend on the concentration of each of the micellized surfactants  $[S_m]$ .

## 4. Results and Discussion

The concentration model (eqs (17) and (5)) and the functions of the derived properties are used to analyze experimental data of several surfactant systems studied with different techniques. First, conductivity, surface tension, NMR shift, and diffusion data of the well-studied anionic surfactant SDS are studied, then conductivity data of other surfactants with lower *cmc* values and

polydisperse surfactants which are notoriously difficult to treat by graphical extrapolation procedures.

#### 4.1. SDS, Conductivity

Figure 2 shows the conductivity of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) in pure water at 25°C. SDS is a well-studied surfactant with a well-defined  $cmc$  of 8.1- 8.2 mM and an aggregation number of 62-64 at 25°C [10, 13, 30]. The fit of model (20) to the data, with  $[S_1]$  and  $[S_m]$  given by eqs (17) and (5), respectively, is excellent (see Figure 2). The model reproduces the data perfectly with randomly distributed residuals, only limited by the digital resolution of the conductivity meter used for the measurement. Even around the  $cmc$  the deviation is less than 0.2%, of the order of the reproducibility of the instrument.

The  $cmc = 8.099$  mM is determined with high precision and coincides well with reference data (Table 1). The relative width  $r = 0.112$  corresponds to a width of the transition region  $\sigma = 0.9$  mM (see eq (9)). The interval  $cmc \pm 2\sigma$  is shown as inset in Figure 2. The slopes  $a = 66.74 \pm 0.03$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> and  $b = 26.43 \pm 0.01$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, the derived micelle ionization degree  $\alpha = 0.236$  (eq (22),  $\lambda_{c^+}(\text{Na}^+) = 50.08$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>) [45] and the slope ratio  $b/a = 0.396$  coincide well with published data [37]. From this data the molar conductivities of monomeric surfactant anions  $\lambda_s^- = 16.66 \pm 0.03$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, and of micelles  $\lambda_{M^-} = 732 \pm 24$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> are obtained.

The straight lines  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  calculated with the parameters of the fit and eq (21) intersect exactly at the  $cmc$ , which is an intrinsic property of the model (20).

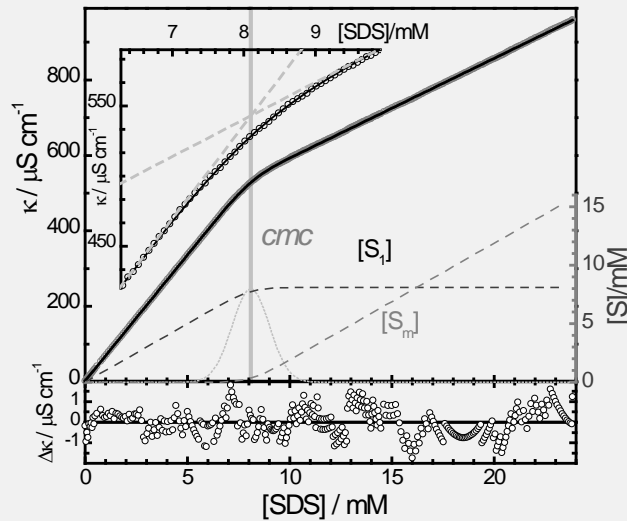


Figure 2: Conductivity  $\kappa$  of SDS in aqueous solution at 298K. Circles: experimental data (the 330 data points appear as thick line). Black solid line: fit of model (20) to the data. Dashed grey lines: concentrations  $[S_1]$  and  $[S_m]$  from eqs (17) and (5). Dotted grey line: second derivative of  $[S_1]$  (eq (9)). Vertical grey line:  $cmc$  as given by the fit. Inset: Zoom of the interval  $[S]_0 = [cmc - 2\sigma, cmc + 2\sigma] = [6.3 \text{ mM}, 9.9\text{mM}]$ . Grey lines: limiting straight lines  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  as given by eq (21). Lower panel: residuals of the fit.

### 3.1 Artículo original

It is well known that different ways to plot the same experimental data can give significantly different values of the *cmc* determined by graphical extrapolating procedures [13]. A typical example is the comparison of plots of conductivity  $\kappa$  to that of molar conductivity (equivalent conductance)  $\Lambda_m$  represented against the total surfactant concentration (or against its square root). The limiting straight lines which can be drawn through the data within a sufficiently small concentration interval around the *cmc*, do not generally intersect at the same concentration in the two types of plots. Figure S11 in the Supporting Information shows the same data as in Figure 2, converted to molar conductivity  $\Lambda_m = (\kappa - \kappa_s)/[S]_0$ . Within a smaller concentration range around the *cmc* (interval indicated in the figure as dashed rectangle) straight lines may be drawn through the data with intersections at concentrations of 7.71mM in the plot of  $\Lambda_m$  vs.  $[S]_0^{1/2}$  and 7.64mM in the plot of  $\Lambda_m$  vs.  $[S]_0$ . These concentrations do not coincide and both are significantly smaller than the *cmc* = 8.099 mM determined from the conductivity in Figure 2. This problem does not arise if eq (23) (with eq (17) for  $[S_1]$ ) is fitted to the molar conductivity, which gives of course the same parameter values as in the case of the conductivity, with exactly the same *cmc*. The parameters of model (17) are independent of whether we analyze the same data as  $\kappa$  or as  $\Lambda_m$  plotted against  $[S]_0$  or  $[S]_0^{1/2}$  (see Table 1). The only differences arise due to slightly different weighting of the experimental errors in the fits, as can be seen in the residuals of the two types of plots (Figures 2 and S11).

Thus the fit of model (17) allows one to determine consistent values of the parameters between the different plots.

**Table 1:** Values of the *cmc*, *r*, micelle ionization ratio  $\alpha$  (eq (22)), and slope ratio *b/a* for different surfactants and techniques obtained from the fits of eqs (19) - (27) together with model eq (17) for  $[S_1]$  and (5) for  $[S_m]$  to the data shown in the corresponding figures. The uncertainties are standard deviations from the fit.

Surfactant	Technique	Ref <sup>a</sup>	Figure	<i>cmc</i> / mM	<i>r</i>	$\alpha$	<i>b/a</i>	<i>T/K</i>
SDS	Conductivity		2	8.099±0.005	0.112±0.001	0.236	0.396	298
SDS	Molar conductivity		S11	8.099±0.004	0.112±0.001	0.236	0.396	298
SDS	Surface Tension	[46]	3	7.7±0.1 7.6±0.2	0.03±0.04 0.1 fixed	-	-	293
SDS <sup>b</sup>	NMR, Diffusion	[47]	4	7.35±0.09	0.10±0.03	-	-	298
DTAB	Conductivity		5a	14.5±0.2	0.16±0.04	0.18	0.24	298
CTAB <sup>c</sup>	Conductivity		5b	0.88±0.07	0.1±0.2	-	0.75	293
LAS	Conductivity		5c	1.64±0.02	0.48±0.02	0.28- 0.35	0.53	293

<sup>a</sup> Source for experimental data

<sup>b</sup> in D<sub>2</sub>O

<sup>c</sup> in phosphate solution, ionic strength = 0.01M.

## 4.2. SDS, Surface Tension

Figure 3 shows surface tension data obtained with SDS solutions at 20°C by Watanabe et al. [46] The data are plotted against SDS concentration  $[S]_0$  both with a linear scale (lower axis) and with logarithmic scale (upper axis). It is not our aim to discuss neither the technique nor the results of the authors, but merely to illustrate the application of our concentration model to this type of data. The authors determine the *cmc* as the point of intersection of two straight lines in a plot of surface tension  $\gamma$  versus SDS concentration to be about 2200 mg kg<sup>-1</sup> = 7.6 mM.

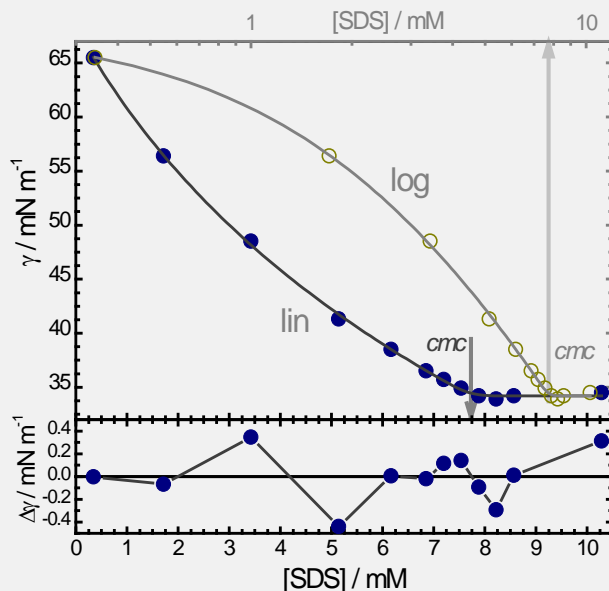


Figure 3: Surface tension  $\gamma$  of SDS in water at 293K from Watanabe et al. converted from mg kg<sup>-1</sup> to 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup> (mM) [46]. Linear plot (lower axis) of experimental data (filled circles) and fit of eq (25) to the data (solid lines). Lin-Log plot (upper axis) of the same experimental data (open circles) and of the fit data (grey line). Vertical grey arrows: *cmc* as given by the fit. Lower panel: residuals of the fit in the linear plot.

Figure 3 shows that no linear behavior of the data is found below the *cmc* and drawing a straight line in this interval is quite arbitrary. The analysis with the Szyszkowski eq (25) together with model (17) for the surfactant monomer concentration is independent of the type of plot and yields an excellent fit with a value of the *cmc* of 7.7±0.1 mM, a relative transition width  $r = 0.03\pm 0.04$ , and the other fit parameters:  $a = 28\pm 2$  mN m<sup>-1</sup>,  $K_{ad} = 0.3$  mM<sup>-1</sup> and  $\gamma_0 = 68.3\pm 0.4$  mN m<sup>-1</sup> (Table 1). The width  $r$  is not well defined, which is mainly due to the small number of experimental points. Furthermore, it is also well known that already very small concentrations of surface active impurities affect the transition region around the *cmc* [27]. However, the value of  $r$  has nearly no influence on that of the *cmc*, and the fit with fixed value  $r = 0.1$  gives the same *cmc*-value with higher uncertainty due to a slightly worse fit (Table 1). This value of the *cmc* coincides well with that determined from extrapolation in the logarithmic plot in Figure 3, but is somewhat lower than that of the conductivity data, which is probably due to the different measurement temperature and the mentioned sensitivity to impurities.

### 4.3. SDS, NMR

Data of chemical shifts  $\delta_{\text{obs}}$  of protons H1 and H5 and self-diffusion coefficients  $D_{\text{obs}}$  of SDS in D2O from NMR experiments published by Cui et al. are shown in Figure 4 [47]. The authors use plots of  $\delta_{\text{obs}}$  and  $D_{\text{obs}}$  against reciprocal surfactant concentration  $[S]_0^{-1}$  and determine the *cmc* from straight lines drawn through some of the experimental points. We performed the fits of eqs (26) and (27) to the data which are excellent in each case, also in the region around the *cmc*. We find no evidence for the formation of “premicelles” as the authors propose.

The use of the eqs (26) and (27) in standard nonlinear optimization routines makes it now possible to perform a *global analysis* of all three data series together in one fit, sharing the *cmc* and *r* as common fit parameters. Global fitting is preferred over single fits as it reduces the number of fit parameters and the correlations between them and improves the statistics of the fit [48]. The global fit of  $\delta_{\text{obs}}(\text{H1})$ ,  $\delta_{\text{obs}}(\text{H5})$  and  $D_{\text{obs}}$  is excellent, as shown in Figure 4, with shared values of *cmc* and *r* given in Table 1 and  $D_1=5.04\pm 0.03 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $D_m=0.28\pm 0.06 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $\delta_1(\text{H1}) = 0.92\pm 0.02 \text{ ppm}$ ,  $\delta_m(\text{H1}) = 0.97\pm 0.04 \text{ ppm}$ ,  $\delta_1(\text{H5}) = 4.12\pm 0.02 \text{ ppm}$ ,  $\delta_m(\text{H5}) = 4.09\pm 0.04 \text{ ppm}$ . (The analysis software used for the global fit does not allow the use of different fitting functions is the same fit. However, we take advantage of the fact that both equations (26) and (27) have the same mathematical form.)

This example illustrates the great potential of the concentration model for the quantitative analysis of NMR data, and even for global analysis, which are, in our opinion, very superior to the graphical extrapolation methods typically applied.

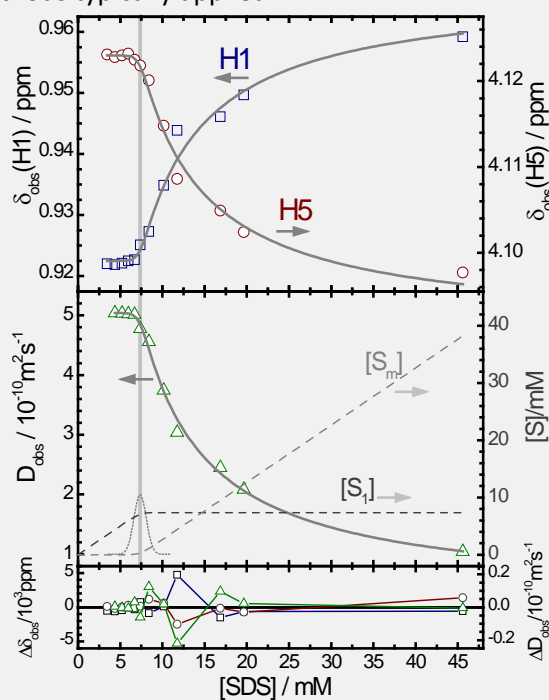


Figure 4:  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts  $\delta_{\text{obs}}$  (upper panel) of protons H1 (quadrats) and H5 (circles) and NMR self-diffusion coefficients  $D_{\text{obs}}$  (middle panel, triangles) of SDS in D<sub>2</sub>O at 298K published by Cui et al. [47] Grey solid lines: global fit of eqs (26) and (27) to the data. Vertical line: *cmc* as given by the fit. Dashed grey lines: simulated concentrations  $[S_1]$  and  $[S_m]$ . Dotted grey line: second derivative of  $[S_1]$ . Lower panel: residuals of the fits.

#### 4.4. DTAB, Conductivity

Figure 5a shows the conductivity of DTAB in aqueous solution as function of surfactant concentration at 298K. The fit with eqs (20) and (17) gives a  $cmc$  of  $14.5 \pm 0.2$  mM and a width of  $r = 0.16 \pm 0.04$  with slopes  $a = 103 \pm 1$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>,  $b = 24.4 \pm 0.4$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> (Table 1). The  $cmc$  coincides well with reported values of 14.5 mM-15.3mM [13, 49, 50]. In spite of the low number of data points, both  $cmc$  and  $r$  are still reliably determined. The relative transition width  $r$  is similar to that obtained for SDS (Table 1). From the slopes and eq (22) the slope ratio  $b/a=0.24$  and a micelle ionization degree  $\alpha = 0.18 \pm 0.01$  are obtained (with  $\lambda(\text{Br}^-) = 78.1$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> [45] and  $n = 50$  [4, 50]). The value of  $\alpha$  is lower than reported values of 0.21[11, 50] or  $0.26 \pm 0.01$  [51]. The data yield the molar conductivities of monomeric surfactant cations  $\lambda_{\text{ct}} = 25 \pm 1$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, and of micelles  $\lambda_{\text{M}^{z+}} = (1.76 \pm 0.02) 10^3$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>.

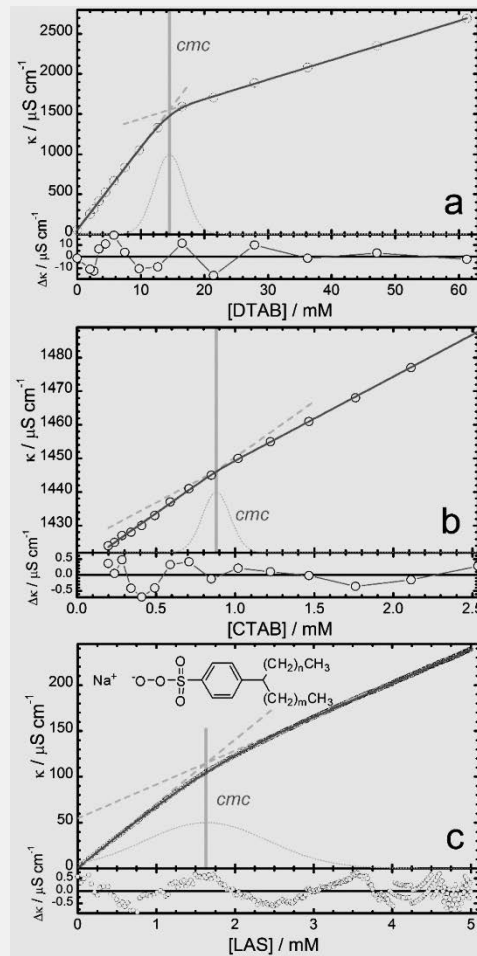


Figure 5: Conductivity  $\kappa$  of DTAB (a), CTAB (b), and LAS (c) in aqueous solution at 298K (CTAB in phosphate solution, ionic strength = 0.01M). Open circles: experimental data, grey solid line: fit of models (20) and (17) to the data. Dotted grey line: second derivative of  $[S_1]$  (eq (9)) with a width given by the fit. Vertical grey line:  $cmc$  as given by the fit. Dashed grey lines: limiting straight lines  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  as given by eq (21). Lower panels: residuals of the fits.

This example shows that, even in the case of a low number of data points, the model fits conductivity data satisfactorily and yields precise values for several properties of the surfactant.

#### 4.5. CTAB, Conductivity

The conductivity of CTAB in phosphate solution (ionic strength = 0.01M) as function of  $[S]_0$  serves here as an example of a system which is notoriously difficult to analyze graphically. The plot of  $\kappa$  against  $[S]_0$  (Figure 5b) shows only a very small change in the slope around the *cmc* which makes it difficult to determine the point of intersection of the limiting lines graphically. On the contrary, eq (20) for  $\kappa$  with eqs (17) and (5) for  $[S_1]$  and  $[S_m]$ , respectively, fit fast and reliably to the data and give a relatively precise value of the *cmc* =  $0.88 \pm 0.07$  mM. This value is lower than the reported value [16, 52] of 0.92 mM, due to the higher ionic strength of the solution.

The low number of experimental points and the small change in the slopes increase the uncertainty in the value of the relative transition width  $r = 0.1 \pm 0.2$ , but its mean value is reasonable and similar to the values determined before. The fit yields slopes of  $a = 33.2 \pm 0.9$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, and  $b = 25.0 \pm 0.4$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, and  $\kappa_s = 1417.1 \pm 0.4$  μS cm<sup>-1</sup> with a ratio  $b/a = 0.75$  (Table 1).

Due to the additional salt in solution both the aggregation number and the molar conductivity of the counter-ion is changed with respect to the known values in pure water.

#### 4.6. LAS, Conductivity

LAS (Sodium linear alkylbenzene sulfonate) is an important commercial anionic surfactant which consist in a complex mixture of homologues of different alkyl chain lengths (C10 to C13 or C14) and phenyl positional isomers with polydisperse chain lengths  $n$  and  $m$ , with a mean value of 11.6 (see structure in Figure 5c) [53]. Again this is an example with a small change in the slopes of the conductivity-concentration plot (Figure 5c). Additionally, each isomer with different chain lengths  $n$  and  $m$  has a slightly different *cmc* which results in a wider transition region in the conductivity plot. The fit of eq (20) with  $[S_1]$  and  $[S_m]$  given by eqs (17) and (5), respectively, converges reliably with *cmc* =  $1.64 \pm 0.02$  mM and a width  $r = 0.48 \pm 0.02$ , which is high, as expected for this polydisperse surfactant. The *cmc* is similar to that determined by surface tension (1.8 mM) [54]. The slopes are  $a = 69.9 \pm 0.5$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> and  $b = 36.86 \pm 0.06$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> with a ratio  $b/a = 0.53$  (Table 1).

The micelle ionization degree  $\alpha$  (eq (22)) depends weakly on the aggregation number  $n$ . For LAS values of  $n$  between 27 and 65 were reported.. These values lead to ionization degrees  $\alpha$  between 0.28 and 0.35 (with  $\lambda_{c^*}(\text{Na}^+) = 50.08$  S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>) [45].

In spite of the small change in the slopes and the wide transition region reliable values for the *cmc* and the slopes are obtained in a single fit. However, in this case a small but significant oscillation of the residuals is observed (lower panel in Figure 5c), in contrast to SDS (Figure 2). This may indicate that this surfactant mixture is not adequately described by a single *cmc* with high  $r$  but should rather be fitted with a *cmc* distribution.

## 5. Conclusion

The empiric concentration model presented here constitutes a useful tool for the quantitative analysis of experimental data obtained with different techniques from surfactant solutions. The model establishes an objective definition of the *cmc* and makes it possible to obtain precise and well defined values of derived physical parameters such as molar conductivities, micelle ionization degrees, surface adsorption equilibrium constants, self-diffusion coefficients, etc. The description of different properties with a common concentration model eliminates subjective graphical procedures, reduces methodological differences and allows one thus to compare directly the results of several techniques or even to analyze them simultaneously in a single global fit. The concentration model can also serve as a robust and fast method to determine the *cmc* in automated high throughput applications [55-57].

The monodisperse surfactants with well-defined *cmc*, SDS, DTAB or CTAB, are very well described with the models based on eq (17) with relative transition widths  $r$  around 0.1 and values of the *cmc* which coincide well with published data. A higher value of the transition width  $r$  is obtained for LAS, which is a complex mixture of homologues and isomers, each with different *cmc* values.

The values obtained for the *cmc* of SDS from the different experimental datasets (Table 1) show significant differences, in spite of the use of the same concentration model in the analysis. Apart from the influence of temperature, impurities and solvents, the differences in the *cmc* values also reflect the fact that the data were measured with different techniques in various laboratories and with strongly varying accuracy. The value obtained from conductivity in our lab with an estimated accuracy of about 0.5%, coincides perfectly with reported values [13, 30]. Surface tension data is known to be strongly sensitive to even small surface-active impurities, and thus the coincidence is quite satisfactory [13]. The chemical shift and diffusion data obtained from NMR give clearly a too low *cmc*-value, a fact that the authors already mentioned, but did not justify [47]. Nevertheless, the data serve the only purpose of demonstrating the application of the concentration model, and a critical evaluation of these values is beyond the scope of this contribution.

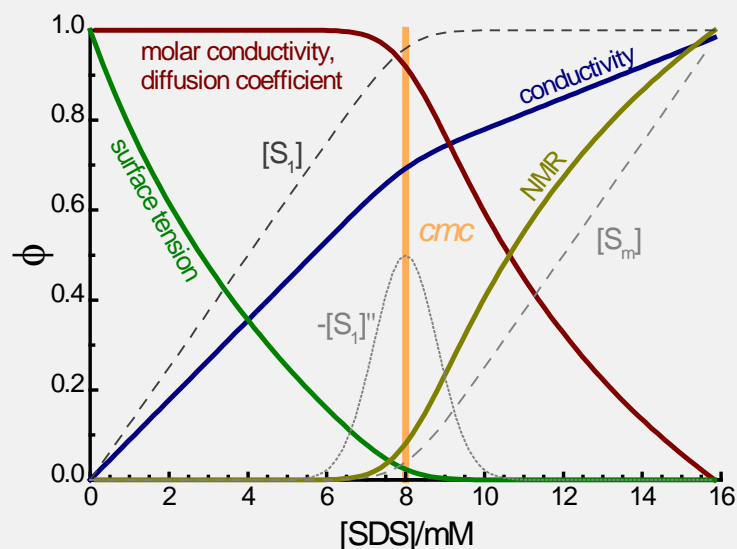


Figure 6: Normalized physical-chemical properties of an aqueous SDS solution as function of total surfactant concentration  $[S]_0$  with the parameters determined from the fits to the experimental data presented above using the concentration model of eq (17). Solid curves: Conductivity  $\kappa$  (eq (20)), molar conductivity  $\Lambda_m$  (eq (23)), surface tension  $\gamma$  (eq (25)),  $^1\text{H}$  NMR chemical shift  $\delta$  (eq (26)) and NMR self-diffusion coefficient  $D$  (eq (27)). Dashed curves: concentration of monomeric surfactant  $[S_1]$  (eq (17)) and concentration of micellized surfactant  $[S_m]$  (eq (5)) Dotted curve: second derivative of  $[S_1]$  (eq (9)). The curves of  $\Lambda_m$ ,  $D$ , and  $\delta(\text{H5})$  overlap. The vertical solid line indicates the  $cmc$ . ( $cmc = 8\text{mM}$ ,  $r = 0.1$ , all other parameters as given in the corresponding figure captions above and in Table 1 )

The concentration model also allows us to plot in a quantitative manner the concentration dependence of several physical properties of the same micelle-forming amphiphile, according to the schematic representation published by Preston [58], and by Lindman and Wennerström [12]; and later reproduced in many textbooks [27, 33]. Figure 6 shows such a plot with the properties studied in this contribution for an aqueous SDS solution: conductivity, molar conductivity, surface tension, NMR chemical shift, and NMR self-diffusion coefficient. In order to obtain a useful didactic representation, we plotted all properties with the parameters obtained from the fits, except for the value of the  $cmc$ , which is set to 8 mM in all cases. We also added the concentrations  $[S_1]$  and  $[S_m]$  and the second derivative (curvature)  $[S_1]''$ . The simple implementation of the concentration model and the possibility to compare easily derived properties will hopefully also be of didactic use. It is instructive to see, that the effect of micellization affects the properties already well before the  $cmc$ , and that the process of micellization is not described by a sharply defined point, as often represented in textbooks, but rather by a gradual change in the degree of micellization.

A natural consequence of the gradual change in micellization is the presence of micellized surfactant already below the point taken as  $cmc$ . The concentration  $[S_m]$ , its fraction  $[S_m]/[S]_0$ , and the degree of micellization all are expected to change already below the  $cmc$ , as can be seen in

Figure 1. The models based on eq (17) together with the assumption of constant aggregation number  $n$  describe extremely well the conductivity data of SDS measured with high precision (Figure 2), but also the surface tension, NMR chemical shifts, and the self-diffusion data. The gradual formation of low concentrations of micelles with full size  $n$  explains perfectly the variation observed in the experimental data around and below the *cmc*. Therefore, at least in the systems studied here, we find no evidence for the formation of surfactant aggregates such as the so called “premicelles”, with different properties to the proper micelles.

### Acknowledgments

L.P. thanks the Gil Dávila Foundation for a scholarship. M.N. and W.A. thank the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Xunta de Galicia for financial support (CTQ2010-21369, INCITE09262304PR, INCITE09E2R209064ES, IN845B-2010/094).

### Supplementary material

Additional figure and fitting functions for Origin data analysis software.

### References

- [1] K. Holmberg, Handbook of Applied Surface & Colloid Chemistry, John Wiley & Sons Inc, 2001.
- [2] T.F. Tadros, Applied Surfactants: Principles and Applications, VCH Verlagsgesellschaft, 2005.
- [3] J.N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, Academic Press, New York, 2010.
- [4] R. Zana, Dynamics of Surfactant Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, 2005.
- [5] D. Blankschtein, A. Shiloach, N. Zoeller, Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2 (1997) 294.
- [6] B.C. Stephenson, K. Beers, D. Blankschtein, Langmuir. 22 (2006) 1500.
- [7] R. Hadgiivanova, H. Diamant, J. Phys. Chem. B. 111 (2007) 8854.
- [8] M. Sammalkorpi, S. Sanders, A. Panagiotopoulos, M. Karttunen, M. Haataja, J. Phys. Chem. B. (2011) .
- [9] A. Gezae Daful, V. Baulin, J. Avalos, A. Mackie, J. Phys. Chem. B. 115 (2011) 3434.
- [10] N.J. Turro, A. Yekta, J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 5951.
- [11] S. Freire, J. Bordello, D. Granadero, W. Al Soufi, M. Novo, Photochem. Photobiol. Sci. 9 (2010) 687.
- [12] B. Lindman, H. Wennerstrom, Top. Curr. Chem. 87 (1980) 1.
- [13] P. Mukerjee, K.J. Mysels, Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems, NIST National Institute of Standards and Technology, Washington D.C. USA, 1971.
- [14] A. Patist, in Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry, K. Holmberg (Ed.), John Wiley & Sons: New York, 2001, p. 239.
- [15] J. Phillips, Trans. Faraday Soc. 51 (1955) 561.
- [16] I. García-Mateos, M. Mercedes Velázquez, L.J. Rodríguez, Langmuir. 6 (1990) 1078.
- [17] P. Shanks, E. Franses, J. Phys. Chem. 96 (1992) 1794.

### 3.1 Artículo original

- [18] M. Pérez-Rodríguez, G. Prieto, C. Rega, L.M. Varela, F. Sarmiento, V. Mosquera, *Langmuir*. 14 (1998) 4422.
- [19] P. Carpena, J. Aguiar, P. Bernaola-Galván, C.C. Ruiz, *Langmuir*. 18 (2002) 6054.
- [20] K. Shinoda, E. Hutchinson, *J. Phys. Chem.* 66 (1962) 577.
- [21] R.F. Kamrath, E.I. Franses, *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*. 22 (1983) 230.
- [22] M.E. Moro, L.J. Rodriguez, *Langmuir*. 7 (1991) 2017.
- [23] J.L. López Fontán, J. Costa, J. Ruso, G. Prieto, F. Sarmiento, *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*. 13 (2004) 133.
- [24] N. Jalsenjak, D. Tezak, *Chemistry-a European Journal*. 10 (2004) 5000.
- [25] A. Jover, F. Meijide, V. Mosquera, J. Vázquez Tato, *J. Chem. Educ.* 67 (1990) 530.
- [26] M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [27] I. Hamley, *Introduction to Soft Matter*. Revised Edition, Wiley Online Library, 2007.
- [28] A.K. Shchekin, A.P. Grinin, F.M. Kuni, A.I. Rusanov, in *Nucleation Theory and Applications*, J.W.P. Schmelzer, G. Röpke, V.B. Priezhev (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, p. 312.
- [29] O. Us' yarov, *Colloid Journal*. 66 (2004) 612.
- [30] R. Williams, J. Phillips, K. Mysels, *Trans. Faraday Soc.* 51 (1955) 728.
- [31] J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*. 72 (1976) 1525.
- [32] S. Morisada, H. Shinto, *J. Phys. Chem. B*. 114 (2010) 6337.
- [33] R.J. Hunter, *Foundations of Colloid Science*, Oxford University Press, 2001.
- [34] H. Evans, *J.Chem.Soc.* (1956) 579.
- [35] L. Sepulveda, J. Cortes, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 5322.
- [36] B.L. Bales, *J. Phys. Chem. B*. 105 (2001) 6798.
- [37] M. Benraou, B.L. Bales, R. Zana, *J. Phys. Chem. B*. 107 (2003) 13432.
- [38] B. Szyszkowski, *Z. Phys. Chem.* 64 (1908) 385.
- [39] K.J. Mysels, *Langmuir*. 2 (1986) 423.
- [40] V. Fainerman, R. Miller, *Langmuir*. 12 (1996) 6011.
- [41] M. Novo, S. Felekyan, C.A.M. Seidel, W. Al-Soufi, *J. Phys. Chem. B*. 111 (2007) 3614.
- [42] M. Amato, E. Caponetti, D.C. Martino, L. Pedone, *J. Phys. Chem. B*. 107 (2003) 10048.
- [43] O. Annunziata, L. Costantino, G. D'Errico, L. Paduano, V. Vitagliano, *J. Colloid Interface Sci.* 216 (1999) 16.
- [44] E. Sutherland, S.M. Mercer, M. Everist, D.G. Leaist, *J. of Chem. Eng. Data*. 54 (2008) 272.
- [45] R.C. Weast, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.
- [46] K. Watanabe, S. Niwa, Y.H. Mori, *J. of Chem. Eng. Data*. 50 (2005) 1672.
- [47] X. Cui, S. Mao, M. Liu, H. Yuan, Y. Du, *Langmuir*. 24 (2008) 10771.
- [48] J.M. Beechem, *Meth. Enzymol.* 210 (1992) 37.
- [49] S. Kato, H. Nomura, R. Zielinski, S. Ikeda, *J. Colloid Interface Sci.* 146 (1991) 53.
- [50] P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan, *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1997.
- [51] B.L. Bales, R. Zana, *J. Phys. Chem. B*. 106 (2002) 1926.

- [52] K. Kalyanasundaram, Photochemistry in Microheterogeneous Systems, Academic Press, New York, 1987.
- [53] N.M. van Os, R. Kok, T.A.B.M. Bolsman, Tenside Surfactants Detergents. 29 (1992) 175.
- [54] P. Goon, C. Manohar, V.V. Kumar, J. Colloid Interface Sci. 189 (1997) 177.
- [55] S. Paillet, B. Grassl, J. Desbrières, Anal. Chim. Acta. 636 (2009) 236.
- [56] C.H. Tan, Z.J. Huang, X.G. Huang, Anal. Biochem. 401 (2010) 144.
- [57] T. Jumpertz, B. Tschapek, N. Infed, S.H.J. Smits, R. Ernst, L. Schmitt, Anal. Biochem. (2010) .
- [58] W.C. Preston, J. Phys. Chem. 52 (1948) 84.
- [59] M. Kline, Calculus: An Intuitive and Physical Approach, Dover Pubns, 1998.



## 3.2 Supplementary Information

### Additional Figures

References to figures, equations, and citations refer to the main paper.

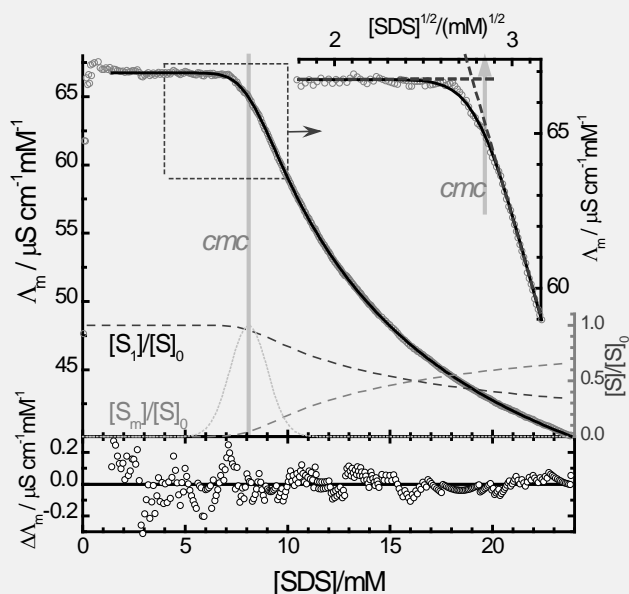


Figure SI1: Molar conductivity  $\Lambda_m = (\kappa - \kappa_s)/[S]_0$  of SDS in pure water at 298K (calculated from the conductivities  $\kappa$  in Figure 2). Circles: experimental data. Black line: fit of eq (23) together with model (17) to the data. Dashed grey lines: concentration fractions  $[S_1]/[S]_0$  and  $[S_m]/[S]_0$  calculated from eqs (17) and (2). Dotted grey line: second derivative of  $[S_1]$  (eq (9)). Inset: Plot of the same molar conductivity data vs. the square root of the concentration  $[S]_0^{1/2}$  in the reduced interval  $[S]_0 = 4-10$  mM. Dashed black lines are limiting straight lines. Vertical grey lines:  $cmc$  as given by the fit. Lower panel: residuals of the fit.

### Fitting functions

We provide ready to use fitting functions for Origin Data Analysis Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060, USA) as compressed zip-archive. Updated versions can be downloaded from the author's webpage.

The functions were tested with Origin 8.5 SR1.

For use in Origin the zip-archive should be decompressed in a temporal directory and the functions should be added from the *fitting function organizer* to the Origin Fitting functions. (Do not copy them directly to the Origin directory.) We propose to add them to a new category such as "APNModel".

All functions can be used for nonlinear fitting and for calculations in columns or other functions. For calculations the functions should be called as "n1f\_FunctionName(parameters)", for example: "n1f\_APNModel\_S1(cS0, cmc, r)".

The functions also serve as examples for other data analysis packages. Therefore we describe briefly the main code of each of the functions.

## Concentration Model

### APNModel\_S1

Concentration model (equation (17)) which is used by all other derived properties.

Takes  $[S]_0$  and calculates the monomeric concentration  $[S_1]$  as function of the  $cmc$  and the relative transition width  $r$ .

$$A = \frac{2 cmc}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2} r}\right)}$$

$$[S_1] = cmc - A \frac{1}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} + (s_0 - 1) \left( \operatorname{erf}\left(\frac{s_0 - 1}{\sqrt{2} r}\right) - 1 \right) \right)$$

Function Name = APNModel\_S1

Brief Description = APN Model: monomeric surfactant concentration - USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

$cS_0$  =

[Dependent Variables]

$cS_1$  =

[Fitting Parameters]

Names =  $cmc, r$

Meanings =  $cmc$ , relative transition width

[Formula]

$s_0 = cS_0 / cmc$ ;

$A = (2 * cmc) / (1 + \sqrt{2/Pi} * r * \exp(-1/(2*r*r)) + \operatorname{erf}(1/\sqrt{2}/r))$ ;

$cS_1 = cmc - (A/2) * (\sqrt{2/Pi} * r * \exp(-((s_0-1)^2/(2*r*r))) + (s_0-1) * (\operatorname{erf}((s_0-1)/(\sqrt{2}*r)) - 1))$  ;

## Derived Properties

### APNModel\_Conductivity

Conductivity of a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the conductivity  $\kappa$  as function of the  $cmc$ , the relative transition width  $r$  and the slopes  $a$  and  $b$ , and the solvent conductivity  $c = \kappa_s$ .

$$\kappa = a[S_1] + b[S_m] / n + c = a[S_1] + b[S_m] + c$$

This function needs the function APNModel\_S1.

The parameters  $cmc, a, b, c$  are actively initialized at the beginning of the fit, assuming that the data are sorted with respect to  $[S]_0$  (ascending or descending).

Function Name = APNModel\_Conductivity

Brief Description = APN Model: Electric conductivity - USC - Al-Soufi 2011 [Independent Variables]

$cS_0$  =

[Dependent Variables]

$k$  =

[Fitting Parameters]

Names =  $cmc, r, a, b, c$

Meanings =  $cmc$ , relative transition width,  $a, b, c$

[Formula]

$cS_1 = \text{nlf\_APNModel\_S1}(cS_0, cmc, r)$ ;

$cS_m = cS_0 - cS_1$ ;

$k = a * cS_1 + b * cS_m + c$ ;

**APNModel\_Conductivity\_k1**

Conductivity of a surfactant solution. Limiting Straight Line 1, below the *cmc*.

Utility Function: Takes  $[S]_0$  and calculates the limiting straight line  $\kappa_1$ , below the *cmc* of the plot of the conductivity  $\kappa$  vs.  $[S]_0$  with the parameters *cmc*, *r*, *a*, *b*, *c* determined with APNModel\_Conductivity.

$$\kappa_1 = a[S]_0 + c$$

The parameters *cmc*, *r* y *b* are not needed, but included for consistency.

Function Name = APNModel\_Conductivity\_k1

Brief Description = APN Model: Electric conductivity Line 1- USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

*cS0* =

[Dependent Variables]

*k1* =

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *a*, *b*, *c*

Meanings = *cmc*, relative curvature, *a*, *b*, *c*

[Formula]

$k1 = a * cS0 + c;$

**APNModel\_Conductivity\_k2**

Conductivity of a surfactant solution. Limiting Straight Line 1, below the *cmc*.

Utility Function: Takes  $[S]_0$  and calculates the limiting straight line  $\kappa_2$ , above the *cmc* of the plot of the conductivity  $\kappa$  vs.  $[S]_0$  with the parameters *cmc*, *r*, *a*, *b*, *c* determined with APNModel\_Conductivity.

$$\kappa_2 = a \cdot cmc + b \cdot ([S]_0 - cmc) + c$$

The parameter *r* is not needed, but included for consistency.

Function Name = APNModel\_Conductivity\_k2

Brief Description = APN Model: Electric conductivity Line 2- USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

*cS0* =

[Dependent Variables]

*k2* =

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *a*, *b*, *c*

Meanings = *cmc*, relative curvature, *a*, *b*, *c*

[Formula]

$k2 = a * cmc + b * (cS0 - cmc) + c;$

**APNModel\_MolarConductivity**

Molar conductivity of a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the molar conductivity (equivalent conductance) as function of the *cmc*, the relative transition width *r* and the slopes *a* and *b*.

$$\Lambda_m = a[S_1]/[S]_0 + b[S_m]/[S]_0$$

This function needs the function APNModel\_S1.

Function Name = APNModel\_MolarConductivity

Brief Description = APN Model: Electric molar conductivity - USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

```

cS0 =
[Dependent Variables]
k =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,a,b
Meanings = cmc,relative transition width,a,b
[Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
k=a* cS1/cS0 +b * cSm/cS0;
    
```

### APNModel\_SelfDiffusion

Self-diffusion coefficient of a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the self-diffusion coefficient  $D_{obs}$  as function of the  $cmc$ , the relative transition width  $r$  and the self-diffusion coefficients of monomeric ( $D_1$ ) and micellized ( $D_m$ ) surfactants.

$$D_{obs} = D_1 \frac{[S_1]}{[S]_0} + D_m \frac{[S_m]}{[S]_0}$$

This function needs the function APNModel\_S1.

```

Function Name = APNModel_SelfDiffusion
Brief Description = APN Model: Self Diffusion Coefficients - USC - Al-Soufi 2011
[Independent Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
Dobs =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,D1,Dm
Meanings = cmc,relative transition width,D1,Dm
[Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
Dobs = (D1* cS1+Dm *cSm)/cS0;
    
```

### APNModel\_NMRChemicalShifts

NMR Chemical Shifts of a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the NMR Chemical Shifts as function of the  $cmc$ , the relative transition width  $r$  and the chemical shifts of monomeric ( $d_1$ ) and micellized ( $d_m$ ) surfactants.

$$\delta_{obs} = \delta_1 \frac{[S_1]}{[S]_0} + \delta_m \frac{[S_m]}{[S]_0}$$

This function needs the function APNModel\_S1.

```

Function Name = APNModel_NMRChemicalShifts
Brief Description = APN Model: NMR Chemical Shifts - USC - Al-Soufi 2011 [Independent
Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
Dobs =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,d1,dm
    
```

## 3.2 Supplementary Information

```
Meanings = cmc,relative transition width,d1,dm  
[Formula]  
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);  
cSm= cS0 - cS1;  
dobs = (d1* cS1+dm *cSm)/(cS1+cSm);
```

### APNModel\_SurfaceTensionSzyszkowski

Surface Tension (Szyszkowski Equation) of a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the Surface Tension  $\gamma$  (g) using the Szyszkowski Equation as function of the  $cmc$ , the relative transition width  $r$ , the adsorption equilibrium constant  $K_{ad}$ , the surface tension of the solvent  $\gamma_0$  ( $g0$ ), and the constant  $a = RT/\omega$ , being  $\omega$  the cross sectional area of the surfactant molecule at the surface per mol.

$$\gamma = \gamma_0 - a \ln(1 + K_{ad} \cdot [S_1])$$

This function needs the function APNModel\_S1.

```
Function Name = APNModel_SurfaceTensionSzyszkowski  
Brief Description = APN Model: Surface Tension (Szyszkowski Equation) - USC - Al-Soufi 2011  
[Independent Variables]  
cS0 =  
[Dependent Variables]  
g =  
[Fitting Parameters]  
Names = cmc,r,a,Kad,g0  
Meanings = cmc,relative transition width,(R T)/omega,adsorption equilibrium constant,g0  
[Formula]  
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);  
g=g0 - a* ln(1+ Kad*cS1);
```

### Utility functions

#### APNModel\_d2S1

First derivative of the monomeric surfactant concentration (equation (12)).

Takes  $[S]_0$  and calculates the first derivative  $[S_1]'$  (gradient) of the monomeric concentration  $[S_1]$  as function of the  $cmc$  and the relative transition width  $r$ .

$$A = \frac{2 cmc}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2} r}\right)}$$
$$[S_1]' = \frac{d[S_1]}{d[S]_0} = \frac{A}{2} \left( 1 - \operatorname{erf}\left(\frac{s_0 - 1}{\sqrt{2} r}\right) \right)$$

```
Function Name = APNModel_d2S1  
Brief Description = APN Model: first derivative of monomeric surfactant concentration - USC  
- Al-Soufi 2011  
[Independent Variables]  
cS0 =  
[Dependent Variables]  
d1S1 =  
[Fitting Parameters]
```

```
Names = cmc,r
Meanings = cmc,relative transition width
[Formula]
s0 = cS0/cmc;
A=(2*cmc)/(1+sqrt(2/Pi)*r*exp(-1/(2*r*r))+erf(1/Sqrt(2)/r));
d1S1=(A/2)*(1-erf((s0-1)/(sqrt(2)*r)));
```

### APNModel\_d2S1

Second derivative of the monomeric surfactant concentration (equation (9)).

Takes  $[S]_0$  and calculates the second derivative  $[S_1]''$  (curvature) of the monomeric concentration  $[S_1]$  as function of the  $cmc$  and the relative transition width  $r$ .

$$A = \frac{2 cmc}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2} r}\right)}$$

$$[S_1]'' = \frac{d^2[S_1]}{ds_0^2} = -A \frac{1}{\sqrt{2\pi} r} e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}}$$

```
Function Name = APNModel_d2S1
Brief Description = APN Model: second derivative of monomeric surfactant concentration -
USC - Al-Soufi 2011
[Independent Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
d2S1 =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r
Meanings = cmc,relative transition width
[Formula]
s0 = cS0/cmc;
A=(2*cmc)/(1+sqrt(2/Pi)*r*exp(-1/(2*r*r))+erf(1/Sqrt(2)/r));
d2S1=-(A/(sqrt(2*Pi)*r))*exp(-(s0-1)^2/(2*r*r));
```



## Capítulo 4. Intercambio de colorante en sistemas micelares

### 4.1 Artículo original

#### **Dye Exchange in Micellar Solutions. Quantitative Analysis of Bulk and Single Molecule Fluorescence Titrations.**

Lucas Piñeiro, Sonia Freire, Jorge Bordello, Mercedes Novo, and Wajih Al-Soufi

**Soft Matter** 2013, 9, 10779-10790, DOI: [10.1039/c3sm52092g](https://doi.org/10.1039/c3sm52092g)

Post-print (final draft post-refereeing) of the article.

#### **Abstract**

A quantitative empirical model is presented, which relates the total surfactant concentration with the fluorescence intensity and the mean translational diffusion coefficient of dyes in micellar solutions, as determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). Based on this model a systematic data analysis method is defined for the precise determination of the dye binding equilibrium constant, the critical micelle concentration, the translational diffusion coefficients, and the hydrodynamic radii of dyes and micelles and related properties. The method can be used for the routine and automatic determination of the *cmc* of surfactant solutions. The model is applied to dyes with very different hydrophobicity in aqueous solutions of the non-ionic surfactant Triton X-100. As a reference the *cmc* of Triton X-100 is also determined directly from changes in the absorbance of its phenyl-ring applying a ratiometric method.

#### **Introduction**

Surfactants are of utmost importance in innumerable industrial applications, pharmaceutical formulations, biochemical protocols, and physiological functions.<sup>1, 2</sup> Surfactant aggregation and the formation of micelles above the critical micelle concentration (*cmc*) is itself a fascinating example of spontaneous self-assembly. Micelles can serve as models for specific aspects of other microheterogeneous structures such as lipid membranes<sup>3</sup>, nano-therapeutic systems<sup>4</sup> or primitive cells<sup>5</sup>. Although long known and well-studied, surfactant chemistry is still a vivid field with a huge number of contributions each year.

The study of the dynamic dye-exchange equilibrium in micellar solutions is important for several reasons. First, dyes are well accessible model compounds for other solubilizates in surfactant

## 4.1 Artículo original

solutions. The binding equilibrium constant and the rate constants of the exchange of solubilizates between the aqueous and the micellar pseudo-phases are of great interest.<sup>6-8</sup> Second, dye probe molecules are widely used for the characterization of surfactant solutions.<sup>9-11</sup> Fluorescence intensity titration is a sensitive method for the determination of the dye binding constant  $K$ , the  $cmc$  or the aggregation number  $n$ .

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS), a single molecule technique, yields the translational diffusion constant of a dye in micellar solution and the relaxation rate constant of the binding of a dye to the micelles.<sup>8, 12-18</sup> From this information one can derive the  $cmc$ ,  $n$ ,  $K$ , the hydrodynamic radii of both dye and micelle<sup>12-16</sup>, and also the dye exchange rate constants<sup>8, 17, 18</sup>, which is a valuable dynamic information not easily accessible with other techniques.

The interaction between dye and surfactant molecules depends on their electrical charge and the hydrophobicity of the dye. Strong interaction due to electrostatic attraction or strong dye hydrophobicity leads to the formation of dye-surfactant aggregates, ionic pairs and distortions in the native surfactant aggregation as probed by the dye.<sup>19-23</sup> A dye with only moderate hydrophobicity and no electrostatic interaction (neutral dye or surfactant) helps to avoid these complications, but implies that the dye will be partitioned between the aqueous and the micellar environments.

The correct analysis and interpretation of the data obtained from dye probes requires a detailed understanding of the fast dye exchange equilibrium in the micellar solution. A dye molecule constantly exchanges between the aqueous and the micellar environments. The fraction of the time a dye molecule is free or bound, or, which is equivalent, the molar fractions of free and bound dye, depend on the binding equilibrium constant and on the micelle concentration. It is generally not correct to assume that at concentrations immediately above the  $cmc$  all dye molecules are located within micelles or to treat the fractions of free dye and of dye located in micelles as two static species in FCS measurements. Therefore, when dyes are used for the characterization of a surfactant solution, for example for the determination of the  $cmc$ , it is imperative to take the dye exchange equilibrium into account.

Beside the chemical structure and the electrical charge of a surfactant, the  $cmc$  is probably the most important property used for its characterization. The  $cmc$  is rather qualitatively defined as the surfactant concentration at the onset of the formation of micelles, experimentally observed by a significant change in some measured property. The lack of a theoretical model for the concentrations of surfactant monomers and micelles in solution makes it difficult to establish a quantitative definition of the  $cmc$ -value, valid for different techniques. A very common procedure to determine the  $cmc$  from experimental data is to look for the intersection of two straight lines traced through plots of the measured property versus the surfactant concentration. This visual data analysis method is highly subjective and can lead to very different  $cmc$  values depending on the type of representation, the quality of the data and the chosen interval around the  $cmc$ .<sup>24</sup> As alternative, we recently presented a compact empirical model for the concentrations of monomeric and micellised surfactants in solution, which establishes a well-defined analytical definition of the  $cmc$ , independent from the technique. We applied it successfully to experimental data from electrical conductivity, surface tension, NMR chemical shift and to self-diffusion coefficient data of different surfactants.<sup>25</sup> It

allowed us to estimate the micellar concentration also around the *cmc* which are so far not easily accessible with other models. In this contribution we will extend this concentration model to the quantitative analysis of the dye exchange equilibrium in micellar solutions, which is otherwise difficult to achieve, especially near the *cmc*.

One objective of this contribution is to discuss the influence of the dye exchange equilibrium on the *cmc* determined from fluorescence titrations and to propose a systematic data analysis method that takes the binding equilibrium of the dye into account. We apply the method to dyes with very different hydrophobicity and analyse the fluorescence emission and the translational diffusion coefficient determined by FCS. The proposed method can be easily used for routine and automatic determination of the *cmc* and related properties.

This paper deals with a typical non-ionic surfactant, Triton X-100 (TX100), which has been widely studied. TX100 is a good example for the inconsistency in the values reported for micellar properties. For example, for the *cmc* at 25°C values between 0.16 mM<sup>26</sup>, and 0.6 mM<sup>27</sup> can be found, depending on the technique and the type of data analysis used. In forthcoming contributions we will consider the electrostatic interactions between charged dyes and ionic surfactants and the special case of Pyrene as probe.

## Theory

In order to describe quantitatively the concentrations of the species involved in a dye-surfactant system three processes have to be analysed: (1) the *formation of micelles* from surfactant molecules, (2) the *partition* of the dye molecules between the aqueous solution and the micellar pseudo-phase, and (3) the *distribution* of the fraction of bound dye molecules among the micelles.

### Monomer and Micellar Concentrations in Surfactant Solutions

The formation of micelles above the critical surfactant concentration (*cmc*) is a spontaneous and highly dynamic process.<sup>7</sup> There is no established and practical quantitative theory for the concentrations of monomeric and micellised surfactants in solution at a given total surfactant concentration. We therefore use an empirical model for these concentrations near the *cmc*.<sup>25</sup>

Starting point is the “Phillips-condition” which defines the *cmc* as the total surfactant concentration  $[S]_0$  at which the change in the gradient of the monomer concentration  $[S_1]$  with respect to  $[S]_0$  is maximum, that is where the third derivative of  $[S_1]$  is zero:<sup>28</sup>

$$\left( \frac{d^3 [S_1]}{d[S]_0^3} \right)_{[S]_0=cmc} = 0 \quad (1)$$

Following García-Mateos<sup>29</sup> we then describe the second derivative of  $[S_1]$  with respect to  $[S]_0$  by a Gaussian function centred at the *cmc*, with amplitude  $A$  and width  $\sigma$ .

$$\frac{d^2 [S_1]}{d[S]_0^2} = \frac{-A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{([S]_0 - cmc)^2}{2\sigma^2}} \quad (2)$$

## 4.1 Artículo original

The standard deviation  $\sigma$  (half width at  $e^{-1/2}$ ) is a measure of the width of the micellar transition region around the *cmc*. In this interval the concentration of surfactant monomers is still not saturated, but already first micelles are formed (see Fig. 2 below). The smaller  $\sigma$  is the sharper is the transition between the two linear regions below and above the *cmc*.

In order to facilitate the comparison of micellar transition widths  $\sigma$  of surfactants with different *cmc* values, we define the *relative micellar transition width*  $r$ :

$$r = \sigma / cmc \quad (3)$$

After double integration of equation (9) we obtain eq. (4) as an empirical model for the monomer concentration  $[S_1]$  as function of the total surfactant concentration  $[S]_0$ .<sup>25</sup>

$$[S_1] = cmc \left[ 1 - \frac{A}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} + (s_0 - 1) \left( \operatorname{erf} \left( \frac{s_0 - 1}{\sqrt{2}r} \right) - 1 \right) \right) \right] \quad (4)$$

with the abbreviation  $s_0 = [S]_0 / cmc$  and the amplitude  $A$ :

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf} \left( \frac{1}{\sqrt{2}r} \right)} \quad (5)$$

The concentration of aggregated (micellised) surfactants,  $[S_m]$ , is the difference between the total surfactant concentration and that of monomeric surfactants:

$$[S_m] = [S]_0 - [S_1] \quad (6)$$

The concentration of micelles,  $[M]$ , depends on the mean aggregation number,  $n$ :

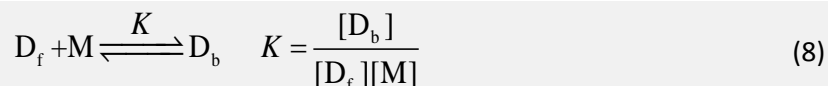
$$[M] = [S_m] / n \quad (7)$$

The model assumes a constant aggregation number  $n$ , also at the onset of micelle formation around the *cmc*. This is in line with simulations<sup>30</sup> and thermodynamic models<sup>31</sup> and proved to describe well the behaviour of several surfactants.<sup>25</sup>

Equations (4)-(6) form an excellent concentration model for the description of the properties of a surfactant solution around the *cmc*.<sup>25</sup> This model can be easily plugged into equations that describe derived properties obtained with different techniques, such as eqs. (9), (26), (16), and (23). The resulting models can be easily implemented as fit-functions in commercial analysis software. Functions for OriginPro (OriginLab Corporation, USA) are given in the Electronic Supplementary Information (ESI) and can be downloaded from the webpage of the authors.

### Binding equilibrium

The exchange of dye molecules between bulk water and micelles is a very fast dynamic process which can be usually well described as a 1:1 binding equilibrium applying the mass action model as given in eq. (8), with an apparent (macroscopic) binding equilibrium constant  $K$ .<sup>6, 7, 23</sup>



The molar fractions of free ( $D_f$ ) and bound dye ( $D_b$ ) at total dye concentration  $[D]_0 = [D_f] + [D_b]$  are then:

$$X_f = \frac{[D_f]}{[D]_0} = \frac{1}{1 + K \cdot [M]}, \quad X_b = \frac{[D_b]}{[D]_0} = \frac{K \cdot [M]}{1 + K \cdot [M]} \quad (9)$$

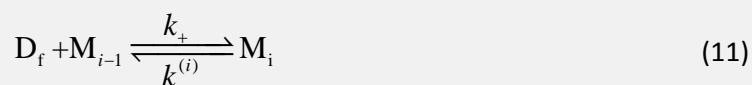
The mean number of dye molecules per micelle (mean occupancy)  $\bar{i}$  depends on the concentrations of bound dye and micelles:

$$\bar{i} = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} i \cdot [M_i]}{\sum_{i=0}^{\infty} [M_i]} = \frac{[D_b]}{[M]} = [D]_0 \cdot K \cdot X_f \equiv \bar{i}_0 \cdot X_f \quad (10)$$

The mean occupancy  $\bar{i}$  decays with increasing surfactant concentration proportional to the fraction of free dye  $X_f$ . At very low surfactant concentrations the initial mean occupancy is given by  $\bar{i}_0 = [D]_0 \cdot K$ , which is constant (see eq. (10)), as both the concentration of bound dye  $[D_b]$  and the micelle concentration  $[M]$  tend to zero. The mean occupancy  $\bar{i}$  is always smaller than this initial value  $\bar{i} \leq \bar{i}_0$ . Depending on  $[D]_0$  and  $K$ , the mean occupancy of the micelles can be high near the *cmc*.

In the equilibrium expression of eq. (8) it is implicitly assumed that the micelle concentration  $[M]$  corresponds always to the *total* micelle concentration. The micelles are not “consumed” in the equilibrium because each micelle can be occupied by more than one dye molecule. We will briefly analyse how this higher occupation affects the experimentally observed equilibrium constant  $K$ .

Following Kalyanasundaram<sup>32</sup> we analyse the dye exchange equilibrium between the free dye  $D_f$  and the dye bound to a micelle  $M_i$  with mean occupancy  $i$ , described by the equilibrium constant  $K_i = k_+ / k_-^{(i)}$  with the association (entry) rate constant  $k_+$  of dye into the micelle and the dissociation (exit) rate constant  $k_-^{(i)}$  of *any* of the  $i$  dye molecules in  $M_i$ :



Now we assume that both the association rate constant  $k_+$  as well as the dissociation rate constant  $k_-$  of *each* of the  $i$  dye molecules in  $M_i$  are independent from the occupation number  $i$ . This is reasonable because the association process is typically diffusion controlled<sup>7, 8, 17, 18</sup> and the dissociation depends mainly on specific interactions between the dye and the micelle and not on the presence of other dye molecules. Then the dissociation rate constant  $k_-^{(i)}$  of any one of the  $i$  dye molecules in a micelle  $M_i$  is  $i$  times that of a dye in a single occupied micelle:  $k_-^{(i)} = i k_-$ :

$$K_i = \frac{[M_i]}{[M_{i-1}][D_f]} = \frac{k_+}{k_-^{(i)}} = \frac{k_+}{i \cdot k_-} \quad (12)$$

With eq. (12) we obtain for the concentration of dye bound to micelles  $[D_b]$ :

$$[D_b] = \sum_{i=1}^{\infty} i \cdot [M_i] = \frac{k_+}{k_-} [D_f] \underbrace{\sum_{i=1}^{\infty} [M_{i-1}]}_{= \sum_{i=0}^{\infty} [M_i]} = \frac{k_+}{k_-} [D_f] [M] \quad (13)$$

Comparing with eq. (8) we see finally that the observed apparent equilibrium constant  $K = k_+/k_-$  is that of the 1:1 equilibrium of the addition of a dye molecule to an unoccupied micelle, and that  $K$  is independent on the actual occupation number:

$$\frac{k_+}{k_-} = \frac{[D_b]}{[D_f][M]} = K \quad (14)$$

The fact that micelles can be occupied  $i$  times is just compensated by the lower effective equilibrium constant  $K_i = K/i$  in eq. (11). Therefore equations (8) and (9) are also valid at high occupation numbers near the *cmc*, as long as the interaction between dye molecules inside the micelle can be neglected. In this case  $K$  is independent of  $[S]$ ,  $[D]$  and  $i$ .

The *distribution* of bound dye molecules among the micelles is well described by a Poisson distribution.<sup>32, 33</sup> The concentrations of micelles which are empty,  $[M_0]$ , occupied once  $[M_1]$ , or more than once,  $[M_{>1}]$ , are given by the respective probabilities:

$$P(i) = \frac{[M_i]}{[M]} = \frac{\bar{i}^i e^{-\bar{i}}}{i!}$$

$$[M_0] = [M] \cdot P(0) = [M] e^{-\bar{i}}, \quad [M_1] = [M] \cdot P(1) = [M] \bar{i} e^{-\bar{i}} \quad (15)$$

$$[M_{>1}] = [M] - [M_0] - [M_1] = [M] (1 - (1 + \bar{i}) e^{-\bar{i}})$$

## Spectral Properties

### Dye Fluorescence Spectra

The fluorescence emission intensity of the dye in the binding equilibrium of eqs. (8) and (9) is the sum of the emissions of free and bound dye as given in eq. (16), where  $F_f(\lambda)$  and  $F_b(\lambda)$  are the respective limiting fluorescence intensities.

$$F(\lambda, [S]_0) = F_f(\lambda) \cdot X_f + F_b(\lambda) \cdot X_b = \frac{F_f(\lambda)}{1 + K \cdot [M]} + \frac{F_b(\lambda) \cdot K \cdot [M]}{1 + K \cdot [M]} \quad (16)$$

### FCS

FCS analyses spontaneous fluorescence intensity fluctuations that may be caused by various processes at the molecular level.<sup>17, 34, 35</sup>

The correlation function for intensity fluctuations due to the translational diffusion  $G_D$  of a fluorescent species across the sample volume of a confocal microscope with radial and axial  $1/e^2$  radii  $w_{xy}$  and  $w_z$ , respectively, is given by:

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \left( \frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (17)$$

$N$  is the mean number of fluorescent molecules within the sample volume and  $\tau_D$  is the translational diffusion time (residence time) of the molecules across the sample volume. From  $\tau_D$  and the radius  $w_{xy}$  the translational diffusion coefficient  $D$  can be calculated:

$$D = \frac{w_{xy}^2}{4\tau_D} \quad (18)$$

The population of the dark triplet state of the dye leads to an additional exponential term in the correlation curve with amplitude  $A_T$  and a time constant  $\tau_T$  given by the triplet lifetime of the fluorophore:

$$G_T(\tau) = 1 + A_T e^{-\tau/\tau_T} \quad (19)$$

The correlation function of a dye in a micellar solution has been described previously.<sup>8, 17, 18, 36</sup> Under conditions where the micelle concentration  $[M]$  is much higher than that of the dye, the dye exchange (eq. (11)) is pseudo-first-order with the relaxation time  $\tau_R$  of the binding process given by:

$$\tau_R = (k_+[M] + k_-)^{-1} \quad (20)$$

Under the assumption that the relaxation time  $\tau_R$  of the binding equilibrium is much shorter than the typical diffusion times of free,  $\tau_{Df}$ , and bound dye,  $\tau_{Db}$ , (fast dye exchange,  $\tau_R \ll \tau_{Df}, \tau_{Db}$ ), the following correlation function for diffusion, triplet dynamics and binding dynamics is obtained:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\bar{\tau}_D} \right)^{-1} \left( 1 + \left( \frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\bar{\tau}_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \cdot G_T \cdot \left( 1 + A_R e^{-\tau/\tau_R} \right) \quad (21)$$

where the diffusion term is now defined by a *mean* diffusion time  $\bar{\tau}_D$  and an amplitude that depends on the mean number  $N$  of dye molecules in the sample volume (independent of their state or brightness). The relaxation term has relative amplitude  $A_R$  and correlation time  $\tau_R$ .

It is important to realize that the two binding states of the dye (free and bound) will not be resolved by FCS as two distinct species, but as a single one with the mean diffusion coefficient  $\bar{D}$ , given by the individual diffusion coefficients  $D_f$  and  $D_b$ , and the molar fractions of free and bound

#### 4.1 Artículo original

dye (eq. (9)).  $\bar{D}$  in turn can be expressed as function of  $[M]$ ,  $K$ , and the limiting diffusion times of free and bound dye  $\tau_{Df}$  and  $\tau_{Db}$ , using eqs. (9) and (18):

$$\bar{D} = X_f D_f + X_b D_b = \frac{1}{1 + K[M]} \frac{w_{xy}^2}{4\tau_{Df}} + \frac{K[M]}{1 + K[M]} \frac{w_{xy}^2}{4\tau_{Db}} \quad (22)$$

This finally leads to the mean diffusion time  $\bar{\tau}_D$  in eq. (21):

$$\bar{\tau}_D = \frac{w_{xy}^2}{4\bar{D}} = \frac{\tau_{Df} \tau_{Db} (1 + K[M])}{\tau_{Db} + \tau_{Df} \cdot K[M]} = \frac{\tau_{Df} (1 + K[M])}{1 + \frac{\tau_{Df}}{\tau_{Db}} K[M]} \quad (23)$$

It is known that the association rate constant  $k_+$  of moderately hydrophobic dyes to micelles is diffusion controlled  $k_+ \approx k_d \approx 10^9 M^{-1} s^{-1}$ .<sup>7, 18</sup> Using eq. (20), this allows one to give an estimate for the upper (slower) limit of the relaxation time  $\tau_R$  for a dye of binding equilibrium constant  $K$ :

$$\tau_R \leq \tau_R ([M] \rightarrow 0) = \frac{1}{k_-} = \frac{K}{k_+} \approx \frac{K}{k_d} \approx \frac{K}{10^9 M^{-1} s^{-1}} \quad (24)$$

#### Ratiometric analysis of surfactant absorbance spectra

Some surfactants show changes in their spectral properties with the micellisation. The typically small changes in absorbance are best detected ratiometrically. The absorbance ( $A$ ) of a surfactant in solution (without dye) at a given wavelength ( $\lambda$ ) and total surfactant concentration ( $[S]_0$ ) is the sum of the absorbances of monomeric and micellised surfactant molecules, given by the respective molar absorption coefficients  $\varepsilon_1(\lambda)$  and  $\varepsilon_m(\lambda)$ , the concentrations  $[S_1]$  and  $[S_m]$ , and the absorption path length  $\ell$ :

$$A(\lambda, [S]_0) = [S_1] \cdot \varepsilon_1(\lambda) \cdot \ell + [S_m] \cdot \varepsilon_m(\lambda) \cdot \ell \quad (25)$$

The absorbance ratio at two wavelengths  $\lambda_a$  and  $\lambda_b$  is then:

$$q_A([S]_0) = \frac{A(\lambda_b)}{A(\lambda_a)} = \frac{[S_1] \cdot \varepsilon_1(\lambda_b) + [S_m] \cdot \varepsilon_m(\lambda_b)}{[S_1] \cdot \varepsilon_1(\lambda_a) + [S_m] \cdot \varepsilon_m(\lambda_a)} = \frac{[S_1] \cdot q_1 + [S_m] \cdot q_m \cdot q_a}{[S_1] + [S_m] \cdot q_a} \quad (26)$$

with absorbance ratios  $q_1$  and  $q_m$  of each species at the two wavelengths, and ratio  $q_a$  of the two species at wavelength  $\lambda_a$ :

$$q_1 = \frac{\varepsilon_1(\lambda_b)}{\varepsilon_1(\lambda_a)}, \quad q_m = \frac{\varepsilon_m(\lambda_b)}{\varepsilon_m(\lambda_a)}, \quad q_a = \frac{\varepsilon_m(\lambda_a)}{\varepsilon_1(\lambda_a)} \quad (27)$$

Ratio  $q_1 = q_A([S]_0 \rightarrow 0)$  can be estimated from the absorbance well below the *cmc*. Ratio  $q_m = q_A([S]_0 \rightarrow \infty)$  is the limit at high concentration. Concentrations  $[S_1]$  and  $[S_m]$  can be determined from eqs. (4)-(6).

## Results and Discussion

### Direct TX100 UV-Absorbance

In order to validate the model we use for the concentrations of monomeric and micellised surfactant (eq. (4)-(6)) we study first a property of the surfactant TX100 itself, without dye and without the need to consider the dye exchange equilibrium. We tested the model before successfully with several ionic surfactants analysing their electrical conductivity,<sup>25</sup> but the neutral TX100 requires a different approach. Both the UV-absorbance and the fluorescence of the phenyl ring of TX100 show significant changes around the *cmc*.<sup>37</sup> However, the fluorescence of TX100 is strongly distorted by reabsorption at concentrations at and above the *cmc*, so that its analysis is questionable.<sup>38-40</sup> We use instead the UV-absorbance of TX100, which shows a small but significant bathochromic (red) shift above the *cmc* accompanied by the appearance of a pronounced shoulder at the red edge around 285nm (grey spectra in Fig. 1). The Lambert-Beer plot of the absorbance at 285nm versus concentration (black symbols in Fig. 1) shows a significant change in its slope around the *cmc*, which is not observed at 270nm. This change is much better appreciated in the plot of the *absorbance ratio* at these wavelengths, which shows a strong increase above the *cmc* (Fig. 2). This *ratimetric* analysis is much less affected by the uncertainties in the TX100 concentration and in the experimental absorbance than the absorbance itself or especially the molar absorbance.

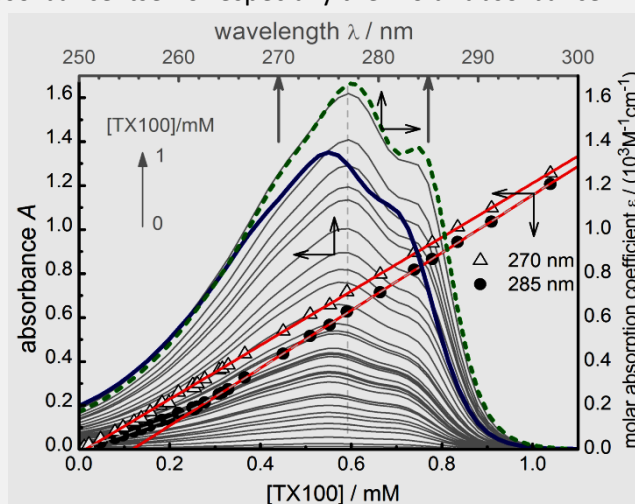


Figure 1 Absorbance of aqueous solutions of TX100. Thin grey curves: absorbance spectra with  $[TX100]=0-1\text{mM}$ . Thick curves: pure spectra of the molar absorption coefficients  $\epsilon$  of monomeric (continuous blue curve) and micellised (dashed green curve) TX100 as obtained from PCGA analysis of the absorbance spectra.<sup>41, 42</sup> Symbols: absorbance vs.  $[TX100]$  at 270 nm (open triangles) and 285 nm (closed circles) and linear fits above 0.3 mM (red straight lines). Small deviations in the baseline of the absorbance spectra due to scattered light at higher TX100 concentrations were corrected.

The fit of the absorbance ratio with eqs. (26), (4)-(6) is excellent (Fig. 2), validating the concentration model, especially also around the *cmc*. The value of the ratio  $q_1$  coincides with the one obtained from a linear fit of the absorbances below the *cmc*. The value of the  $cmc = 0.270 \pm 0.002 \text{ mM}$  matches well the literature value of  $0.26 \text{ mM}$ .<sup>32</sup> The relative transition width  $r$  of about 10% is very

similar to that obtained from conductivity measurements for SDS.<sup>25</sup> The similarity of the relative transition width between SDS and TX100 is striking, given the big differences in their *cmc*, aggregation number and charge (SDS: *cmc* = 8.1mM,  $n = 62$ ).<sup>25</sup>

The concentration model of eqs (26), (4)-(6) makes it also possible to apply more detailed data analysis methods, such as principal component analysis (PCA) and global analysis (GA) of the full absorbance (or emission) spectra<sup>41, 42</sup>, which give the pure spectra of the molar absorption coefficients  $\epsilon$  of monomeric and micellised of TX100 (Thick lines in Fig. 1).

### Fluorescence Titrations

We analyse first the properties of moderately hydrophobic dyes, such as ANS and the coumarines C153 and C152 separately. Then we compare the data of several dyes of very different hydrophobicity and discuss the problems in the use of graphical methods for the determination of the *cmc* and present how to improve the analysis.

#### ANS in TX100 micelles

The dye 2-anilinonaphthalene-6-sulfonic acid (ANS) and its analogues are well known protein-labelling probes<sup>43</sup> which are nearly nonfluorescent in water but highly fluorescent in nonpolar environments. The high sensitivity of this type of dyes to the solvent polarity and their moderate hydrophobicity make them a good choice for the determination of the *cmc* of micellar solutions.<sup>44-52</sup>

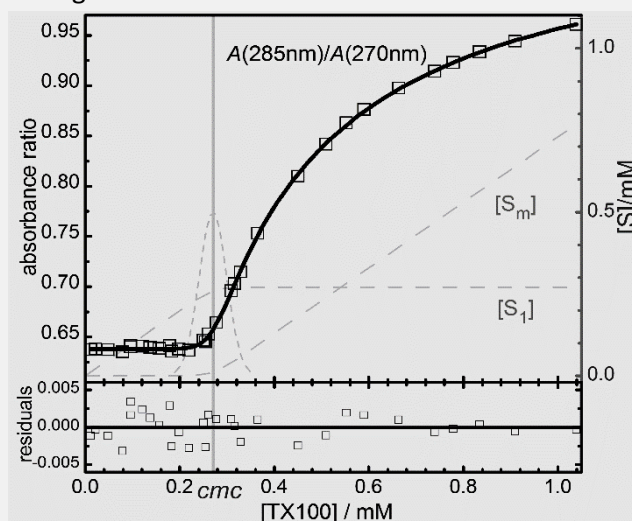


Figure 2 Absorbance ratio (squares, left scale)  $A(285\text{nm})/A(270\text{nm})$  of TX100 (data of Fig. 1) and nonlinear fit (thick line) of equations (26), (4) and (5) with  $cmc=0.270\pm 0.002$  mM $\ddagger$ ,  $r=0.108\pm 0.008$ ,  $q_1=0.6385$ ,  $q_m=1.076$  and  $q_a=0.99$ . The dashed lines (right scale) are the calculated concentrations of surfactant monomers ( $[S_1]$ ) and of surfactants in micelles ( $[S_m]$ ) (eqs.(4)-(5)), and the relative second derivative of  $[S_1]$  (eq.(9)) in arbitrary units with transition width  $\sigma = r \cdot cmc$ . The vertical line at  $[S]_0=0.27$  mM indicates the *cmc*.

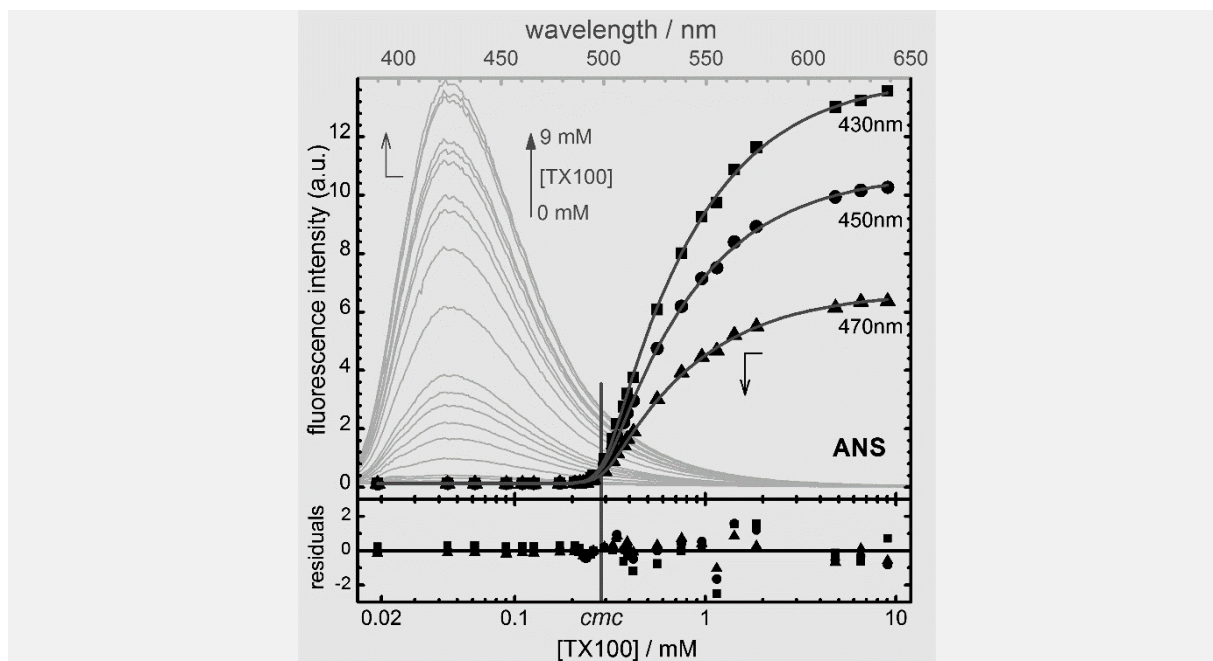


Figure 3 Fluorescence of ANS in aqueous TX100 solutions with  $[TX100]=0-9$  mM. Thin grey curves and upper wavelength scale: fluorescence emission spectra. Black symbols and lower concentration scale: Fluorescence intensities vs.  $[TX100]$ . Thick grey curves: global fit of eqs. (16), (4)-(6) at three wavelengths with  $cmc=0.288\pm0.005$  mM,  $r=0.15\pm0.01$ ,  $K = (380\pm20) 10^3 \text{ M}^{-1}$ . ( $\lambda_{exc}=350\text{nm}$ ,  $[ANS]_0=2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ).

Fig. 3 shows the emission spectra obtained in titrations of ANS with TX100 (thin grey curves). In pure water and below the  $cmc$  ANS shows only a very weak emission around 425 nm. Above the  $cmc$  the emission increases strongly and stabilizes only at high TX100 concentrations (see intensity-concentration profiles in Fig. 3). The plot of the fluorescence emission intensity at one wavelength versus the TX100 concentration is curved above the  $cmc$ , with no clearly linear region, neither in linear nor in logarithmic concentration scales.

The global fit of the concentration model of eqs. (4)-(6) together with eq. (16) (fit-functions given in the ESI) to the intensity-concentration profiles at three wavelengths is excellent (see Fig. 3). The nonlinear fit-parameters  $K$ ,  $cmc$ , and  $r$ , are common to all wavelength, whereas the linear parameters  $F_f(\lambda)$  and  $F_b(\lambda)$  are fitted individually. The results are given in Fig. 3. The value  $cmc=0.288$  mM coincides with that determined above from the absorbance of TX100, taking into account the accuracy of about 1% in the concentration of the different stock solutions of TX100.‡ The relative transition width  $r = 0.15\pm0.01$  is higher than that of the absorbance ratio, but still within the  $3\sigma$  interval of their precision.

It is instructive to analyse briefly the concentration dependence of some of the properties of the surfactant solution in this titration, as shown in Fig. 4. The high aggregation number  $n=143$  of TX100 leads to low micellar concentrations as compared to that of total surfactant. Therefore, the fraction of bound ANS  $X_b$  (grey dotted line in Fig. 4, panel a) increases only slowly with increasing

surfactant concentration  $[S]_0$ , in spite of the relatively high binding constant  $K = 3.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Up to the turning point with  $X_f = X_b = 0.5$  at about  $[S]_0^{(50\%)} = 0.66 \text{ mM}$  ( $[M]^{(50\%)} = K^{-1}$  or  $[S]_0^{(50\%)} \approx cmc + n/K$ ) the fraction of free dye is still higher than that of bound one. The mean occupancy of micelles with ANS molecules,  $\bar{i} = 0.8 X_f$  (grey curve in Fig. 4, panel b), is always lower than one, also near the *cmc*.

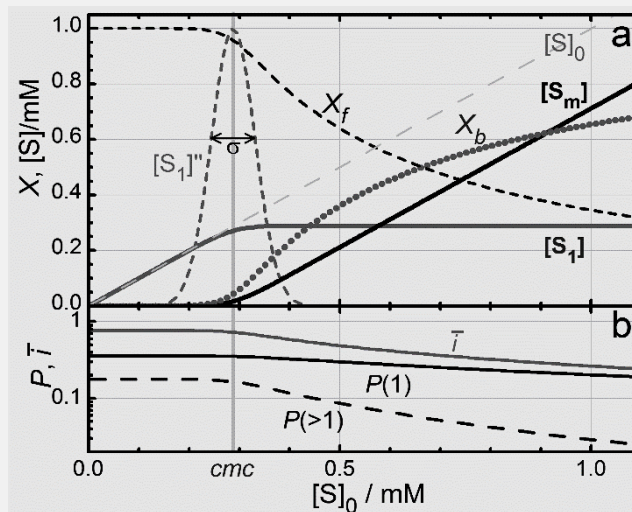


Figure 4 Calculated properties of ANS/TX100 solutions versus the total surfactant concentration ( $[S]_0$ ), with  $K = 3.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ,  $[ANS]_0 = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , and  $n = 143$ . Panel a: fractions of free ( $X_f$ ), and bound ( $X_b$ ) dye (eq. (9)), concentrations of surfactant monomers ( $[S_1]$ ) and of surfactants in micelles ( $[S_m]$ ) (eqs.(4)-(5)), and relative second derivative of  $[S_1]$  (eq.(9)) in arbitrary units. The double arrow corresponds to the transition width  $\sigma = r \cdot cmc$  (eq. (10)). The vertical line at  $[S_0] = 0.288 \text{ mM}$  indicates the *cmc*. The thin dashed line represents  $[S_0]$  itself. Panel b: Occupancy probabilities for one dye per micelle ( $P(1)$ , black solid line) and for more than one ( $P(>1)$ , black dashed line), as given by eq.(15), and mean occupancy number  $\bar{i}$  (grey solid line).

### C152 and C153 in TX100 micelles

The neutral laser dyes coumarin 152 (C152) and coumarin 153 (C153) are typical fluorescent probes sensitive to the polarity and viscosity of their local environment.<sup>53, 54</sup> These 7-aminocoumarines have relatively low fluorescence quantum yields in aqueous solution and poor photostability.<sup>55</sup> However, being neutral dyes with relatively high Stokes shifts and a strong increase in fluorescence emission in nonpolar or restrictive microenvironments, C152 and C153 are very interesting probes for the study of heterogeneous systems such as micelles.<sup>18, 53</sup>

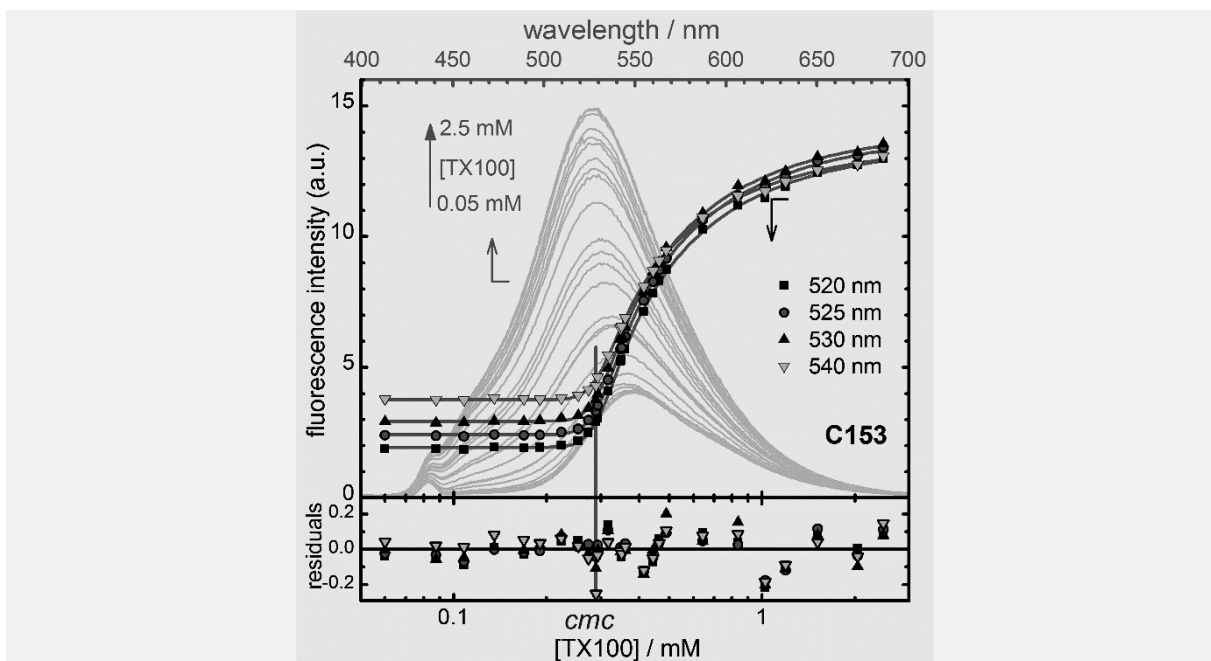


Figure 5 Fluorescence of C153 in aqueous TX100 solutions with  $[TX100]=0.05\text{-}2.5\text{ mM}$ . Thin grey curves and upper wavelength scale: fluorescence emission spectra. Black symbols and lower concentration scale: Fluorescence intensities vs.  $[TX100]$ . Thick curves: global fit of eqs. (16), (4)-(6) at four wavelength with  $cmc = 0.290 \pm 0.005\text{ mM}$ ,  $r = 0.121 \pm 0.005$ ,  $K = (970 \pm 20) 10^3\text{ M}^{-1}$ . ( $\lambda_{exc}=380\text{nm}$ ,  $[C153]_0 < 5 \cdot 10^{-8}\text{ M}$ , Raman peak around  $440\text{nm}$ )

Fig. 5 shows the fluorescence emission spectra obtained from titrations of C153 with TX100 (grey curves). The corresponding data for C152 can be found in the ESI. In pure water and below the  $cmc$  both C153 and C152 show only a very weak emission around  $540\text{ nm}$ . Above the  $cmc$  the emission increases strongly with a significant blue-shift (see intensity-concentration profiles in Fig. 5 and the ESI). The increase is more pronounced for C153 than for C152.

Equations (16) and (4)-(6) fit the concentration profiles very well (Fig. 5 and ESI), also around the  $cmc$ . The C153 data fit with  $cmc=0.290 \pm 0.005\text{ mM}$ ,  $r=0.121 \pm 0.005$  and  $K = (970 \pm 20) 10^3\text{ M}^{-1}$ , and that of C152 with  $cmc=0.22 \pm 0.05\text{ mM}$ ,  $r=0.18 \pm 0.13$  and  $K = (170 \pm 10) 10^3\text{ M}^{-1}$ . The  $cmc$  of C153 coincides well with the values determined before. The low binding equilibrium constant  $K$  of C152 makes this dye much less sensitive to the formation of micelles than ANS or C153 and leads to high uncertainties in the determination of the  $cmc$  and  $r$ .

### Comparison of several dyes in exchange with TX100

Fig. 6 shows the *normalized* fluorescence emission intensity of dyes of different hydrophobicity as function of TX100 concentration in a logarithmic concentration scale (see the linear concentration scale in the ESI). The highly hydrophobic dyes Perylene, Pyrene and C153 change their emission intensity already below the  $cmc$  of TX100 and reach saturation within the studied concentration range. The less hydrophobic dyes ANS, C152, coumarin 460 (C460) and rhodamine 123 (R123) show practically no change below the  $cmc$  and reach saturation only at high TX100 concentration. Dyes of

very low hydrophobicity such as Pyronine Y need very high TX100 concentrations to show a significant change in emission intensity. All curves can be fitted globally with equation (16) and the surfactant concentration model (4)-(6) with fixed common values of  $cmc=0.27$  and  $r=0.15$ . The results for the binding constants coincide well with those from fits of the individual titration series. The binding constants of the dyes span over several orders of magnitude, from  $K=4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  in the case of the weakly binding Pyronine Y up to  $K=1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  of the strongly hydrophobic Perylene (see Table 1). The behaviour of these dyes with very different hydrophobicity can be described with the same model for the binding equilibrium and the surfactant concentrations, with a common  $cmc$  of the surfactant and without the need to assume that pre-micellar aggregates are formed before the  $cmc$ , as proposed by other authors.<sup>56-58</sup>

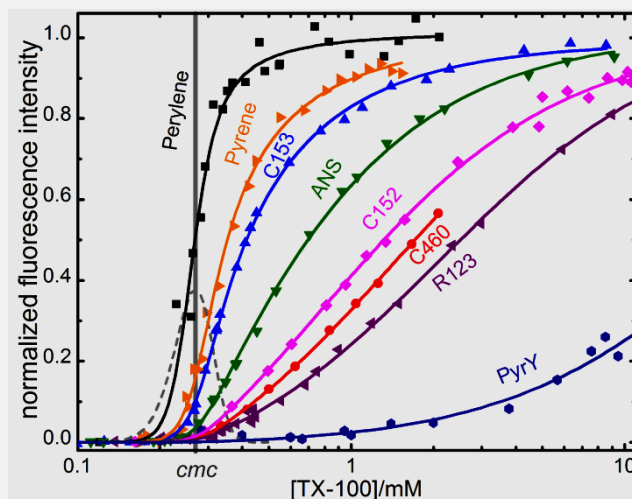


Figure 6 Normalized fluorescence emission intensity of several dyes in aqueous solutions of TX100 as function of surfactant concentration,  $F_{norm} = (F - F_f) / (F_b - F_f)$ . Continuous curves are results of a global fit of eqs. (16), (4)-(6) with fixed values of  $cmc=0.27$  mM and  $r=0.15$ . The excitation and emission wavelength and the ratios  $F_b / F_f$  are given in Table 1. Note the logarithmic concentration scale. This figure with a linear concentration scale is given in the ESI. The dashed grey line is the relative second derivative of  $[S_1]$  (eq.(9)) in arbitrary units with transition width  $\sigma = r \cdot cmc$ .

The very high affinities of dyes such as perylene or pyrene to TX100 micelles produce high initial mean occupation numbers  $\bar{i}_0 = [D]_0 \cdot K$  (eq. (10)) of the micelles near the  $cmc$  (see Table 1). Interactions between dye molecules bound to the same micelle can cause self-quenching of the dye or the formation of dimers or excimers and can distort the observed fluorescence titration curve. In order to reduce these effects we kept the mean occupation number below one using low dye concentrations in the experiments. However even at the lowest pyrene concentration, we observed quenching of the pyrene fluorescence near the  $cmc$  due to excimer formation.<sup>32, 43</sup> We did not take this effect into account here but indicate for pyrene an apparent binding constant  $K$  in Table 1. A more detailed analysis of the rather complex behaviour of the pyrene fluorescence in surfactant solutions will be subject of a forthcoming contribution.

**Table 1** Binding equilibrium constants  $K$  of dyes in aqueous solutions of TX100 and critical micelle concentration  $cmc$  of TX100 determined from fluorescence titrations of the dyes.

Dye	$K/10^3 \text{ M}^{-1}$ <sup>‡</sup>	$cmc$ <sup>b</sup> / mM	$\lambda_{ex}, \lambda_{em}$ <sup>c</sup> / nm	$F_b/F_f$ <sup>d</sup>	$[D]_0/M$	$\bar{i}_0$ <sup>f</sup>
Perylene	$(10 \pm 2) 10^3$ <sup>a</sup>	0.25	405, 444	8	-	-
Pyrene	$(2 \pm 1) 10^3$ <sup>a</sup>	0.26	319, 383	5	$2 \cdot 10^{-7}$	0.4
C153	$970 \pm 20$ <sup>b</sup>	0.290	380, 525	6	$< 5 \cdot 10^{-8}$	$< 0.05$
ANS	$380 \pm 20$ <sup>b</sup>	0.288	350, 420	125	$2 \cdot 10^{-6}$	0.8
C152 <sup>g</sup>	$140 \pm 15$ <sup>b</sup>	0.22	405, 510	4	$< 5 \cdot 10^{-7}$	$< 0.07$
C460 <sup>g</sup>	$82 \pm 5$ <sup>b</sup>	0.25	380, 450	12	$3 \cdot 10^{-7}$	0.03
R123 <sup>g</sup>	$60 \pm 5$ <sup>b</sup>	0.24	488, 525	0.3	$2 \cdot 10^{-8}$	0.001
Pyry <sup>e</sup>	$4 \pm 1$ <sup>a</sup>	-	515, 560	0.5	$1 \cdot 10^{-6}$	0.004

<sup>a</sup> Estimated from the global fit shown in Fig. 6.

<sup>b</sup> Determined from fits at several wavelength of titrations of individual dyes as shown for ANS (Fig. 3) and C153 (Fig. 5) and in the ESI.

<sup>c</sup> Excitation and emission wavelength used in data of Fig. 6.

<sup>d</sup> Ratio of the limiting fluorescence emission intensities  $F_b/F_f$  of free and bound dye at  $\lambda_{em}$ .

<sup>e</sup> Determined from a concentration range extended up to  $[TX100] = 50 \text{ mM}$ .

<sup>f</sup> Initial mean occupation number  $\bar{i}_0 = [D]_0 \cdot K$  (eq. (10))

<sup>g</sup> See figures in ESI.

### Determination of the $cmc$

It is common practice to determine the  $cmc$  of a surfactant solution from the dye fluorescence with graphical methods.<sup>10, 24</sup> Oversimplifying, it is in general assumed that the dye is sufficiently hydrophobic so that, once micelles are formed, all dye molecules are immediately incorporated into the micelles, with a negligible concentration of free dye in the aqueous phase. The  $cmc$  is then identified as the concentration at the onset of a change in absorbance or emission intensity in a titration series. Plots of the fluorescence intensity (or dye absorbance) at a given wavelength versus the logarithm of the concentration typically show an approximately linear region around their inflection point (see Fig. 6). The intersection of a straight line drawn through this region with the horizontal line defined by the points well below the  $cmc$  is then taken as the  $cmc$ . However, the selection of the points for the “linear” region is highly subjective, even in the case that the linear regression and the intersection are calculated analytically. The value of the  $cmc$  determined with this graphical method from fluorescence intensity titrations dye was found to deviate systematically from those determined from direct properties, such as surface tension or conductivity of the surfactants.<sup>10, 59</sup> Fig. 7 (a) shows the same titration data as Fig. 6, but overlaid with linear regressions of the data in the approximately linear region of each of the curves. The straight lines and the intersections with the horizontal line (black dots) were determined analytically. The  $cmc$  values determined by this method depend strongly on the affinity of the dye to the micelles, with values between 0.2 mM (Perylene) and 0.4 mM (R123). In Fig. 7 (b) we compare the dependence of the  $cmc$ -values determined with the two methods on the binding constants  $K$  of each of the dyes (note the logarithmic scale in  $K$ ). Panel (b) shows a clear systematic trend both in the value and in the uncertainty of the  $cmc$  determined by the graphical method (black dots). On the contrary, the  $cmc$ -values determined from fits with the proposed concentration model (blue triangles) show a much

smaller dependence on the dye used, with a weighted mean value of  $0.276 \pm 0.008$  mM, which coincides well with the value from direct TX100 absorbance. The proposed concentration model takes into account the binding equilibrium of the dyes and yields consistent values for the *cmc* despite the huge difference in the values of the binding equilibrium constants.

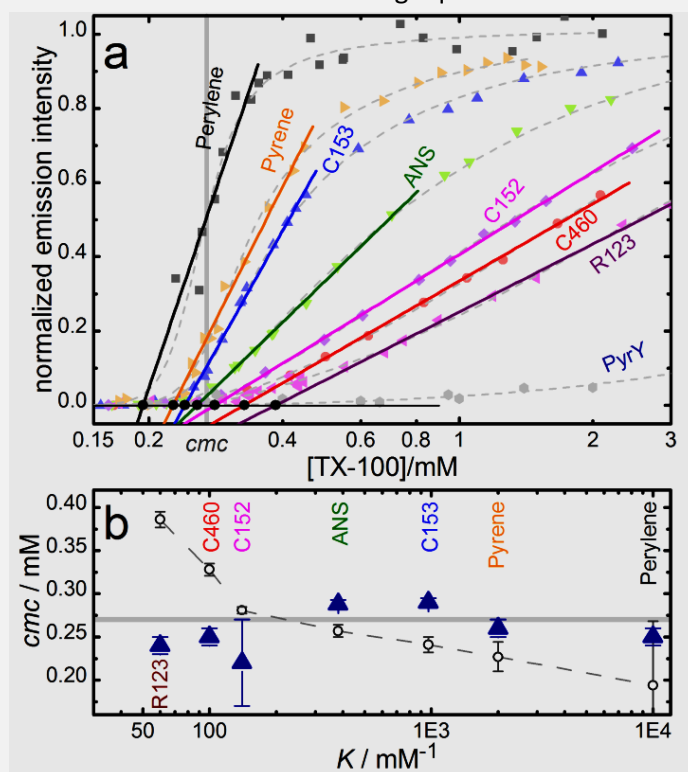


Figure 7 Influence of the binding equilibrium on the determination of the *cmc* by different methods. (a) Filled symbols and grey dashed lines: same fluorescence intensities as in Fig. 6. Straight Lines: Linear regression of the approximately linear part of the fluorescence intensity. Black dots: intersections with the horizontal straight line taken by this graphical method as the *cmc*. (b) Dependence of the *cmc*-values estimated with the two methods on the binding constant  $K$  (Table 1). Blue triangles: fits of concentration model eqs. (4)-(6) and (16) as in Fig. 6. Circles: graphical method based on the intersection of straight lines given in panel a. Grey horizontal line: *cmc* = 0.27 mM estimated from the direct TX100 absorbance (Figs.1 and 2).

It is important to recognize that the deviations between the true *cmc* and the values determined by the graphical method are intrinsic to the graphical method and not due to impurities or measurement uncertainties. The deviations cannot be easily corrected and it is also not obvious for a given surfactant which dye will yield the best *cmc* estimation. We therefore strongly discourage the use of such a graphical method. In order to obtain consistent and reproducible values of the *cmc* from moderately hydrophobic dyes we recommend therefore the use of an analytical model that takes into account the binding equilibrium of the dye, such as that of equations (16), (4)-(6). This analytical model avoids the subjectivity of the graphical methods and uses the full experimental data set, including the values near the *cmc*. This fit procedure can be easily implemented for global fitting

and automated analysis. An analytical model such as the one presented here makes it also possible to apply principal component analysis (PCA) and global analysis to the whole spectral dataset and to obtain the number of spectral components and their pure emission spectra.

### Fluorescence Correlation Spectroscopy

In previous contributions we presented how to use FCS for the determination of dynamic rate constants of the dye-exchange process with micelles.<sup>8, 17, 18</sup> Nevertheless, the high sensitivity of FCS to the size of the diffusing fluorescent particles makes it also very suitable for the estimation of the *cmc*, the size of the micelles, the formation of pre-micellar aggregates and other micellar properties.<sup>12-15</sup> In this contribution we focus on the analysis of the changes in the translational diffusion of the dyes R123 and C152 in TX100 solutions as measured by FCS.

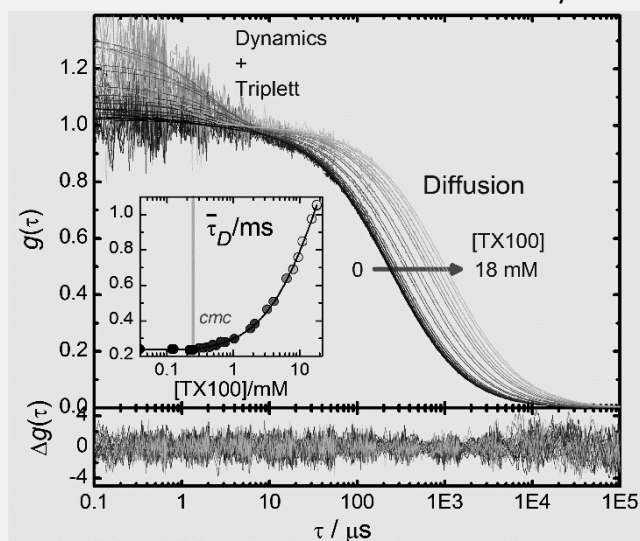


Figure 8 Normalized fluorescence correlation curves (FCS) of R123 in TX100 solutions with  $[TX100]=0-18\text{mM}$ . Noisy curves are the experimental data. Thin smooth curves are fits of eq. (21) with the mean diffusion times  $\bar{\tau}_D$  which are shown as circles in the inset. The continuous line in the inset is the fit of eq. (23) to the values of  $\bar{\tau}_D$  obtained from the individual fits. The fit parameters are given in Table 2 and in the text.

Fig. 8 shows normalized FCS curves of R123 in aqueous solutions of TX100 with  $[TX100]=0-18\text{mM}$ . Up to the *cmc* the correlation curves overlap perfectly with that of the free dye. They show a diffusion term at about  $250\ \mu\text{s}$ , and a small triplet term around  $3\ \mu\text{s}$  with the expected irradiance-dependent amplitude.

Above the *cmc* the diffusion term shifts to higher correlation times (up to  $1100\ \mu\text{s}$  at  $[TX100]=18\text{mM}$ ) without any further change in its shape. The additional irradiance-independent term below  $10\ \mu\text{s}$  reflects the fast flicker in the brightness of the dye during its dynamic exchange between water and the micelles, which depend on the dynamic rate constants of association and dissociation,  $k_+$  and  $k_-$  as given in eq. (11).<sup>8, 17, 18</sup>

Individual fits of the correlation curves of R123 (Fig. 8) and C152 (see ESI) with the correlation function for one diffusing species, triplet and binding dynamics (eq. (21)) in the full time range are

excellent and give the mean diffusion times shown for R123 in the inset of Fig. 8 (for C152 see the ESI). The precision of the FCS data of R123 is much higher because this dye is much brighter and photostable than C152.

**Table 2** Results of fits of the FCS titrations from Figs. 8 and 9 for R123, C152 and Chol-Bp.<sup>c</sup>

	R123	C152	Chol-Bp
$K/10^3 \text{ M}^{-1}$	56±2	143±14	-
$\lambda_{ex}/\text{nm}$	488	405	488
$cmc / \text{mM}$	0.25±0.02	(0.27)	-
$\tau_{Df} / \text{ms}^a$	0.237±0.00	0.242±0.005	-
	2		
$\tau_{Db} / \text{ms}^a$	1.97±0.08	2.2±0.5	1.85±0.10
$D_f / 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}{}^b$	4.58±0.01	5.1±0.1	-
$D_b / 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}{}^b$	0.55±0.02	0.55±0.02	0.56±0.02
$R_{hf} / \text{Å}$	5.2	4.7	-
$R_{hb} / \text{Å}$	44	44	43

<sup>a</sup> from global fits of eq (21) and (23) to the full titration data. <sup>b</sup> from global fits of eq (23) to the  $D$  values in Fig. 9 with common but free  $D_b$ .

<sup>c</sup> all fits with fixed value of  $r = 0.15$ . Values of  $r$  between 0.1 and 0.2 had no influence on the results indicated in this Table.

The measured diffusion times  $\tau_{Df}$  of free R123 and C152 are similar despite the smaller size of the latter because of the slightly bigger focus size at the excitation wavelength of 405nm used for C152 as compared to the size at 488nm used to excite R123. The translational diffusion coefficients and hydrodynamic radii are absolute values, independent on the focus size.

Below the  $cmc$  the measured diffusion times are identical to those of the free dyes. Above the  $cmc$  still only one species is observed, but with a mean diffusion time which increases with the surfactant concentration. As expected, even around the  $cmc$ , free dye and bound dye are not observed separately as two species because of their fast exchange between free and bound states during the time the dye needs to diffuse through the sample volume. The slow limit  $\tau_R^0$  of the relaxation time of this fast exchange can be estimated with eq. (24) from the binding constants of the dyes (see Table 1).<sup>8</sup> One obtains limits of  $\tau_R^0 \approx 60 \mu\text{s}$  for R123 and  $\tau_R^0 \approx 140 \mu\text{s}$  for C152, both faster than the diffusion times even of the pure dyes.

The individual mean diffusion times  $\bar{\tau}_D$  can in turn be fitted with the fast exchange equilibrium model of eq. (23) with eqs. (4)-(6) for the micelle concentration (see inset of Fig. 8 and the ESI). The fits are excellent (see parameters in Table 2). The same parameter values are obtained with global target fits of equations (21), (23), and (4)-(6) directly to the full correlation curves.<sup>36</sup>

The binding constants  $K$  obtained from these fits of the FCS data with the fast exchange model are in very good agreement with those obtained before from the bulk fluorescence intensity

titrations (Table 1). Despite the considerable extrapolation above the highest measured TX100 concentration a relatively precise value for the limiting diffusion time ( $\tau_{D_b}$ ) of bound R123 is obtained. The  $cmc$  can be well recovered from the R123 data. The uncertainty in the C152 data is much higher, both due to its lower brightness and photostability and because of the low binding equilibrium constant. For the individual fit of the C152 data we therefore fixed the value of the  $cmc$  to that obtained directly from the TX100 absorbance.

Using the known diffusion coefficients of the free dyes as a reference, the diffusion times  $\bar{\tau}_D$  can be converted to translational diffusion coefficients  $\bar{D}$  (eq. (18)), which are independent of the detection volume (see Fig. 9). This conversion leads to non-constant uncertainties in  $\bar{D}$ , which are therefore used as weights in the fits.

The translational diffusion coefficient of free C152 is slightly higher than that of free R123, as expected from the smaller size of C152. Up to the  $cmc$  the diffusion coefficients of both dyes are constant and equal to that of the free dyes. Above the  $cmc$  the mean diffusion coefficients decrease due to the increasing fraction of the time a dye is bound to the slower diffusing micelle. At high TX100 concentration both curves tend to the same limiting diffusion coefficient, that of the TX100 micelle. This value of  $D_b = (0.55 \pm 0.02) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  obtained in a global fit of both dyes coincides excellently with the reported value of  $D_b = 0.54 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  obtained from Dynamic Light Scattering.<sup>60</sup>

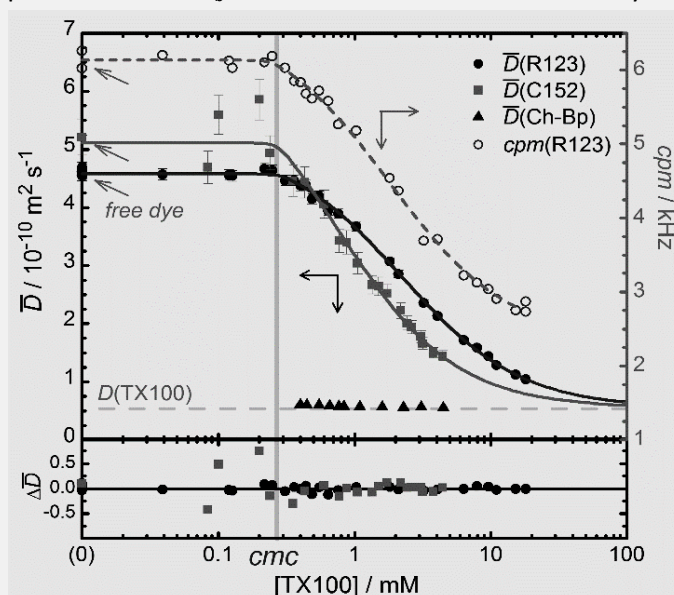


Figure 9 Upper panel, left scale: Mean translational diffusion constants  $D$  of the dyes R123 (black circles), C152 (grey squares) and Bdp-Chol (black triangles) in aqueous TX100 solutions, determined from the FCS data shown in Fig. 8 and ESI. Smooth lines represent the global fit of eq. (22) to the R123 and C152 data with the parameters given in Table 2. The open circles are the fluorescence intensity of R123 (counts per second per molecule,  $cpm$ , right scale) and the fit of eq. (16) (dashed line). Lower Panel: residuals of the global fit to  $D$ . The fit parameters are given in Table 2 and in the text.

## 4.1 Artículo original

We also measured under the same conditions FCS curves of a highly hydrophobic cholesterol labelled with the dye Bodipy (Bdp-Chol) at different TX100 concentrations (black triangles in Fig. 9). In pure water, not even nanomolar FCS concentrations of Bdp-Chol could be dissolved. In the presence of TX100 at concentrations below the *cmc* big and polydisperse aggregates were observed. However, immediately above the *cmc* stable solutions were obtained with a single diffusion term at  $\bar{\tau}_D = 1.9$  ms, which did not increase further at higher TX100 concentrations, indicating that all Bdp-Chol was incorporated into micelles. The corresponding translational diffusion coefficient (see Table 2) coincides very well with the one determined from the fits to R123 and C152 and with the mentioned published value. The incorporation of the dyes R123, C152 and Chol-Bp into the micelles does not have a significant influence on the diffusion coefficient or hydrodynamic radius of the TX100 micelles, as opposed to observations with other guests.<sup>12</sup>

It should also be noted that the diffusion coefficients measured around the *cmc* can be satisfactorily explained by the proposed concentration model. At least with these two dyes of low hydrophobicity we do not observe dye-surfactant aggregates, premicellar aggregates or nucleation of micelles. However, up to now, we did not obtain FCS data around the *cmc* from more hydrophobic dyes that may induce these effects more effectively.

The fluorescence intensity observed in the FCS titrations for R123 at different TX100 concentrations is also represented in Fig. 9 (open circles). From the totally registered intensity and the mean number of R123 molecules present in the sample volume (typically 4-10 molecules) the fluorescence intensity detected from each dye molecule is calculated (fluorescence counts per second per molecule, cpm). This intensity is the single molecule equivalent to the bulk fluorescence intensity of R123 represented in Fig. 6 and can be fitted with the same eqs. (16), (4)-(6), giving the same value of  $K = (57 \pm 2) 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

## Experimental Section

### Materials

Dyes used: Perylene (Fluka 77341, CAS 198-55-0, Mw=252.32); Pyrene (Aldrich 42,642-3 (99%), CAS 129-00-0, Mw=202.26); C153 (Coumarin 153, Aldrich 546186, CAS 53518-18-6, Mw=309.29); ANS (2-anilinonaphthalene-6-sulfonic acid, Molecular Probes A-50, CAS 20096-53-1, Mw=299.34); C152 (Coumarin 152, Aldrich 363324 (98%), CAS 53518-14-2, Mw=257.22); C460 (Coumarin 460, 7-diethylamino-4-methylcoumarin (99%), Aldrich D87759, CAS 91-44-1, Mw=231.3); R123 (Rhodamine123, Sigma R8004, CAS 62669-70-9, 380.83); PyrY (PyroninY, Aldrich 213519 (53%), CAS 92-32-0, 302.81); Bdp-Chol (TopFluor (Bodipy) Cholesterol, 23-(dipyrrrometheneboron difluoride)-24-norcholesterol, Avanti 810255P, CAS 878557-19-8, Mw 576.61). All dyes were used without further purification. The surfactant TX100 (Triton X-100, Fluka 93426, CAS 9002-93-1, Mw=646.85) was checked for potential fluorescence impurities and was used without further purification. Solutions were prepared using Milli-Q water. Dyes with very low solubility in pure water (Perylene, Pyrene and Bdp-Chol) were dissolved directly in aqueous TX100 solutions. In the case of perylene these solutions had to be filtered in order to avoid dye precipitation during the titrations.

For each dye a different TX100 stock solution was prepared, with an uncertainty of about 1% in the absolute TX100 concentration. This uncertainty propagates to all derived values, and defines the accuracy of the *cmc* and *K* values. This uncertainty is, however, not included in the errors given throughout the text, which indicate only the precision of the nonlinear fits.

### Absorbance and Fluorescence Measurements

Absorbance spectra were recorded using quartz cells with an absorption path length of 10.0 mm in a Varian-Cary 300 spectrometer. The baseline was recorded with water in both sample and reference cells. Steady-state fluorescence measurements were obtained with an Edinburgh-Instruments F900 spectrofluorimeter, equipped with a Xenon lamp of 450 W as excitation source. All experiments were carried out at  $25 \pm 1$  °C.

### FCS Measurements

The FCS setup was described before.<sup>18, 61</sup> A drop of each sample was deposited on a borosilicate coverslip (Menzel Gläser, NO. 1 DE) or in a well of a glass bottom microplate (Whatman Ltd.). The samples were excited through a microscope objective (Olympus, UPLSAPO 60xW/1.20, water immersion) by laser light at 405nm or 489 nm. The fluorescence was collected by the same objective and passed through a pinhole (Thorlabs,  $\varnothing=100$   $\mu\text{m}$ , US) and filtered by band-pass filters (Semrock, Brightline HC 525/45, US or AHF Analysentechnik, HQ550/100M, Germany) The output signals of avalanche photodiodes (MPD50CTC APD,  $\varnothing=50$   $\mu\text{m}$ , MPD, Italy) were processed and stored by TCSPC-modules (SPC 132, Becker & Hickl GmbH, Berlin, Germany).

Typically 10 million photons were collected for each correlation curve. All measurements were made at stabilized temperature,  $25.0 \pm 0.5$  °C. The excitation power was typically  $P=120$   $\mu\text{W}$ , the mean irradiance  $I_0/2 = 9$   $\text{kW cm}^{-2}$ .<sup>55</sup>

The detection volumes were calibrated at 489 nm with Rhodamine 123 and at 405 nm with C152:  $w_{xy}(405\text{nm}) = 0.70$   $\mu\text{m}$  and  $w_{xy}(488\text{nm}) = 0.66$   $\mu\text{m}$  @488nm. The diffusion coefficient  $D(\text{R123}, 25^\circ\text{C}) = (4.6 \pm 0.4) 10^{-10}$   $\text{m}^2\text{s}^{-1}$  was estimated from PFG-NMR<sup>62</sup> and dual-focus FCS<sup>63</sup> data.<sup>64</sup> The diffusion coefficient  $D(\text{C152}, 25^\circ\text{C}) = (5.2 \pm 0.6) 10^{-10}$   $\text{m}^2\text{s}^{-1}$  has been taken from Bordello et. al.<sup>18</sup> The diffusion coefficients are given for 25°C.

The detection volumes were selected big enough in order to assure at least a 50-fold temporal separation between the diffusional terms and the fast terms of the binding dynamics and the triplet state blinking. Power series were performed both for free dye and at highest surfactant concentration in order to determine the photobleaching limits.<sup>18</sup>

### Conclusions

We present for the first time a practical quantitative model for the surfactant concentration dependence of the fluorescence intensity and the translational diffusion coefficients of dyes in micellar solutions. The model yields excellent fits of the experimental data, especially also around and below the *cmc*. We show how this model can be used for the precise determination of the binding equilibrium constants of dyes of very different hydrophobicity.

## 4.1 Artículo original

We strongly advise not to use subjective graphical methods for the determination of the *cmc* of surfactant solutions. We demonstrate that the intersection of two straight lines in plots of the fluorescence emission intensity of a dye versus the surfactant concentration depends strongly on the affinity of the dye to the micelles and, of course, on the chosen interval and the quality of the data. The same applies to other properties, such as the diffusion coefficient or absorbance.

Data analysis based on a concentration model such as that presented in this contribution can lead to objective and consistent values of the *cmc* which are much less dependent on the technique or on subjective decisions. Furthermore, this type of analysis is easily implemented in commercial fitting software and can be used for global and automated analysis, also in high throughput applications. It is not limited to fluorescence intensity and diffusion coefficients, but can also be applied to ratiometric data and to other properties which depends directly on the concentration of monomeric and micellised surfactants.

### Acknowledgements

J.B., S.F., and L.P. thank the Ministerio de Ciencia e Innovación, the Xunta de Galicia, and the Gil Dávila Foundation for their research scholarships. M.N. and W.A. thank the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Xunta de Galicia for their financial support (CTQ2010-21369, INCITE09262304PR, IN845B-2010/094, INCITE09E2R209064ES, CN2013/314).

### Notes and references

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: Additional figures and Fitting functions. See DOI: 10.1039/b000000x/

‡ The errors indicate only the precision of one standard deviation as obtained from the nonlinear fits. The accuracy of the values is mostly limited by that of the concentration of the different TX100 stock solutions (see experimental section).

- 1 T. F. Tadros, *Applied surfactants: principles and applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- 2 M. J. Rosen and J. T. Kunjappu, *Surfactants and interfacial phenomena*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2012.
- 3 A. M. Seddon, P. Curnow and P. J. Booth, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2004, **1666**, 105-117.
- 4 E. Blanco, C. W. Kessinger, B. D. Sumer and J. Gao, *Exp. Biol. Med.*, 2009, **234**, 123-131.
- 5 P. Stano, *Systems and synthetic biology*, 2010, **4**, 149-156.
- 6 C. S. Dunaway, S. D. Christian and J. F. Scamehorn, in *in Solubilization in Surfactant Aggregates, Surfactant Science Series, Vol. 55*, ed. S. D. Christian and J. F. Scamehorn, Marcel Dekker, New York, 1995, pp.3-31.
- 7 R. Zana, in *in Dynamics of Surfactant Self-assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases*, ed. R. Zana, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, 2005,.
- 8 M. Novo, S. Felekyan, C. A. M. Seidel and W. Al-Soufi, *J Phys Chem B*, 2007, **111**, 3614-3624.

- 9 K. P. Ananthapadmanabhan, E. D. Goddard, N. J. Turro and P. L. Kuo, *Langmuir*, 1985, **1**, 352-355.
- 10 A. Patist, in *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*, ed. K. Holmberg, John Wiley & Sons: New York, 2001, pp.239.
- 11 Y. Nakahara, T. Kida, Y. Nakatsuji and M. Akashi, *Langmuir*, 2005, **21**, 6688-6695.
- 12 M. A. Hink, A. Van Hoek and A. J. W. G. Visser, *Langmuir*, 1999, **15**, 992-997.
- 13 H. Zettl, Y. Portnoy, M. Gottlieb and G. Krausch, *J Phys Chem B*, 2005, **109**, 13397-13401.
- 14 L. Yu, M. Tan, B. Ho, J. L. Ding and T. Wohland, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **556**, 216-225.
- 15 F. Lushtinetz and C. Dosche, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **338**, 312-315.
- 16 A. Techen, C. Hille, C. Dosche and M. U. Kumke, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **377**, 251-261.
- 17 W. Al-Soufi, B. Reija, S. Felekyan, C. A. Seidel and M. Novo, *Chemphyschem*, 2008, **9**, 1819-1827.
- 18 J. Bordello, M. Novo and W. Al-Soufi, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **345**, 369-376.
- 19 M. Deumié and M. El Baraka, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1993, **74**, 255-266.
- 20 P. Pal, H. Zeng, G. Durocher, D. Girard, R. Giasson, L. Blanchard, L. Gaboury and L. Villeneuve, *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 1996, **98**, 65-72.
- 21 J. C. Micheau, G. V. Zakharova and A. K. Chibisov, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, **6**, 2420-2425.
- 22 R. Barnadas-Rodríguez and J. Estelrich, *J Phys Chem B*, 2009, **113**, 1972-1982.
- 23 S. Freire, J. Bordello, D. Granadero, W. Al Soufi and M. Novo, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, **9**, 687-696.
- 24 P. Mukerjee and K. J. Mysels, *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*, NIST National Institute of Standards and Technology, Washington D.C. USA, 1971.
- 25 W. Al-Soufi, L. Piñeiro and M. Novo, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **370**, 102-110.
- 26 S. H. Brooks, A. Berthod, B. A. Kirsch and J. G. Dorsey, *Anal. Chim. Acta*, 1988, **209**, 111-121.
- 27 G. B. Behera, B. K. Mishra, P. K. Behera and M. Panda, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1999, **82**, 1-42.
- 28 J. Phillips, *Transactions of the Faraday Society*, 1955, **51**, 561-569.
- 29 I. García-Mateos, M. Mercedes Velázquez and L. J. Rodríguez, *Langmuir*, 1990, **6**, 1078-1083.
- 30 S. Morisada and H. Shinto, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, **114**, 6337-6343.
- 31 R. Hadgiivanova and H. Diamant, *J Phys Chem B*, 2007, **111**, 8854-8859.
- 32 K. Kalyanasundaram, *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, Academic Press, New York, 1987.
- 33 J. K. Thomas, *Chem. Rev.*, 1980, **80**, 283-299.
- 34 J. Widengren and R. Rigler, *Cell Mol. Biol.*, 1998, **44**, 857-879.
- 35 R. Rigler and E. S. Elson, *Fluorescence correlation spectroscopy: theory and applications*, Springer Verlag, Berlin, 2001.
- 36 W. Al-Soufi, B. Reija, M. Novo, S. Felekyan, R. Kühnemuth and C. A. M. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 8775-8784.
- 37 K. Kalyanasundaram and J. Thomas, in *Micellization, Solubilization, and Microemulsions*, ed. K. L. Mittal, Springer, US, 1977, pp.569-588.
- 38 F. G. Sánchez and C. C. Ruiz, *J Lumin*, 1993, **55**, 321-325.

#### 4.1 Artículo original

- 39 H. Om, G. A. Baker, K. Behera, V. Kumar, K. K. Verma and S. Pandey, *Chemphyschem*, 2010, **11**, 2510-3.
- 40 U. Anand, C. Jash and S. Mukherjee, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **364**, 400-6.
- 41 W. Al-Soufi, M. Novo, M. Mosquera and F. Rodríguez-Prieto, *Reviews in Fluorescence 2009*, 2011, , 23-45.
- 42 W. Al-Soufi, M. Novo and M. Mosquera, *Appl. Spectrosc.*, 2001, **55**, 630-636.
- 43 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, USA, 2006.
- 44 H. C. Chiang and A. Lukton, *J. Phys. Chem.*, 1975, **79**, 1935-1939.
- 45 K. Birdi, H. Singh and S. Dalsager, *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, 2733-2737.
- 46 E. De Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato and V. Bocchini, *Anal. Biochem.*, 1981, **115**, 278-286.
- 47 E. Abuin, *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **186**, 332-338.
- 48 P. Griffiths, J. Roe, B. Bales, A. Pitt and A. Howe, *Langmuir*, 2000, **16**, 8248-8254.
- 49 N. Memon, A. Balouch and W. L. Hinze, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ed. R. A. Meyers, John Wiley & Sons, Ltd, US, 2006,.
- 50 S. A. Moore, A. A. Harris and R. M. Palepu, *Fluid Phase Equilib.*, 2007, **251**, 110-113.
- 51 A. Accardo, D. Tesauro, L. Del Pozzo, G. Mangiapia, L. Paduano and G. Morelli, *Journal of Peptide Science*, 2008, **14**, 903-910.
- 52 P. Castellazzi, G. Mercier and J. Blais, *Water, Air, & Soil Pollution*, 2012, **223**, 337-349.
- 53 B. D. Wagner, *Molecules*, 2009, **14**, 210-237.
- 54 B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Germany, 2002.
- 55 C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler and C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 2651-2659.
- 56 S. J. Yunes, N. D. Gillitt and C. A. Bunton, *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, **281**, 482-487.
- 57 M. Sowmiya, A. Tiwari and S. Saha, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **344**, 97.
- 58 D. LeBard, B. Levine, R. DeVane, W. Shinoda and M. Klein, *Chemical Physics Letters*, 2012, **522**, 38-42.
- 59 A. Patist, S. S. Bhagwat, K. W. Penfield, P. Aikens and D. O. Shah, *Journal of Surfactants and Detergents*, 2000, **3**, 53-58.
- 60 G. D. J. Phillis, J. Stott and S. Z. Ren, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 11563-11568.
- 61 D. Granadero, J. Bordello, M. J. Pérez-Alvite, M. Novo and W. Al-Soufi, *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, **11**, 173-188.
- 62 P. O. Gendron, F. Avaltroni and K. J. Wilkinson, *J. Fluoresc.*, 2008, **18**, 1093-1101.
- 63 C. Muller, A. Loman, V. Pacheco, F. Koberling, D. Willbold and W. Richtering, *Europhys. Lett.*, 2008, **83**.
- 64 P. Kapusta, , *Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration*, Picoquant Application Note, 2010

## 4.2 Supplementary Information

### Dye Exchange in Micellar Solutions. Quantitative Analysis of Bulk and Single Molecule Fluorescence Titrations.

References to figures and equations refer to the main paper.

#### Additional Data

##### Direct TX100 UV-Absorption

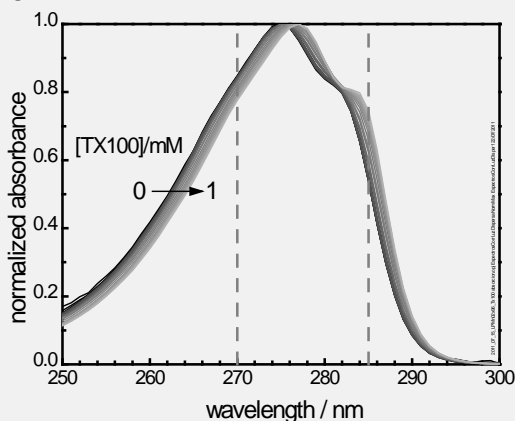


Figure SI1: Corrected absorption spectra of TX100 normalized at the maximum with concentrations between 0 and 1 mM. Dashed lines indicate the wavelength used for the ratiometric analysis.

##### R123 in TX100 micelles

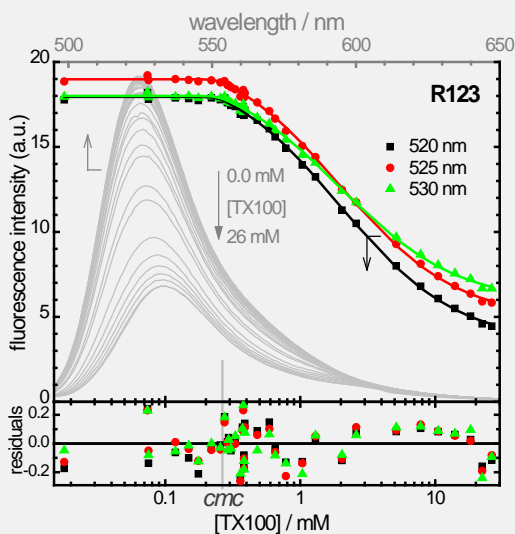


Figure SI2: Fluorescence of R123 in aqueous TX-100 solutions with  $[TX-100]= 0-26$  mM. Grey curves and upper wavelength scale: fluorescence spectra. Filled symbols and lower concentration scale: Fluorescence intensities at three wavelength vs. TX-100 concentration. Continuous curves: global fit of equations (4-7, 16) at three wavelengths with  $cmc=0.24\pm 0.01$  mM,  $r=0.1\pm 0.1$ ,  $K = (65.5\pm 1) 10^3 M^{-1}$  and a ratio  $F_b/F_f = 0.25$  at 525 nm ( $\lambda_{exc}=488$ nm,  $[R123]_0 = 2 \cdot 10^{-8}$  M).

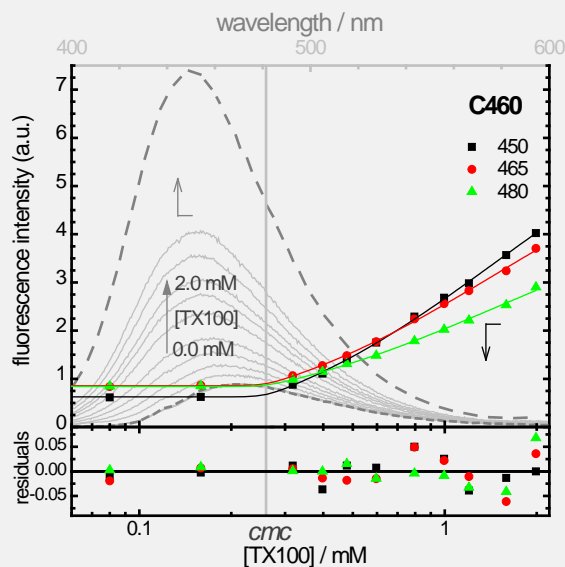
**C460 in TX100 micelles**

Figure S13: Fluorescence of C460 in aqueous TX-100 solutions with  $[TX-100]=0-2$  mM. Grey curves and upper wavelength scale: fluorescence spectra and pure emission spectra of free C460 (short dash) and bound C460 (dash). Filled symbols and lower concentration scale: Fluorescence intensities at three wavelength vs. TX-100 concentration. Continuous curves: global fit of equations (4-7, 16) at three wavelengths with  $cmc=0.25\pm 0.01$  mM,  $r=0.1$  (fix),  $K = (82\pm 5) 10^3 M^{-1}$  and a ratio  $F_b/F_f = 12$  at 450 nm ( $\lambda_{exc}=380$ nm,  $[C460]_0 = 3 \cdot 10^{-7}$  M).

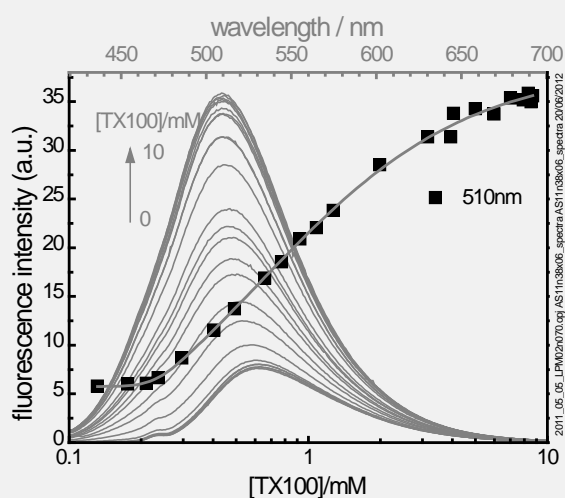
**C152 in TX100 micelles**

Figure S14: Fluorescence of C152 in aqueous TX-100 solutions with  $[TX-100]=0-10$  mM. Grey curves and upper wavelength scale: fluorescence spectra. Black squares and lower concentration scale: Fluorescence intensities at 510 nm vs. TX-100 concentration. Solid grey curve: fit of eqs. (4-7, 16) with  $cmc = 0.22\pm 0.02$  mM,  $r = 0.18\pm 0.13$ ,  $K = (170\pm 10) 10^3 M^{-1}$  at 510 nm. ( $\lambda_{exc}=380$ nm,  $[C152]_0 < 5 \cdot 10^{-7}$  M)

**Comparison of several dyes in exchange with TX-100**

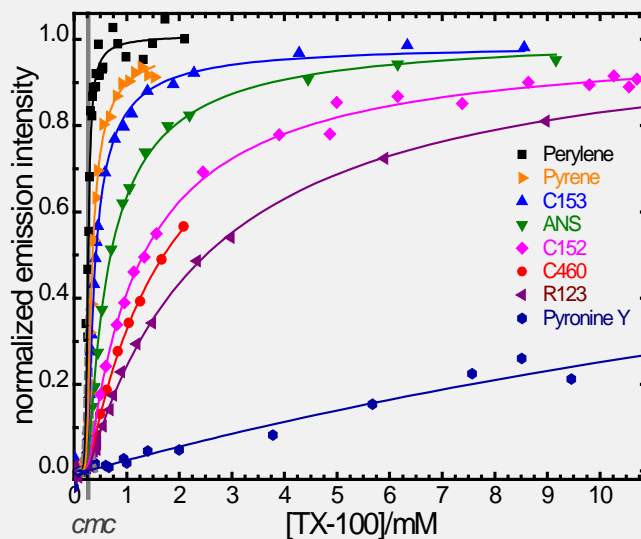


Figure S15: Normalized fluorescence emission intensity  $F_{norm} = (F - F_f) / (F_b - F_f)$  of several dyes in aqueous solutions of TX-100 as function of surfactant concentration. Continuous curves are results of a global fit of equations (4-7, 16) with  $cmc=0.27$  mM and  $r=0.15$ . The excitation and emission wavelength and the ratios  $F_b / F_f$  are given in Table 1.

**Fluorescence Correlation Spectroscopy data of R123 and C152**

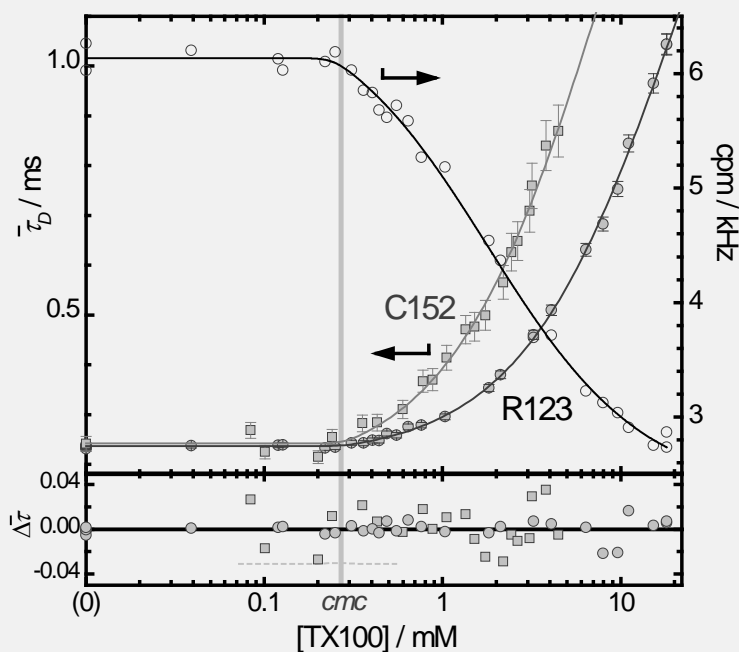


Figure S16: Mean diffusion times  $\bar{\tau}$  (filled symbols) and fluorescence counts per second and molecule ( $cpm$ , open circles) from FCS titrations of R123 (circles) and C152 (squares) in TX100 solutions with  $[TX100]=0-18$ mM. Continuous lines are fits of eq. (23) to  $\bar{\tau}$  and (16) to  $cpm$ , both with eqs. (4-7) for the micelle concentration. The fit parameters are given in Table 2 and in the text.

## Experimental Section

### FCS Measurements

The confocal epi-illuminated setup used for the FCS measurements is home-built<sup>1, 2</sup> and similar to that described elsewhere.<sup>3, 4</sup> A drop of each sample was deposited on a borosilicate coverslip (Menzel Gläser, NO. 1 DE) or in a well of a glass bottom microplate (Whatman Ltd.). The samples were excited by the continuous linearly polarized light of a laser diode (Becker&Hickl, BDL-485-SMC (489 nm) or BDL-405-SMC (405nm), DE) coupled to a monomode optical fiber (Point-Source, kineFLEX-P-1-S-405-0.7, UK). The light output of the fiber was collimated (Schäfter&Kirchhoff, 60FC-4-6,2-01-DI, DE), spectrally cleaned (Semrock, Brightline HC 482/18 or Maxdiode LD01-405/10, US), redirected by a dichroic mirror (Semrock, Brightline BS R488, US or AHF Analysentechnik, z405 RDC, DE) and focused into the sample by a high aperture microscope objective (Olympus, UPLSAPO 60xW/1.20, water immersion) mounted in an inverted microscope (Olympus, IX-71). The fluorescence was collected by the same objective and then refocused through the dichroic mirror onto a pinhole (Thorlabs,  $\varnothing=100\ \mu\text{m}$ , US) in the image plane. The light passing the pinhole was collimated, then split into two beams by a nonpolarizing beamsplitter cube (Thorlabs, BS016, US) and each beam focused onto avalanche photodiodes (MPD50CTC APD,  $\varnothing=50\ \mu\text{m}$ , MPD, Italy). Band-pass filters (Semrock, Brightline HC 525/45, US or AHF Analysentechnik, HQ550/100M, Germany) in front of the detectors discriminated fluorescence from scattered laser light. The output signals were processed and stored by TCSPC-modules (SPC 132, Becker & Hickl GmbH, Berlin, Germany). Correlation curves were calculated with the Single Photon Counting software by Becker & Hickl GmbH.

Typically 10 million photons were collected for each correlation curve. All measurements were made at stabilized temperature,  $25.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ . The excitation power as measured in the focus of the microscope objective (power meter Thorlabs, PM30-120, US) was typically  $P=120\ \mu\text{W}$ , corresponding to a mean irradiance of  $I_0/2 = P/(\pi \cdot w_{xy}^2) = 9\ \text{kW cm}^{-2}$ .<sup>5</sup>

The focal area and the detection volume were calibrated at 489 nm with Rhodamine 123 and at 405 nm with C152. The diffusion coefficient  $D(\text{R123}, 25^\circ\text{C}) = (4.6 \pm 0.4) \times 10^{-10}\ \text{m}^2\text{s}^{-1}$  was estimated from PFG-NMR.<sup>6</sup> and dual-focus FCS<sup>7</sup> data.<sup>8</sup> The diffusion coefficient  $D(\text{C152}, 25^\circ\text{C}) = (5.2 \pm 0.6) \times 10^{-10}\ \text{m}^2\text{s}^{-1}$  has been taken from Bordello et. al.<sup>1</sup> The diffusion coefficients are given for  $25^\circ\text{C}$ .

### References

- 1 J. Bordello, M. Novo and W. Al-Soufi, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **345**, 369-376.
- 2 D. Granadero, J. Bordello, M. J. Pérez-Alvite, M. Novo and W. Al-Soufi, *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, **11**, 173-188.
- 3 S. Felekyan, R. Kühnemuth, V. Kudryavtsev, C. Sandhagen, W. Becker and C. A. M. Seidel, *Rev. Sci. Instrum.*, 2005, **76**.
- 4 W. Al-Soufi, B. Reija, M. Novo, S. Felekyan, R. Kühnemuth and C. A. M. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 8775-8784.
- 5 C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler and C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 2651-2659.

6 P. O. Gendron, F. Avaltroni and K. J. Wilkinson, *J. Fluoresc.*, 2008, **18**, 1093-1101.

7 C. Muller, A. Loman, V. Pacheco, F. Koberling, D. Willbold and W. Richtering, *Europhys. Lett.*, 2008, **83**.

8 P. Kapusta, , *Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration*, [http://www.picoquant.com/technotes/appnote\\_diffusion\\_coefficients.pdf](http://www.picoquant.com/technotes/appnote_diffusion_coefficients.pdf).

## Fitting functions

We provide ready to use fitting functions for Origin Data Analysis Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060, USA) as compressed zip-archive. Updated versions can be downloaded from the author's webpage.

The functions were tested with Origin 8.5 SR1.

For use in Origin the zip-archive should be decompressed in a temporal directory and the functions should be added from the *fitting function organizer* to the Origin Fitting functions. (Do not copy them directly to the Origin directory.) We propose to add them to a new category such as "APNModel".

All functions can be used for nonlinear fitting and for calculations in columns or other functions. For calculations the functions should be called as "n1f\_FunctionName(parameters)", for example: "n1f\_APNModel\_S1(cS0, cmc, r)".

The functions also serve as examples for other data analysis packages. Therefore we describe briefly the main code of each of the functions.

For further information see:

Wajih Al-Soufi, Lucas Piñeiro, Mercedes Novo, A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: Application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tension data, **Journal of Colloid and Interface Science**, Volume 370, Issue 1, 15 March 2012, Pages 102-110, ISSN 0021-9797, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.037>.

## Concentration Model

### APNModel\_S1

Concentration model which is used by all other derived properties.

Takes [S]0 and calculates the monomeric concentration [S1] as function of the *cmc* and the relative transition width *r*.

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}r}\right)}$$

$$[S_1] = cmc \left[ 1 - A \frac{1}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} + (s_0 - 1) \left( \operatorname{erf}\left(\frac{s_0-1}{\sqrt{2}r}\right) - 1 \right) \right) \right]$$

## 4.2 Supplementary Information

```
Function Name = APNModel_S1
Brief Description = APN Model: monomeric surfactant concentration - USC - Al-Soufi 2011
[Independent Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
cS1 =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r
Meanings = cmc,relative transition width
[Formula]
s0 = cS0/cmc;
A=2/(1+sqrt(2/Pi)*r*exp(-1/(2*r*r))+erf(1/Sqrt(2)/r));
cS1=cmc*(1 - (A/2)*( sqrt(2/Pi)*r*exp(-(s0-1)^2/(2*r*r)))+(s0-1)*(erf((s0-1)/(sqrt(2)*r))-1)
));
```

### Derived Properties

#### APNModel\_DyeExchangeFluorFull

Fluorescence emission intensity of a dye in exchange equilibrium between the aqueous and the micellar pseudo-phase in a surfactant solution (Full version).

Takes  $[S]_0$  and calculates the fluorescence intensity  $F(\lambda, [S]_0)$  as function of the parameters  $cmc$ , the relative transition width  $r$ , the aggregation number  $n$ , the partition equilibrium constant  $K$ , and the limiting fluorescence intensities of free and bound dye ( $F_f$ ,  $F_b$ ).

$$F(\lambda, [S]_0) = F_f(\lambda) \cdot X_f + F_b(\lambda) \cdot X_b = \frac{F_f(\lambda) + F_b(\lambda) \cdot K \cdot [M]}{1 + K \cdot [M]}$$

This function needs the function APNModel\_S1.

This same model can of course also be used for any other property of the form  $A([S]_0) = A_f \cdot X_f + A_b \cdot X_b$ , such as the translational diffusion constant  $D$ .

The aggregation number  $n$  and the partition equilibrium constant  $K$  are fully correlated in this fit model ( $K \cdot [M] = K \cdot [S_m] / n$ ) and can therefore not determined simultaneously. The aggregation number  $n$  has to be treated as a constant and fixed during the fit. If  $n$  is unknown, then it should be fixed to  $n=1$ . In this case the fitted value of  $K$  is the ratio  $K/n$ .

The parameters  $cmc, K, F_f, F_b$  are actively initialized at the beginning of the fit, assuming that the data are sorted with respect to  $[S]_0$  (ascending or descending).

```
Function Name = APNModel_DyeExchangeFluorFull
Brief Description = APN Model: Dye Exchange - USC - Al-Soufi 2013- V01
[Independent Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
F =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,n,K,Ff,Fb
Meanings = cmc,relative transition width,aggregation number,K,F free dye,F bound dye
[Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
cM=cSm/n;
F= (Ff + Fb*K*cM)/(1+K*cM);
```

### APNModel\_DyeExchangeFluorShort

Fluorescence emission intensity of a dye in exchange equilibrium between the aqueous and the micellar pseudo-phase in a surfactant solution (Short version).

This fit model is identical to APNModel\_DyeExchangeFluorFull, except for the definition of the parameters. The limiting fluorescence intensities of free (Ff) and bound dye (Fb) are now expressed by the fluorescence intensity ratio  $q_{bf} = F_b/F_f$  and the limiting fluorescence intensities of free (Ff).

Furthermore, in order to avoid the full correlation between the aggregation number  $n$  and the partition equilibrium constant  $K$  only the ratio  $Kn = K/n$  is used as fit parameter.

The model takes  $[S]_0$  and calculates the fluorescence intensity  $F(\lambda, [S]_0)$  as function of the  $cmc$ , the relative transition width  $r$ , the ratio  $Kn = K/n$  between the partition equilibrium constant  $K$  and the aggregation number  $n$ , the limiting fluorescence intensities of free (Ff,  $F_A$ ) and the fluorescence intensity ratio  $q_{bf} = F_b/F_f$ .

$$F(\lambda, [S]_0) = F_f(\lambda) \cdot X_f + F_b(\lambda) \cdot X_b = \frac{F_f(\lambda) + q_{bf} \cdot F_f(\lambda) \cdot Kn \cdot [S_m]}{1 + Kn \cdot [S_m]}$$

This function needs the function APNModel\_S1.

This same model can of course also be used for any other property of the form  $A([S]_0) = A_f \cdot X_f + A_b \cdot X_b$ , such as the translational diffusion constant  $D$ .

The parameters  $cmc, Kn, F_f, q_{bf}$  are actively initialized at the beginning of the fit, assuming that the data are sorted with respect to  $[S]_0$  (ascending or descending).

```
Function Name = APNModel_DyeExchangeFluorShort
Brief Description = APN Model: Dye Exchange - USC - Al-Soufi 2013- V01 [Independent
Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
F =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,Kn,Ff,qbf
Meanings = cmc,relative transition width,K/n,Ffree,Fbound/Ffree
[Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
Fb=Ff*qbf;
F= (Ff + Fb*Kn*cSm)/(1+Kn*cSm);
```

### APNModel\_AbsorptionBandRatio

Ratio of the direct absorption at two wavelengths  $\lambda_a$  and  $\lambda_b$  of a surfactant as function of the surfactant concentration.

Takes  $[S]_0$  and calculates the ratio of the absorptions at two wavelengths  $\lambda_a$  and  $\lambda_b$  as function of the parameters  $cmc$ , the relative transition width  $r$ , and the molar absorptivity ratios  $q_1, q_m$ , and  $q_a$ .

$$q(\lambda, [S]_0) = \frac{A(\lambda_b)}{A(\lambda_a)} = \frac{[S_1] \cdot q_1 + [S_m] \cdot q_m \cdot q_a}{[S_1] + [S_m] \cdot q_a}$$

with the molar absorptivity ratios:

## 4.2 Supplementary Information

$$q_1 = \frac{\varepsilon_1(\lambda_b)}{\varepsilon_1(\lambda_a)}, q_m = \frac{\varepsilon_m(\lambda_b)}{\varepsilon_m(\lambda_a)}, q_a = \frac{\varepsilon_m(\lambda_a)}{\varepsilon_1(\lambda_a)}$$

This function needs the function APNModel\_S1.

The value of  $q(\lambda, [S]_0=0) = q_1$  is treated separately.

```
Function Name = APNModel_AbsorptionBandRatio
Brief Description = APN Model: Absorption Band Ratio - USC - Al-Soufi 2013- V01
[Independent Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
q =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,q1,qm,qa
Meanings = cmc,relative transition width,ratio momomers,ratio micellized,ratio first band
[Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
q= ( cS0>0 ? (cS1*q1+cSm*qm*qa)/(cS1 + cSm*qa) : q1);
```

### APNModel\_DyeExchangeFCS\_tauDMean

Mean diffusion time  $\bar{\tau}_D$  of a dye in fast exchange equilibrium between the aqueous and the micellar pseudo-phase in a surfactant solution.

The model takes  $[S]_0$  and calculates the mean diffusion time  $\bar{\tau}_D$  as function of the *cmc*, the relative transition width *r*, the ratio  $Kn = K/n$ , and the diffusion times of free ( $\tau_{D,f}$ ) and bound dye ( $\tau_{D,b}$ ):

$$\bar{\tau}_D = \frac{w_{xy}^2}{4D} = \frac{\tau_{D,f}(1 + K \cdot [M])}{1 + \frac{\tau_{D,f}}{\tau_{D,b}} K \cdot [M]} = \frac{\tau_{D,f}(1 + Kn \cdot [S_m])}{1 + \frac{\tau_{D,f}}{\tau_{D,b}} Kn \cdot [S_m]}$$

In order to avoid the full correlation between the aggregation number *n* and the partition equilibrium constant *K* only the ratio  $Kn = K/n$  is used as fit parameter.

This function needs the function APNModel\_S1.

```
Function Name = APNModel_DyeExchangeFCS_tauDMean
Brief Description = APN Model: Dye Exchange - USC - Al-Soufi 2013- V01
[Independent Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
tD =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,Kn,tDf,tDb
Meanings = cmc,relative transition width,K/n,tauD free dye,tauD bound dye [Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
tD = tDf*(1+Kn*cSm)/(1 + (tDf/tDb) * Kn*cSm);
```

### Other models used before:

#### APNModel\_Conductivity

Conductivity of a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the conductivity  $\kappa$  as function of the  $cmc$ , the relative transition width  $r$  and the slopes  $a$  and  $b$ , and the solvent conductivity  $c = \kappa_s$ .

$$\kappa = a[S_1] + b'[S_m] / n + c = a[S_1] + b[S_m] + c$$

This function needs the function APNModel\_S1.

The parameters  $cmc$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $c$  are actively initialized at the beginning of the fit, assuming that the data are sorted with respect to  $[S]_0$  (ascending or descending).

Function Name = APNModel\_Conductivity

Brief Description = APN Model: Electric conductivity - USC - Al-Soufi 2011 [Independent Variables]

$cS0 =$

[Dependent Variables]

$k =$

[Fitting Parameters]

Names =  $cmc, r, a, b, c$

Meanings =  $cmc, \text{relative transition width}, a, b, c$

[Formula]

$cS1 = \text{nlf\_APNModel\_S1}(cS0, cmc, r);$

$cSm = cS0 - cS1;$

$k = a * cS1 + b * cSm + c;$

#### APNModel\_Conductivity\_k1

Conductivity of a surfactant solution. Limiting Straight Line 1, below the  $cmc$ .

Utility Function: Takes  $[S]_0$  and calculates the limiting straight line  $\kappa_1$ , below the  $cmc$  of the plot of the conductivity  $\kappa$  vs.  $[S]_0$  with the parameters  $cmc, r, a, b, c$  determined with APNModel\_Conductivity.

$$\kappa_1 = a[S]_0 + c$$

The parameters  $cmc, r$  y  $b$  are not needed, but included for consistency.

Function Name = APNModel\_Conductivity\_k1

Brief Description = APN Model: Electric conductivity Line 1- USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

$cS0 =$

[Dependent Variables]

$k1 =$

[Fitting Parameters]

Names =  $cmc, r, a, b, c$

Meanings =  $cmc, \text{relative curvature}, a, b, c$

[Formula]

$k1 = a * cS0 + c;$

## 4.2 Supplementary Information

### APNModel\_Conductivity\_k2

Conductivity of a surfactant solution. Limiting Straight Line 1, below the *cmc*.

Utility Function: Takes [S]0 and calculates the limiting straight line  $\kappa_2$ , above the *cmc* of the plot of the conductivity  $\kappa$  vs. [S]0 with the parameters *cmc*, *r*, *a*, *b*, *c* determined with APNModel\_Conductivity.

$$\kappa_2 = a \cdot cmc + b \cdot ([S]_0 - cmc) + c$$

The parameter *r* is not needed, but included for consistency.

Function Name = APNModel\_Conductivity\_k2

Brief Description = APN Model: Electric conductivity Line 2- USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

cS0 =

[Dependent Variables]

k2 =

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *a*, *b*, *c*

Meanings = *cmc*, relative curvature, *a*, *b*, *c*

[Formula]

k2=a\* *cmc* b\*(cS0-*cmc*)+ c;

### APNModel\_MolarConductivity

Molar conductivity of a surfactant solution.

Takes [S]0 and calculates the molar conductivity (equivalent conductance) as function of the *cmc*, the relative transition width *r* and the slopes *a* and *b*.

$$\Lambda_m = a[S_1]/[S]_0 + b[S_m]/[S]_0$$

This function needs the function APNModel\_S1.

Function Name = APNModel\_MolarConductivity

Brief Description = APN Model: Electric molar conductivity - USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

cS0 =

[Dependent Variables]

k =

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *a*, *b*

Meanings = *cmc*, relative transition width, *a*, *b*

[Formula]

cS1= nlf\_APNModel\_S1(cS0, *cmc*, *r*);

cSm= cS0 - cS1;

k=a\* cS1/cS0 +b \* cSm/cS0;

### APNModel\_SelfDiffusion

Self-diffusion coefficient of a surfactant solution.

Takes [S]0 and calculates the self-diffusion coefficient  $D_{obs}$  as function of the *cmc*, the relative transition width *r* and the self-diffusion coefficients of monomeric ( $D_1$ ) and micellized ( $D_m$ ) surfactants.

$$D_{obs} = D_1 \cdot \frac{[S_1]}{[S]_0} + D_m \cdot \frac{[S_m]}{[S]_0}$$

This function needs the function APNModel\_S1.

```
Function Name = APNModel_SelfDiffusion
Brief Description = APN Model: Self Diffusion Coefficients - USC - Al-Soufi 2011
[Independent Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
Dobs =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,D1,Dm
Meanings = cmc,relative transition width,D1,Dm
[Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
Dobs = (D1* cS1+Dm *cSm)/cS0;
```

### APNModel\_NMRChemicalShifts

NMR Chemical Shifts of a surfactant solution.

Takes [S]0 and calculates the NMR Chemical Shifts as function of the *cmc*, the relative transition width *r* and the chemical shifts of monomeric (*d1*) and micellized (*dm*) surfactants.

$$\delta_{obs} = \delta_1 \cdot \frac{[S_1]}{[S]_0} + \delta_m \cdot \frac{[S_m]}{[S]_0}$$

This function needs the function APNModel\_S1.

```
Function Name = APNModel_NMRChemicalShifts
Brief Description = APN Model: NMR Chemical Shifts - USC - Al-Soufi 2011 [Independent
Variables]
cS0 =
[Dependent Variables]
Dobs =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,d1,dm
Meanings = cmc,relative transition width,d1,dm
[Formula]
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
dobs = (d1* cS1+dm *cSm)/(cS1+cSm);
```

## 4.2 Supplementary Information

### APNModel\_SurfaceTensionSzyszkowski

Surface Tension (Szyszkowski Equation) of a surfactant solution.

Takes [S]0 and calculates the Surface Tension  $\gamma$  using the Szyszkowski Equation as function of the  $cmc$ , the relative transition width  $r$ , the adsorption equilibrium constant  $K_{ad}$ , the surface tension of the solvent  $\gamma_0$  ( $g0$ ), and the constant  $a = RT/\omega$ , being  $\omega$  the cross sectional area of the surfactant molecule at the surface per mol.

$$\gamma = \gamma_0 - a \ln(1 + K_{ad} \cdot [S_1])$$

This function needs the function APNModel\_S1.

Function Name = APNModel\_SurfaceTensionSzyszkowski

Brief Description = APN Model: Surface Tension (Szyszkowski Equation) - USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

cS0 =

[Dependent Variables]

g =

[Fitting Parameters]

Names =  $cmc, r, a, Kad, g0$

Meanings =  $cmc, relative\ transition\ width, (R\ T)/\omega, adsorption\ equilibrium\ constant, g0$

[Formula]

cS1= nlf\_APNModel\_S1(cS0,cmc,r);

g=g0 - a\* ln(1+ Kad\*cS1);

### Utility functions

#### APNModel\_d2S1

First derivative of the monomeric surfactant concentration (equation (10)).

Takes [S]0 and calculates the first derivative  $[S_1]'$  (gradient) of the monomeric concentration  $[S_1]$  as function of the  $cmc$  and the relative transition width  $r$ .

$$[S_1]' = \frac{d[S_1]}{d[S]_0} = \frac{A}{2} \left( 1 - \operatorname{erf} \left( \frac{s_0 - 1}{\sqrt{2r}} \right) \right)$$

Function Name = APNModel\_d2S1

Brief Description = APN Model: first derivative of monomeric surfactant concentration - USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

cS0 =

[Dependent Variables]

d1S1 =

[Fitting Parameters]

Names =  $cmc, r$

Meanings =  $cmc, relative\ transition\ width$

[Formula]

s0 = cS0/cmc;

A=2/(1+sqrt(2/Pi)\*r\*exp(-1/(2\*r\*r))+erf(1/Sqrt(2)/r));

d1S1=(A/2)\*(1-erf((s0-1)/(Sqrt(2)\*r)));

### APNModel\_d2S1

Second derivative of the monomeric surfactant concentration (equation (7)).

Takes [S]0 and calculates the second derivative [S1]'' (curvature) of the monomeric concentration [S1] as function of the *cmc* and the relative transition width *r*.

$$[S_1]'' = \frac{d^2[S_1]}{ds_0^2} = -\frac{A}{cmc} \frac{1}{\sqrt{2\pi}r} e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}}$$

Function Name = APNModel\_d2S1

Brief Description = APN Model: second derivative of monomeric surfactant concentration - USC - Al-Soufi 2011

[Independent Variables]

*cS0* =

[Dependent Variables]

*d2S1* =

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*

Meanings = *cmc*, relative transition width

[Formula]

*s0* = *cS0/cmc*;

*A* =  $2/(1+\sqrt{2/\pi}) * r * \exp(-1/(2*r*r)) + \text{erf}(1/\sqrt{2}/r)$ ;

*d2S1* =  $-(A/(cmc*\sqrt{2*\pi}*r)) * \exp(-(s0-1)^2/(2*r*r))$ ;





## Capítulo 5. Emisión de fluorescencia de pireno en disoluciones de tensioactivos

### 5.1 Artículo original

#### Fluorescence Emission of Pyrene in Surfactant Solutions

Lucas Piñeiro, Mercedes Novo, and Wajih Al-Soufi

**Advances in Colloid and Interface Science** 2015, 215, 1–12

DOI:10.1016/j.cis.2014.10.010

Post-print (final draft post-refereeing) of the article.

#### Abstract

The systematic description of the complex photophysical behavior of pyrene in surfactant solutions in combination with a quantitative model for the surfactant concentrations reproduces with high accuracy the steady-state and the time resolved fluorescence intensity of pyrene in surfactant solutions near the *cmc*, both in the monomer and in the excimer emission bands. We present concise model equations that can be used for the analysis of the pyrene fluorescence intensity in order to estimate fundamental parameters of the pyrene-surfactant system, such as the binding equilibrium constant  $K$  of pyrene to a given surfactant micelle, the rate constant of excimer formation in micelles, and the equilibrium constant of pyrene-surfactant quenching. The values of the binding equilibrium constant  $K_{TX100} = 3300 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  and  $K_{SDS} = 190 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  for Triton X-100 (TX100) and SDS micelles, respectively, show that the partition of pyrene between bulk water and micelles cannot be ignored, even at relatively high surfactant concentrations above the *cmc*. We apply the model to the determination of the *cmc* from the pyrene fluorescence intensity, especially from the intensity ratio at two vibronic bands in the monomer emission or from the ratio of excimer to monomer emission intensity. We relate the finite width of the transition region below and above the *cmc* with the observed changes in the pyrene fluorescence in this region.

**Keywords:** Surfactants · Pyrene · Critical Micelle Concentration · Fluorescence · Kinetic Description

## Contents

1	Introduction
2	Theory
2.1	Surfactant Concentration Model
2.2	Binding Equilibrium
2.3	Dye Distribution
2.4	Excimer Formation
2.5	Pyrene-Surfactant Quenching
2.6	Steady-State Fluorescence Intensity
2.7	Time-Resolved Fluorescence Intensity
3	Results and Discussion
3.1	Steady-State Fluorescence Intensity
3.2	Time-Resolved Fluorescence Intensity
3.3	Pyrene-Surfactant Quenching
4	Conclusion
5	Experimental Section
5.1	Materials
5.2	Absorbance and Fluorescence Measurements
5.3	Data Analysis
	Acknowledgements
	References

## 1. Introduction

Pyrene has been used since more than 50 years as fluorescent probe par excellence for microheterogeneous systems such as micelles [1-13], polymers [14-16], proteins [17-19], peptides [20] and biological membranes [18,21-23]. The sensitivity of the pyrene fluorescence intensity to the solvent polarity is widely used for the determination of the *cmc* of micellar systems [3,12,13,24-30]. Therefore, it is surprising that there is still no established procedure to extract a *cmc* value from pyrene fluorescence data that can be related to basic properties of the micellar system and thus be compared to results obtained from other techniques. Currently, ad hoc graphical procedures are used, such as the intersection of straight lines drawn through the experimental data at low and high surfactant concentrations or the fit of arbitrary functions that have no foundation on the well-known fluorescence properties of pyrene in micellar systems. In order to obtain a *cmc* value consistent with other techniques it is necessary to use a common definition of the *cmc* that is based on the surfactant concentration and then to deduce the response of the pyrene fluorescence to the changes in the micellar solution around the *cmc*. The difficulty to do this lies mainly in the first part, the definition of the *cmc* and the necessary model for the concentrations of monomeric and micellized surfactant around the *cmc*. Many excellent theoretical and numerical descriptions of surfactant self-aggregation [31-37] allow now to understand and to predict the properties of micellar systems, but they are still too complex to be used as models for the analysis of experimental data. As a practical solution we proposed recently a manageable model for the surfactant concentration derived from a few empirically established properties of micellar solutions around the *cmc* [38]. This model reproduces with high precision the concentrations of monomeric and micellized surfactant around the *cmc* and allows one to deduce unified descriptions for several properties that depend on these concentrations. We obtained consistent *cmc* values from different surfactant properties such as electrical conductivity, surface tension, NMR chemical shifts, absorption, and self-diffusion

coefficients, and also from the fluorescence intensity and the mean translational diffusion coefficient of several fluorescent dyes in surfactant solutions [38,39]. In this contribution we combine this concentration model with the well-known photophysics of pyrene in order to obtain a manageable procedure for the analysis of the fluorescence intensity of pyrene in micellar solutions.

The photophysical behaviour of pyrene in microheterogeneous systems is complex and has been object of many detailed studies and reviews. The fluorescence spectrum of pyrene shows characteristic vibronic bands around 370 - 400 nm, whose absolute and relative intensities, width and positions depend sensitively on the polarity of the microenvironment [3,26,40-45]. The pyrene fluorescence emission can be quenched due to the diffusion controlled formation of excimers with a characteristic emission band at longer wavelengths around 500 nm [24,40,46-49]. The time dependence of the pyrene fluorescence intensity after pulsed excitation follows Stern-Volmer quenching kinetics in pure water but has a much more complex behaviour in microheterogeneous environments [26,49-53]. Although pyrene is highly hydrophobic and only sparingly soluble in pure water, it still follows a partition equilibrium between the aqueous phase and the micellar pseudophase with a partition equilibrium constant that is high but not infinite [27,39].

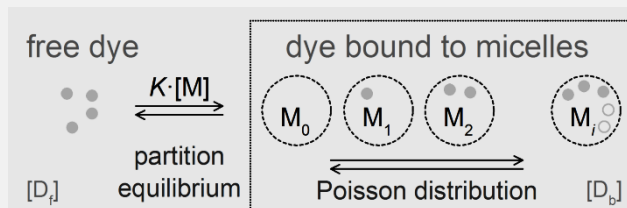
The ratio of the fluorescence intensities of the first and third vibronic bands of pyrene ( $I_{I}/I_{III}$ -ratio) increases characteristically with increasing polarity of the probe environment and defines the so called "py-scale" [42,44]. The passage of the hydrophobic pyrene from the aqueous phase to the apolar micellar pseudophase with increasing surfactant concentrations results in a sigmoidal decrease of the  $I_{I}/I_{III}$ -ratio around the *cmc*. Although visually very suggestive, there is not one special point of the sigmoid which can be directly assigned to the *cmc* of the solution, especially not the centre of the sigmoid. Zana et al. [27] gave a special solution for the limiting case of zero *cmc* taking into account the partition equilibrium of pyrene between aqueous and micellar phase. Aguiar et al. proposed to use the relative width of the sigmoidal as a criterion for the selection of one of two possible *cmc* values: the centre of the sigmoid in the case of nonionic surfactants and the intersection of two straight lines drawn through the rapidly changing part and the horizontal part at high concentrations for ionic surfactants with higher *cmc* values [30]. This leads to *cmc* values that are in agreement with those obtained with other techniques. However, this phenomenological approach does not take into account the partition equilibrium of pyrene and does not relate the sigmoidal model and its parameters with more fundamental physical properties of the system under study. It is not clear why any of the two selected concentrations should represent the same *cmc* as determined with other techniques.

Pyrene excimer formation is another property that is highly sensitive to the formation of the first micelles around the *cmc* [8,52,54,55]. Due to the low solubility of pyrene in pure water, the efficiency of excimer formation is low at surfactant concentrations below the *cmc*. The same is true at high surfactant concentrations where there is a very low probability to find more than one pyrene molecule in a micelle. However, at the *cmc* the pyrene molecules are crowded into the first few micelles so that excimer formation is favoured and leads to a relatively strong peak in the excimer fluorescence intensity. Again, this peak does not coincide with the *cmc* itself and the quantitative analysis of the excimer fluorescence for the determination of the *cmc* has not been fully achieved yet.

## 5.1 Artículo original

Misra et al. interpret the fact that the excimer peak appears at concentrations below the *cmc* as evidence for the formation of pre-micellar aggregates and the gradual decrease of the  $I_1/I_3$ -ratio as a progressive increase of the micellar size [56]. As we will show here, both observations can be readily explained taking into account the partition equilibrium of pyrene and the finite size of the transition region around the *cmc* without the need for pre-micelles or a step-wise growth of micellar size.

A full description of the dependence of the pyrene fluorescence intensity and decay on the surfactant concentration near the *cmc* has to take into account several processes (Scheme 1): (1) the concentration of monomeric surfactant and micelles for a given total surfactant concentration (the surfactant-concentration model), (2) the partition equilibrium of pyrene between bulk water and micelles, (3) the distribution of bound pyrene among the micelles, (4) the quenching of pyrene due to excimer formation and (5) the interaction of pyrene with monomeric surfactant. We will combine these processes step by step and then apply the resulting equations to experimental data.



**Scheme 1:** Processes controlling the dependence of the pyrene fluorescence intensity and decay on the surfactant concentration near the *cmc*. Free dye ( $D_f$ ) partitions between bulk water and micelles with binding equilibrium constant  $K$ . The distribution of the bound dye ( $D_b$ ) among the micelles leads to different local dye concentrations in micelles  $M_i$  with occupancy  $i$ . Not shown here is the quenching of free dye by surfactant molecules and the formation of dye excimers in the micelles.

## 2. Theory

We distinguish three dominant fluorescent pyrene species in a micellar solution: free pyrene in the aqueous phase emitting as monomer ( $D_f$ ), and pyrene bound to micelles emitting as monomer ( $D_{bm}$ ) or emitting as excimer ( $D_{be}$ ) (see Fig. SI2 in the SI). We ignore the very weak contribution of the excimer formed by free pyrene in water.

At a given emission wavelength  $\lambda$  the total observed fluorescence intensity  $I^{(\lambda)}$  is the sum of the contributions of each of the species:

$$I^{(\lambda)} = F_f^{(\lambda)}[D_f] + F_{bm}^{(\lambda)}[D_{bm}] + F_{be}^{(\lambda)}[D_{be}] \quad (1)$$

This expression for the fluorescence intensity applies both in the so called “monomer” and in the “excimer” bands of the pyrene emission spectrum, with varying contributions of the species depending on the wavelength. In the “monomer” band the emission is dominated by free and bound monomeric ( $F_f, F_{bm}$ ) pyrene with a residual emission of the pyrene excimer. In the “excimer” band the situation is just reversed, with a strong contribution of the excimer ( $F_{be}$ ).

The task is now to obtain reasonable model equations for the concentrations of the species ( $D_f, D_{bm},$  and  $D_{be}$ ) as a function of the total surfactant concentration  $[S]_0$ . A rigorous kinetic

description of the pyrene fluorescence in detergent micelles was given by Infelta and Grätzel [5]. We combine their results with our surfactant concentration model, introduce the interaction between pyrene and surfactant monomers observed at low surfactant concentrations and derive and discuss expressions for cases relevant for the determination of the *cmc*. We also derive equations for the time dependency of pyrene fluorescence. In the following we present the steps in a systematic way.

## 2.1. Surfactant Concentration Model

The established model to calculate the concentration of micelles in solution  $[M] = ([S]_0 - cmc) / n$  from the total surfactant  $[S]_0$ , the *cmc*, and the aggregation number  $n$ , works well above the *cmc* region, but is not defined in the important region below and near the *cmc*. Recently we introduced an improved surfactant-concentration model that has proven to provide an excellent basis for a variety of derived direct properties of a surfactant solution around the *cmc* and also for the fluorescence intensity and mean translational diffusion of fluorescent probes in micellar solutions [38,39]. The model is still compact enough to be easily implemented in standard fitting software for routine data analysis.

At low  $[S]_0$  monomeric surfactants dominate whereas at high  $[S]_0$  micelles determine the properties of the solution. The transition between these regions around the *cmc* is not abrupt but gradual within a transition concentration interval with width  $\sigma$ , given by the width of a Gauss function that describes the second derivative (curvature) of  $[S_1]$  with respect to  $[S]_0$  (see SI). The smaller  $\sigma$  is the sharper is the transition between the two linear regions below and above the *cmc*. In order to facilitate the comparison of widths  $\sigma$  between surfactants with different *cmc* values, we define the relative transition width  $r$  as:

$$r = \sigma / cmc \quad (2)$$

Our model (eq. (3)) for the concentration of surfactant monomers  $[S_1]$  in a solution with total surfactant concentration  $[S]_0$  is based on the “Phillips-condition” [57] and has the form of adequately normalized sigmoidal function centred around the *cmc* and with relative transition width  $r$  and the relative concentration  $s_0 = [S]_0 / cmc$  [38,39]:

$$[S_1] = cmc \left[ 1 - \frac{A}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r \exp\left(-\frac{(s_0 - 1)^2}{2r^2}\right) + (s_0 - 1) \left( \operatorname{erf}\left(\frac{s_0 - 1}{\sqrt{2}r}\right) - 1 \right) \right) \right] \quad (3)$$

where  $A$  is the normalization constant (for small  $r < 0.5$ :  $A \approx 1$ ):

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r \exp\left(-\frac{1}{2r^2}\right) + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}r}\right)} \approx 1 \quad (r < 0.5) \quad (4)$$

The concentration of aggregated (micellized) surfactants,  $[S_m]$ , is the difference between the total concentration and that of monomeric surfactants:

$$[S_m] = [S]_0 - [S_1] \quad (5)$$

The concentration of micelles,  $[M]$ , depends on the mean aggregation number  $n$ , which is taken to be constant around the  $cmc$ :

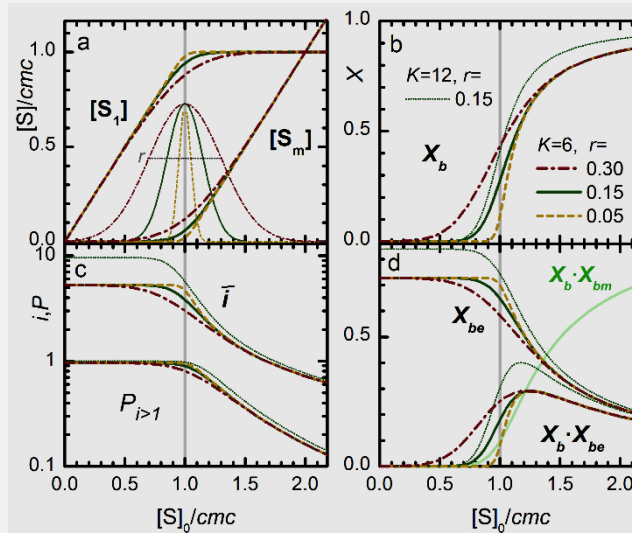
$$[M] = [S_m] / n \quad (6)$$

Fig. 1-a shows simulated data of  $[S_1]$  and  $[S_m]$  and the Gaussian function with width  $r$  calculated with the concentration model (eqs. (3) to (5)) for three typical values of the relative transition width  $r$ . Details of the surfactant concentration model (eqs. (3) to (6)) have been discussed before and are given in the SI [38].

The concentration of micelles formed already below the  $cmc$  increases with the relative transition width  $r$  (see Fig. 1-a). For typical small values of  $r$  ( $r < 0.5$ ) the fraction of micellized surfactants  $[S_m] / [S]_0$  at the  $cmc$  is  $[S_m](cmc) / cmc \approx r / \sqrt{2\pi} \approx 0.4r$  and thus the micelle concentration at the  $cmc$  is given by:

$$[M](cmc) \approx \frac{cmc}{n} \frac{r}{\sqrt{2\pi}} = \frac{1}{n} \frac{\sigma}{\sqrt{2\pi}} \approx 0.4 \frac{\sigma}{n} \quad (7)$$

The polydispersity of real surfactant samples is not explicitly taken into account but is captured by the relative transition width  $r$ . For example, the conductivity of the polydisperse surfactant mixture LAS is well described by the model with an atypically high value of  $r$  of 0.48 [38].

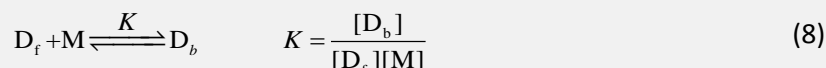


**Fig.1:** Relative concentrations  $[S_1]/cmc$ ,  $[S_m]/cmc$ , molar fractions  $X_b$ ,  $X_{be}$ ,  $X_b \cdot X_{be}$ , mean occupancy  $\bar{i}$  and occupancy probability  $P_{i>1}$  versus relative surfactant concentration  $s_0 = [S_0]/cmc$  for different values of  $r$  and  $K$  as indicated. The thin lines in panel a are Gaussians with width  $r$  and arbitrarily normalized amplitude. (Values used for the simulations:  $cmc=0.275$ ,  $n=143$ ,  $K=3300$  and  $6000$ ,  $[D]_0=1.6 \cdot 10^{-3}$ ,  $K_q=2.2$ ,  $K'_{be}=0.6$ ). The value of  $K$  is normalized to  $K \cdot cmc/n$ .

## 2.2. Binding Equilibrium

Near the  $cmc$  pyrene coexist in the aqueous phase and in the micellar pseudophase with concentrations of free and bound pyrene given by a 1:1 binding equilibrium as shown in eq.(8), with an apparent (macroscopic) binding equilibrium constant  $K$  [4,27,39,58-60]. Some authors prefer the

term “partition equilibrium”. However, the binding equilibrium constant  $K$  should not be confounded with a partition constant of a phase equilibrium [61].



The molar fractions of free ( $X_f$ ) and bound dye ( $X_b$ ) with respect to the total dye concentration  $[D]_0 = [D_f] + [D_b]$  are given by eq. (9). The fraction of bound dye  $X_b$  near the  $cmc$  is shown in Fig. 1-b for different values of  $r$  and  $K$ . Both  $K$  and  $r$  determine  $X_b$ . For a given value of  $K=6$  (thick lines) an increasing transition width  $r$  moves the onset of the transition region towards lower concentrations (to about  $cmc-2\sigma$  or  $1-2r$  in this scale) and thus also, the onset of the increase in  $X_b$ . With increasing  $r$  the concentration of dye bound to micelles already below the  $cmc$  increases. Comparing two values of  $K$  ( $K=6$  and  $K=12$ ) at the same  $r=0.15$ , the onset of the change in  $X_b$  coincides, but the change is faster for the higher  $K$ . In any case, both parameters affect  $X_b$  in a rather similar way and are therefore correlated in nonlinear fits.

$$X_f = \frac{[D_f]}{[D]_0} = \frac{1}{1 + K \cdot [M]}, \quad X_b = \frac{[D_b]}{[D]_0} = \frac{K \cdot [M]}{1 + K \cdot [M]} \quad (9)$$

### 2.3. Dye Distribution

The mean number of pyrene molecules per micelle (mean occupancy  $\bar{i}$ ) is given by the ratio of the concentrations of bound pyrene and micelles:

$$\bar{i} = \frac{[D_b]}{[M]} = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} i \cdot [M_i]}{\sum_{i=0}^{\infty} [M_i]} = K[D_f] = [D]_0 \cdot K \cdot X_f \quad (10)$$

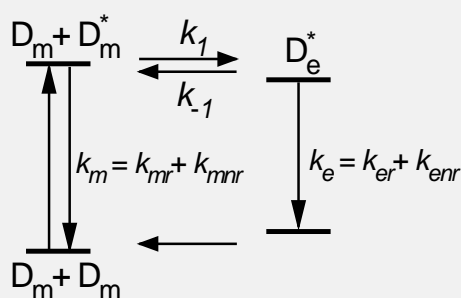
At very low surfactant concentration (and consequently low  $[M]$  and  $[D_b]$ ) the mean occupancy  $\bar{i}$  starts at a limiting value of  $\bar{i} \leq K \cdot [D]_0$ , and then decreases proportionally to the fraction of free dye  $X_f$  as the micelle concentration increases (see Fig. 1-c). Again  $K$  and  $r$  have subtly different influence on the mean occupancy  $\bar{i}$ . With a broader transition width  $r$  the mean occupancy  $\bar{i}$  decreases already at lower surfactant concentrations  $[S]$ . Higher values of  $K$  move the whole curve up to higher values of  $\bar{i}$ .

The distribution of bound pyrene among the micelles is sufficiently well described by a Poisson distribution [5,26,62-65]. The probability  $P_i$  that a micelle is occupied by  $i$  pyrene molecules (in a micelle  $M_i$ ) depends on the mean occupancy of the micelles  $\bar{i}$  as in eq. (11).

$$P_i = \frac{[M_i]}{[M]} = \frac{\bar{i}^i e^{-\bar{i}}}{i!} \quad (11)$$

Fig. 1-c shows the probability  $P_{i>1}$  that micelles are occupied by two or more dye molecules.

## 2.4. Excimer Formation



**Scheme 2:** Mechanism of the formation of excimer  $D_e^*$  with rate constants  $k_1$  and  $k_{-1}$  after excitation of the monomeric dye  $D_m$ . The deactivation rate constants of monomeric dye ( $k_m$ ) and excimer ( $k_e$ ) are sums of radiative ( $k_{mr}$ ,  $k_{er}$ ) and non-radiative rate constants ( $k_{mnr}$ ,  $k_{enr}$ ).

The differential equations describing the dynamics of the excimer formation of pyrene in micelles have been presented by Infelta et al. and other authors [5,47,52]. The equations for the case of a homogeneous pyrene solution without surfactants is presented in the SI. Here we show briefly the results in a micellar solution with bound pyrene. The detailed derivation is given in the SI.

An excited monomeric dye  $D_m^*$  can either deactivate directly to the ground state or it can form the excimer  $D_e^*$  interacting with an unexcited monomeric dye  $D_m$ , as shown in Scheme 2. The lifetimes of the excited monomer is  $\tau_m = (k_m + k_1[D_m])^{-1}$  and that of the excimer  $\tau_e = (k_e)^{-1}$ .

In a micellar solution both free and bound pyrene contribute to the observed fluorescence intensity (eq. (1)). Free pyrene in water forms only a very small fraction of excimer  $D_{fe}$ , which we neglect in our model ( $[D_{fe}] \approx 0$ ,  $[D_{fm}] \approx [D_f]$ ). This free excimer  $D_{fe}$  could, however, be easily included in the model. On the contrary, the contribution of the excimer emission from pyrene bound to micelles is important and has to be modelled carefully taking into account the local pyrene concentration given by the occupancy  $i$  of the micelles.

Without back reaction in the excited state ( $k_e \gg k_{-1}$ ), the fraction of bound excited dye in micelles  $M_i$  that decays as monomers ( $X_{bm}^{(i)}$ ) or excimers ( $X_{be}^{(i)}$ ) is given by:

$$X_{bm}^{(i)} = \frac{1}{1 + K'_{be}(i-1)} \quad X_{be}^{(i)} = 1 - X_{bm}^{(i)} \quad (12)$$

The fraction of bound excimer  $X_{be}^{(1)}$  is zero for a micelle  $M_1$  occupied by only one dye molecule and increases with higher occupation numbers. The constant  $K_{be}$  of the formation of excimer in micelles is given by the rate constants of excimer formation  $k_1$  and of the monomer deactivation  $k_m$  and is taken to be independent of the occupancy of the micelle:

$$K_{be} = \frac{k_1}{k_m} \quad K'_{be} = \frac{K_{be}}{V_m} \quad (13)$$

The volume  $V_m$  contains the dye bound to a micelle and defines the local concentration of not excited dye in a micelle  $M_i$ :  $[D_{bm}]^{(i)} = (i-1)/V_m$ . This volume is included in the constants

$K'_{be} = K_{be} / V_m$  and  $k'_1 = k_1 / V_m$ . Neither the constant  $K_{be}$  nor the volume  $V_m$  depend on  $[S]_0$  as long as the structure and the size of the micelles do not change significantly.

The total steady state fluorescence intensities  $I_{bm}$  and  $I_{be}$  of bound monomer and excimer are then given by the sum of the intensities from micelles with different occupation numbers (see SI):

$$I_{bm} = F_{bm} X_{bm} X_b [D]_0, I_{be} = F_{be} X_{be} X_b [D]_0 \quad (14)$$

with the fraction  $X_b$  of bound dye (eq. (9)), and the monomer and excimer fractions of bound dye  $X_{bm}$  and  $X_{be}$ :

$$X_{bm} = e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{1 + iK'_{be}} \frac{\bar{i}^i}{i!}, X_{be} = 1 - X_{bm} \quad (15)$$

As can be seen in Fig. 1-d the excimer fraction of bound dye  $X_{be}$  decreases with increasing surfactant concentration following the decreasing mean occupation number. However, more relevant, the overall fraction of bound dye emitting as excimer  $X_b X_{be}$  shows a sharp maximum near the *cmc*. This excimer fraction increases at the beginning of the transition region as the first bound dye appears (increasing  $X_b$ , high  $\bar{i}$ ), passes through a maximum near the *cmc* and then decays as  $\bar{i}$  gets smaller. The peak in  $X_b X_{be}$  results from the competition of two effects. On the one hand, the fraction of bound dye  $X_b$  increases as the first micelles appear; on the other hand, the probability that this bound dye emits as excimer ( $X_{be}$ ) decreases with the surfactant concentration since it is distributed among more micelles with decreasing occupancy  $\bar{i}$ . The form of  $X_b X_{be}$  curve and the position of its maximum depend sensitively and in a complex manner on both on  $r$  and  $K$ .

It is worth noting, that the peak in this curve does not simply results "from the passage of  $\bar{i}$  through a maximum after which all the pyrene in the system is solubilized in micelles", as previously reported [66]. The occupancy  $\bar{i}$  has no maximum and, more important, the fraction of bound (solubilized) pyrene  $X_b$  is still far from reaching saturation ( $X_b = 1$ ) at the maximum of the  $X_b X_{be}$  curve (see Fig. 1-d). Full solubilisation of pyrene is only reached asymptotically at high surfactant concentrations that depend, of course, on the value of  $K$  (see also Figs. 3, 5, 6)

## 2.5. Pyrene-Surfactant Quenching

The emission of dyes may be quenched by surfactant molecules and their counterions [60]. Pyrene is a neutral probe and does not show the complex behaviour observed for charged dyes and ionic surfactants, as for example for the cationic dye Rhodamine 123 [60]. In this section we describe the observed decrease of the pyrene fluorescence below the *cmc* as a static and/or dynamic quenching process. We discuss the quenching process in section 3.3 on the basis of steady-state and time-resolved fluorescence data.

The contribution to the fluorescence intensity  $I_f^{(\lambda)}$  of the unquenched free dye can be expressed by the fraction of *not quenched dye*  $X_{nq}$  and the total concentration of free monomeric dye  $[D_f] = X_f [D]_0$ :

$$I_f^{(\lambda)} = F_f^{(\lambda)} X_{nq} X_f [D]_0 \quad (16)$$

If both static and dynamic quenching occur the fraction  $X_{nq} = \left( (1 + K_{qs} [S_1]) (1 + K_{qd} [S_1]) \right)^{-1}$  is second order in  $[S_1]$  with the quenching constants  $K_{qs}$  and  $K_{qd}$  of static and dynamic quenching, respectively.

In the case that one of the two quenching processes dominates a first order fraction with quenching constant  $K_q$  is sufficient:

$$X_{nq} = \left( 1 + K_q [S_1] \right)^{-1} \quad (17)$$

The nature of the dominant quenching process has to be determined from additional information such as time-resolved fluorescence data.

Above the transition region the fraction becomes constant  $X_{nq} = (1 + K_q \cdot cmc)^{-1}$ .

The same quenching formalism applies to the pyrene species bound to micelles,  $D_{bm}$  and  $D_{be}$ . However, the quenching of these species depends on the *local* concentration of surfactant and on the microviscosity within the micelles. The size and structure of micelles do not significantly change within the concentration range studied here, and, therefore, within a micelle, both the quenching constant  $K_q$  and the local surfactant concentration  $[S_m]_{local} \approx n / V_m$  should be independent from the total surfactant concentration. Then, the fraction of quenched bound dye is constant and can be included in the constants  $F_{bm}$  and  $F_{be}$ .

## 2.6. Steady-State Fluorescence Intensity

Finally we can express the overall observed fluorescence intensity  $I^{(\lambda)}([S]_0)$  as a function of the total surfactant concentration substituting in eq. (1) the individual contributions deduced above:

$$I^{(\lambda)} = I_{f,nq}^{(\lambda)} + I_{bm}^{(\lambda)} + I_{be}^{(\lambda)} = F_f^{(\lambda)} [D]_0 \left( X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(\lambda)} X_b X_{bm} + q_{be,f}^{(\lambda)} X_b X_{be} \right) \quad (18)$$

Here we define brightness ratios  $q$  of the fluorescence intensities of bound monomer and excimer with respect to free dye at a given wavelength  $\lambda$  (see Fig.2-a):

$$q_{bm,f}^{(\lambda)} = \frac{F_{bm}^{(\lambda)}}{F_f^{(\lambda)}}, \quad q_{be,f}^{(\lambda)} = \frac{F_{be}^{(\lambda)}}{F_f^{(\lambda)}} \quad (19)$$

Together with the concentration model of eqs (3)-(6) eq. (18) describes the fluorescence intensity of pyrene in micellar solutions as a function of total surfactant concentration with model parameters  $cmc$ ,  $r$ ,  $n$ ,  $K$ ,  $F_f^{(\lambda)}$ ,  $q_{bm,f}^{(\lambda)}$ ,  $q_{be,f}^{(\lambda)}$ ,  $K_q$ ,  $K'_{be}$ , and  $[D]_0$ . The total dye concentration  $[D]_0$  and the

aggregation number  $n$  are usually known. The fluorescence intensity of free dye in pure water  $F_f^{(\lambda)}[D]_0 = I^{(\lambda)}([S]_0 = 0) \equiv I_f^{(\lambda)}$ , and the ratio  $q_{bm,f}^{(\lambda)}$  can be determined from the intensities at zero and at high micelle concentrations, respectively. The other parameters ( $cmc$ ,  $r$ ,  $K$ ,  $K_q$ ,  $K'_{be}$ , and  $q_{be,f}^{(\lambda)}$ ) have to be determined by nonlinear fit.

Traditionally not the absolute intensity of the pyrene emission is analysed but the *spectral ratio*  $SR$  at two wavelengths,  $\lambda_1$  and  $\lambda_2$ , for example the monomer/monomer ( $I_{II}/I_{III}$ ) ratio (“py-scale” [42,44]) or excimer/monomer ratios. We distinguish here between the “spectral ratio”  $SR^{(2,1)} = I^{(2)}/I^{(1)}$  of the fluorescence intensities at two wavelengths of the same species and the “brightness ratio”  $q$  of the intensities of two different species (eg. free and bound) at the same wavelength.

With eq. (18) we obtain for the spectral ratio at  $\lambda_1$  and  $\lambda_2$ :

$$SR^{(2,1)} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} = \frac{F_f^{(2)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(2)} X_b X_{bm} + F_{be}^{(2)} X_b X_{be}}{F_f^{(1)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(1)} X_b X_{bm} + F_{be}^{(1)} X_b X_{be}} \quad (20)$$

Neglecting the residual excimer emission in the monomer band and vice versa, we get the following two expressions for the spectral monomer-monomer and excimer-monomer ratios (see SI):

$$\begin{aligned} SR_m^{(2,1)} &= \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}} \\ SR_e^{(e,m)} &= \frac{I^{(e)}}{I^{(m)}} \approx \frac{SR_f^{(e,m)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(e,m)} q_{bm,f}^{(m)} X_b X_{bm} + q_{be,f}^{(e,m)} X_b X_{be}}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(m)} X_b X_{bm}} \end{aligned} \quad (21)$$

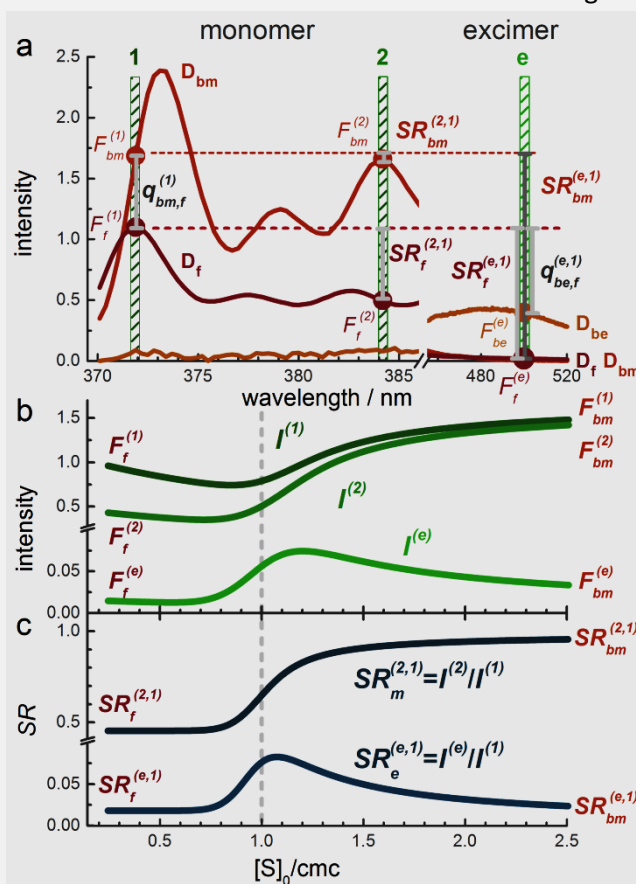
The limiting values of the monomer-monomer ratio  $SR_m^{(1,2)}$  are the spectral ratios of free pyrene,  $SR_f^{(2,1)}$  at  $[S]_0 = 0$ , and of bound monomeric pyrene,  $SR_{bm}^{(2,1)}$  at  $[S]_0 \gg cmc$  (see Fig.2):

$$\begin{aligned} SR_f^{(2,1)} &= \frac{F_f^{(2)}}{F_f^{(1)}} & SR_{bm}^{(2,1)} &= \frac{F_{bm}^{(2)}}{F_{bm}^{(1)}} \\ SR_f^{(e,m)} &= \frac{F_f^{(e)}}{F_f^{(m)}} & SR_{bm}^{(e,m)} &= \frac{F_{bm}^{(e)}}{F_{bm}^{(m)}} \\ q_{be,f}^{(e,m)} &= \frac{F_{be}^{(e)}}{F_f^{(m)}} \end{aligned} \quad (22)$$

At very low pyrene concentrations the excimer formation can be neglected in eq. (21) ( $X_{bm} \approx 1$ ,  $X_{be} \approx 0$ ). Below the transition region  $SR_m^{(2,1)} \approx SR_f^{(2,1)}$ , independently of the quenching fraction  $X_{nq}$ . Above the transition region  $X_{nq}$  is constant. With the constant  $c = q_{bm,f}^{(1)} K(1 + K_q \cdot cmc)$  and not too high values of  $r$  we get a further simplified equation for  $SR_m^{(2,1)}$  (see SI):

$$SR_m^{(2,1)} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} K[M]}{X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} K[M]} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} + SR_{bm}^{(2,1)} c[M]}{1 + c[M]} \quad (23)$$

Around the *cmc* both the absolute intensities  $I^{(\lambda)}$  and the spectral ratios  $SR_m^{(2,1)} = I^{(2)}/I^{(1)}$  and  $SR_e^{(e,m)} = I^{(e)}/I^{(m)}$  depend sensitively on the interplay between the binding equilibrium constant  $K$  and the occupancy  $i$  (see Fig.2-b and c). The intensities and the spectral ratios follow the fractions  $X_f$ ,  $X_b \cdot X_{bm}$ , and  $X_b \cdot X_{be}$  discussed above (Fig. 1). Note that the curves of the intensities and those of the spectral ratios are significantly different, with different positions of the inflection points of the monomer curves and of the peaks of the excimer signals. The *cmc* does not correspond to any of these special points, but its relative position depends again on the values of  $K$  and  $r$ . It is also important to note, that neither of these curves has the exact form of a sigmoidal Boltzmann function.



**Fig.2:** a) Detail of the pyrene spectrum with the spectral parameters used in the text. b) Simulated fluorescence intensity  $I^{(\lambda)}([S]_0)$  of eq. (18) at three wavelengths 372 nm (1), 384 nm (2), and 500 nm (e) as indicated in a). c) simulated spectral ratios  $SR_f^{(2,1)}$  and  $SR_{bm}^{(2,1)}$  of eq. (21) at the three wavelength 1,2, and e as indicated in a).

## 2.7. Time-Resolved Fluorescence Intensity

The time dependence of the pyrene fluorescence had been derived by Tachiya, by Selinger and Watkins, and by Infelta et al. [5,47,50,52,67]. We summarize the main results in our nomenclature

and combine them with our surfactant concentration model. The detailed derivation can again be found in the SI.

The observed time dependent fluorescence intensity is the sum of the contributions ( $i_{bm}^{(i)}(t)$ ,  $i_{be}^{(i)}(t)$ ) from micelles  $M_i$  with different occupation numbers  $i$ :

$$\begin{aligned} I_{bm}(t) &= \sum_{i=1}^{\infty} i_{bm}^{(i)}(t) = F_{bm} [D]_b e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{\bar{i}^i}{i!} \exp(-(k_m(1+K'_{be}i)t) \\ I_{be}(t) &= \sum_{i=1}^{\infty} i_{be}^{(i)}(t) = F_{be} [D]_b e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{\bar{i}^i}{i!} \frac{K'_{be}i}{1+K'_{be}i-k_e/k_m} (\exp(-k_e t) - \exp(-(k_m(1+K'_{be}i)t)) \end{aligned} \quad (24)$$

The fluorescence intensity in the monomer band  $I_{bm}(t)$  can be solved analytically ( $K'_{be} = K_{be} / V_m$ ,  $k'_1 = k_1 / V_m$ ):

$$I_{bm}(t) = F_{bm} [D_b] \exp\left(\bar{i} \left( \exp(-K'_{be} k_m t) - 1 \right) - k_m t\right) = F_{bm} [D_b] \exp\left(\bar{i} \left( \exp(-k'_1 t) - 1 \right) - k_m t\right) \quad (25)$$

The analytical expression for the excimer intensity  $I_{be}(t)$  is less useful for numerical applications (see SI). In fitting functions it is more reliable to calculate the sums in eq.(24) up to some reasonable occupation number  $i$ .

Note that  $I_{bm}(t)$  is not monoexponentially with a lifetime  $\tau_m = (k_m + k_1[D_m])^{-1}$  as one would expect in a homogeneous solution. The excimer formation with  $k_1[D_{bm}^{(i)}]$  depends on the local dye concentration  $[D_{bm}^{(i)}]$ , which varies according to the distribution of the dye among in the micelles. In each micelle  $M_i$  the excited dye decays with a different lifetime  $\tau_{bm}^{(i)} = (k_m + k_1[D_{bm}^{(i)}])^{-1}$ . In higher occupied micelles the monomer emission is rapidly quenched due to the effective excimer formation leading to fast decays. At  $t=0$  the decay starts with a rate constant  $k_m + k_1(\bar{i}/V) = k_m(1+K'_{be}\bar{i})$ . At longer times ( $K'_{be}k_m t \gg 1$ ) finally only the emission from micelles  $M_1$  with a single excited dye is observed that decays monoexponentially with  $\tau_{bm}^{(1)} = (k_m)^{-1}$ . The time dependence in eq. (25) can be easily confounded with a double exponential decay with  $\tau_{bm}^{(1)} = (k_m)^{-1}$  and a short lifetime, which has no explanation in a homogeneous system (see Fig. SI1 in SI).

The monomer decay  $I_{bm}(t)$  in eq. (25) is furthermore strongly dependent on the micellar concentration. First, trivially, because the concentration of bound dye  $[D_b]$  depends on  $[M]$  (eq. (9)). Second, and more important, because the mean occupancy  $\bar{i}$  in the exponent of  $I_{bm}(t)$  varies with both  $[D_b]$  and  $[M]$  (eq.(10)). At high micellar concentrations ( $[S]_0 \gg cmc$ ) the mean occupancy tends to zero ( $\bar{i} = [D_b] / [M] \rightarrow 0$ ) and  $I_{bm}(t)$  decays monoexponentially with  $k_m$ . At very low micellar concentrations the mean occupancy is limited by  $\bar{i} \leq [D]_0 \cdot K$  (eq. (10)), although the amplitude of the decay vanishes. The expression of eq. (25) can be used directly as fitting function for  $I_{bm}(t)$ .

The excimer fluorescence intensity  $I_{be}(t)$  is zero at time zero,  $I_{be}(t=0) = 0$  and increases with a complex time dependent rise time given by that of the monomer decay as discussed before. At long

times the decay is monoexponential with  $k_e$ . However, at intermediate times the intensity curve follows a more complex function than the difference between excimer and monomer decays.

So finally the time resolved fluorescence emission  $I(t)$  is given by the sum of the contributions of free dye ( $\tau_f$ ), bound monomer  $I_{bm}(t)$  (eq. (25)), and bound excimer  $I_{be}(t)$  (eq.(24)). Additionally a small contribution of surfactant fluorescence (for example in TX100) and/or fluorescent impurities with typically short lifetime ( $\tau_s$ ) is added. The amplitudes  $A_x$  contain all constant pre-exponential factors.

$$I(t) = A_s e^{-t/\tau_s} + A_f e^{-t/\tau_f} + A_{bm} I_{bm}(t) + A_{be} I_{be}(t) \quad (26)$$

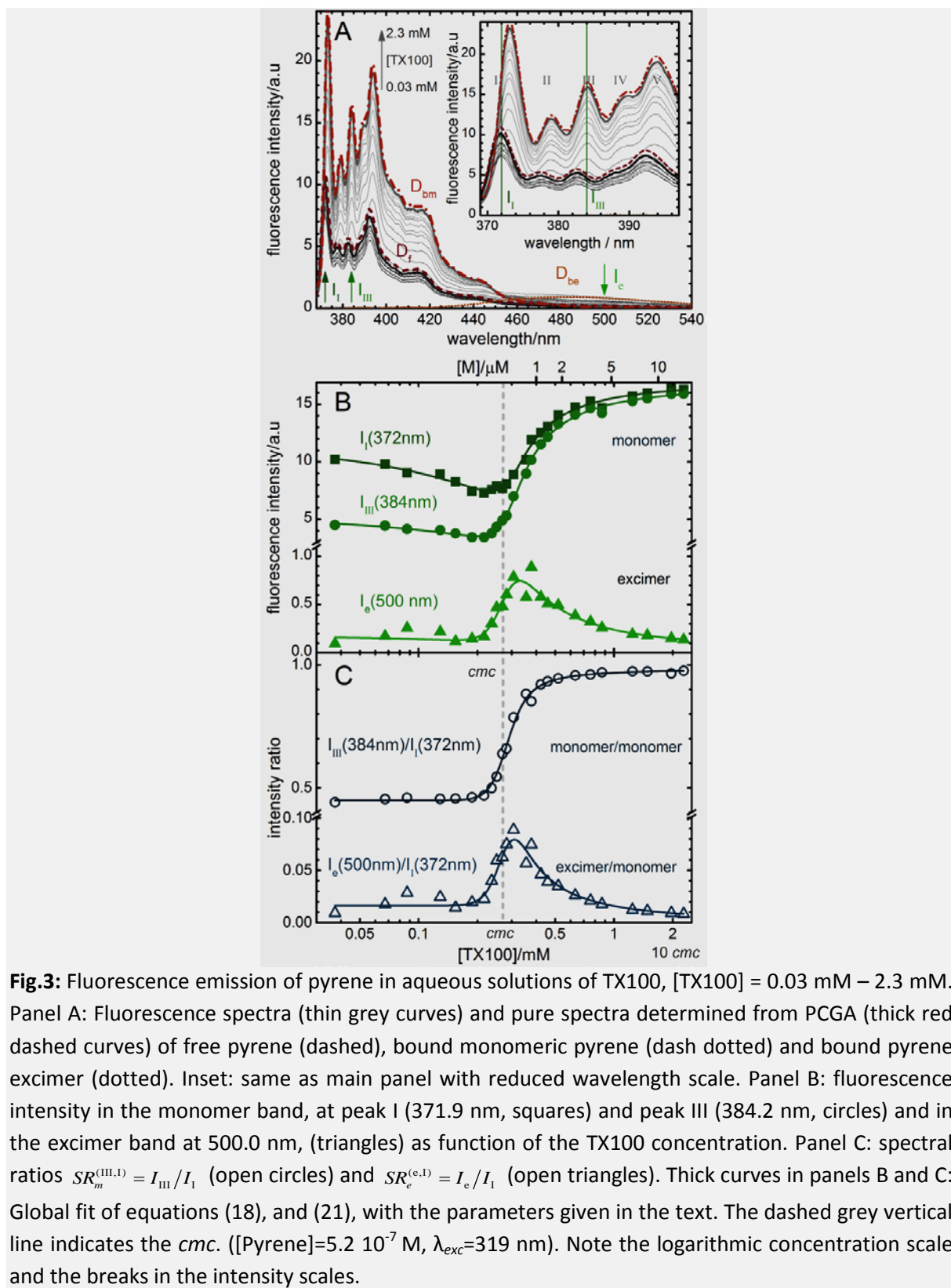
### 3. Results and Discussion

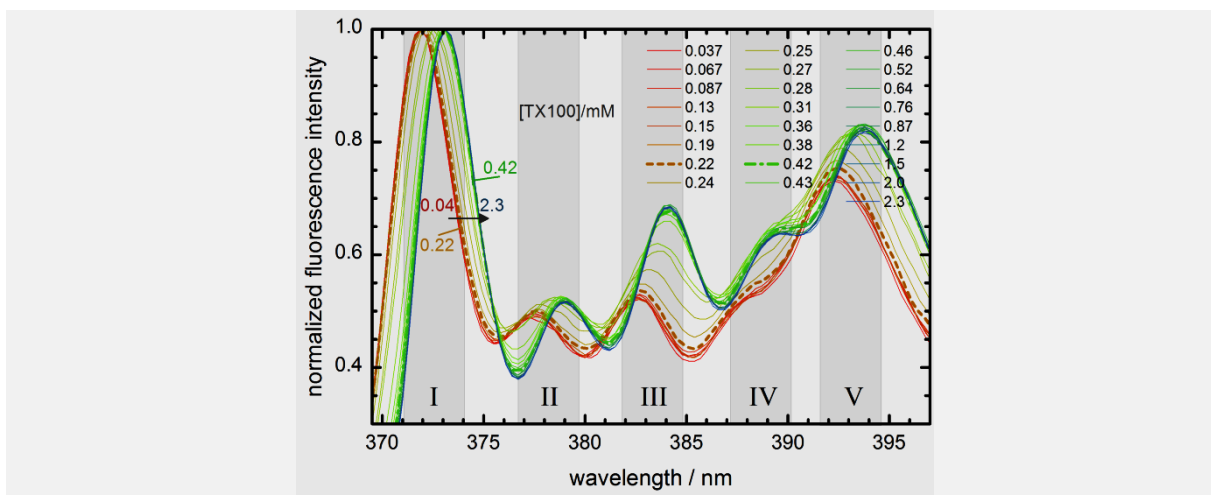
#### 3.1. Steady-State Fluorescence Intensity

Fig.3 shows spectra and profiles of the fluorescence intensity for pyrene in aqueous solutions of increasing concentrations of TX100. The spectrum of pyrene at the lowest TX100 concentration (black curve in panel A, [TX100] = 0.03mM) presents the known vibronic structure in the monomer band between 370 and 450 nm and no measurable excimer emission above 480 nm. At TX100 concentrations up to about 0.2 mM the fluorescence intensity decreases without significant change in the shape of the spectra. Above 0.2 mM a red-shift of the monomer band of nearly 2 nm and a strong increase of its intensity is observed. Around 0.3 mM a small and broad excimer emission appears with a maximum at 500 nm. The dependence of the fluorescence intensity in the first ( $I_I$  at 372 nm) and in the third vibronic band ( $I_{III}$  at 384 nm) and in the excimer band ( $I_e$  at 500 nm) on [TX100] is shown in panel B of Fig. 3. Below the *cmc* the fluorescence intensity in the monomer band ( $I_I$  and  $I_{III}$ ) decreases and reaches a minimum around 0.22 mM. Near the *cmc* this intensity increases strongly until it reaches about twice the initial value at concentrations above 1 mM.

In the excimer band ( $I_e$ ) the fluorescence emission is nearly zero below the *cmc*. Around the *cmc* the excimer intensity increases sharply and then decreases more slowly at higher concentrations. The minimum in the monomer emission does not coincide with the maximum in the excimer emission, and neither of them matches the value of the *cmc* of TX100 of about 0.26-0.27 mM [26,39].

As can be seen in the inset of Fig.3-a and in the normalized spectra (Fig.4) the spectral shift and the change in the shape of the spectra occurs in a narrow TX100 concentration interval around the *cmc*. Below about 0.2mM the intensity decreases, but the spectra do not change their shape (Fig.4, dashed orange curve)). This indicates that in this concentration interval the observed emission comes from the same species, namely free pyrene monomer, and that the observed quenching leads to a non-fluorescent species. Around the *cmc*, between 0.2 mM and 0.4 mM (Fig.4, dashed dotted green curve), follows a fast increase in intensity accompanied by a strong red shift in peak positions and a significant change in the shape of the spectrum. These spectral changes can only be explained by the contribution of at least two fluorescent species that are assigned to free and bound monomer. Above 0.4 mM the shape and position of the spectra stay again mostly constant.





**Fig.4:** Normalized spectra of pyrene in TX100 solutions as shown in Fig. 3. The TX100 concentration increases from 0.04 mM (red) to 2.3 mM (blue), with 0.22 mM (dash, orange) and 0.42 mM (dashed dotted, green). Roman numbers and grey rectangles refer to the vibronic peaks in the pyrene spectrum.

Principal Component Analysis (PCA) [68,69] of the series of spectra confirms the presence of three fluorescent species in the concentration range studied here (see Figs. SI5 – SI7 in the SI). We assign them to free monomeric pyrene,  $D_f$ , bound monomeric pyrene,  $D_{bm}$ , and bound pyrene emitting as excimer,  $D_{be}$ . The observed spectra (or fluorescence intensities at given wavelength) are the sum of the contributions of these three species as given by eq (18). At low [TX100] only free dye  $D_f$  is present. The addition of TX100 quenches the fluorescence of free pyrene possibly due to formation of non-fluorescent surfactant-pyrene complexes (see section 3.3). Therefore the fraction of not quenched dye,  $X_{nq}$ , decreases with increasing  $[S_1]$  (eq. (17)) until the  $cmc$  is reached (see Fig.6-b). Above the  $cmc$  the value of  $X_{nq}$  stays constant since the concentration of monomeric surfactant does not vary ( $[S_1] = cmc$ ).

At the onset of the formation of micelles, just before the  $cmc$ , a further small decrease in monomer emission is observed, which is not explained by the quenching process. In parallel a sharp increase in the excimer emission,  $I_e$ , is found. Both changes are due to the formation of pyrene excimer in higher occupied micelles near the  $cmc$  that do not emit in the monomer region.

As more and more pyrene molecules bind to micelles the emission in the monomer band is dominated by the higher emissive bound pyrene monomers, whereas the emission in the excimer band vanishes slowly as bound pyrene is distributed among the increasing concentration of micelles. Both the binding equilibrium and the distribution take place within a rather wide concentration interval from just below the  $cmc$  up to a multiple of it (note the logarithmic concentration scale in Fig. 3).

Table 1.

Results of global fits to the experimental data as indicated in the text.

	TX100	SDS
$cmc / 10^3 \text{ mol } \ell^{-1}$	0.275±0.005	8.1±0.1
$r$	0.16±0.01	0.07±0.03
$K / 10^3 \text{ mol } \ell^{-1}$	3300±200	190±40
$K_q / 10^3 \text{ mol } \ell^{-1}$	2.2±0.2	0.23±0.03
$K'_{be} = K_{be} V_m^{-1} / 10^3 \text{ mol}^{-1}$	0.6±0.3	3±1
$n$	143	64
$\tau_f / 10^{-9} \text{ s}$	124	127
$k_m / 10^6 \text{ s}^{-1}$ ( $\tau_m / 10^{-9} \text{ s}$ )	4.3 (232)	6.3 (160)
$k_e / 10^6 \text{ s}^{-1}$ ( $\tau_e / 10^{-9} \text{ s}$ )	9.8 (102)	34 (30)
$k'_1 = k_1 V_m^{-1} / 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	2.4	20
$\tau_s / 10^{-9} \text{ s}$	5	4
$SR_f^{(2,1)} / SR_{bm}^{(2,1)} / q_{bm,f}^{(1)} / q_{be,f}^{(e)}$ [a]	0.45/0.98/1.5/ 28	0.44/0.91/1.4/46
$SR_f^{(e,1)} / SR_{bm}^{(e,1)} / q_{be,f}^{(e,1)}$ [a]	0.016/0.004/0.37	0.020/.004/0.85
$[M](cmc)^{[b]} / 10^{-6} \text{ mol } \ell^{-1}$	0.12	3.5

[a]  $\lambda_1=372\text{nm}$  (peak I),  $\lambda_2=384\text{nm}$  (peak III),  $\lambda_e=500\text{nm}$  (excimer)

[b] Micelle concentration at the  $cmc$  estimated from eq.(7).

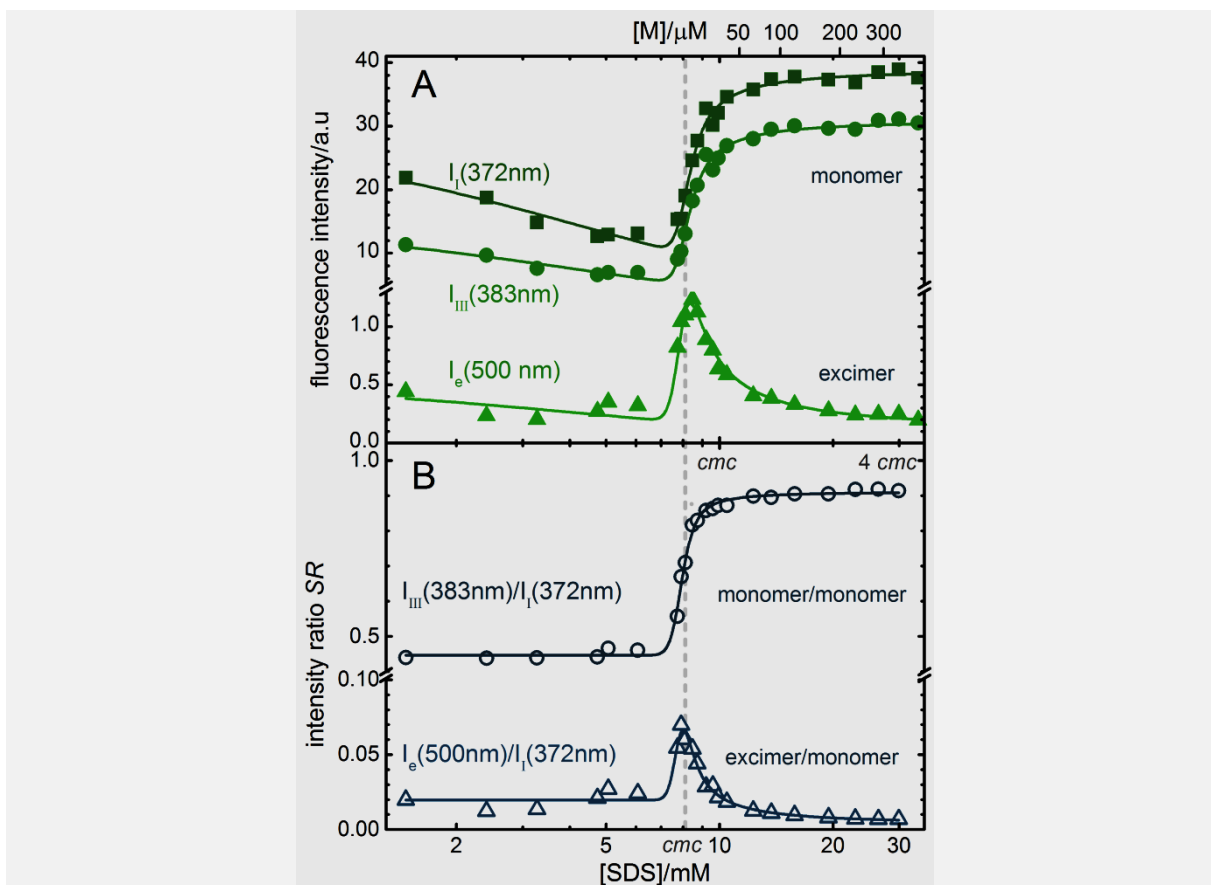
The surfactant concentration dependence of the pyrene fluorescence emission both in the monomer and in the excimer bands are very well described by the model of eq. (18) together with the concentration model of eq. (3). Global fits at three selected wavelength, 371.9 nm, 384.2 nm and 500.0 nm, are shown in Fig.3-b. Global fits of the whole series of spectra by PCGA are given in the SI. The best fit parameter values are given in Table 1. The corresponding fluorescence intensity ratios at 371.9 nm, 384.2 nm and 500.0 nm are  $q_{bm,f}^{(\lambda)}=1.49$ , 3.26 and 0.42, and  $q_{be,f}^{(\lambda)}=0$ , 0, 27, respectively. In the monomer bands the fit reproduces excellently the quenching at low TX100 concentration, the small “dip” just below the  $cmc$  due to the formation of excimer and then the sharp increase of the intensity after the  $cmc$ . Also the excimer band is very well described, both the sharp increase around the  $cmc$  and the approximately exponential decrease at higher concentrations. The fit determines a value of the  $cmc$  that is in very good agreement with that determined from the direct TX100 absorption ( $cmc = 0.270 \text{ mM}$ ) [39] and with other literature values [26]. The width of the transition region ( $r$ ) is higher than the value  $r=0.11$  obtained from the TX100 absorption but comparable to that determined for the exchange of other dyes with TX100- micelles [39]. The value of the binding equilibrium constant  $K = 3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  is very high and confirms the value published before [39].

Fig.3-c shows the spectral ratio  $SR_m^{(III,I)} = I_{III}/I_I$  of the monomer intensities in peak I at 371.9 nm and peak III at 384.2 nm and the excimer-monomer ratio  $SR_e^{(e,1)} = I_e/I_I$  between the excimer emission at 500 nm and the monomer peak I. The monomer ratio  $SR_m^{(III,I)}$  is flat below the transition

## 5.1 Artículo original

region up to about 0.2 mM, increases sharply between 0.2 and 0.4 mM and stabilizes at higher concentrations. The excimer ratio  $SR_e^{(e,1)}$  shows a sharp increase just below the  $cmc$  followed by a peak and a less pronounced decay at higher concentrations. The concentration dependencies of these ratios are similar to those of the corresponding absolute intensities, but with some important differences (see Fig. 3-b and c). In the monomer ratio the effect of the pyrene-surfactant quenching is eliminated as discussed above (eq.(23)). Also the effect of the quenching due to excimer formation is mostly compensated so that the ratio increases much faster above the  $cmc$  than the corresponding intensities. Similarly, the peak in the excimer ratio is more symmetric than that of the intensity. The simpler form of the spectral ratios comes at a price, the loss of information. The spectral ratios are well fitted with eq. (21) using the parameters determined from the absolute intensities (Table 1). However, the fit of eq. (21) to the monomer ratio alone does not allow one to determine all parameters ( $cmc$ ,  $r$ ,  $K$ ,  $d_{bm,f}^{(1)}$ , and  $K_q$ ) independently due to the strong parameter correlation. This is not the case for fits of the absolute intensities, especially for simultaneous (global) fits at several wavelengths (peaks). Practical aspects of the determination of the  $cmc$  from pyrene spectral ratios will be subject of a following contribution.

The pyrene emission in solutions with increasing SDS concentrations behaves similarly to that of pyrene in TX100 solutions (Fig. 5). The main difference is the apparently more pronounced change near the  $cmc$  of the monomer intensities and of the monomer spectral ratio and the sharper peak of the excimer signals. Global fits of the model of eq. (18) together with the concentration model of eq. (3) at three selected wavelengths, 372 nm, 383 nm and 500 nm, are shown in Fig.5–a. The best fit parameter values are given in Table 1. The corresponding fluorescence intensity ratios at 372 nm, 383 nm and 500 nm are  $d_{bm,f}^{(\lambda)} = 1.36, 2.09$  and  $0.28$  and  $d_{be,f}^{(\lambda)} = 0, 0, 46$ , respectively. The spectral ratios in the monomer and in the excimer bands are also well reproduced by eq. (21) using the parameters determined from the absolute intensities (Table 1). The concentration dependencies of selected parameters is shown in Fig. 6 both for TX100 and for SDS. Again, the  $cmc$  does not coincide with characteristic points of the experimental data. It lies now clearly to the right of the mid-point of the monomer ratio and nearly in the middle of the excimer peak. The fit gives a  $cmc$  value which coincides with that determined from electrical conductivity [38]. The value of  $r$  agrees with that determined before ( $r = 0.11$ ) but has a high uncertainty due to the low data quality just before the  $cmc$ .



**Fig. 5:** Fluorescence emission of pyrene in aqueous solutions of SDS,  $[\text{SDS}] = 1.5 \text{ mM} - 33 \text{ mM}$ . Panel A: fluorescence intensity in the monomer band at peak I (372 nm, squares) and peak III (383 nm, circles) and in the excimer band at 500 nm, (triangles) as function of the SDS concentration. Panel B: fluorescence intensity ratios (spectral ratios)  $SR_m^{(III,I)} = I(372\text{nm})/I(383\text{nm})$  (open circles) and  $SR_e^{(e,I)} = I(500\text{nm})/I(372\text{nm})$  (open triangles). Thick curves in panels B and C: Global fit of equations (18), (21) with the parameters given in the text. The dashed grey vertical line indicates the *cmc*. ( $[\text{Pyrene}] = 1.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ,  $\lambda_{exc} = 319 \text{ nm}$ ). Note the logarithmic concentration scale and the breaks in the intensity scales.

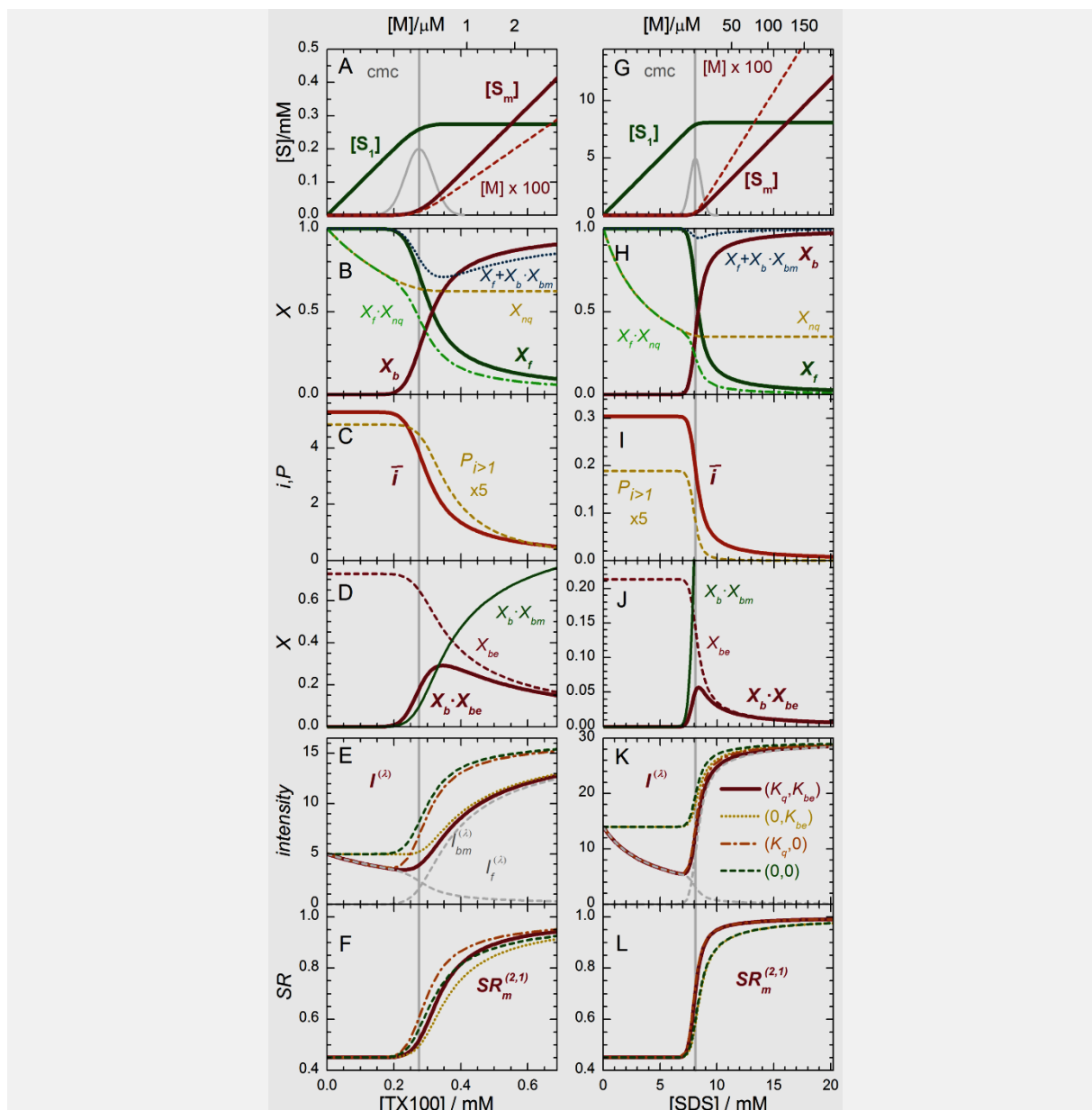
We compare the fluorescence properties of pyrene in TX100 and SDS in Fig. 6 that covers the same concentration interval of  $[S]_0 = 0 - 2.5 \text{ cmc}$  for both surfactants. The first row of panels (a, g) show the surfactant concentrations  $[S_1]$ ,  $[S_m]$ , and  $[M]$  versus the total surfactant concentration  $[S]_0$  (lower scale) and  $[M]$  (upper scale). Note the much higher micellar concentrations in the case of SDS. The second row (panels b, h) shows the fractions of free ( $X_f$ ) and bound ( $X_b$ ) pyrene, the fraction of not quenched free dye ( $X_f X_{nq}$ ), and the fraction of monomeric dye ( $X_f + X_b X_{bm}$ ). The mean occupancy  $\bar{i}$  and the probability double or higher occupancy ( $P_{>1}$ ) are plotted in panels c and d. In the fourth row (panels d, j) the excimer fraction ( $X_{be}$ ), the fraction of bound excimer ( $X_b X_{be}$ ), and the fraction of bound monomer ( $X_b X_{bm}$ ) are compared. Note the relatively high fraction of bound excimer up to several multiples of the *cmc*. Finally, the lower two rows show the influence of quenching and

## 5.1 Artículo original

excimer formation on the fluorescence intensity ( $I$ ) and the spectral monomer ratio ( $SR_m$ ) (see below).

Special attention deserves the value of the equilibrium constant  $K_{SDS} = 190 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  of pyrene in SDS micelles, which is 17 times smaller than the corresponding value in TX100 ( $K_{TX100} = 3300 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). First, it is important to note that the affinity (solubility, partition) of pyrene to micelles depends strongly on the surfactant. The frequently found assumption of an “infinite” affinity to micelles has to be checked in each case. Second, the smaller  $K_{SDS}$  would be apparently in contradiction with the faster changes observed in the SDS data as compared to TX100 that seem to hint to a higher binding constant (compare Figs. 3-b and 5-a). This is of course a question of scales. The equilibrium constant  $K$  is defined as a function of the micelle concentration  $[M]$  (eq. (8)), but the experimental data are represented versus the total surfactant concentration  $[S]_0$ . Due to the much higher  $cmc$  (and the lower  $n$ ) the SDS micelle concentration  $[M]$  increases much faster with  $[S]_0$  than that of TX100. For example, at  $[S]_0 = 2 \text{ cmc}$ , we have  $[M] \approx 1.8 \text{ }\mu\text{M}$  for TX100, but  $[M] \approx 127 \text{ }\mu\text{M}$  for SDS, 70 times higher ( $[M](2cmc) \approx ([S]_0 - cmc)/n = cmc/n$ , see the micelle concentration scale at the upper part of Figs. 3-b and 5-a). The complex dependence of  $[M]$  on  $[S]_0$  near and above the  $cmc$  makes it difficult to interpret the fluorescence data in a representation versus  $[S]_0$ . And finally, for this data the  $cmc$  is smaller than the value determined from the fit of a Boltzmann function to the ratio  $SR_m^{(III,1)} = I_1/I_{III}$ , defined as  $x_0 + 2\Delta x = 8.39 \text{ mM}$  applying the criterion given by Aquiar et al. (see Fig. SI3 in the SI) [30]. The fits with the model equations presented here recover consistent values of the  $cmc$  without the need for additional assumptions or classifications.

It is important to be aware of the strong dependence of the absolute intensities and the spectral ratios on the processes of quenching and excimer formation. The lowest two rows of panels in Fig. 6 show simulated curves of the fluorescence intensity  $I^{(2)}([S]_0)$  (eq. (18)) and the spectral ratio  $SR_m^{(2,1)}$  (eq. (21)) with the data of Table 1, but suppressing the effect of quenching ( $K_q = 0$ , orange dotted line), or of excimer formation ( $K_{be} = 0$ , orange dashed dotted line), or both (green dashed line) (see also Fig. SI4 in the SI). Due to the formation of excimer (with  $X_b \cdot X_{be}$ , panels D and J) the monomer emission is partially quenched in the transition region (see the fraction of monomeric dye ( $X_f + X_b \cdot X_{bm}$ ) in panels b and h) and, therefore, the onset of the monomer intensity curve is strongly displaced towards higher concentrations as compared to the case without excimer formation. Also the spectral ratio is affected with opposite effects of quenching and excimer formation. The dependence of  $I$  and  $SR_m$  on the excimer formation makes them also sensitively dependent on the total pyrene concentration. It is obvious that any method used to extract the  $cmc$  from these curves needs to take into account these different effects. It is not surprising that graphical analysis methods lead to differing  $cmc$  values depending on the experimental conditions and on the nature of the surfactant.

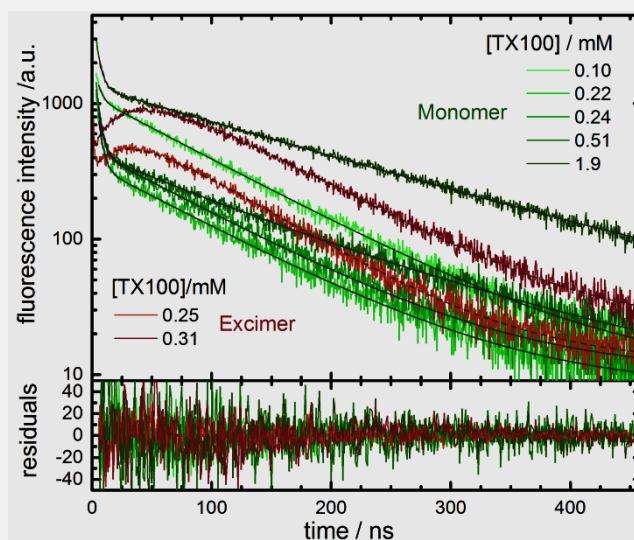


**Fig.6:** Surfactant concentrations  $[S_1]$ ,  $[S_m]$ ,  $[M]$  molar fractions  $X_f$ ,  $X_{nq}$ ,  $X_b$ ,  $X_{be}$ , mean occupancy  $\bar{i}$ , occupancy probability  $P_{i>1}$ , fluorescence intensity, and spectral ratio versus surfactant concentration  $[S_0]$  with the values of  $K$  and  $r$  determined for TX100 (panels A-F) and SDS (panels G-L) (see Table 1).

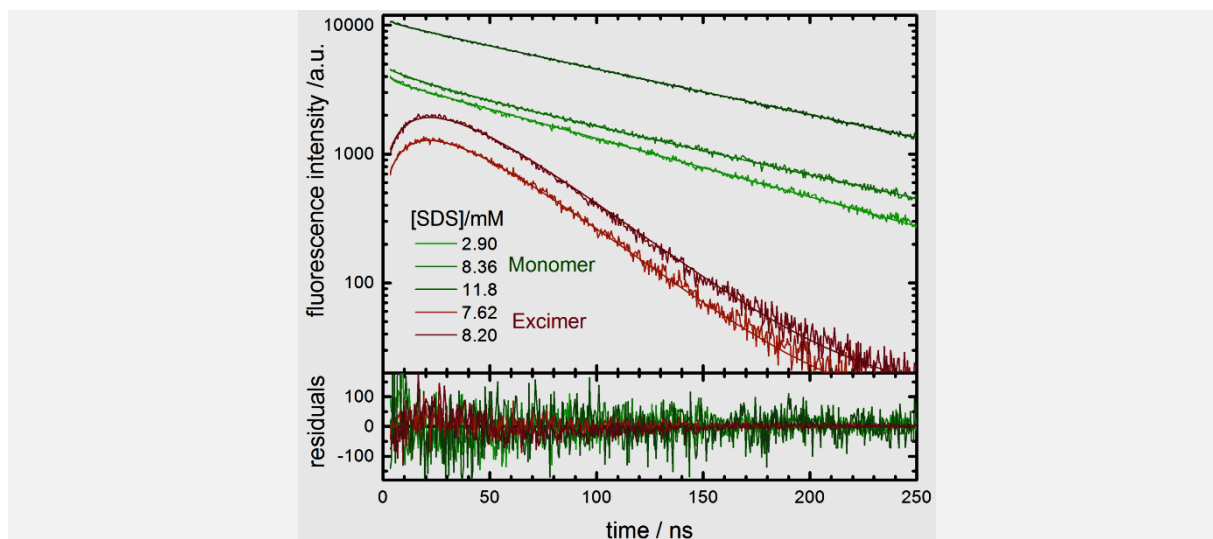
### 3.2. Time-Resolved Fluorescence Intensity

The time dependence of the fluorescence of pyrene in TX100 and SDS solutions after pulsed excitation is a complex function of the emission wavelength and surfactant concentration (Figs. 7 and 8). The fluorescence intensities in the monomer (390nm) and excimer (500nm) bands are very well fitted with eq. (26) and the parameters given in Table 1. In these global fits the values of  $cmc$ ,  $r$ ,  $K$ , and  $K_q$  were fixed to those obtained from the steady state data. The value of  $K'_{be}$  determined from

the time-resolved data (see figure captions) coincide very well with those from the steady-state intensity (Table 1). The fluorescence in the monomer band of pyrene in TX100 solution shows a first fast decay with a lifetime of  $\tau_s = 5$  ns that is independent of [TX100] and is therefore attributed to the fluorescence of the phenyl ring of TX100. A similar but much smaller contribution was observed in the case of SDS which is probably due to some fluorescent impurity. At concentrations below the *cmc* the monomer intensity decays monoexponentially with lifetime  $\tau_f$ , independent on [S]<sub>0</sub>. Similarly, at concentrations much above the *cmc* a single lifetime  $\tau_m$  is found. In the transition region around the *cmc* the decays are more complex due to excimer formation but are very well described by eq. (26) (see Fig. S11 in the SI), both in the monomer and in the excimer bands. The monomer intensity has a first faster decay corresponding to the formation of excimer in micelles of different occupancies and then a slower decay with  $\tau_m$ . The excimer intensity grows first following the initial decay in the monomer intensity and then decays with  $\tau_e$ . The excellent fits of time resolved and steady state data with the same set of parameter values corroborate the validity of the proposed models. Reported SDS excimer formation rates  $k_1$  of  $20 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  are in good agreement with our value [8,55,70,71]. The lifetime of pyrene is quenched by oxygen both in water and within the micelles [72]. Our lifetime of free monomers and those bound to SDS micelles are slightly lower than those found for aerated solutions [72].



**Fig.7:** Time resolved fluorescence intensity of pyrene in aqueous TX100 solutions. Green thin curves: monomer band at 390 nm. Red thick curves: excimer band at 500 nm. Global fit with eq. (26) and parameters as given in the text ( $K'_{be} = (0.5 \pm 0.1) 10^3 \text{ mol}^{-1}$ ). Excitation at 300 nm. [Pyrene]= $1.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  for the monomer band and [Pyrene]= $3.2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  for the excimer band.



**Fig.8:** Time resolved fluorescence intensity of pyrene in aqueous SDS solutions. Green thin curves: monomer band at 390 nm. Red thick curves: excimer band at 500 nm. Global fit with eq. (26) and parameters as given in the text ( $K'_{be} = (4 \pm 1)10^3 \text{ mol}^{-1}$ ). Excitation at 300 nm.  $[\text{Pyrene}] = 3.2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ .

### 3.3. Pyrene-Surfactant Quenching

At low surfactant concentrations the fluorescence of pyrene decreases strongly upon addition of TX100 and to a lesser extent with SDS (Figs. 3 and 5), without shift in the position of the spectral peaks (Fig. 4). The observed decrease in fluorescence is well fitted as a (first order) quenching process between pyrene and free surfactant monomers as given in eqs.(16) and (17). Below the *cmc* the fluorescence of pyrene decays with a single lifetime which is independent of the surfactant concentration ( $\tau_f$  in Table 1). This constant lifetime hints to static quenching in the ground state as the dominant process, as opposed to dynamic quenching, which would reduce the fluorescence lifetime. Static quenching is also in line with the increase of the solubility of pyrene in the presence of low surfactant concentrations as compared to pure water. Nevertheless, the stoichiometry and the nature of the pyrene-surfactant interactions are not clear. In the case of TX100 quenching probably occurs through formation of a ground-state non-fluorescent complex between the phenyl group of TX100 and pyrene, whereas SDS likely shows non-specific interactions with pyrene more appropriately described by the model of an effective sphere of quenching [45]. Nevertheless, at low quencher concentrations both types of static quenching and even the formation of complexes of higher quencher stoichiometries would lead to the same eq. (17) for the description of the steady-state fluorescence data. In conclusion, in order to infer the exact nature of the pyrene-surfactant interactions further studies should be performed which are beyond the scope of this work.

## 4. Conclusion

The complex photophysical behaviour of pyrene in surfactant solutions involves several processes that had been separately treated in detail in the past. The systematic description of these processes in combination with a quantitative model for the surfactant concentrations allows us now

## 5.1 Artículo original

to reproduce with high accuracy the behaviour of the steady-state and the time-resolved fluorescence intensity of pyrene in surfactant solutions near the *cmc*, both in the monomer and in the excimer emission bands. Our treatment yields concise model equations that can be used for the analysis of the pyrene fluorescence intensity in order to estimate fundamental parameters of the pyrene-surfactant system. We show how sensitively the pyrene fluorescence intensity depends on the binding equilibrium constant  $K$  of pyrene to a given surfactant micelle, on the rate constant of excimer formation in micelles  $k_i$  (or  $K_{be}$ ), and on the pyrene-surfactant quenching with  $K_q$ . The values  $K_{TX100} = 3300 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  and  $K_{SDS} = 190 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  for the binding of pyrene to TX100 and SDS micelles, respectively, are very high compared to other dyes [39], but not high enough to ignore the partition of pyrene even at relatively high surfactant concentrations above the *cmc*. The model offers also a solution to the notorious problem of the determination of the *cmc* from the pyrene fluorescence intensity, especially from the intensity ratio at two vibronic bands in the monomer emission or from the ratio of excimer to monomer emission intensity. Without further assumptions or ad hoc criteria we recover consistent values of the *cmc* of SDS and TX100 which are comparable with those determined from other techniques.

The precise determination of the *cmc* of a surfactant with the proposed model and pyrene as probe raises the question how the presence of a dye affects micelle formation and thus the exact position of the *cmc*. The quenching of the pyrene fluorescence and the much higher solubility of pyrene as compared to pure water show that pyrene and surfactant molecules interact already far below the *cmc*. Furthermore, near the *cmc* the concentration of bound pyrene is comparable to that of the micelles (mean occupancy  $\bar{i} \approx 0.2 - 4$ , see Fig. 6 and  $[M](cmc)$  in Table 1). We observe, however, that the values of the *cmc* of SDS and TX100 determined from the pyrene fluorescence coincide with those determined without dye, directly from the surfactant conductivity or absorbance [38,39]. The presence of hydrophobic pyrene molecules seems not to have a significant influence on the position of the *cmc* in these surfactants.

Finally we note that the finite width of the transition region below and above the *cmc* gives a plausible explanation for the appearance of significant concentrations of micelles already below the *cmc* and thus for the observed changes in the pyrene fluorescence in this region, without the need to postulate a species distinct from the proper micelles. We find thus no experimental evidence of premicellar aggregates or a shift of the *cmc* due to the presence of pyrene.

## 5. Experimental Section

### 5.1. Materials

Pyrene (Aldrich 42,642-3 (99%), CAS 129-00-0, Mw=202.26, used without further purification). The surfactants TX100 (Triton X-100, Fluka 93426, CAS 9002-93-1, Mw=646.85) and SDS (Sodium dodecyl sulphate, Sigma-Aldrich 436143, CAS 151-21-3, Mw 288.38 g/mol) were checked for potential fluorescence impurities and were used without further purification. Solutions were prepared using Milli-Q water.

Stock solutions of pyrene in ethanol were prepared by weighing. Aliquots of this pyrene stock solution were evaporated and the remaining dry thin film of solid pyrene was redissolved in a known

volume of a concentrated surfactant solution ( $[S]_0 > cmc$ ) by prolonged stirring. Each sample was prepared freshly in 10 mL sample tubes by weighing each component and stirred about 30 seconds in a vortex just before measurement. In contrast to reports of other authors [73] we found significant changes in the spectral ratios and in the amount of excimer formed in the presence of trace amounts of ethanol in the samples.

## 5.2. Absorbance and Fluorescence Measurements

Steady-state fluorescence measurements were obtained with an Edinburgh-Instruments F900 spectrofluorimeter, equipped with a Xenon lamp of 450 W as excitation sources. The excitation wavelength was 319nm, lower than the typically used 337nm in order to avoid the overlap of the raman band with the first vibronic peak of pyrene. Slit widths of excitation and emission were 3nm and 0.5nm, respectively, with a digital resolution of 0.3 nm. Inner filter effects due to absorption by the surfactant at the excitation wavelengths can be excluded. For time-resolved fluorescence measurements the same F900 TCSPC-Spectrofluorimeter was used with pulsed LEDs (EPLD-300 and EPLD-345) for excitation. Decays in the monomer (excimer) band at 390nm (500nm) were excited at 300nm (345nm) with an emission slit of 10nm. All experiments were carried out at  $25 \pm 1$  °C.

## 5.3. Data Analysis

All data were analyzed with OriginPro 9.1 (*OriginLab Corporation*, US). All given uncertainties correspond to one standard deviation from the fits and do not include calibration errors. The Origin fit functions we used are given ready to use in the supplementary data. Time-resolved fluorescence intensities were either analyzed individually with the proprietary Edinburgh-Instruments Analysis software with excitation pulse deconvolution or globally in OriginPro 9.5 applying the model equations as tail-fits without deconvolution. Principal components global analysis (PCGA) of series of emission spectra was applied using a Mathematica (Wolfram Research, Champaign, IL) program developed by our group [68,69]. The model equations have been derived in Mathematica (Wolfram Research, Champaign, IL).

## Acknowledgements

We thank Dr. Belén Reija for technical assistance. L.P. thanks the Xunta de Galicia for his research scholarships. M.N. and W.A. thank the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Xunta de Galicia for their financial support (INCITE09262304PR, CTQ2010-21369, CN2012/314, GPC2013/052).

## References

- [1] Förster T, Selinger B. Der Konzentrationsumschlag der Fluoreszenz aromatischer Kohlenwasserstoffe in mizell-kolloidaler Lösung. Zeitschrift Naturforschung Teil A 1964;19:38.
- [2] Graetzel M, Thomas J. The application of fluorescence techniques to the study of micellar systems. Modern fluorescence spectroscopy 1976;2:169-216.
- [3] Kalyanasundaram K, Thomas JK. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. J.Am.Chem.Soc. 1977;99:2039-44.

## 5.1 Artículo original

- [4] Almgren M, Grieser F, Thomas Jk. Dynamic And Static Aspects Of Solubilization Of Neutral Arenes In Ionic Micellar Solutions. *J.Am.Chem.Soc.* 1979;101:279-91.
- [5] Infelta PP, Graetzel M. Statistics of solubilize distribution and its application to pyrene fluorescence in micellar systems. A concise kinetic model. *J.Chem.Phys.* 1979;70:179-86.
- [6] Singer LA. Fluorescence Probes of Micellar Systems—An Overview. *Solution Behavior of surfactants*: Springer; 1982, p. 73-112.
- [7] De Schryver F, Croonen Y, Geladé E, Van der Auweraer M, Dederen J, Roelants E, et al. Fluorescence Quenching in Micellar Systems. *Surfactants in Solution*: Springer; 1984, p. 663-672.
- [8] Malliaris A. Fluorescence probing in aqueous micellar systems: an overview. *International Reviews in Physical Chemistry* 1988;7:95-121.
- [9] Rharbi Y, Winnik MA. Solute Exchange Between Surfactant Micelles by Micelle Fragmentation and Fusion. *Adv.Colloid Interface Sci.* 2001;89:25-46.
- [10] Capek I. Fate of excited probes in micellar systems. *Adv.Colloid Interface Sci.* 2002;97:91-149.
- [11] Mohr A, Talbiersky P, Korth H, Sustmann R, Boese R, Bläser D, et al. A new pyrene-based fluorescent probe for the determination of critical micelle concentrations. *The journal of physical chemistry.B* 2007;111:12985-92, 10.1021/jp0731497.
- [12] Mitsionis AI, Vaimakis TC. Estimation of AOT and SDS CMC in a methanol using conductometry, viscometry and pyrene fluorescence spectroscopy methods. *Chemical Physics Letters* 2012.
- [13] Topel O, Cakir BA, Budama L, Hoda N. Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *Journal of Molecular Liquids* 2013;177:40-3.
- [14] Winnik FM. Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. *Chem.Rev.* 1993;93:587-614,10.1021/cr00018a001.
- [15] da Graça Miguel M. Association of surfactants and polymers studied by luminescence techniques. *Adv.Colloid Interface Sci.* 2001;89–90:1-23.
- [16] Varga I, Mészáros R, Makuska R, Claesson PM, Gilányi T. Effect of graft density on the nonionic bottle brush polymer/surfactant interaction. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2009;25:11383-9,10.1021/la901499x.
- [17] Lehrer SS. Intramolecular pyrene excimer fluorescence: a probe of proximity and protein conformational change. *Methods Enzymol.* 1997;278:286-95.
- [18] Somerharju P. Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem.Phys.Lipids* 2002;116:57-74.
- [19] Bains G, Patel AB, Narayanaswami V. Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes. *Molecules* 2011;16:7909-35.
- [20] Brea RJ, Vazquez ME, Mosquera M, Castedo L, Granja JR. Controlling Multiple Fluorescent Signal Output in Cyclic Peptide-Based Supramolecular Systems. *J.Am.Chem.Soc.* 2007;129:1653-7.
- [21] Galla H, Sackmann E. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1974;339:103-15.

- [22] Vanderkooi JM, Callis JB. Pyrene. Probe of lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes. *Biochemistry* 1974;13:4000-6.
- [23] Wong M, Kulpa CF, Kerry Thomas J. Kinetic processes in *Escherichia coli* membranes and cells: A laser photolysis study using derivatives of pyrene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1976;426:711-22.
- [24] Dorrance R, Hunter T. Absorption and emission studies of solubilization in micelles. Part 1.— Pyrene in long-chain cationic micelles. *J.Chem.Soc., Faraday Trans.1* 1972;68:1312-21.
- [25] Ananthapadmanabhan KP, Goddard ED, Turro NJ, Kuo PL. Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration. *Langmuir* 1985;1:352-5.
- [26] Kalyanasundaram K. *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*. New York: Academic Press; 1987.
- [27] Anthony O, Zana R. Fluorescence Investigation of the Binding of Pyrene to Hydrophobic Microdomains in Aqueous Solutions of Polysoaps. *Macromolecules* 1994;27:3885-91.
- [28] Regev O, Zana R. Aggregation behavior of Tyloxapol, a nonionic surfactant oligomer, in aqueous solution. *J.Colloid Interface Sci.* 1999;210:8-17.
- [29] Caetano W, Tabak M. Interaction of Chlorpromazine and Trifluoperazine with Anionic Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Micelles: Electronic Absorption and Fluorescence Studies. *J.Colloid Interface Sci.* 2000;225:69-81,10.1006/jcis.2000.6720.
- [30] Aguiar J, Carpena P, Molina-Bolivar JA, Ruiz CC. On the Determination of the Critical Micelle Concentration by the Pyrene 1 : 3 Ratio Method. *J.Colloid Interface Sci.* 2003;258:116-22.
- [31] Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces*. 3rd ed. New York: Academic Press; 2010.
- [32] Zana R. *Dynamics of Surfactant Self-assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases*. Boca Raton: Taylor & Francis/CRC Press; 2005.
- [33] Blankschtein D, Shiloach A, Zoeller N. Thermodynamic theories of micellar and vesicular systems. *Current opinion in colloid & interface science* 1997;2:294-300.
- [34] Stephenson BC, Beers K, Blankschtein D. Complementary use of simulations and molecular-thermodynamic theory to model micellization. *Langmuir* 2006;22:1500-13.
- [35] Hadgiivanova R, Diamant H. Premicellar aggregation of amphiphilic molecules. *J Phys Chem B* 2007;111:8854-9.
- [36] Sammalkorpi M, Sanders S, Panagiotopoulos A, Karttunen M, Haataja M. Simulations of Micellization of Sodium Hexyl Sulfate. *The Journal of Physical Chemistry B* 2011.
- [37] Gezae Daful A, Baulin V, Avalos J, Mackie A. Accurate Critical Micelle Concentrations from a Microscopic Surfactant Model. *The Journal of Physical Chemistry B* 2011;115:3434-43.
- [38] Al-Soufi W, Piñeiro L, Novo M. A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: Application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tension data. *J.Colloid Interface Sci.* 2012;370:102-10,10.1016/j.jcis.2011.12.037.
- [39] Piñeiro L, Freire S, Bordello J, Novo M, Al-Soufi W. Dye exchange in micellar solutions. Quantitative analysis of bulk and single molecule fluorescence titrations. *Soft Matter* 2013;9:10779-90.

## 5.1 Artículo original

- [40] Hauser M, Klein U. Excimere in micellaren Lösungen. Zeitschrift für Physikalische Chemie Neue Folge 1972;78:32-9.
- [41] Nakajima A. Variations in the Vibrational Structures of Fluorescence Spectra of Naphthalene and Pyrene in Water and in Aqueous Surfactant Solutions. Bull.Chem.Soc.Jpn. 1977;50:2473-4.
- [42] Glushko V, Thaler MS, Karp CD. Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions: behavior in model solvents. Arch.Biochem.Biophys. 1981;210:33-42.
- [43] Dong DC, Winnik MA. The Py scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with ET and Y values. Photochem.Photobiol. 1982;35:17-21.
- [44] Karpovich DS, Blanchard GJ. Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the py polarity scale. J.Phys.Chem. 1995;99:3951-8,10.1021/j100012a014.
- [45] Valeur B, Berberan Santos MN. Molecular fluorescence: principles and applications. 2nd ed. Weinheim: Wiley VCH; 2012.
- [46] Hauser M, Klein U. Fluorescence and Excimer Kinetics in Micellar Detergent Solutions. Acta Physica Et Chemica 1973;19:363-73.
- [47] Selinger BK, Watkins AR. Distributional effects on excimer formation in micellar surfactant solutions. Chemical Physics Letters 1978;56:99-104.
- [48] Selinger BK, Watkins AR. Pyrene excimer kinetics in micelles of nonionic surfactants. Journal of Photochemistry 1982;20:319-25.
- [49] Turro NJ, Kuo PL. Pyrene excimer formations in micelles of nonionic detergents and of water-soluble polymers. Langmuir 1986;2:438-42.
- [50] Tachiya M. Application of a generating function to reaction kinetics in micelles. Kinetics of quenching of luminescent probes in micelles. Chemical Physics Letters 1975;33:289-92.
- [51] Maestri M, Infelta PP, Grätzel M. Kinetics of fast light-induced redox processes in micellar systems: Intramolecular electron transfer. J.Chem.Phys. 1978;69:1522-,10.1063/1.436724.
- [52] Gehlen MH, De Schryver FC. Time-resolved Fluorescence Quenching in Micellar Assemblies. Chem.Rev. 1993;93:199-221.
- [53] Ranganathan R, Vautier-Giongo C, Bales BL. Toward a Hydrodynamic Description of Bimolecular Collisions in Micelles. An Experimental Test of the Effect of the Nature of the Quencher on the Fluorescence Quenching of Pyrene in Sds Micelles and in Bulk Liquids. J Phys Chem B 2003;107:10312-8.
- [54] Förster T. Excimers. Angewandte Chemie International Edition in English 1969;8:333-43.
- [55] Malliaris A, Le Moigne J, Sturm J, Zana R. Temperature dependence of the micelle aggregation number and rate of intramolecular excimer formation in aqueous surfactant solutions. J.Phys.Chem. 1985;89:2709-13.
- [56] Sahoo L, Sarangi J, Misra PK. Organization of amphiphiles, Part 1: Evidence in favor of pre-micellar aggregates through fluorescence spectroscopy. Bull.Chem.Soc.Jpn. 2002;75:859-65.
- [57] Phillips J. The energetics of micelle formation. Transactions of the Faraday Society 1955;51:561-9.

- [58] Dunaway CS, Christian SD, Scamehorn JF. Overview and history of the study of solubilization. In: Christian SD, Scamehorn JF, editors. *Solubilization in Surfactant Aggregates*, Surfactant Science Series, Vol. 55 New York: Marcel Dekker; 1995, p. 3-31.
- [59] Zana R. Dynamics in Micellar Solutions of Surfactants. In: Zana R, editor. *Dynamics of Surfactant Self-assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases* Boca Raton: Taylor & Francis/CRC Press; 2005.
- [60] Freire S, Bordello J, Granadero D, Al Soufi W, Novo M. Role of Electrostatic and Hydrophobic Forces in the Interaction of Ionic Dyes with Charged Micelles. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010;9:687-96.
- [61] McNaught AD, McNaught AD. *IUPAC Compendium of chemical terminology*. Oxford: Blackwell Science; 1997.
- [62] Dorrance RC, Hunter TF. Absorption and emission studies of solubilization in micelles. Part 2.— Determination of aggregation numbers and solubilisate diffusion in cationic micelles. *J.Chem.Soc., Faraday Trans.1* 1974;70:1572-80.
- [63] Hunter TF. The distribution of solubilisate molecules in micellar assemblies. *Chemical Physics Letters* 1980;75:152-5.
- [64] Thomas JK. Radiation-induced reactions in organized assemblies. *Chem.Rev.* 1980;80:283-99.
- [65] Moroi Y. Distribution of solubilizates among micelles and kinetics of micelle-catalyzed reactions. *J.Phys.Chem.* 1980;84:2186-90.
- [66] Kim J, Domach MM, Tilton RD. Effect of Electrolytes on the Pyrene Solubilization Capacity of Dodecyl Sulfate Micelles. *Langmuir* 2000;16:10037-43,10.1021/la0005560.
- [67] Tachiya M. Kinetics of quenching of luminescent probes in micellar systems. II. *J.Chem.Phys.* 1982;76:340.
- [68] Al-Soufi W, Novo M, Mosquera M. Principal component global analysis of fluorescence and absorption spectra of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole. *Appl.Spectrosc.* 2001;55:630-6.
- [69] Al-Soufi W, Novo M, Mosquera M, Rodríguez-Prieto F. Principal Component Global Analysis of Series of Fluorescence Spectra. *Reviews in Fluorescence* 2009 2011:23-45.
- [70] Lianos P, Viriot ML, Zana R. Study of the solubilization of aromatic hydrocarbons by aqueous micellar solutions. *J.Phys.Chem.* 1984;88:1098-101,10.1021/j150650a014.
- [71] Villegas MM, Neal SL. Model-independent analysis of pyrene photokinetics in SDS micelles. *The Journal of Physical Chemistry A* 1997;101:6890-6.
- [72] Geiger MW, Turro NJ. Pyrene fluorescence lifetime as a probe for oxygen penetration of micelles. *Photochem.Photobiol.* 1975;22:273-6.
- [73] Kim J, Domach MM, Tilton RD. Pyrene solubilization capacity in octaethylene glycol monododecyl ether (C12E8) micelles. *Colloids Surf.Physicochem.Eng.Aspects* 1999;150:55-68.

## 5.2 Supplementary Information

### Electronic Supplementary Information Fluorescence Emission of Pyrene in Surfactant Solutions

Lucas Piñeiro, Mercedes Novo, and Wajih Al-Soufi\*

Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, University of Santiago de Compostela  
E-27002 Lugo (Spain), Fax: (+34) 982824001, E-mail: [wajih.al-soufi@usc.es](mailto:wajih.al-soufi@usc.es)

References to figures and equations refer to the main paper. The bibliographic references are given at the end of this document.

#### Theory

We complement the theory given in the main paper with detailed descriptions.

#### Surfactant Concentration Model

Starting point for the surfactant concentration model [1,2] is the “Phillips-condition” [3], which defines the *cmc* as the total surfactant concentration  $[S]_0$  corresponding to the maximum change in gradient in a property-concentration relationship. We apply this condition directly to the change in the gradient of the monomer concentration  $[S_1]$  with respect to  $[S]_0$  and define the *cmc* as the concentration at which the third derivative of  $[S_1]$  is zero:

$$\left( \frac{d^3[S_1]}{d[S]_0^3} \right)_{[S]_0=cmc} = 0 \quad (S11)$$

We then describe the second derivative of  $[S_1]$  with respect to  $[S]_0$  by a Gauss function centred at the *cmc*, with amplitude  $A$  and width  $\sigma$  as given in equation(S12): [4]

$$\frac{d^2[S_1]}{d[S]_0^2} = \frac{-A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{([S]_0-cmc)^2}{2\sigma^2}} = \frac{-A}{cmc} \frac{1}{\sqrt{2\pi}r} e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} \quad (S12)$$

The width  $\sigma$  of the Gaussian is a measure of the width of the transition region around the *cmc*. The smaller  $\sigma$  is the sharper is the transition between the two linear regions below and above the *cmc*. In order to facilitate the comparison of widths  $\sigma$  between surfactants with different *cmc* values, we define the *relative transition width*  $r$  as given in in (S13).

$$r = \sigma/cmc \quad (S13)$$

Only to simplify the expressions, we also define a *relative total surfactant concentration*  $s_0$  as ratio between  $[S]_0$  and *cmc*:

$$s_0 = [S]_0/cmc \quad (S14)$$

Double integration of equation (SI2) gives the model of eq. (SI5) for the concentration of surfactant monomers  $[S_1]$  in a solution with total surfactant concentration  $[S]_0$ . This model is an adequately normalized sigmoidal function centred around the *cmc* and with relative width  $r$ :

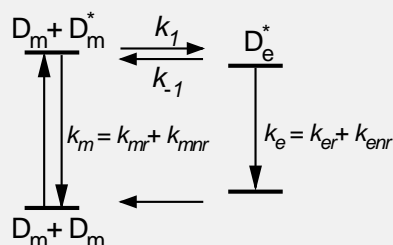
$$[S_1] = cmc \left[ 1 - \frac{A}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} + (s_0-1) \left( \operatorname{erf} \left( \frac{s_0-1}{\sqrt{2}r} \right) - 1 \right) \right) \right] \quad (\text{SI5})$$

where  $A$  is the normalization constant (for small  $r < 0.5$ :  $A \approx 1$ ):

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf} \left( \frac{1}{\sqrt{2}r} \right)} \approx 1 \quad (r < 0.5) \quad (\text{SI6})$$

### Excimer Formation

An excited monomeric dye  $D_m^*$  can either deactivate directly to the ground state or it can form the excimer  $D_e^*$  interacting with an unexcited monomeric dye  $D_m$ , as shown in the following Scheme.



Without back reaction in the excited state ( $k_e \gg k_{-1}$ ) we have:

$$\begin{aligned} \frac{d[D_m^*](t)}{dt} &= -k_m [D_m^*] - k_1 [D_m^*][D_m] + k_{-1} [D_e^*] \\ \frac{d[D_e^*](t)}{dt} &= -(k_e + k_{-1}) [D_e^*] + k_1 [D_m^*][D_m] \\ [D_m^*](t=0) &= [D_m^*]_0, [D_e^*](t=0) = 0 \end{aligned} \quad (\text{SI7})$$

Integration of eq. (SI7) gives the following time dependence of the excited monomer and excimer concentrations with the lifetimes of the excited monomer  $\tau_m = (k_m + k_1[D_m])^{-1}$  and the excimer  $\tau_e = (k_e)^{-1}$ :

$$\begin{aligned} [D_m^*](t) &= [D_m^*]_0 e^{-(k_m + k_1[D_m])t} \\ [D_e^*](t) &= [D_m^*]_0 \frac{k_1[D_m]}{-k_e + (k_m + k_1[D_m])} \left( e^{-k_e t} - e^{-(k_m + k_1[D_m])t} \right) \end{aligned} \quad (\text{SI8})$$

The fluorescence intensity observed at time  $t$  from excited monomer ( $i_m(t)$ ) and excimer ( $i_e(t)$ ) is then:

## 5.2 Supplementary Information

$$\begin{aligned} i_m(t) &= k_{mr}[D_m^*](t) \\ i_e(t) &= k_{er}[D_e^*](t) \end{aligned} \quad (\text{SI9})$$

Integration of these intensities gives the steady state fluorescence intensities  $I_m$  and  $I_e$  of monomer and excimer as a function of the initial concentration of excited dye  $[D_m^*]_0$ , the rate constants defined in Scheme 1, and the concentration of dye in the ground state,  $[D_m]$ :

$$\begin{aligned} I_m &= \int_0^{\infty} i_m dt = \frac{k_{mr}}{k_m} \frac{k_m}{k_m + k_1[D_m]} [D_m^*]_0 = \Phi_m X_m [D_m^*]_0 \\ I_e &= \int_0^{\infty} i_e dt = \frac{k_{er}}{k_e} \frac{k_1[D_m]}{k_m + k_1[D_m]} [D_m^*]_0 = \Phi_e X_e [D_m^*]_0 \end{aligned} \quad (\text{SI10})$$

Here we use molar fractions of monomer  $X_m$  and excimer  $X_e$  as function of the constant  $K_e$ :

$$\begin{aligned} K_e &= \frac{k_1}{k_m} \quad X_m + X_e = 1 \\ X_m &= \frac{k_m}{k_m + k_1[D_m]} = \frac{1}{1 + K_e[D_m]} \\ X_e &= \frac{k_1[D_m]}{k_m + k_1[D_m]} = \frac{K_e[D_m]}{1 + K_e[D_m]} \end{aligned} \quad (\text{SI11})$$

With backreaction in the excited state one would get instead for the molar fractions of monomer  $X_m$  and excimer  $X_e$  as function of the constant  $K_e$ :

$$\begin{aligned} K_e &= \frac{k_1 k_e}{k_m (k_{-1} + k_e)} \\ X_m &= \frac{k_m (k_{-1} + k_e)}{k_m (k_{-1} + k_e) + k_1 k_e [D_m]} = \frac{1}{1 + K_e [D_m]} \\ X_e &= \frac{k_1 k_e [D_m]}{k_m (k_{-1} + k_e) + k_1 k_e [D_m]} = \frac{K_e [D_m]}{1 + K_e [D_m]} \end{aligned} \quad (\text{SI12})$$

The products  $X_m [D_m^*]_0$  and  $X_e [D_m^*]_0$  in eq. (SI10) are the concentrations of excited dye which decay as monomers or excimers, respectively. The ratios  $k_{mr}/k_m = \Phi_m$  and  $k_{er}/k_e = \Phi_e$  are the corresponding fluorescence quantum yields.

The ratio between excimer and monomer fluorescence intensities is then

$$\frac{I_e}{I_m} = \frac{\Phi_e X_e}{\Phi_m X_m} = \frac{k_{er}}{k_{mr}} \frac{k_1}{k_e} [D_m] = \frac{\Phi_e}{\Phi_m} K_e [D_m] \quad (\text{SI13})$$

In a micellar solution both free and bound pyrene contribute to the observed fluorescence intensity. Free pyrene in water forms only a very small fraction of excimer, which we neglect in our model ( $[D_{fe}] \approx 0$ ,  $[D_{fm}] \approx [D_f]$ ). Free excimer  $D_{i,e}$  could be easily included with a fixed value of the corresponding constant  $K_{f,e}$ .

On the contrary, the contribution of the excimer emission from pyrene bound to micelles is important and has to be modelled carefully taking into account the local pyrene concentration given by the occupancy  $i$  of the micelles.

After pulsed excitation, the initial concentration of excited bound monomeric dye  $[D_{bm}^*]_0^{(i)}$  in micelles  $M_i$ , is given by the molar absorption coefficient  $\alpha_b$  of bound dye, the occupancy  $i$  and the concentration of micelles  $[M_i]$ :

$$[D_{bm}^*]_0^{(i)} = \alpha_b i [M_i] \quad (SI14)$$

Here we assume that a total of  $\alpha_b [D_b]$  bound dye molecules are excited, but not more than one in each micelle. This is reasonable taking into account the very low absorption of the dye in fluorescence measurements and the low occupancies  $i \leq \bar{i}_0 = K[D]_0$ , so that  $\alpha_b [D_b] \ll [M]$ .

The total initial concentration of excited bound dye is then:

$$[D_{bm}^*]_0 = \sum_{i=1}^{\infty} [D_{bm}^*]_0^{(i)} = \alpha_b \sum_{i=1}^{\infty} i [M_i] = \alpha_b [D_b] \quad (SI15)$$

In order to obtain the steady state fluorescence intensities  $(I_{bm}^{(i)}, I_{be}^{(i)})$  from bound monomer and excimer in micelles  $M_i$  the eqs. (SI10) and (SI11) have to be written with local concentrations of excited and not excited dye:

$$\begin{aligned} I_{bm}^{(i)} &= \phi_m X_{bm}^{(i)} [D_{bm}^*]_0^{(i)} = \Phi_m \alpha_b X_{bm}^{(i)} i [M_i] \\ I_{be}^{(i)} &= \phi_e X_{be}^{(i)} [D_{bm}^*]_0^{(i)} = \Phi_e \alpha_b X_{be}^{(i)} i [M_i] \end{aligned} \quad (SI16)$$

The probability that in a micelle  $M_i$  of volume  $V_m$  an excited dye forms an excimer depends on the local concentration of not excited dye  $[D_{bm}]^{(i)}$ :

$$[D_{bm}]^{(i)} = (i-1) / V_m \quad (SI17)$$

Substituting this local concentration in eq. (SI11) we obtain the fraction of bound excited dye in micelles  $M_i$  that decays as monomers ( $X_{bm}^{(i)}$ ) or excimers ( $X_{be}^{(i)}$ ):

$$X_{bm}^{(i)} = \frac{1}{1 + K_{be} (i-1) / V_m}, \quad X_{be}^{(i)} = \frac{K_{be} (i-1) / V_m}{1 + K_{be} (i-1) / V_m} \quad (SI18)$$

The volume  $V_m$  contains the dye bound to the micelle. Neither the constant  $K_{be}$  nor the volume  $V_m$  depend on  $[S]_0$  as long as the structure and the size of the micelles do not change significantly. The fraction of bound excimer  $X_{be}^{(i)}$  is zero for a micelle  $M_1$  occupied by only one dye molecule and increases with higher occupation numbers.

The total steady state fluorescence intensities  $I_{bm}$  and  $I_{be}$  of bound monomer and excimer are now given by the sum of the intensities (eq.(SI16)) from micelles with different occupation numbers. Defining constants  $F_{bm} = \Phi_m \alpha_b$ ,  $F_{be} = \Phi_e \alpha_b$  and  $K'_{be} = K_{be} / V_m$  we get:

## 5.2 Supplementary Information

$$\begin{aligned}
 I_{bm} &= F_{bm} \sum_{i=1}^{\infty} X_{bm}^{(i)} i [M_1] = F_{bm} [M] \sum_{i=1}^{\infty} X_{bm}^{(i)} i P(i) = F_{bm} [D_b] \frac{1}{\bar{i}} \sum_{i=1}^{\infty} X_{bm}^{(i)} i P(i) \\
 &= F_{bm} X_{bm} [D_b] = \underline{F_{bm} X_{bm} X_b [D]_0} \\
 I_{be} &= F_{be} \sum_{i=1}^{\infty} X_{be}^{(i)} i [M_1] = F_{be} [M] \sum_{i=1}^{\infty} X_{be}^{(i)} i P(i) = F_{be} [D_b] \frac{1}{\bar{i}} \sum_{i=1}^{\infty} X_{be}^{(i)} i P(i) \\
 &= F_{be} X_{be} [D_b] = \underline{F_{be} X_{be} X_b [D]_0}
 \end{aligned} \tag{SI19}$$

with the fraction  $X_b$  of bound dye and the monomer and excimer fractions of bound dye  $X_{bm}$  and  $X_{be}$  :

$$\begin{aligned}
 X_{bm} &= \frac{1}{\bar{i}} \sum_{i=1}^{\infty} X_{bm}^{(i)} i P(i) = e^{-\bar{i}} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{1}{1 + (i-1)K'_{be}} \frac{\bar{i}^{i-1}}{(i-1)!} \\
 X_{be} &= \frac{1}{\bar{i}} \sum_{i=1}^{\infty} X_{be}^{(i)} i P(i) = e^{-\bar{i}} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(i-1)K'_{be}}{1 + (i-1)K'_{be}} \frac{\bar{i}^{i-1}}{(i-1)!}
 \end{aligned} \tag{SI20}$$

We can simplify the expressions substituting  $i-1$  by  $i$  and starting the summation in zero instead of one:

$$\begin{aligned}
 X_{bm} &= e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{1 + iK'_{be}} \frac{\bar{i}^i}{i!} \\
 X_{be} &= e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{iK'_{be}}{1 + iK'_{be}} \frac{\bar{i}^i}{i!}
 \end{aligned} \tag{SI21}$$

The series in these monomer and excimer fractions of bound dye  $X_{bm}$  and  $X_{be} = 1 - X_{bm}$  can be solved analytically:

$$X_{bm} = \frac{1}{K'_{be}} e^{-\bar{i}} (-\bar{i})^{-1/K'_{be}} \left( \Gamma\left(\frac{1}{K'_{be}}, 0\right) - \Gamma\left(\frac{1}{K'_{be}}, -\bar{i}\right) \right) \tag{SI22}$$

However, this solution with the Gamma function involves complex numbers and is not stable in numeric applications. Therefore, in the fit functions we calculate the sum up to some reasonable limit, dynamically selected depending on the value of the mean occupancy  $\bar{i}$ . Terms for  $i > 6 + 3\bar{i}$  are smaller than  $10^{-4}$  and therefore negligible in the summation:

$$\begin{aligned}
 X_{bm} &\approx e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{6+3\bar{i}} \frac{1}{1 + iK'_{be}} \frac{\bar{i}^i}{i!} \\
 X_{be} &= 1 - X_{bm}
 \end{aligned} \tag{SI23}$$

### Steady-State Fluorescence Intensity

We can express the overall observed fluorescence intensity  $I^{(2)}([S]_0)$  as a function of the total surfactant concentration substituting the individual contributions deduced above:

$$\begin{aligned}
 I^{(\lambda)}([S]_0) &= I_{f,nq}^{(\lambda)} + I_{bm}^{(\lambda)} + I_{be}^{(\lambda)} \\
 &= F_f^{(\lambda)}[D_{f,m}]X_{nq} + F_{bm}^{(\lambda)}[D_b]X_{b,bm} + F_{be}^{(\lambda)}[D_b]X_{b,e} \\
 &= [D]_0 \left( F_f^{(\lambda)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(\lambda)} X_b X_{bm} + F_{be}^{(\lambda)} X_b X_{be} \right) \\
 &= F_f^{(\lambda)} [D]_0 \left( X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(\lambda)} X_b X_{bm} + q_{be,f}^{(\lambda)} X_b X_{be} \right)
 \end{aligned} \tag{SI24}$$

Traditionally not the absolute intensity of the pyrene emission is analysed but the *spectral ratio*  $SR$  at two wavelengths,  $\lambda_1$  and  $\lambda_2$ , either as monomer/monomer (for example, the  $I_{II}/I_{III}$  ratio) or as excimer/monomer ratios. With eq. (SI24) we obtain for the spectral ratio at  $\lambda_1$  and  $\lambda_2$ :

$$SR^{(2,1)} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} = \frac{F_f^{(2)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(2)} X_b X_{bm} + F_{be}^{(2)} X_b X_{be}}{F_f^{(1)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(1)} X_b X_{bm} + F_{be}^{(1)} X_b X_{be}} \tag{SI25}$$

Neglecting the residual excimer emission in the monomer band and vice versa, we get the following two expressions for the spectral monomer-monomer and excimer-monomer ratios:

$$\begin{aligned}
 SR_m^{(2,1)} &= \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} \approx \frac{F_f^{(2)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(2)} X_b X_{bm} + \cancel{F_{be}^{(2)} X_b X_{be}}}{F_f^{(1)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(1)} X_b X_{bm} + \cancel{F_{be}^{(1)} X_b X_{be}}} \approx \frac{F_f^{(2)} X_f X_{nq} + \frac{F_{bm}^{(2)} F_{bm}^{(m)}}{F_{bm}^{(1)} F_f^{(1)}} X_b X_{bm}}{X_f X_{nq} + \frac{F_{bm}^{(1)}}{F_f^{(1)}} X_b X_{bm}} \\
 &\approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}}
 \end{aligned} \tag{SI26}$$

$$\begin{aligned}
 SR_e^{(e,m)} &= \frac{I^{(e)}}{I^{(m)}} \approx \frac{F_f^{(e)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(e)} X_b X_{bm} + F_{be}^{(e)} X_b X_{be}}{F_f^{(m)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(m)} X_b X_{bm} + \cancel{F_{be}^{(m)} X_b X_{be}}} \approx \frac{\frac{F_f^{(e)}}{F_f^{(m)}} X_f X_{nq} + \frac{F_{bm}^{(e)} F_{bm}^{(m)}}{F_{bm}^{(m)} F_f^{(m)}} X_b X_{bm} + \frac{F_{be}^{(e)}}{F_f^{(m)}} X_b X_{be}}{X_f X_{nq} + \frac{F_{bm}^{(m)}}{F_f^{(m)}} X_b X_{bm}} \\
 &\approx \frac{SR_f^{(e,m)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(e,m)} q_{bm,f}^{(m)} X_b X_{bm} + q_{be,f}^{(e,m)} X_b X_{be}}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(m)} X_b X_{bm}}
 \end{aligned} \tag{SI27}$$

With the following ratios as indicated in Fig. SI2:

$$\begin{aligned}
 SR_f^{(2,1)} &= \frac{F_f^{(2)}}{F_f^{(1)}} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} ([S_0] = 0) & SR_f^{(e,m)} &= \frac{F_f^{(e)}}{F_f^{(m)}} = \frac{I^{(e)}}{I^{(m)}} ([S_0] = 0) \\
 SR_{bm}^{(2,1)} &= \frac{F_{bm}^{(2)}}{F_{bm}^{(1)}} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} ([S_0] \gg cmc) & SR_{bm}^{(e,m)} &= \frac{F_{bm}^{(e)}}{F_{bm}^{(m)}} = \frac{I^{(e)}}{I^{(m)}} ([S_0] \gg cmc) \\
 q_{be,f}^{(e,m)} &= \frac{F_{be}^{(e)}}{F_f^{(m)}}
 \end{aligned} \tag{SI28}$$

At very low pyrene concentrations the excimer formation can be neglected in eq. (21) ( $X_{bm} \approx 1$ ,  $X_{be} \approx 0$ ) and we get further simplified equations for the spectral monomer ratio  $SR_m^{(2,1)}$ :

$$\begin{aligned}
 SR_m^{(2,1)} &= \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} \approx \frac{F_f^{(2)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(2)} X_b}{F_f^{(1)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(1)} X_b} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} X_b}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} X_b} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} K[M]}{X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} K[M]} \\
 &\approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} \cdot c \cdot K[M]}{X_{nq} + c \cdot [M]}
 \end{aligned} \tag{SI29}$$

## 5.2 Supplementary Information

Below the transition region we have  $[M]=0$ , so that  $SR_m^{(2,1)} \approx SR_f^{(2,1)}$ , independently of the quenching fraction  $X_{nq}$ . Above the transition region  $X_{nq} = (1 + K_q \cdot cmc)^{-1}$  is constant. We can therefore further approximate the ratio  $SR_m^{(2,1)}$  defining a new quenching constant  $K'_q = (1 + K_q \cdot cmc)$ . This approximation is valid for not too high values of  $r$ .

$$SR_m^{(2,1)} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} K'_q K \cdot [M]}{1 + q_{bm,f}^{(1)} K'_q K \cdot [M]} = \frac{SR_f^{(2,1)} + SR_{bm}^{(2,1)} \cdot c' \cdot [M]}{1 + c' \cdot [M]} \quad (SI30)$$

### Time-Resolved Fluorescence Intensity

The time dependence of the pyrene fluorescence had been derived by Tachiya, by Selinger and Watkins, and by Infelta et al. [5-9] We summarize the main results in our nomenclature and combine them with the surfactant concentration model. The detailed derivation can again be found in the SI.

In a micelle  $M_i$  with pyrene occupancy  $i$  the fluorescence intensity emitted at time  $t$  from excited monomer ( $i_{bm}^{(i)}(t)$ ) and excimer ( $i_{be}^{(i)}(t)$ ) is given by eqs.((SI8) and (SI9)) substituting the local concentrations of excited and not excited dye in  $M_i$  from eqs. (SI14) and (SI17):

$$\begin{aligned} i_{bm}^{(i)}(t) &= k_{mr} \alpha_b i [M_i] e^{-(k_m + k_1 [D_{bm}]^{(i)})t} \\ &= k_{mr} \alpha_b i [M_i] e^{-k_m (1 + K_e [D_{bm}]^{(i)})t} \\ i_{be}^{(i)}(t) &= k_{er} \alpha_b i [M_i] \frac{k_1 [D_m]^{(i)}}{k_m + k_1 [D_{bm}]^{(i)} - k_e} \left( e^{-k_e t} - e^{-(k_m + k_1 [D_{bm}]^{(i)})t} \right) \\ &= k_{er} \alpha_b i [M_i] \frac{K_e [D_{bm}]^{(i)}}{1 + K_e [D_{bm}]^{(i)} - k_e / k_m} \left( e^{-k_e t} - e^{-k_m (1 + K_e [D_{bm}]^{(i)})t} \right) \end{aligned} \quad (31)$$

The observed time dependent fluorescence intensity is the sum of the contributions from all micelles with different occupation numbers  $M_i$ :

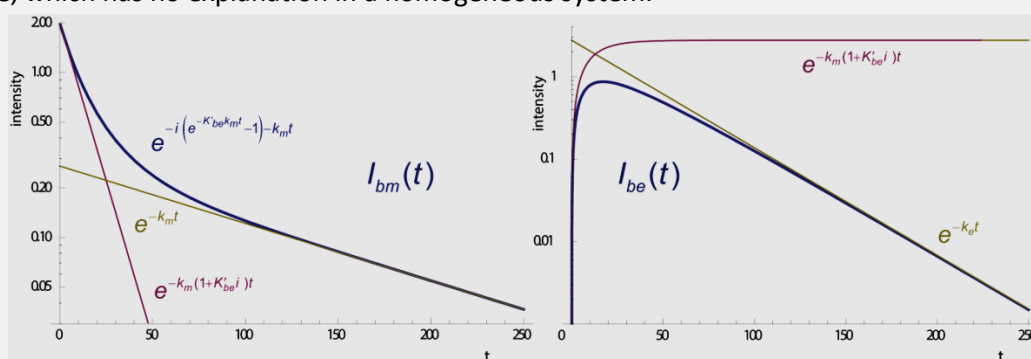
$$\begin{aligned} I_{bm}(t) &= \sum_{i=1}^{\infty} i_{bm}^{(i)}(t) = k_{mr} \alpha_b \sum_{i=1}^{\infty} i [M_i] e^{-(k_m + k_1 [D_{bm}]^{(i)})t} = k_{mr} \alpha_b [M] \sum_{i=1}^{\infty} iP(i) e^{-(k_m + k_1 [D_{bm}]^{(i)})t} \\ &= k_{mr} \alpha_b [M] e^{-\bar{i} t} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{\bar{i}^i}{(i-1)!} e^{-(k_m (1 + K_{be} (i-1))t)} = k_{mr} \alpha_b [D]_b e^{-\bar{i} t} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{\bar{i}^i}{i!} e^{-k_m (1 + K_{be} (i-1))t} \\ I_{be}(t) &= \sum_{i=1}^{\infty} i_{be}^{(i)}(t) = \\ &= k_{er} \alpha_b \sum_{i=1}^{\infty} i [M_i] \frac{k_1 [D_m]^{(i)}}{k_m + k_1 [D_{bm}]^{(i)} - k_e} \left( e^{-k_e t} - e^{-(k_m + k_1 [D_{bm}]^{(i)})t} \right) \\ &= k_{er} \alpha_b [M] \sum_{i=1}^{\infty} iP(i) \frac{K_e [D_{bm}]^{(i)}}{1 + K_e [D_{bm}]^{(i)} - k_e / k_m} \left( e^{-k_e t} - e^{-k_m (1 + K_e [D_{bm}]^{(i)})t} \right) \\ &= k_{er} \alpha_b [M] e^{-\bar{i} t} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{\bar{i}^i}{(i-1)!} \frac{K'_{be} (i-1)}{1 + K'_{be} (i-1) - k_e / k_m} \left( e^{-k_e t} - e^{-k_m (1 + K_{be} (i-1))t} \right) \\ &= k_{er} \alpha_b [D]_b e^{-\bar{i} t} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{\bar{i}^{i-1}}{(i-1)!} \frac{K'_{be} (i-1)}{1 + K'_{be} (i-1) - k_e / k_m} \left( e^{-k_e t} - e^{-k_m (1 + K_{be} (i-1))t} \right) \\ &= k_{er} \alpha_b [D]_b e^{-\bar{i} t} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{\bar{i}^i}{i!} \frac{K'_{be} i}{1 + K'_{be} i - k_e / k_m} \left( e^{-k_e t} - e^{-k_m (1 + K_{be} i)t} \right) \end{aligned} \quad (32)$$

In the last steps we simplified the expressions substituting  $i-1$  by  $i$  and starting the summation in zero instead of one .

These infinite sums can be solved analytically. The monomer fluorescence intensity of dye bound to micelles  $I_{bm}(t)$  (eq. (33)) decays exponentially with a time-dependent lifetime ( $K'_{be} = K_{be}/V_m$ ,  $k'_1 = k_1/V_m$ ). At time zero the fluorescence intensity is  $I_{bm}(t=0) = k_{mr}\alpha_b[D_b]$ , that of the excited bound dye.

$$\begin{aligned} I_{bm}(t) &= k_{mr}\alpha_b[M]\bar{i} e^{-\bar{i}(e^{-K'_{be}k_m t}-1)-k_m t} \\ &= k_{mr}\alpha_b[D_b] e^{-\bar{i}(e^{-K'_{be}k_m t}-1)-k_m t} \\ &= k_{mr}\alpha_b[D_b] e^{-\bar{i}(e^{-k_1 t}-1)-k_m t} \end{aligned} \quad (33)$$

Note that this decay is not monoexponentially with a lifetime  $\tau_m = (k_m + k_1[D_m])^{-1}$  as the concentration dependence  $[D'_m](t)$  in eq. (S18) seems to imply (see Fig. S11). The excimer formation with  $k_1[D_{bm}^{(i)}]$  depends on the local dye concentration, which varies according to the distribution of the dye occupancies in the micelles. In each micelle  $M_i$  a decay with a different lifetime  $\tau_{bm}^{(i)} = (k_m + k_1[D_{bm}^{(i)}])^{-1}$  is observed. In higher occupied micelles the monomer emission is rapidly quenched due to the effective excimer formation which leads to fast decays. At  $t=0$  the decay starts with a rate constant  $k_m + k_1(\bar{i}/V) = k_m(1 + K'_{be}\bar{i})$ . At longer times ( $K'_{be}k_m t \gg 1$ ) finally only the emission from micelles  $M_1$  with a single excited dye is observed which decay monoexponentially with  $\tau_{bm}^{(1)} = (k_m)^{-1}$ . The time dependence in eq. (33) can be easily confounded with a double exponential decay with  $\tau_{bm}^{(1)} = (k_m)^{-1}$  and a short lifetime, which has no explanation in a homogeneous system.



**Figure S11:** Simulated decays  $I_{bm}(t)$  (eq. (33)) and  $I_{be}(t)$  (eq. (34)) and limiting decays with  $k'_1=0.04$ ,  $k_m=0.008$ ,  $K'_{be}=5$ ,  $\bar{i}=2$ .

The monomer decay  $I_{bm}(t)$  in eq. (33) is furthermore strongly dependent on the micellar concentration. First, trivially, because the concentration of bound dye  $[D_b]$  depends on  $[M]$ . Second, and more important, because the mean occupancy  $\bar{i}$  in the exponent of  $I_{bm}(t)$  varies with both  $[D_b]$  and  $[M]$ . At high micellar concentrations ( $[S]_0 \gg cmc$ ) the mean occupancy tends to zero ( $\bar{i} = [D_b]/[M] \rightarrow 0$ ) and  $I_{bm}(t)$  decays monoexponentially with  $k_m$ . At very low micellar concentrations the mean occupancy is limited by the initial mean occupancy  $\bar{i} \leq \bar{i}_0 = [D]_0 \cdot K$ , however the amplitude of the decay vanishes. The expression of eq. (33) can be used directly as fitting function for  $I_{bm}(t)$ .

The expression for the excimer fluorescence (eq. (34)) involves the exponential integral  $E_n(z)$  and is less useful for numerical applications. In fitting functions it is usually more reliable to calculate

## 5.2 Supplementary Information

the sums in eq. (32) up to some reasonable occupation number  $i$  (see SI). The excimer fluorescence intensity at time zero is zero,  $I_{be}(t=0)=0$  and increases with a complex time dependent rise time given by that of the monomer decay as discussed before. At long times the decay is monoexponential with  $k_e$ . However, at intermediate times the intensity curve follows a more complex function than the difference between excimer and monomer decays.

$$I_{be}(t) = k_{er}\alpha_b[M]^{-2}e^{-\bar{t}} \left( E_n(-\bar{t} e^{-K_{be}k_m t}) \cdot e^{-k_m(K_{be}+1)t} - E_n(-\bar{t}) \cdot e^{-k_e t} \right)$$

$$E_n(z) = \int_1^{\infty} \frac{e^{-zt}}{t^n} dt, \quad n = (k_e - k_m) / (K_{be}k_m) \quad (34)$$

(The sign of the exponential integral  $E_n(z)$  is negative for typical values of  $n$  and  $z$  in eq.(34). Therefore, the first term belongs to the rise time and the second to the decay, as expected)

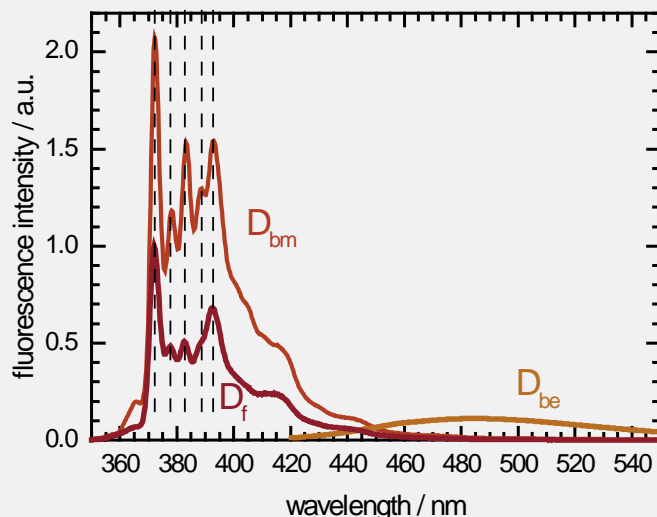
So finally the time resolved fluorescence emission  $I(t)$  is given by the sum of the contributions of free dye ( $\tau_f$ ), bound monomer  $I_{bm}(t)$  (eq. (33)), and bound excimer  $I_{be}(t)$  (eq. (32) or (34)). Additionally a small contribution of surfactant fluorescence (TX100) and fluorescent impurities with typically short lifetime ( $\tau_s$ ) is added. The amplitudes  $A_x$  contain all constant pre-exponential factors.

$$I(t) = A_s e^{-t/\tau_s} + A_f e^{-t/\tau_f} + A_{bm} I_{bm}(t) + A_{be} I_{be}(t) \quad (35)$$

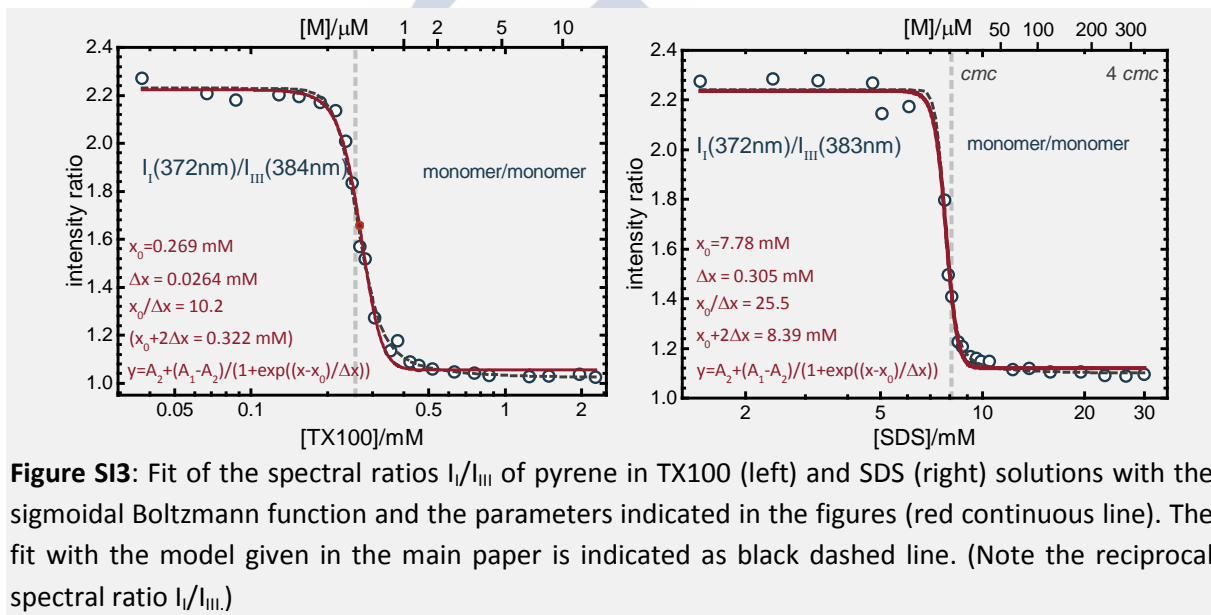
## References

- [1] W Al-Soufi, L Piñeiro, M Novo. A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: Application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tension data, J.Colloid Interface Sci. 370 (2012) 102-110.
- [2] L Piñeiro, S Freire, J Bordello, M Novo, W Al-Soufi. Dye exchange in micellar solutions. Quantitative analysis of bulk and single molecule fluorescence titrations, Soft Matter. 9 (2013) 10779-10790.
- [3] J Phillips. The energetics of micelle formation, Transactions of the Faraday Society. 51 (1955) 561-569.
- [4] I García-Mateos, M Mercedes Velázquez, LJ Rodríguez. Critical micelle concentration determination in binary mixtures of ionic surfactants by deconvolution of conductivity/concentration curves, Langmuir. 6 (1990) 1078-1083.
- [5] M Tachiya. Application of a generating function to reaction kinetics in micelles. Kinetics of quenching of luminescent probes in micelles, Chemical Physics Letters. 33 (1975) 289-292.
- [6] M Tachiya. Kinetics of quenching of luminescent probes in micellar systems. II, J.Chem.Phys. 76 (1982) 340.
- [7] BK Selinger, AR Watkins. Distributional effects on excimer formation in micellar surfactant solutions, Chemical Physics Letters. 56 (1978) 99-104.
- [8] PP Infelta, M Graetzel. Statistics of solubilizate distribution and its application to pyrene fluorescence in micellar systems. A concise kinetic model, J.Chem.Phys. 70 (1979) 179-186.
- [9] MH Gehlen, FC De Schryver. Time-resolved Fluorescence Quenching in Micellar Assemblies, Chem.Rev. 93 (1993) 199-221.

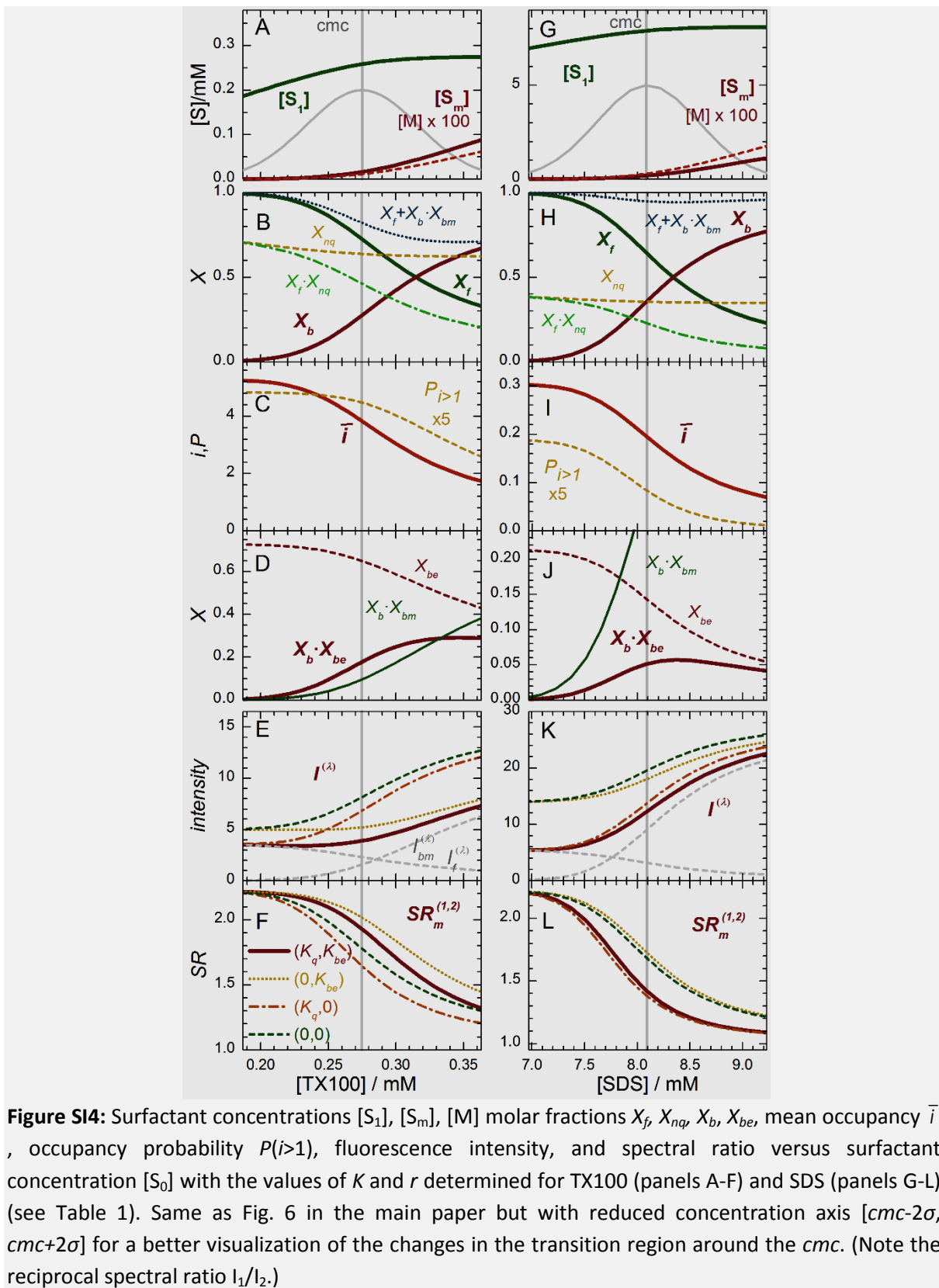
Additional Figures



**Figure S12:** "Pure" fluorescence spectra of the species involved in the model of the emission of pyrene in surfactant solutions: free pyrene in the aqueous phase emitting as monomer ( $D_f$ ), and pyrene bound to micelles emitting as monomer ( $D_{bm}$ ) or emitting as excimer ( $D_{be}$ ).

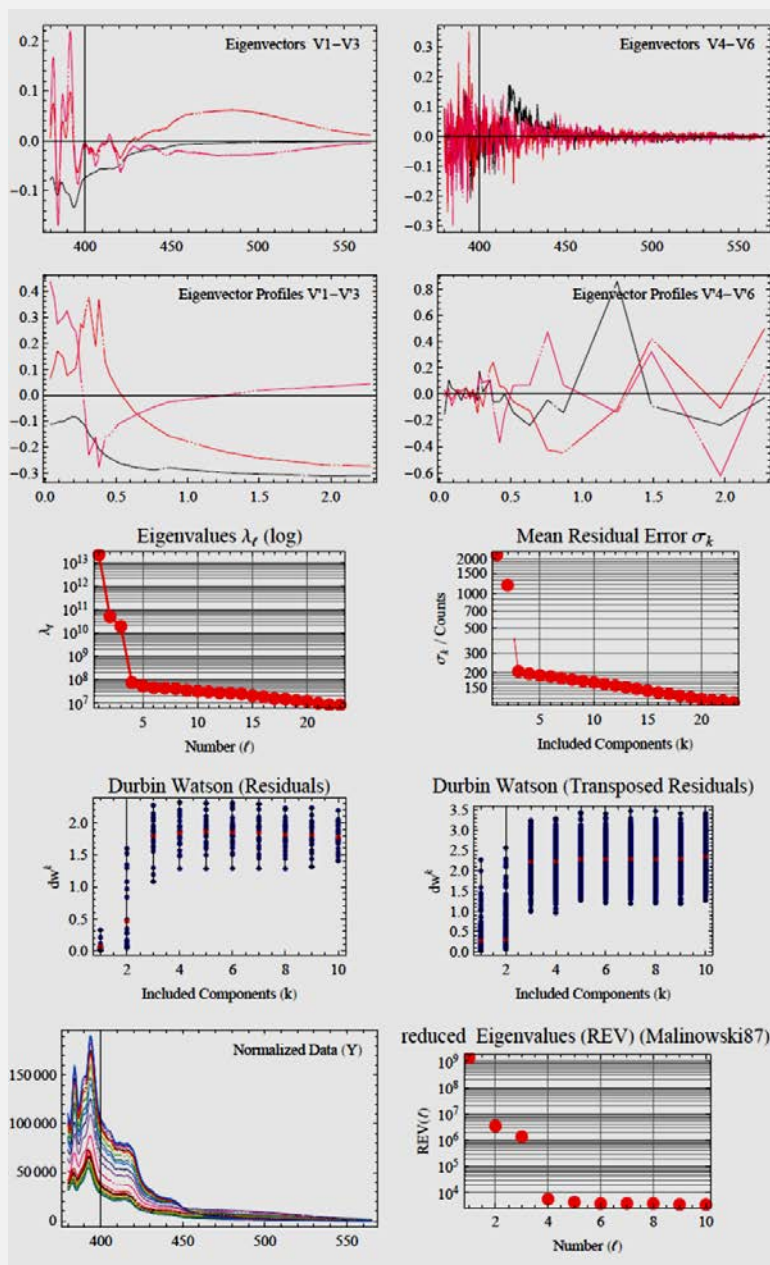


**Figure S13:** Fit of the spectral ratios  $I_I/I_{III}$  of pyrene in TX100 (left) and SDS (right) solutions with the sigmoidal Boltzmann function and the parameters indicated in the figures (red continuous line). The fit with the model given in the main paper is indicated as black dashed line. (Note the reciprocal spectral ratio  $I_I/I_{III}$ .)



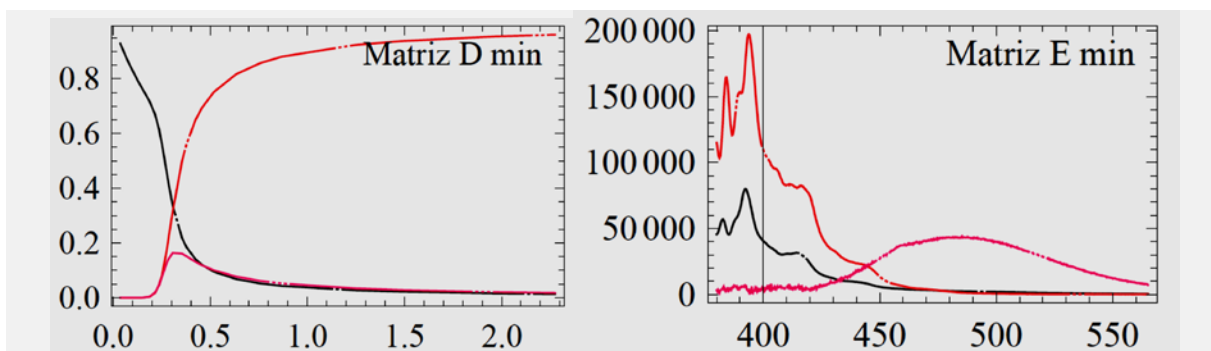
**Figure S14:** Surfactant concentrations  $[S_1]$ ,  $[S_m]$ ,  $[M]$  molar fractions  $X_f$ ,  $X_{nq}$ ,  $X_b$ ,  $X_{be}$ , mean occupancy  $\bar{i}$ , occupancy probability  $P_{i>1}$ , fluorescence intensity, and spectral ratio versus surfactant concentration  $[S_0]$  with the values of  $K$  and  $r$  determined for TX100 (panels A-F) and SDS (panels G-L) (see Table 1). Same as Fig. 6 in the main paper but with reduced concentration axis  $[cmc-2\sigma, cmc+2\sigma]$  for a better visualization of the changes in the transition region around the cmc. (Note the reciprocal spectral ratio  $I_1/I_2$ .)

**Principal Component Global Analysis (PCGA) of Pyrene in TX100**

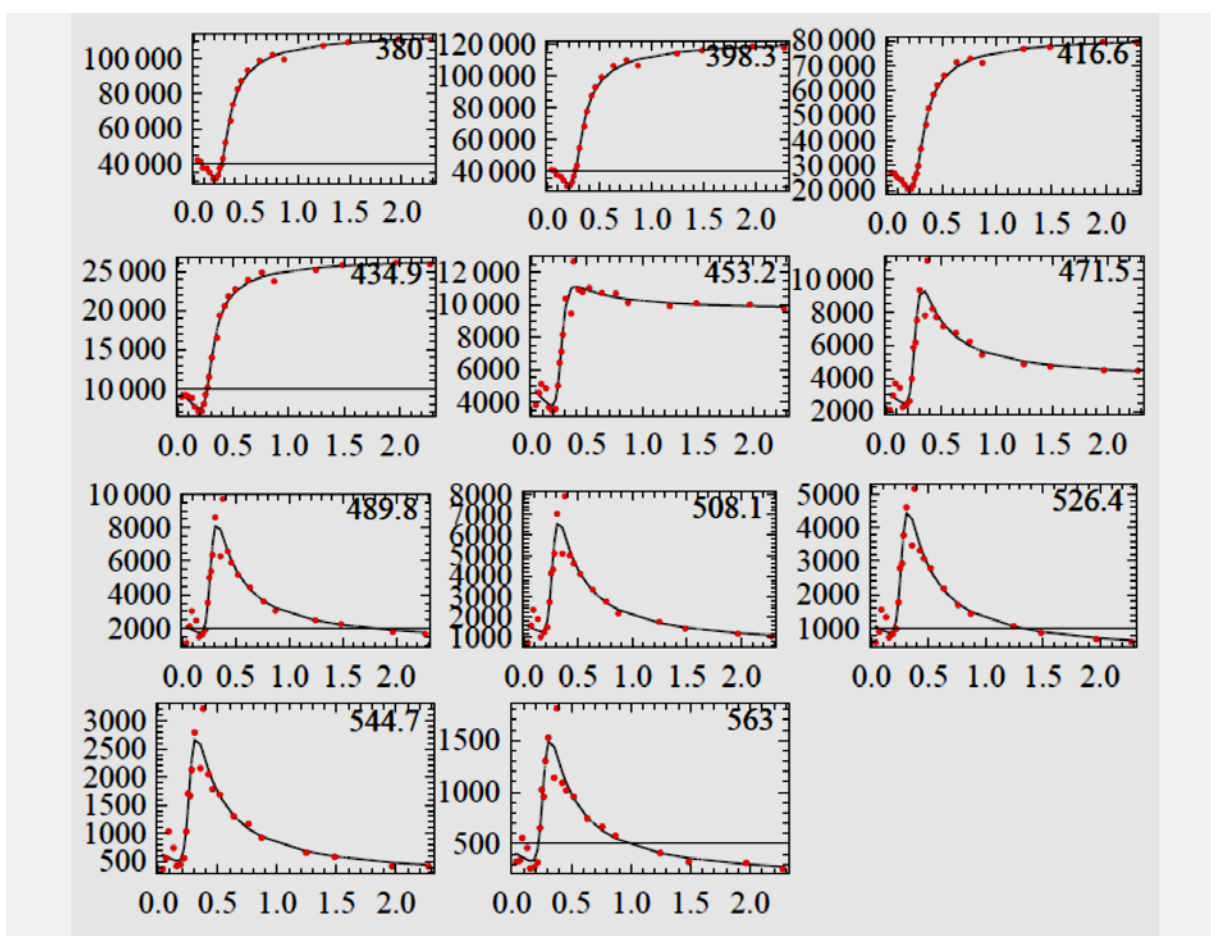


**Figure S15:** Principal Component Analysis of fluorescence intensity spectra of pyrene in aqueous solutions of TX100, [TX100] = 0.03 mM–2.3 mM (same data as in Fig. 3). All plots indicate three emissive components.

5.2 Supplementary Information



**Figure S16:** Global Analysis of fluorescence intensity spectra of pyrene in aqueous solutions of TX100, [TX100] = 0.03 mM–2.3 mM (same data as in Fig. 3) with the equation for  $I([S]_0)$  given in text. Fluorescence Intensity  $I=D \cdot E$ ,  $D$ : matrix of concentration profiles  $[D_f]$ ,  $[D_{bm}]$ , and  $[D_{be}]$ ,  $E$ : matrix of “pure” spectra of the species  $D_f$ ,  $D_{bm}$ , and  $D_{be}$ .



**Figure S17:** Global Analysis of fluorescence intensity spectra of pyrene in aqueous solutions of TX100, [TX100] = 0.03 mM–2.3 mM (same data as in Fig. 3) with the equation for  $I([S]_0)$  given in text. Representation of the fit for selected intensity profiles vs. [TX100]/mM at the wavelength/nm indicated in the upper right corner of each plot.

## Fitting functions

We provide ready to use fitting functions for Origin Data Analysis Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060, USA) as compressed zip-archive. Updated versions can be downloaded from the author's webpage.

The functions were tested with Origin 8.5 SR1 and Origin 9.1.

For use in Origin the zip-archive should be decompressed in a temporal directory and the functions should be added from the *fitting function organizer* to the Origin Fitting functions. (Do not copy them directly to the Origin directory.)

We propose to add them to a new category such as "APNModel".

All functions can be used for nonlinear fitting and for calculations in columns or other functions.

For calculations the functions should be called as "nlf\_FunctionName(parameters)", for example: "nlf\_APNModel\_S1(cS0,cmc,r)".

The concentration model  $nlf\_APNModel\_S1(cS0,cmc,r)$  is called from within the other functions.

The fitting functions also serve as examples for other data analysis packages.

For further information see:

Wajih Al-Soufi, Lucas Piñeiro, Mercedes Novo, A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: Application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tension data, **Journal of Colloid and Interface Science**, Volume 370, Issue 1, 15 March 2012, Pages 102-110, ISSN 0021-9797, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.037>.

Lucas Piñeiro, Sonia Freire, Jorge Bordello, Mercedes Novo, and Wajih Al-Soufi, *Dye exchange in micellar solutions. Quantitative analysis of bulk and single molecule fluorescence titrations*, Soft Matter 2013, 9, 10779-10790, DOI: 10.1039/c3sm52092g

Webpage of the authors: <http://www.usc.es/fotofqm/en/units/single-molecule-fluorescence>

## Concentration Model

### APNModel\_S1

Concentration model used by all other derived properties.

Takes  $[S]_0$  and calculates the monomeric concentration  $[S_1]$  as function of the  $cmc$  and the relative transition width  $r$ .

$$[S_1] = cmc \left[ 1 - \frac{A}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r \exp\left(-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}\right) + (s_0-1) \left( \operatorname{erf}\left(\frac{s_0-1}{\sqrt{2}r}\right) - 1 \right) \right) \right]$$

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r \exp\left(-\frac{1}{2r^2}\right) + \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}r}\right)}$$

Function Name = APNModel\_S1

Brief Description = APN Model: monomeric surfactant concentration - USC - Al-Soufi 2011  
[Independent Variables]

## 5.2 Supplementary Information

```

cS0 =
[Dependent Variables]
cS1 =
[Fitting Parameters]
Names = cmc,r
Meanings = cmc,relative transition width
[Formula]
s0 = cS0/cmc;
A=2/(1+sqrt(2/Pi)*r*exp(-1/(2*r*r))+erf(1/Sqrt(2)/r));
cS1=cmc*(1 - (A/2)*( sqrt(2/Pi)*r*exp(-(s0-1)^2/(2*r*r)))+(s0-1)*(erf((s0-1)/(sqrt(2)*r))-1
));

```

### Pyrene Fluorescence

#### APNModel\_PyreneFluorIntensity

Fluorescence emission intensity of a dye (pyrene) in exchange equilibrium between the aqueous and the micellar pseudo-phase in a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the fluorescence intensity  $I^{(\lambda)}([S]_0)$  as function of the following parameters:

$$I^{(\lambda)}([S]_0) = I_{f,nq}^{(\lambda)} + I_{bm}^{(\lambda)} + I_{be}^{(\lambda)} = I_f^{(\lambda)} \left( X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(\lambda)} X_b X_{bm} + q_{be,f}^{(\lambda)} X_b X_{be} \right)$$

$$q_{bm,f}^{(\lambda)} = \frac{F_{bm}^{(\lambda)}}{F_f^{(\lambda)}}, \quad q_{be,f}^{(\lambda)} = \frac{F_{be}^{(\lambda)}}{F_f^{(\lambda)}}$$

with

$$X_f = \frac{1}{1 + K \cdot [M]}, \quad X_b = 1 - X_f, \quad X_{nq} = \frac{1}{1 + K_q [S_1]}, \quad \bar{i} = \frac{[D]_b}{[M]} = [D]_0 \cdot K \cdot X_f$$

$$X_{bm} = e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{i!} \frac{\bar{i}^i}{1 + i K'_{be}}, \quad X_{be} = 1 - X_{bm}$$

$[S_1]$  and  $[S_m]$  are calculated with the surfactant concentration model (APNModel).

$[D]_0$  is necessary for the determination of the mean occupancy.

Parameter	Variable	
<i>cmc</i>	<i>cmc</i>	critical micelle concentration
<i>r</i>	<i>r</i>	relative transition width
<i>n</i>	<i>n</i>	aggregation number
<i>K</i>	<i>K</i>	binding equilibrium constant
<i>cD0</i>	[D] <sub>0</sub>	total dye concentration
<i>Kq</i>	<i>K<sub>q</sub></i>	quenching equilibrium constant
<i>KeV</i>	$K'_{be} = K_{be} / V_m$	excimer formation constant
<i>IfL</i>	$I_f^{(\lambda)} = F_f^{(\lambda)} [D]_0$	fluorescence intensity of free dye at wavelength $\lambda$
<i>qbmFL</i>	$q_{bm,f}^{(\lambda)} = F_{bm}^{(\lambda)} / F_f^{(\lambda)}$	fluorescence intensity ratio of <b>bound monomer</b> and <b>free</b> dye at wavelength $\lambda$
<i>qbefL</i>	$q_{be,f}^{(\lambda)} = F_{be}^{(\lambda)} / F_f^{(\lambda)}$	fluorescence intensity ratio of <b>bound excimer</b> and <b>free</b> dye at wavelength $\lambda$

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *n*, *K*, *cD0*, *Kq*, *KeV*, *IfL*, *qbmFL*, *qbefL*

[Independent Variables]

*cS0* =

[Dependent Variables]

*IL* =

[Formula]

```
double cS1, cSm, cM, Xf, Xb, im, Xnq, Xbm, Xbe, imMin, ifac;
```

```
int ii;
```

```
// call concentration model APNModel
```

```
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
```

```
cSm= cS0 - cS1;
```

```
cM=cSm/n;
```

```
// fractions
```

```
Xf= 1/(1+K*cM);
```

```
Xb= 1-Xf;
```

```
Xnq = 1/(1+Kq*cS1);
```

```
// mean occupancy im
```

```
im = cD0*K*Xf;
```

```
// determine Xbm and Xbe iteratively
```

```
// number of terms to be summed up
```

```
imMin = ceil(6+3*im);
```

```
// initialize
```

```
Xbm=1; // term with i=0
```

```
ifac=1;
```

```
for(ii = 1; ii < imMin; ii++) // start with i=1 (term with i=0 is 1)
```

```
{
```

```
    //increase factorial ifac=i!
```

```
    ifac*=ii;
```

```
    // add next summand
```

```
    Xbm += pow(im,ii)/(ifac*(1+ii*KeV));
```

```
}
```

```
Xbm *=exp(-im);
```

```
Xbe = 1 - Xbm;
```

```
IL= IfL*(Xf*Xnq + qbmFL*Xb*Xbm + qbefL*Xb*Xbe);
```

## 5.2 Supplementary Information

### APNModel\_PyreneFluorSRMonExc

Spectral Ratio at two wavelength of the fluorescence emission intensity of a dye (pyrene) in exchange equilibrium between the aqueous and the micellar pseudo-phase in a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the spectral ratio of the fluorescence intensities  $I^{(2)}([S]_0)$  as function of the following parameters:

$$SR^{(2,1)} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm} + q_{be,f}^{(2,1)} X_b X_{be}}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}}$$

This general function can be used for the monomer-monomer ratio  $SR_m^{(2,1)} = I^{(2)}/I^{(1)}$

$$SR_m^{(2,1)} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} \approx \frac{SR_f^{(2,1)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(2,1)} q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}} \text{ with } q_{be,f}^{(2,1)} = 0$$

and also for the excimer-monomer ratio  $SR_e^{(e,1)} = I^{(e)}/I^{(1)}$

$$SR_e^{(e,1)} = \frac{I^{(e)}}{I^{(1)}} \approx \frac{SR_f^{(e,1)} X_f X_{nq} + SR_{bm}^{(e,1)} q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm} + q_{be,f}^{(e,1)} X_b X_{be}}{X_f X_{nq} + q_{bm,f}^{(1)} X_b X_{bm}}$$

$$SR_f^{(2,1)} = \frac{F_f^{(2)}}{F_f^{(1)}}, \quad SR_f^{(e,1)} = \frac{F_f^{(e)}}{F_f^{(1)}}, \quad SR_{bm}^{(2,1)} = \frac{F_{bm}^{(2)}}{F_{bm}^{(1)}}, \quad SR_{bm}^{(e,1)} = \frac{F_{bm}^{(e)}}{F_{bm}^{(1)}}$$

$$q_{bm,f}^{(1)} = \frac{F_{bm}^{(1)}}{F_f^{(1)}}, \quad q_{be,f}^{(e,1)} = \frac{F_{be}^{(e)}}{F_f^{(1)}}$$

with

$$X_f = \frac{1}{1 + K \cdot [M]}, \quad X_b = 1 - X_f, \quad X_{nq} = \frac{1}{1 + K_q [S_1]}$$

$$\bar{i} = \frac{[D_b]}{[M]} = [D]_0 \cdot K \cdot X_f, \quad X_{bm} = e^{-\bar{i}} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{1 + iK'_{be}} \frac{\bar{i}^i}{i!}, \quad X_{be} = 1 - X_{bm}$$

$[S_1]$  and  $[S_m]$  are calculated with the surfactant concentration model (APNModel).

$[D]_0$  is necessary for the determination of the mean occupancy.

Parameter	Variable	
<i>cmc</i>	<i>cmc</i>	critical micelle concentration
<i>r</i>	<i>r</i>	relative transition width
<i>n</i>	<i>n</i>	aggregation number
<i>K</i>	<i>K</i>	binding equilibrium constant
<i>cD0</i>	$[D]_0$	total dye concentration
<i>Kq</i>	$K_q$	quenching equilibrium constant
<i>KeV</i>	$K'_{be} = K_{be} / V_m$	excimer formation constant
<i>SRf21</i>	$SR_f^{(2,1)} = F_f^{(2)} / F_f^{(1)}$	fluorescence intensity ratio of <b>free</b> dye at $\lambda_2$ and $\lambda_1$
<i>SRbm21</i>	$SR_{bm}^{(2,1)} = F_{bm}^{(2)} / F_{bm}^{(1)}$	fluorescence intensity ratio of <b>bound monomer</b> at $\lambda_2$ and $\lambda_1$
<i>qbef21</i>	$q_{be,f}^{(2,1)} = F_{be}^{(2)} / F_f^{(1)}$	fluorescence intensity ratio of <b>bound excimer</b> and <b>free</b> dye at $\lambda_2$ and $\lambda_1$
<i>qbmf1</i>	$q_{bm,f}^{(1)} = F_{bm}^{(1)} / F_f^{(1)}$	fluorescence intensity ratio of <b>bound monomer</b> and <b>free</b> dye at $\lambda_1$

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *n*, *K*, *cD0*, *Kq*, *KeV*, *SRf21*, *SRbm21*, *qbef21*, *qbmf1*

[Independent Variables]

*cS0* =

[Dependent Variables]

*SR21* =

[Formula]

double *cS1*, *cSm*, *cM*, *Xf*, *Xb*, *im*, *Xnq*, *Xbm*, *Xbe*, *imMin*;

int *ii*, *ifac*;

// call concentration model APNModel

*cS1*= nlf\_APNModel\_S1(*cS0*,*cmc*,*r*);

*cSm*= *cS0* - *cS1*;

*cM*=*cSm*/*n*;

// fractions

*Xf*= 1/(1+*K*\**cM*);

*Xb*= 1-*Xf*;

*Xnq* = 1/(1+*Kq*\**cS1*);

// mean occupancy *im*

*im* = *cD0*\**K*\**Xf*;

// determine *Xbm* and *Xbe* iteratively

// number of terms to be summed up

*imMin* = ceil(6+3\**im*);

// initialize

*Xbm*=1; // term with *i*=0

*ifac*=1;

for(*ii* = 1; *ii* < *imMin*; *ii*++) // start with *i*=1 (term with *i*=0 is 1)

{

  //increase factorial *ifac*=*i*!

*ifac*\*=*ii*;

  // add next summand

*Xbm* += pow(*im*,*ii*)/(*ifac*\*(1+*ii*\**KeV*));

}

*Xbm* \*=exp(-*im*);

*Xbe* = 1 - *Xbm*;

*SR21*= (*SRf21*\**Xf*\**Xnq* + *SRbm21*\**qbmf1*\**Xb*\**Xbm* + *qbef21*\**Xb*\**Xbe*) / (*Xf*\**Xnq* + *qbmf1*\**Xb*\**Xbm*);

## 5.2 Supplementary Information

### APNModel\_PyreneFluorDecayMon

Time resolved intensity in the monomer band of the fluorescence emission of a dye (pyrene) in exchange equilibrium between the aqueous and the micellar pseudo-phase in a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the spectral ratio of the fluorescence intensities  $I^{(\lambda)}([S]_0)$  as function of the following parameters:

$$I(t) = A_s e^{-t/\tau_s} + A_f I_f(t) + A_{bm} I_{bm}(t)$$

$$I_f(t) = F_f X_f X_{nq} [D]_0 e^{-k_f t}$$

$$I_{bm}(t) = F_{bm} X_b [D]_0 e^{\bar{i} \left( e^{-k_f t} - 1 \right) - k_m t} = F_{bm} X_b [D]_0 e^{\bar{i} \left( e^{-K_{be} k_m t} - 1 \right) - k_m t}$$

with

$$k'_{be} = \frac{k_1}{V_m} \quad K'_{be} = \frac{k_1}{k_m V_m}$$

$$X_f = \frac{1}{1 + K \cdot [M]}, \quad X_b = 1 - X_f, \quad X_{nq} = \frac{1}{1 + K_q [S_1]}, \quad \bar{i} = \frac{[D_b]}{[M]} = [D]_0 \cdot K \cdot X_f$$

$[S_1]$  and  $[S_m]$  are calculated with the surfactant concentration model (APNModel).

$[D]_0$  is necessary for the determination of the mean occupancy.

Fractions  $X_f$ ,  $X_{nq}$ ,  $X_b$  are applied for correct amplitudes in global fits ( $X_{bm}$  is not taken into account).

Parameter	Variable	
<i>cmc</i>	<i>cmc</i>	critical micelle concentration
<i>r</i>	<i>r</i>	relative transition width
<i>n</i>	<i>n</i>	aggregation number
<i>K</i>	<i>K</i>	binding equilibrium constant
<i>cD0</i>	$[D]_0$	total dye concentration
<i>Kq</i>	$K_q$	quenching equilibrium constant
<i>KeV</i>	$K'_{be} = K_{be} / V_m$	excimer formation constant $K'_{be} = k_1 / (k_m V_m)$
<i>km</i>	$k_m$	bound monomer decay rate constant
<i>I0</i>	$I_0$	residual fluorescence intensity (baseline)
<i>t0</i>	$t_0$	time shift
<i>ts</i>	$\tau_s$	lifetime of surfactant or impurities (component with short lifetime)
<i>tf</i>	$\tau_f$	lifetime of free dye
<i>As</i>	$A_s$	amplitude of surfactant or impurities
<i>Af</i>	$A_f$	amplitude of free dye
<i>Abm</i>	$A_{bm}$	amplitude of bound monomer
<i>cS0</i>	$[S]_0$	total surfactant concentration

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *n*, *K*, *cD0*, *Kq*, *KeV*, *km*, *I0*, *t0*, *ts*, *tf*, *As*, *Af*, *Abm*, *cS0*

```
[Independent Variables]
t =

[Dependent Variables]
I =

[Formula]
// call concentration model APNModel
double cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
double cSm= cS0 - cS1;
double cM=cSm/n;

// fractions
double Xf= 1/(1+K*cM);
double Xb= 1-Xf;
double Xnq = 1/(1+Kq*cS1);

// mean occupancy im
double im = cD0*K*Xf;

// this is a tail-fit, so shift t=0 to the pulse position
double tt = t-t0;

double If = Xf*Xnq * exp(-tt/τf);
double Ibm = Xb* exp(im*exp(-KeV*km*tt)-im - km*tt);

I = I0 + As*exp(-tt/τs) + Af*If + Abm*Ibm;
```

### APNModel\_PyreneFluorDecayMonExc

Time resolved intensity in the monomer band of the fluorescence emission of a dye (pyrene) in exchange equilibrium between the aqueous and the micellar pseudo-phase in a surfactant solution.

Takes  $[S]_0$  and calculates the spectral ratio of the fluorescence intensities  $I^{(\lambda)}([S]_0)$  as function of the following parameters:

$$I(t) = A_s e^{-t/\tau_s} + A_f I_f(t) + A_{bm} I_{bm}(t) + A_{be} I_{be}(t)$$

$$I_f(t) = F_f X_f X_{nq} [D]_0 e^{-k_f t}$$

$$I_{bm}(t) = F_{bm} X_b [D]_0 e^{\bar{i} \left( e^{-k_f t} - 1 \right) - k_m t} = F_{bm} X_b [D]_0 e^{\bar{i} \left( e^{-K_{be} k_m t} - 1 \right) - k_m t}$$

$$I_{be}(t) = F_{be} X_b [D]_0 e^{-\bar{i} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{\bar{i}^i}{i!} \frac{K'_{be} i}{1 + K'_{be} i - k_e/k_m} \left( e^{-k_e t} - e^{-k_m (1 + K'_{be} i) t} \right)}$$

with

$$K'_{be} = \frac{k_1}{V_m} \quad K_{be} = \frac{k_1}{k_m} \frac{1}{V_m}$$

$$X_f = \frac{1}{1 + K \cdot [M]}, \quad X_b = 1 - X_f, \quad X_{nq} = \frac{1}{1 + K_q [S_1]}, \quad \bar{i} = \frac{[D]_0}{[M]} = [D]_0 \cdot K \cdot X_f$$

$[S_1]$  and  $[S_m]$  are calculated with the surfactant concentration model (APNModel).

## 5.2 Supplementary Information

$[D]_0$  is necessary for the determination of the mean occupancy.

Fractions  $X_f$ ,  $X_{nq}$ ,  $X_b$  are applied for correct amplitudes in global fits ( $X_{bm}$  and  $X_{be}$  are not taken into account).

Parameter	Variable	
<i>cmc</i>	<i>cmc</i>	critical micelle concentration
<i>r</i>	<i>r</i>	relative transition width
<i>n</i>	<i>n</i>	aggregation number
<i>K</i>	<i>K</i>	binding equilibrium constant
<i>cD0</i>	$[D]_0$	total dye concentration
<i>Kq</i>	$K_q$	quenching equilibrium constant
<i>KeV</i>	$K'_{be} = K_{be} / V_m$	excimer formation constant $K'_{be} = k_1 / (k_m V_m)$
<i>km</i>	$k_m = (\tau_m)^{-1}$	bound monomer decay rate constant
<i>ke</i>	$k_e = (\tau_e)^{-1}$	bound excimer decay rate constant
<i>I0</i>	$I_0$	residual fluorescence intensity (baseline)
<i>t0</i>	$t_0$	time shift
<i>ts</i>	$\tau_s$	lifetime of surfactant or impurities (component with short lifetime)
<i>tf</i>	$\tau_f$	lifetime of free dye
<i>As</i>	$A_s$	amplitude of surfactant or impurities
<i>Af</i>	$A_f$	amplitude of free dye
<i>Abm</i>	$A_{bm}$	amplitude of bound monomer
<i>Abe</i>	$A_{be}$	amplitude of bound excimer
<i>cS0</i>	$[S]_0$	total surfactant concentration

[Fitting Parameters]

Names = *cmc*, *r*, *n*, *K*, *cD0*, *Kq*, *KeV*, *km*, *ke*, *I0*, *t0*, *ts*, *tf*, *As*, *Af*, *Abm*, *Abe*, *cS0*

[Independent Variables]

t =

[Dependent Variables]

It =

[Formula]

```
// call concentration model APNModel
double cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
double cSm= cS0 - cS1;
double cM= cSm/n;
```

```
// fractions
double Xf= 1/(1+K*cM);
double Xb= 1-Xf;
double Xnq = 1/(1+Kq*cS1);
```

```
// mean occupancy im
double im = cD0*K*Xf;
```

```
// this is a tail-fit, so shift t=0 to the pulse position
double tt = t-t0;
```

```

// Free dye
double If = Xf*Xnq * exp(-tt/tf);

// Bound Monomer
double Ibm = Xb* exp(im*exp(-KeV*km*tt)-im - km*tt);

// Bound Excimer
// determine Ibm iteratively
// number of terms to be summed up
double imMin = ceil(6+3*im);

// initialize
double Ibe = 0;
double ifac = 1;
double term1, term2, term3;
int ii;

// we start at ii=1 because summand is 0 for ii=0
for(ii = 1; ii < imMin; ii++ )
{
    ifac *= ii; //Factorial j!
    term1= pow(im,ii)/ifac;
    term2= ((ii*KeV)/(1+ii*KeV-ke/km));
    term3= (exp(-ke*tt) - exp(-km*(1 +KeV*ii)*tt));
    Ibe += term1 * term2 * term3; //excimer sum
}
Ibe*= Xb*exp(-im); // complete equation

// Total decay
It = I0 + As*exp(-tt/ts) + Af*If + Abm*Ibm + Abe*

```





## Capítulo 6. Determinación de la *cmc* usando pireno como sonda fluorescente

### 6.1 Introducción.

El pireno es un colorante hidrofóbico con propiedades fotofísicas únicas. Presenta un espectro vibracional resuelto característico muy sensible al entorno. La relación de intensidades de dos bandas vibracionales permite estimar la polaridad del medio (Glushko 1981, Karpovich 1995). Las bandas típicamente utilizadas son la primera y la tercera, a 372nm y 382nm, respectivamente. El pireno tiene una alta afinidad para las micelas de tensioactivos. El cambio en la relación de las bandas vibracionales al pasar del medio acuoso al interior menos polar de las micelas es muy frecuentemente utilizado para detectar la formación de micelas alrededor de la *cmc* (Förster 1964, Graetzel 1976, Kalyanasundaram 1977, Almgren 1979, Infelta 1979, Singer 1982, De Schryver 1984, Malliaris 1988, Rharbi 2001, Capek 2002, Mohr 2007, Mitsionis 2012, Topel 2013).

Aparte del método gráfico del corte de dos rectas mencionado anteriormente (Capítulo 1), otro procedimiento empírico habitual para obtener la *cmc* de la relación de intensidades es el ajuste de una función sigmoide logística (Aguiar 2003). A priori no se identifica ninguna característica de esta curva empírica con la *cmc*. Aguiar et al. observaron que la *cmc* de tensioactivos iónicos coincide aproximadamente con el punto de inflexión de la curva sigmoide, mientras que en la de tensioactivos no-iónicos está desplazado hacia mayores concentraciones (Aguiar 2003). Sin embargo estos autores no relacionan sus observaciones con propiedades fisicoquímicas del pireno, de los tensioactivos y de su interacción. En nuestra opinión el ajuste directo de datos experimentales tan complejos como la relación de intensidades de una sonda fluorescente repartida entre fase acuosa y micelas con curvas matemáticas fenomenológicas no puede llevar a una comprensión del sistema bajo estudio y por consecuencia tampoco a valores coherentes de los parámetros que lo caracterizan.

La motivación principal de este capítulo es aplicar los modelos de las concentraciones de tensioactivos y de la fluorescencia de pireno presentados en los capítulos anteriores a datos de fluorescencia del pireno en diferentes tensioactivos y comparar con los resultados obtenidos utilizando técnicas directas con el objetivo de encontrar un método más general que permita determinar la *cmc* de tensioactivos usando la fluorescencia del pireno como sonda.

Presentamos en este capítulo datos con un análisis y una discusión preliminar, pendientes de su publicación.

## 6.2 Teoría.

El modelo “APN” para la concentración del surfactante monomérico y micelizado ya se ha descrito con anterioridad en los capítulos (3 y 4). Se basa en la que se denomina como “condición de Phillips” (6.1) que define la *cmc* como la concentración total de surfactante  $[S]_0$  a la que el gradiente de la concentración monomérica  $[S_1]$  con respecto a  $[S]_0$  es máxima o, lo que es lo mismo, donde la tercera derivada de  $[S_1]$  es cero (Al-Soufi 2012).

$$\left( \frac{d^3[S_1]}{d[S]_0^3} \right)_{[S]_0=cmc} = 0 \quad (6.1)$$

Integrando se obtiene como segunda derivada con respecto a  $[S]_0$  una función Gaussiana centrada en la *cmc* con una amplitud  $A$  y un ancho  $\sigma$ :

$$\frac{d^2[S_1]}{d[S]_0^2} = \frac{-A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{([S]_0-cmc)^2}{2\sigma^2}} = \frac{-A}{cmc} \frac{1}{\sqrt{2\pi}r} e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} \quad (6.2)$$

Para simplificar las expresiones, se define una nueva variable, *concentración total de surfactante relativa* que se denomina como  $s_0$ :

$$s_0 = [S]_0 / cmc \quad (6.3)$$

El parámetro  $\sigma$  de la Gaussiana indica el ancho de la región de transición en torno a la *cmc*. Para poder comparar entre diferentes *cmc*, definimos como nuevo parámetro el *ancho de transición relativo*:

$$r = \sigma / cmc \quad (6.4)$$

Con las ecuaciones (6.2) y (6.3) podemos obtener una ecuación que describe  $[S_1]$  como función de  $[S]_0$  con una amplitud  $A$  y por consiguiente la concentración de surfactante micelizado  $[S_m]$  (Al-Soufi 2012):

$$[S_1] = cmc \left[ 1 - \frac{A}{2} \left( \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{(s_0-1)^2}{2r^2}} + (s_0-1) \left( \operatorname{erf} \left( \frac{s_0-1}{\sqrt{2}r} \right) - 1 \right) \right) \right] \quad (6.5)$$

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r e^{-\frac{1}{2r^2}} + \operatorname{erf} \left( \frac{1}{\sqrt{2}r} \right)}$$

$$[S_m] = [S]_0 - [S_1]$$

Para explicar la intensidad de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones de surfactantes se tendrá en cuenta el equilibrio de partición del pireno entre la fase acuosa y las micelas (ecuación (6.6) (Piñeiro 2013).



Teniendo en cuenta el equilibrio ( $K$ ) y la definición de las concentraciones de cada especie en la formación de micelas (6.5) podremos definir todas las especies provenientes de la interacción entre el pireno en todas sus formas con el surfactante. Además podremos describir los cambios en los espectros y asignar a que especie es debido: pireno libre en fase acuosa emitiendo como monómero ( $D_f$ ), pireno enlazado a micelas como monómero ( $D_{bm}$ ). Ya presentamos los detalles de este tratamiento en el capítulo anterior. Ignoramos en este capítulo la pequeña contribución del excímero en las micelas ( $D_{be}$ ) y libre.

Los espectros puros de las especies de pireno  $D_f$  y  $D_{bm}$  se representan en la Figura 6.1

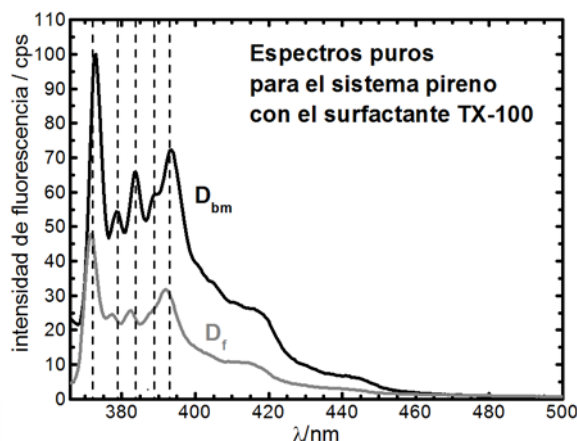


Figura 6.1 Espectros puros para el sistema Pireno TX-100 para el pireno libre ( $D_f$ ) y en el interior de las micelas ( $D_{bm}$ ).  $[TX100] = 0.091mM$  ( $D_f$ ) ,  $[TX100] = 1.64mM$  ( $D_{bm}$ ),  $[Pireno]= 5.4 \times 10^{-7} M$ ,  $\lambda_{exc}=319 nm$ .

Para una longitud de onda dada la intensidad de fluorescencia es la suma de las contribuciones de cada una de las especies con  $F_f$  y  $F_{bm}$  siendo los “espectros puros” de las dos especies  $D_f$  y  $D_{bm}$  (Al-Soufi 2012):

$$I^{(\lambda)} = F_f^{(\lambda)}[D_f] + F_{bm}^{(\lambda)}[D_{bm}] \tag{6.7}$$

El siguiente paso es obtener un modelo que describe los diferentes procesos que tienen lugar en la formación y equilibrio entre las diferentes especies fluorescentes.

### 6.2.1 Equilibrio de reparto

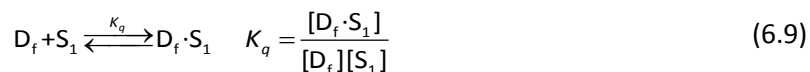
El proceso más importante es el intercambio del pireno entre las micelas y la fase acuosa. Es un proceso rápido que se puede describir como un equilibrio 1:1 con una constante de equilibrio macroscópica  $K$  (6.6).

Las fracciones molares del fluoróforo libre ( $X_f$ ) y el fluoróforo micelizado ( $X_b$ ) para un concentración total de pireno:  $[D]_0=[D_f]+[D_b]$  se describen como (Al-Soufi 2012):

$$X_f = \frac{[D_f]}{[D]_0} = \frac{1}{1 + K \cdot [M]}, \quad X_b = \frac{[D_b]}{[D]_0} = \frac{K \cdot [M]}{1 + K \cdot [M]} \tag{6.8}$$

### 6.2.2 Quenching entre el pireno y el surfactante monomérico

La emisión del pireno puede ser desactivada mediante *quenching* por parte de las moléculas de surfactante. Se define una constante Stern-Vollmer  $K_q$  que describe el equilibrio entre la colorante libre  $D_f$  y el complejo colorante-surfactante  $D_f \cdot S_1$ . Se describe mediante la siguiente expresión (Piñeiro 2015):



La contribución del pireno libre no desactivado, sin *quenching*,  $I_{f,nq}^{(\lambda)}$ , puede ser expresada como la fracción de colorante que no ha sufrido quenching  $X_{nq}$  y la concentración total de colorante libre  $[D_f]$ :

$$I_{f,nq}^{(\lambda)} = F_f^{(\lambda)} [D_f] X_{nq} \quad (6.10)$$

$$X_{nq} = \frac{1}{1 + K_q [S_1]}$$

### 6.2.3 Fluorescencia del estado estacionario

En este apartado vamos a expresar la intensidad de fluorescencia observada total como una función de la concentración de surfactante, utilizando para ello la expresión (6.7):

$$I^{(\lambda)} = I_{f,nq}^{(\lambda)} + I_{bm}^{(\lambda)} = F_f^{(\lambda)} [D_{f,m}] X_{nq} + F_{bm}^{(\lambda)} [D_b] X_{bm} = [D]_0 \left( F_f^{(\lambda)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(\lambda)} X_b X_{bm} \right) \quad (6.11)$$

Utilizando las expresiones que proporciona el modelo de concentraciones de cada especie presente en la formación de micelas (6.5), la ecuación (6.11) nos permite describir la intensidad de fluorescencia del pireno en disoluciones micelares con parámetros como la *cmc*,  $r$ ,  $n$ ,  $K$ ,  $F_f^{(\lambda)}$ ,  $F_{bm}^{(\lambda)}$ ,  $q_{bm,f}^{(\lambda)}$  y  $[D_0]$ . Los parámetros conocidos  $n$  y  $[D_0]$  se fijarán en el ajuste.

La función de ajuste empleada es la denominada "APNModel\_PyreneFluorIntensity" que se describe en la sección 5.2

### 6.2.4 Relación de intensidades absolutas de emisión de fluorescencia

Como ya hemos indicado en la introducción deseamos utilizar la relación de intensidades absolutas a dos longitudes de onda características conocidas como  $I_I$  e  $I_{III}$  a longitudes de onda  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ . Denominaremos esta relación espectral  $SR$ , (*spectral ratio*). Utilizando la ecuación (6.11) podemos obtener la expresión para la relación de intensidades:

$$SR^{(2,1)} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} = \frac{F_f^{(2)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(2)} X_b X_{bm}}{F_f^{(1)} X_f X_{nq} + F_{bm}^{(1)} X_b X_{bm}} \quad (6.12)$$

Para simplificar las ecuaciones y el ajuste y para reducir las correlaciones entre los parámetros, se procede a utilizar relaciones entre intensidades de emisión de fluorescencia que se denominarán  $q_i^{(j)}$  donde  $i, j$  son parámetros que describen que compuestos están interaccionando entre sí.

Trabajamos con una concentración suficientemente baja como para no tener cantidades de excímero apreciables, y por esto asumimos que  $X_{bm} = 1$ . Teniendo en cuenta estas consideraciones podemos expresar la relación de intensidades como:

$$SR^{(2,1)} = \frac{I^{(2)}}{I^{(1)}} = \frac{F_f^{(2)} X_f X_{nq} + F_b^{(2)} X_b}{F_f^{(1)} X_f X_{nq} + F_b^{(1)} X_b} = \frac{SR_f^{(2,1)} X_f X_{nq} + SR_b^{(2,1)} q_{b,f}^{(1)} X_b}{X_f X_{nq} + q_{b,f}^{(1)} X_b} \quad (6.13)$$

Con las relaciones:

$$SR_f^{(2,1)} = \frac{F_f^{(2)}}{F_f^{(1)}} \quad SR_b^{(2,1)} = \frac{F_b^{(2)}}{F_b^{(1)}} \quad q_{b,f}^{(1)} = \frac{F_b^{(1)}}{F_f^{(1)}} \quad (6.14)$$

Si sustituimos las fracciones ( $X_f$  and  $X_b$ ) de la ecuación (6.8) observamos que existe una fuerte correlación entre  $q_{b,f}^{(1)}$  y  $K$ . Para poder realizar el ajuste determinaremos la constante  $q_{b,f}^{(1)}$  del ajuste de las intensidades absolutas o a través de una estimación de la misma.

La función de ajuste es la APNModel\_PyreneFluorSRMon:

```
Function Name = APNModel_PyreneFluorSRMon

[Fitting Parameters]
Names = cmc,r,n,K,Kq,SRf21,SRb21,qbf1

[Independent Variables]
cS0 =

[Dependent Variables]
SR21 =

[Formula]
double cS1, cSm, cM, Xf, Xb, Xnq;

// call concentration model APNModel
cS1= nlf_APNModel_S1(cS0,cmc,r);
cSm= cS0 - cS1;
cM=cSm/n;

// fractions
Xf= 1/(1+K*cM);
Xb= 1-Xf;
Xnq = 1/(1+Kq*cS1);

SR21= (SRf21*Xf*Xnq + SRb21*qbf1*Xb) / (Xf*Xnq + qbf1*Xb);
```

### 6.2.5 Conductividad eléctrica de disoluciones de surfactantes iónicas

La conductividad eléctrica expresada como conductancia específica de una disolución de un surfactante iónico para cada especie presente en la formación de micelas se puede describir con la siguiente expresión, con las conductividades molares para los aniones del surfactante monomérico  $\lambda_{S^-}$ , de los contraiones  $\lambda_{C^+}$ , y de las micelas  $\lambda_{Mz}$ . (Al-Soufi 2012):

## 6.2 Teoría.

$$\kappa = \underbrace{(\lambda_{c^+} + \lambda_s)}_a [S_1] + \underbrace{(\lambda_{M^{z-}} + z\lambda_{c^+})}_{b'} [M] + \kappa_s = a[S_1] + b'[M] + \kappa_s \quad (6.15)$$

Cada micela con carga  $z$ -e y número de agregación  $n$  añade  $(n-z)$  contraiones, y presenta  $z$  contraiones libres en la disolución.  $\kappa_s$  es la conductividad del disolvente sin surfactante. Con  $[M] = [S_m]/n$  y  $b = b'/n$  obtenemos la siguiente expresión abreviada:

$$\kappa = a[S_1] + b[S_m] + \kappa_s \quad (6.16)$$

Los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $\kappa_s$  pueden ser determinados mediante el ajuste de la expresión (6.16) a los datos de la conductividad usando para ello el modelo de concentración de la eq. (6.5). Los parámetros  $a$  y  $b$  tienen unidades de conductividad molar y se definen como las pendientes a baja y a alta concentración como  $\kappa_1$  y  $\kappa_2$  y son definidas por la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \kappa_1 &= a \cdot [S]_0 + \kappa_s \\ \kappa_2 &= a \cdot cmc + b \cdot ([S]_0 - cmc) + \kappa_s \end{aligned} \quad (6.17)$$

El ajuste se realiza utilizando la función APNModel\_Conductivity.fdf dada en el capítulo 4.2.

### 6.2.6 Relación de absorbancias en el espectro de absorción

El surfactante Triton X-100 presenta cambios en su espectro de absorción entre su forma libre y micelizada (Al-Soufi 2012). Los cambios se analizan de forma más precisa usando un método de relación de absorciones a dos longitudes de onda.

La absorbancia ( $A$ ) de una disolución de surfactante sin colorante a una longitud de onda  $\lambda$  y una concentración total de surfactante ( $[S]_0$ ) es la suma de las absorbancias del surfactante monomérico y micelizado representadas por las coeficientes de absorción molares correspondientes  $\epsilon_1(\lambda)$  y  $\epsilon_m(\lambda)$ , las concentraciones  $[S_1]$  y  $[S_m]$  y la longitud del camino óptico  $\ell$  (Piñeiro 2013):

$$A(\lambda, [S]_0) = [S_1] \cdot \epsilon_1(\lambda) \cdot \ell + [S_m] \cdot \epsilon_m(\lambda) \cdot \ell \quad (6.18)$$

La relación de absorbancias a dos longitudes de onda diferentes  $\lambda_a$  y  $\lambda_b$  está definida mediante la ecuación:

$$q_A(\lambda, [S]_0) = \frac{A(\lambda_b)}{A(\lambda_a)} = \frac{[S_1] \cdot \epsilon_1(\lambda_b) + [S_m] \cdot \epsilon_m(\lambda_b)}{[S_1] \cdot \epsilon_1(\lambda_a) + [S_m] \cdot \epsilon_m(\lambda_a)} = \frac{[S_1] \cdot q_1 + [S_m] \cdot q_m \cdot q_a}{[S_1] + [S_m] \cdot q_a} \quad (6.19)$$

Donde representamos la relación de absorciones para para cada especie como  $q_i$  y como  $q_a$  a la relación de dos especies a una longitud onda fija  $\lambda_a$ :

$$q_1 = \frac{\epsilon_1(\lambda_b)}{\epsilon_1(\lambda_a)}, \quad q_m = \frac{\epsilon_m(\lambda_b)}{\epsilon_m(\lambda_a)}, \quad q_a = \frac{\epsilon_m(\lambda_a)}{\epsilon_1(\lambda_a)} \quad (6.20)$$

La expresión que se utiliza para el ajuste se denomina APNModel\_AbsorptionBandRatio.fdf y se describe en el capítulo 4.2.

### 6.3 Propiedades de los surfactantes estudiados

En general los surfactantes neutros presentan cierta polidispersidad, siendo el TX100, el más monodisperso mientras Brij35, Brij 58 Brij 56, Brij S10, C12E7 y C12E10 presentan una elevada polidispersidad

. Los tensioactivos iónicos estudiados (salvo los comerciales FAES y LAS que son mezclas) presentan una muy buena monodispersidad. El valor de polidispersidad se relaciona con el parámetro  $r$ , el ancho relativo de la región de transición. Un mayor valor de  $r$  puede indicar una mayor polidispersidad.

#### 6.3.1 Tensioactivos neutros

##### 6.3.1.1 TX100

La estructura molecular del Triton X-100 (TX-100) se muestra en la figura siguiente; se trata de un tensioactivo neutro que forma parte de la familia de los alquilfenoles. En los años 70 y 80 los alquilfenoles etoxilados se usaron como sustancias tensioactivas en detergentes para lavavajillas y otras aplicaciones. Sin embargo, su producción ha disminuido en años recientes por su posible toxicidad, y están siendo reemplazados por alcoholes lineales etoxilados.

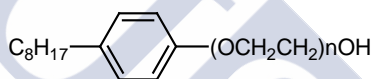


Figura 6.2 Estructura molecular del Triton X-100 ( $n \approx 10$ ).

Para el TX-100 se conocen los valores de la CMC a temperatura ambiente y del número de agregación:  $cmc = 2,45 \cdot 10^{-4} M$  y  $n = 143$  (Kalyanasundaram 1977, Piñeiro 2013).

##### 6.3.1.2 C12E7

El C12E7, cuya fórmula es  $CH_3 - (CH_2)_{11} - (OCH_2CH_2)_7 - OH$ , es ampliamente usado por la industria de detergentes en combinación con otros tensioactivos aniónicos, de hecho, fue suministrado a nuestro grupo de investigación por la empresa Henkel para su estudio.

Pertenece al grupo de los denominados FAES, o "fatty" alquilpolioxietilensulfatos, que resultan de la sulfonación de alcoholes procedentes de la apertura de epóxidos con alcoholes primarios.

El producto que nos proporcionan es polidisperso: pertenece a un producto comercial de la compañía Henkel® donde la mayoría es C12E7 pero desconocemos su composición exacta.

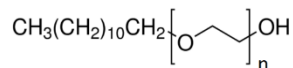


Figura 6.3 Estructura del C12E7 ( $n=7$ )

Se conoce la concentración micelar crítica del C12E7 ( $cmc = 6,6 \cdot 10^{-5} M$ ) así como su número de agregación ( $n = 70$ ). (Jeong 2002).

## 6.3 Propiedades de los surfactantes estudiados

### 6.3.1.3 C12E10

El C12E10, con estructura idéntica al C12E7; cuya fórmula es  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{10} - \text{OH}$ , es ampliamente usado por la industria de detergentes. Sus propiedades únicas en términos estructurales ofrecen un modelo para estudiar variaciones en la hidrofobicidad y en las propiedades de la disolución haciendo posible la utilización de mezclas de surfactantes. Técnicas de Maldi-TOF demuestran que el C12E10 puede ser polidisperso (Patrick 1997). El surfactante utilizado en la referencia bibliográfica proviene de la misma empresa (Sigma).

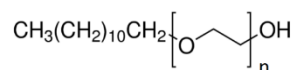


Figura 6.4 Estructura del C12E10 ( $n=10$ )

Se conoce la concentración micelar crítica del C12E10 ( $13.6 \cdot 10^{-5}$  M) así como su número de agregación ( $n = 72$ ). (Jeong 2002).

### 6.3.1.4 BRIJ-35

Brij-35 es el nombre comercial para el tricosaeilenglicol dodecil éter. El número 35 indica la suma de la longitud de la cadena alquílica y de los grupos alquil éter. Su masa molecular es 1198 g/mol (es un promedio, existe cierta polidispersidad no cuantificada). Es un surfactante no iónico donde las cadenas polietilénicas actúan como parte hidrofílica y las cadenas alquílicas actúan como parte hidrofóbica. Sus principales usos son en cosmética, farmacia, pinturas, limpieza y biotecnología. Brij-35 es útil para la solubilización de proteínas de membrana e incluir compuestos hidrofóbicos en reacciones enzimáticas. Brij-35 es un surfactante proporcionado por Sigma® de tipo comercial donde no se proporciona la polidispersidad del surfactante, y se indica que el número de cadenas alquil éter es mayoritariamente 23. Se conoce la concentración micelar crítica del Brij-35 ( $cmc = 6,0 \cdot 10^{-5}$  M) así como su número de agregación ( $n = 40$ ) (Jeong 2002).

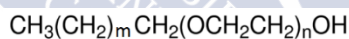


Figura 6.5 Estructura molecular del Brij-35 ( $m=10$ ,  $n \approx 23$ ).

### 6.3.1.5 BRIJ-58

Brij-58 es el nombre comercial para el eicosaetilenglicol hexadecil éter. Su masa molecular es 1124 g/mol (es un promedio, existe cierta polidispersidad no descrita). Es un surfactante de estructura similar al Brij-35 con usos similares. Uno de los usos más utilizados es la solubilización de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Su aplicación característica es la investigación RNAsa en bacterias. En este caso estamos tratando también un surfactante polidisperso del cual Sigma® sólo nos proporciona la inexactitud de la masa. La idea de la dispersión del surfactante comercial se indica también en (McKelvey 2002). Se conoce la concentración micelar crítica del Brij-58 ( $cmc = 7,5 \cdot 10^{-5}$  M) así como su número de agregación ( $n = 82$ ) (Schwarz 2007, Ray 1998).

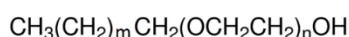


Figura 6.6 Estructura molecular del Brij-58 ( $m=14$ ,  $n \approx 20$ ).

### 6.3.1.6 BRIJ-56

Brij-56 es el nombre comercial para el decaetilenglicol hexadecil éter. Su masa molecular es 683 g/mol (es un promedio, existe cierta polidispersidad no especificada). Es un surfactante de estructura similar al Brij-35 con usos similares. Uno de los usos más interesantes es la extracción de plaguicidas apolares para su estudio. Brij-56 es un surfactante comercial de Croda International PLC proporcionado por Sigma® de donde no se nos proporciona la polidispersidad del surfactante, y se indica que el número de cadenas alquil éter es mayoritariamente 10. Se conoce la concentración micelar crítica del Brij-56 ( $cmc = 3,6 \cdot 10^{-5}$  M) así como su número de agregación ( $n = 141$ ). (Schwarz 2007, Ray 1998).

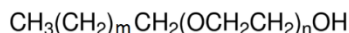


Figura 6.7 Estructura molecular del Brij-56 ( $m=14$ ,  $n \approx 10$ ).

### 6.3.1.7 BRIJ-S10

Brij-S10 es el nombre comercial para el decaetilenglicol octadecil éter. Su masa molecular es 711 g/mol (es un promedio, existe cierta polidispersidad no descrita). Es un surfactante de estructura similar al Brij-35 con usos similares. La polidispersidad se pone de manifiesto como en el caso anterior, con el Brij-56. El uso más habitual es actuar como emulsificador entre fases polar y apolar. Se conoce la concentración micelar crítica del Brij-S10 ( $cmc = 1,0 \cdot 10^{-5}$  M) así como su número de agregación ( $n = 58$ ) (Ribeiro 2012, Moore 2007).

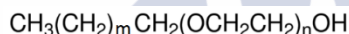


Figura 6.8 Estructura molecular del Brij-S10 ( $m=16$ ,  $n \approx 10$ ).

## 6.3.2 Tensioactivos iónicos

### 6.3.2.1 SDS

La estructura molecular del SDS, dodecil sulfato sódico, se muestra en la figura siguiente; se trata de un tensioactivo aniónico que se obtiene a través de la sulfonación del dodecanol y neutralización con una sal de sodio. Se utiliza principalmente en la industria de cosméticos. Se emplea comúnmente como agente desnaturizador en la realización de electroforesis. Es uno de los surfactantes más estudiados. Se conoce la concentración micelar crítica del SDS ( $cmc = 8,2 \cdot 10^{-3}$  M) así como su número de agregación ( $n = 62$ ) (Kalyanasundaram 1977, Piñeiro 2013).

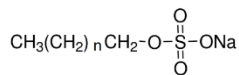


Figura 6.9 Estructura molecular del SDS ( $n=10$ ).

### 6.3.2.2 STS

La estructura molecular del STS, tetradecil sulfato sódico, se muestra en la figura siguiente; se trata de un tensioactivo aniónico y se obtiene a través de la sulfonación del tetradecanol y neutralización con una sal de sodio. Se utiliza principalmente en la industria de farmacéutica. Es un agente

### 6.3 Propiedades de los surfactantes estudiados

esclerosante. Funciona mediante el cierre de la vena varicosa a través de cicatrices. Se emplea comúnmente como agente desnaturalizador en la realización de electroforesis. Se conoce la concentración micelar crítica del STS ( $cmc = 2.0 \cdot 10^{-3}$  M) así como su número de agregación ( $n = 107$ ) (Ranganathan 2000).

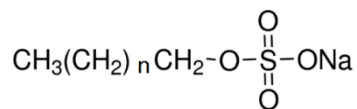


Figura 6.10 Estructura molecular del STS( $n=12$ ).

#### 6.3.2.3 LAS

El LAS, conocido como sulfonato sódico de alquilbenceno. Su masa molecular es 420 g/mol. Es un surfactante que comercialmente se vende como mezcla de surfactantes de la misma familia: las cadenas alquílicas presenta longitudes de cadena de 10, 12 y 14 carbonos. La posición del grupo sulfonato también presenta isomería estructural donde su posición en el anillo bencénico es diferente en cada caso. Ha sido proporcionado por Henkel sin indicación de su polidispersidad. Se conoce la concentración micelar crítica del LAS ( $cmc = 2.7 \cdot 10^{-3}$  M) pero no el número de agregación. (Freire 2010b). Un ejemplo de la estructura es la siguiente:

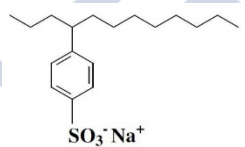


Figura 6.11 Estructura molecular del LAS ( $n \approx 12$ ).

#### 6.3.2.4 FAES o SLES

El SLES, del grupo de los FAES es conocido como lauriléter sulfato sódico. Su masa molecular es 420 g/mol. Igual que el SDS, su uso está centrado en la industria de los cosméticos. La diferencia más importante entre los dos es la etoxilación. El valor de  $n = 3$  es un promedio. Indicar la elevada polidispersidad del surfactante proporcionado por Henkel®. El producto que nos proporcionan es polidisperso: pertenece a un producto comercial de la compañía Henkel®: TEXAPON NSO 27%, donde la mayoría es SLES pero desconocemos su composición.

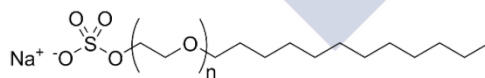


Figura 6.12 Estructura molecular del SLES ( $n \approx 3$ ).

Se conoce la concentración micelar crítica del FAES ( $cmc = 2.9 \cdot 10^{-3}$  M) así como su número de agregación ( $n = 86$ ) (Bilia 2008).

### 6.3.2.5 DTAB

La estructura molecular del DTAB, bromuro de dodeciltrimetilamonio, se muestra en la figura siguiente. Se trata de un tensioactivo catiónico. Se han utilizado para extraer pesticidas y en procesos de intercambio iónico. Se conoce la concentración micelar crítica del DTAB ( $cmc = 15.2 \cdot 10^{-3}$  M) así como su número de agregación ( $n = 72$ ) (Hiemenz 1997).

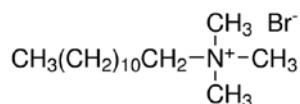


Figura 6.13 Estructura molecular del DTAB

### 6.3.2.6 CTAB

La estructura molecular del CTAB, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, se muestra en la figura siguiente. Presenta usos similares al DTAB y se combina con el mismo. Se utiliza también en cromatografía. Se conoce la concentración micelar crítica del CTAB ( $cmc = 0.9 \cdot 10^{-3}$  M) así como su número de agregación ( $n = 60$ ) (Kalyanasundaram 1977).

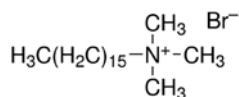


Figura 6.14 Estructura molecular del CTAB

## 6.3.3 Resumen de datos bibliográficos de los tensioactivos

En la tabla 6.1 se presentan los resultados que se han obtenido de la búsqueda bibliográfica mediante el procedimiento que denominaremos relación de picos en los casos que se haya podido encontrar resultados. En el ajuste utilizado mediante Boltzman se obtienen dos parámetros sin significado físico:  $x_0$  que sería el punto de inflexión de la curva y  $dx$  que indica la pendiente de cambio de la curva. Para entender mejor a que nos referimos explicaremos brevemente que significan estos 2 parámetros y como se obtienen.

Un método muy utilizado para la determinación de la  $cmc$  de la emisión de fluorescencia del pireno es el análisis de la relación de intensidades a dos longitudes de onda características que se corresponden con el pico 1 y en el pico 3 del espectro del pireno. La dependencia de esta relación de intensidades con la concentración de surfactante es frecuentemente ajustada con una función sigmoidea tipo Boltzmann como es la siguiente:

$$SR = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{([S]_0 - x_0)/dx}} + A_2 \quad (6.21)$$

aquí la variable  $SR$  corresponde a la relación de intensidades,  $[S]_0$  a la concentración total de surfactante,  $A_1$  y  $A_2$  son los límites superiores e inferiores del sigmoide, respectivamente,  $x_0$  es el centro del mismo y  $dx$  indica el ancho del rango de concentraciones donde tiene lugar el cambio de la relación de intensidades. Como ya habíamos comentado en la introducción a este capítulo, se observa que la  $cmc$  de los tensioactivos coincide en algunos casos con el centro  $x_0$  del sigmoide, pero

### 6.3 Propiedades de los surfactantes estudiados

en muchos casos es significativamente más alto. Aguiar et al. proponen usar el valor de  $x_0$  o de  $x_0 + 2 dx$  según el valor de la relación  $x_0/dx$ . De esta forma la *cmc* de los tensioactivos iónicos coincide aproximadamente con el primero de estos puntos, mientras que la de tensioactivos noniónicos en general con el segundo (Aguiar 2003).

Para facilitar la comparación con el método más general que desarrollamos aquí presentamos en la tabla 6.1 los datos obtenidos con el método de Aguiar et al. junto a otros datos bibliográficos.

Tabla 6.1 Datos bibliográficos para diferentes surfactantes.

Surfactante	$x_0$	$dx$	$dx/x_0$	<i>cmc</i> /mM	<i>n</i>
Surfactantes neutros					
TX100	0.245 <sup>(1)</sup>	0.050 <sup>(1)</sup>	0.204	0.25 <sup>(1)</sup> , 0.26 <sup>(4)</sup> , 0.27 <sup>(22)</sup>	143 <sup>(4)</sup>
BRIJ58	-	-	-	0.075 <sup>(9)</sup>	92 <sup>(10)</sup>
BRIJ56	-	-	-	0.036 <sup>(9)</sup>	141 <sup>(10)</sup>
BRIJ35	-	-	-	0.06 <sup>(2),(4)</sup>	40 <sup>(2),(4)</sup>
BRIJ78 (S10)	-	-	-	0.01 <sup>(19)</sup>	58 <sup>(20)</sup>
C12E7	-	-	-	0.066 <sup>(11)</sup>	70 <sup>(12)</sup>
C12E10	-	-	-	0.136 <sup>(17)</sup>	72 <sup>(18)</sup>
Surfactantes iónicos					
CTAB	0.897 <sup>(1)</sup>	0.057 <sup>(1)</sup>	0.063	0.98 <sup>(1)</sup> , 0.92 <sup>(4)</sup>	60 <sup>(3),(4)</sup>
DTAB	13.60 <sup>(1)</sup>	0.77 <sup>(1)</sup>	0.057	15.2 <sup>(1)</sup>	71 <sup>(7)</sup>
SDS	7.62 <sup>(1)</sup>	0.28 <sup>(1)</sup>	0.036	8.1 <sup>(21)</sup> , 8.22 <sup>(1)</sup>	62 <sup>(4)</sup>
STS	-	-	-	2.0 <sup>(14)</sup>	107 <sup>(14)</sup>
FAES	-	-	-	2.9 <sup>(13)</sup>	86 <sup>(13)</sup>
LAS	0.4 <sup>(6)</sup>	0.30 <sup>(6),(8)</sup>	0.75	2.70 <sup>(5)</sup>	-

(1) (Aguiar 2003). La *cmc* fue determinada mediante relación de intensidades de fluorescencia del pireno (ajuste mediante Boltzmann).

(2) (Tóth 2006). Número de agregación determinado por simulación.

(3) (Wong 1999). La *cmc* fue determinada por la intensidad absoluta de fluorescencia.

(4) (Kalyanasundaram 1977).

(5) (Goon 1997).

(6) Estudio previo en nuestro grupo de investigación (Taboada 2009, Proyecto fin de carrera). *cmc* determinada mediante intensidades de fluorescencia absoluta.

(7) (Bales 2002).

(8) (Freire 2010). La *cmc* fue obtenida mediante conductividad. Técnica no fluorescente.

(9) (Schwarz 2007). La *cmc* fue obtenida mediante desplazamientos de RMN. Técnica no fluorescente.

(10) (Ray 1998).

(11) (Brown 2005).

(12) (Jeong 2002). La *cmc* fue obtenida mediante desplazamientos de RMN. Técnica no fluorescente.

(13) (Bilia 2008). La *cmc* fue y *n* determinado mediante modelos teóricos.

(14) (Ranganathan 2000).

(15) (Verma 2010). La *cmc* fue obtenida mediante tensión superficial. Técnica no fluorescente.

(16) (Kang 2011). Número de agregación determinado por simulación.

(17) (Hu 2011). La *cmc* fue determinada mediante relación de intensidades de fluorescencia del pireno (ajuste mediante Boltzmann). No proporcionan los datos de  $x_0$  y  $dx$ .

(18) (Sulthana 1998). Número de agregación determinada mediante intensidades de fluorescencia absoluta.

(19) (Ribeiro 2012). La *cmc* fue determinada mediante intensidades de fluorescencia absolutas.

(20) (Moore 2007). Número de agregación determinado mediante intensidades de fluorescencia absolutas.

(21) (Al-Soufi 2012).

(22) (Piñeiro 2013).

## 6.4 Resultados

A continuación presentaremos los dos grupos de surfactantes estudiados como modelos: surfactantes neutros y surfactantes iónicos. El procedimiento experimental se describe en el capítulo 2.1.2.

### 6.4.1 Surfactantes neutros

Estudiamos los siguientes surfactantes neutros: TX100, Brij 35, Brij 58, Brij 56, Brij 78, C12E7 y C12E10.

Teniendo en cuenta el estudio previo (Capítulo 5) elegimos en todas las medidas concentraciones de pireno bajas para que la influencia del excímero sea pequeña o despreciable. Seguimos el procedimiento habitual: mantenemos la concentración de colorante constante e incrementamos la concentración de surfactante hasta alcanzar un valor suficiente para poder trazar de forma adecuada el perfil de intensidades para una longitud de onda dada. Las disoluciones son acuosas y las muestras son preparadas a la temperatura de 25°C, la misma temperatura que se usa para las medidas. El pH de las muestras es de 7 (neutro).

Las muestras preparadas se han medido en cubetas de cuarzo termostalizadas. Las medidas se realizaron inmediatamente después de preparar las muestras. El equipo empleado es un equipo de fluorescencia de la empresa Edinburgh Instruments, modelo F900. La muestra se excita con una longitud de onda de 319nm obtenido a partir de una fuente de luz (lámpara de xénon) y un monocromador. La luz emitida se recoge mediante una combinación de monocromador y fotomultiplicador. Los datos de la intensidad de emisión son recogidos a cada 0.5nm en el rango desde 362nm a 542nm. Las rendijas de excitación en todas las medidas son de 5nm, las rendijas de emisión en todas las medidas son de 2nm. La resolución digital es de 0.5nm.

#### 6.4.1.1 TX100

En la Figura 6.15 presentamos los espectros medidos para el sistema pireno: TX100 con  $[Pireno]=5.4 \times 10^{-9} M$ . La concentración de [TX100] de las muestras varía ente 0.09mM y 1.64mM.

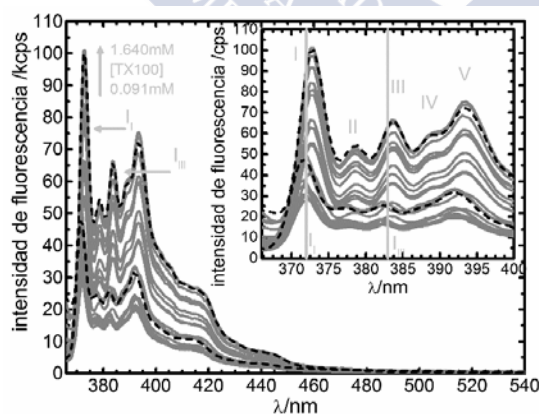


Figura 6.15 Espectros de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones acuosas de TX100 (curvas continuas en gris). Los espectros de menor y mayor concentración de TX100 se indican a trazos. Gráfica insertada: escala reducida de la gráfica principal.  $[TX100] = 0.091mM - 1.64mM$ .  $[Pireno] = 5.4 \times 10^{-9} M$ .

## 6.4 Resultados

A continuación representamos la intensidad de fluorescencia para dos longitudes de onda (372nm y 384nm) frente a la concentración de surfactante (Figura 6.16). La intensidad de fluorescencia en ambas longitudes de onda disminuye en una primera etapa hasta alcanzar la *cmc*. En una segunda etapa la intensidad aumenta hasta alcanzar un límite que corresponde a la intensidad del pireno en el interior de las micelas. En la misma gráfica se representa también el ajuste de la ecuación (6.11) (función APNModel\_PyreneFluorIntensity) con los parámetros de ajuste de la tabla 6.2 ( $cmc^F = 0.28 \pm 0.01$  mM).

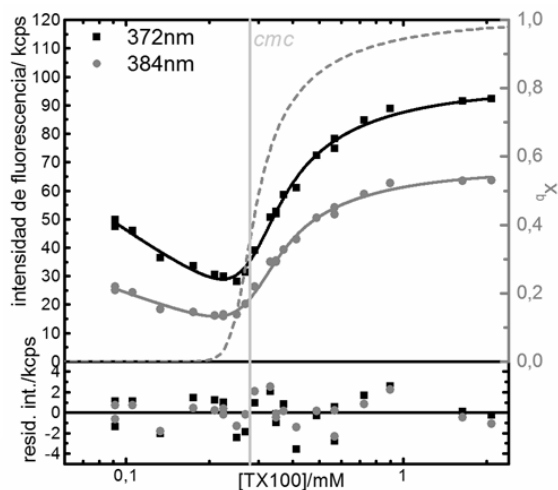


Figura 6.16 Intensidad de fluorescencia en la banda del monómero en el pico I (372nm, negro) y pico III (384nm, gris). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.11) con los parámetros de ajuste de la tabla 6.2. Línea discontinua: fracción  $X_b$  de pireno en el interior de micelas estimada con los datos del ajuste y la ecuación (6.8). La línea vertical indica el valor de la *cmc* ajustado.  $[TX100] = 0.091\text{mM} - 1.64\text{mM}$ ,  $[Pireno] = 5.4 \times 10^{-7}$  M.

Finalmente trataremos los datos del modo que pretendemos estudiar en este capítulo: la relación de intensidades de fluorescencia a dos longitudes de onda características (en el pico I y en el pico III). Partiendo de las intensidades de fluorescencia representadas en la Figura 6.16 podremos representar la relación entre la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de 372nm y 384nm frente a la concentración de surfactante en la Figura 6.17. Se observa que la relación de intensidades se mantiene constante hasta cerca de la *cmc* para después aumentar hasta alcanzar el valor final. El valor final alcanzado es la relación de intensidades de los picos del pireno en el interior de las micelas.

Para el ajuste se utiliza el modelo para la relación de intensidades de fluorescencia (6.13), el modelo APN para la definición del equilibrio de reparto (6.8) y la interacción de quenching entre el pireno y el surfactante (6.9). Se utiliza la expresión que se describe en la sección 6.2.4. Teniendo en cuenta la fuerte correlación en el ajuste entre la *cmc* y la constante de equilibrio  $K$ , hemos utilizado el valor de la constante de equilibrio obtenida en el ajuste anterior de las intensidades absolutas. El ajuste da un valor de  $cmc^{SR} = 0.24 \pm 0.01$  mM.

Los valores de la *cmc* obtenidos en estos ajustes son concordantes entre si y también con los resultados presentados en el Capítulo 5.1.

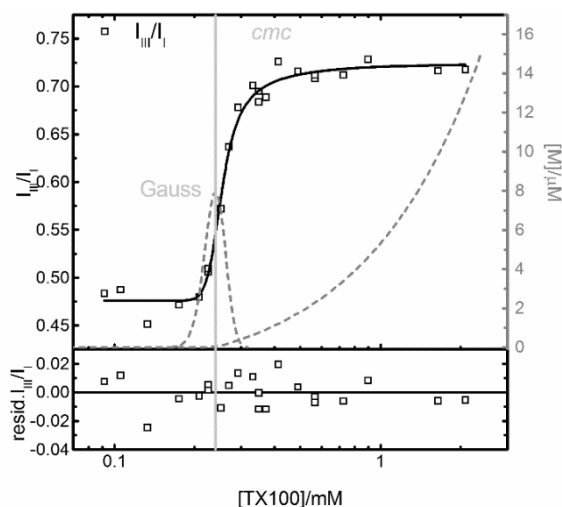


Figura 6.17 Relación de intensidades de fluorescencia  $I(384\text{nm})/I(372\text{nm})$  ( $I_{III}/I_I$ , cuadrados) Incertidumbre de la relación de intensidades  $I(384\text{nm})/I(372\text{nm})$  ( $I_{III}/I_I$ , cuadrados). Líneas: ajuste global de la ecuación del modelo APN para la relación de intensidades de fluorescencia  $I(384\text{nm})/I(372\text{nm})$  con los parámetros en la tabla 6.5). La línea vertical indica el valor de la *cmc* ajustado. En gris, perfiles de la concentración de  $[M]$  en  $\mu\text{M}$  y perfil de la distribución Gaussiana.  $[\text{TX100}] = 0.091\text{mM} - 1.64\text{mM}$  Disolución acuosa  $\text{pH}=7$   $T^{\circ}=25^{\circ}\text{C}$ ,  $[\text{Pireno}] = 5.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=319 \text{ nm}$ . Rango espectro:  $362\text{-}542\text{nm}$ , Equipo F900

#### Influencia de la resolución espectral sobre las relaciones espectrales

Los valores de las relaciones espectrales iniciales y finales,  $SR_f^{(2,1)}$  y  $SR_b^{(2,1)}$ , obtenidos aquí (Tabla 6.5) son significativamente diferentes que los del Capítulo 5.1, “Table 1”. Como ya mencionamos antes, estas relaciones espectrales se utilizan en la bibliografía para estimar la hidrofobicidad del entorno del pireno (“PY-scale”). Es importante tener en cuenta que estos valores dependen sensiblemente de las condiciones experimentales, especialmente de las longitudes de onda exactas de su medida y también de la resolución espectral elegida. En nuestro caso las longitudes de onda  $I(384\text{nm})/I(372\text{nm})$  son idénticas, pero no la resolución espectral, que es menor en las medidas de este capítulo. Para mejorar la relación señal ruido a las bajas concentraciones de pireno utilizadas aquí aumentamos el ancho de las rendijas de emisión y con esto reducimos la resolución espectral.

Deberemos comprobar el efecto que tiene el cambio de la resolución en los espectros y por consiguiente en la relación de intensidades. En la figura siguiente se han simulado las bandas del pireno para distintos *intervalos de promedio*. Para simular el efecto de la disminución de la resolución espectral (o aumento del ancho de las rendijas), calculamos unos promedios en grupos de 1, 3, 5, 7 o 9 valores de la intensidad de emisión de fluorescencia de los datos adquiridos. Indicar que

## 6.4 Resultados

el grupo de 1 valor corresponde a los datos iniciales adquiridos cada 0.3 nm. Los espectros simulados para el pireno libre y micelizado se representan a continuación:

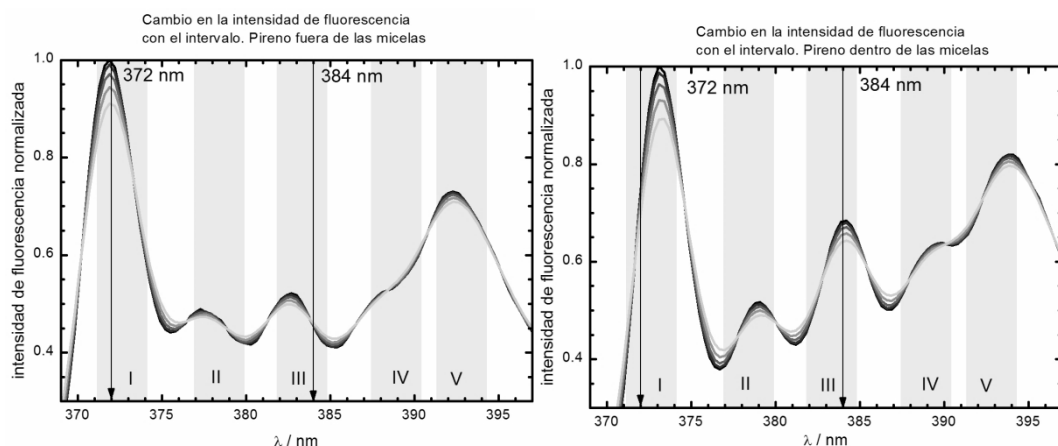


Figura 6.18 Espectros simulados para el pireno libre (izquierda) y micelizado (derecha). Simulación de las bandas del pireno para distintos *intervalos de promedio*. Cálculo de promedios en grupos de 1, 3, 5, 7 o 9 valores de la intensidad de emisión de fluorescencia de los datos adquiridos.

Observamos en los espectros del pireno libre (izquierda) que la longitud de onda de 372 nm a la que analizamos los datos del pico 1 coincide muy bien con su máximo, por lo que apreciamos la bajada de la intensidad de fluorescencia al aumentar el intervalo del promedio. Sin embargo, la intensidad en el pico 3 a la longitud de onda de estudio de 384 nm no coincide con el máximo y la intensidad apenas cambia.

Para el pireno micelizado (derecha) observamos que ahora la primera longitud de onda de 372 nm no coincide con el máximo del pico 1, y que el espectro en ese punto apenas cambia su intensidad de fluorescencia. Al contrario, la longitud de onda de estudio de 384 nm se sitúa justo en el máximo del pico 3 y su intensidad disminuye de forma clara.

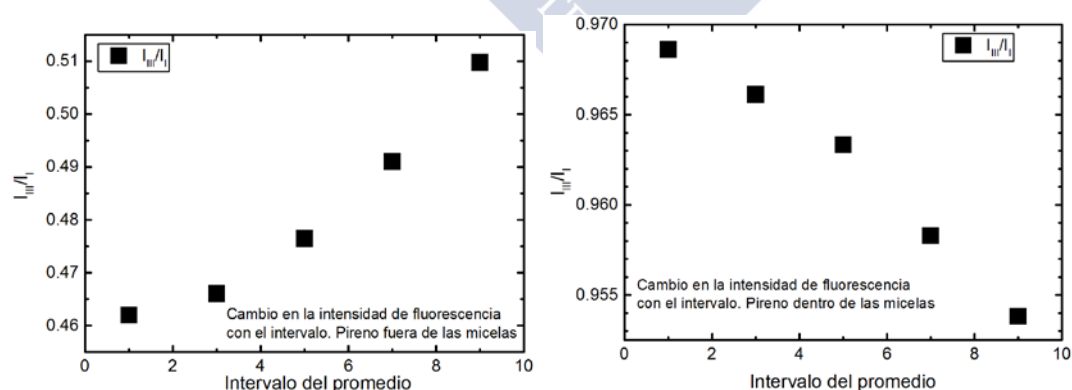


Figura 6.19 Relación de intensidades  $I_{III}/I_I$  simulados para el pireno libre (izquierda) y micelizado (derecha).

En las figuras anteriores representamos la relación de las intensidades simulados para el pireno libre (izquierda) y micelizado (derecha). La relación de intensidades entre una intensidad que no cambia y un valor que va disminuyendo (o aumentando), da lugar a una relación de intensidades que va aumentando (o disminuyendo) al aumentar la longitud del intervalo del promedio.

En ambas representaciones (espectros y relación de intensidades de fluorescencia) estamos observando los efectos de un desplazamiento del espectro del pireno hacia mayores longitudes de onda cuando se encuentra en el interior de las micelas. La elección de las dos longitudes de onda de medida, junto con la resolución espectral y la calibración absoluta del espectrofotómetro afectan fuertemente los valores de las relaciones espectrales. Es importante tener este efecto en cuenta a la hora de comparar datos de distintas medidas o incluso autores.

Debemos indicar que la anterior descripción es un análisis cualitativo que nos indica la dirección del cambio (aumento o descenso) pero que no nos permite cuantificar cual va a ser el descenso o el aumento de la relación de intensidades.

### 6.4.1.2 Surfactantes Brij

A continuación vamos a proceder a presentar los resultados obtenidos para el grupo de surfactantes neutros Brij representado por Brij 58, Brij 56, Brij 35 y Brij S10. A diferencia de los datos proporcionados para el TX100, la *cmc* obtenida por fluorescencia del pireno no podrá ser comparada con una técnica no fluorescente disponible en nuestro laboratorio. Para la comparación utilizaremos datos bibliográficos. El procedimiento a realizar es análogo al seguido para el TX-100. Podemos observar en la Figura 6.20 que el espectro de pireno a menor concentración de Brij presenta intensidades de fluorescencia muy diferentes a pesar de concentraciones de pireno similares. Estas diferencias pueden ser explicadas por varias posibles razones. La primera de ellas es la estabilidad de las disoluciones. A concentraciones por debajo de la *cmc*, la solubilidad de pireno es muy baja y puede tener lugar cierta precipitación. Aunque el procedimiento desarrollado para la preparación de las muestras intenta evitar esta precipitación, esta tiene lugar y puede afectar la intensidad. Otra razón son las diferentes concentraciones de surfactante, que tienen diferentes efectos de quenching en cada caso.

En la Figura 6.21, en el panel con numeración impar podemos observar como la intensidad de fluorescencia varía con la concentración de surfactante. En una primera etapa pre-*cmc* la intensidad de fluorescencia disminuye (Brij 58 y Brij 35) o permanece constante (Brij 56 y Brij S10), posteriormente la intensidad aumenta hasta un valor superior al inicial que corresponde con la intensidad de fluorescencia de las micelas. En el panel con numeración par podemos observar como la relación de intensidad permanece constante para luego aumentar en la región de transición hasta alcanzar el valor final correspondiente a la presencia de micelas. Indicar que si en la primera etapa donde la relación de intensidades permanece constante, en algunos casos esta estabilidad no es tan definida y la razón de que la relación de intensidades ya aumente desde el primer momento es debido a los intervalos de transición muy grandes ( $r > 0.3$ ) de estos surfactantes.

## 6.4 Resultados

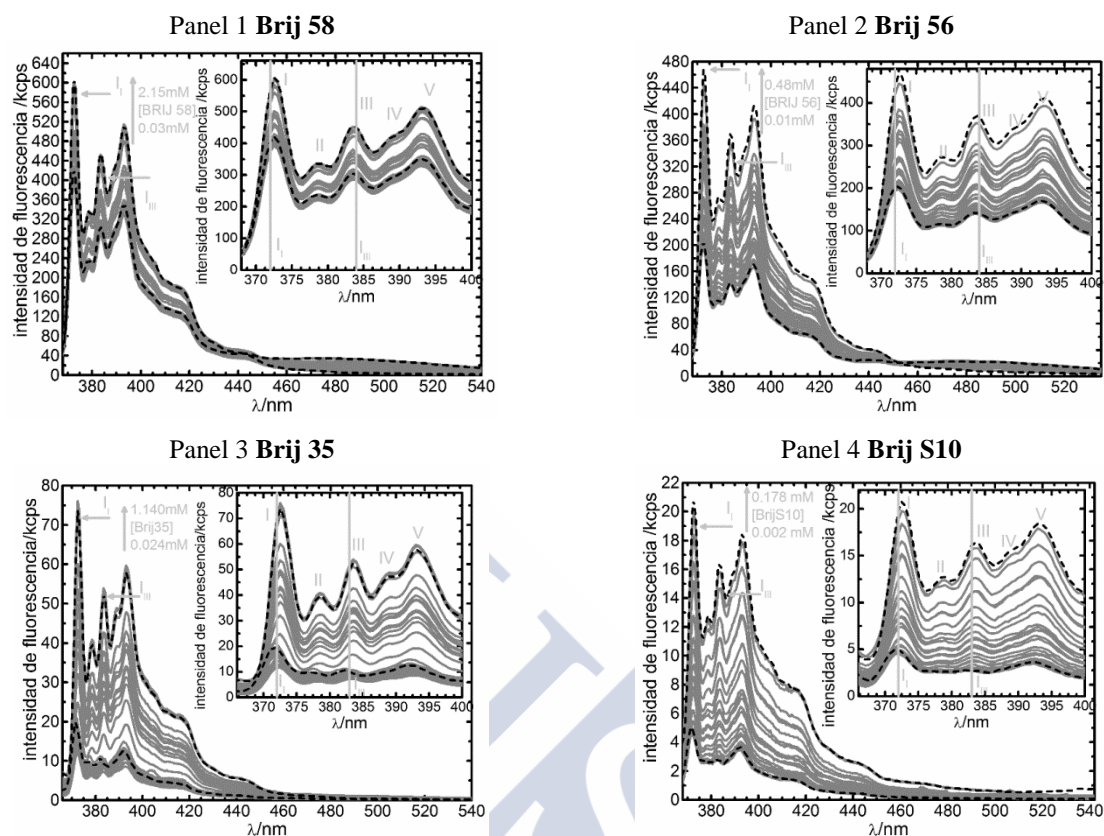


Figura 6.20 Espectros de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones acuosas de Brij 58 (Panel 1), Brij 56 (Panel 2), Brij 35 (Panel 3) y Brij S10 (Panel 4) (curvas continuas en gris). Los espectros de menor y mayor concentración de Brij se indican a trazos. Gráfica insertada: escala reducida de la gráfica principal. Panel 1: [Brij 58] = 0.03 mM – 2.15 mM ([Pireno] =  $5.4 \times 10^{-7}$  M), Panel 2: [Brij 56] = 0.01 mM – 0.48 mM ([Pireno] =  $5.9 \times 10^{-7}$  M), Panel 3: [Brij 35] = 0.02 mM – 1.14 mM ([Pireno] =  $2.6 \times 10^{-7}$  M), Panel 4: [Brij S10] = 0.002 mM – 0.178 mM ([Pireno] =  $5.9 \times 10^{-7}$  M).

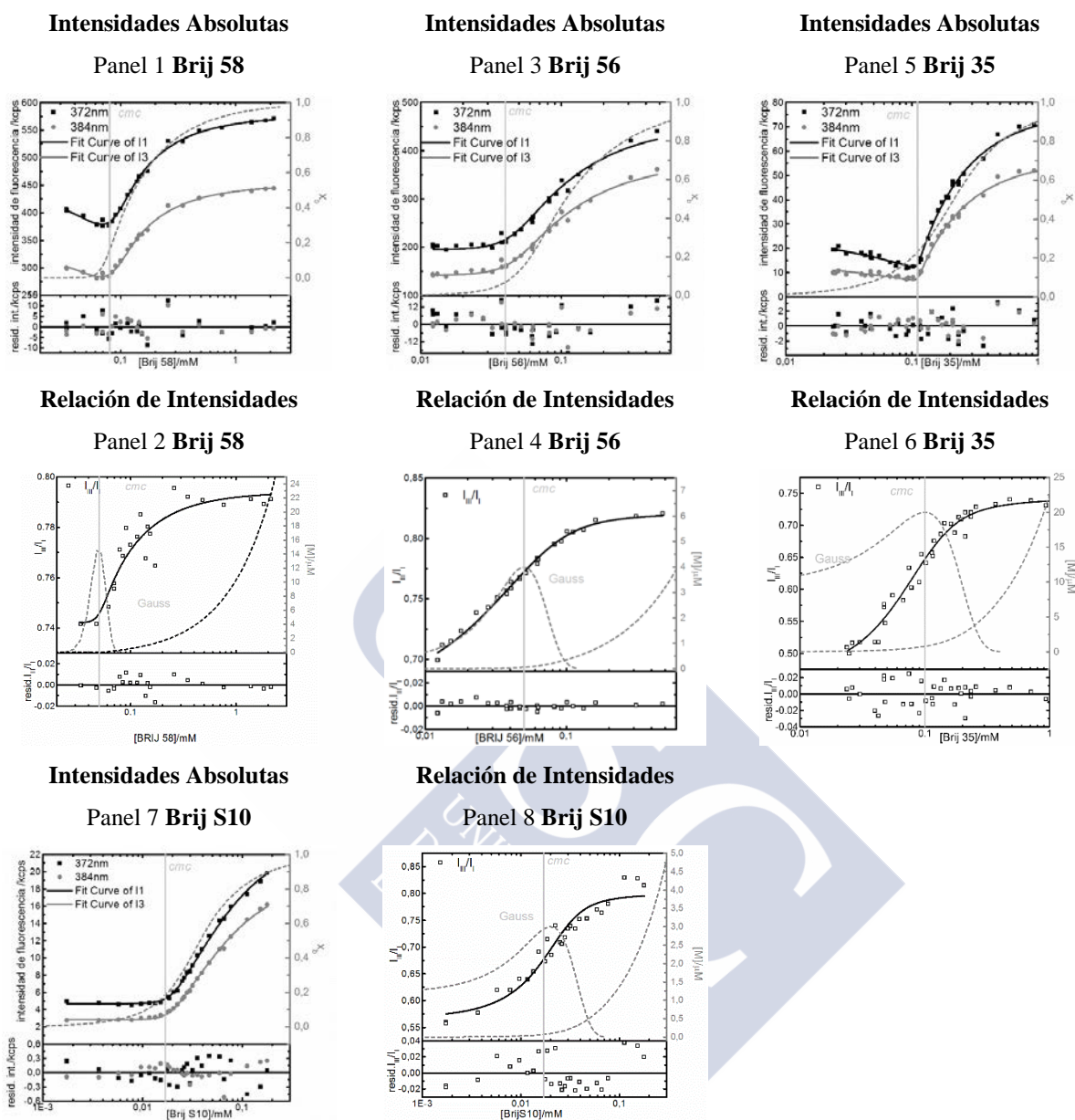


Figura 6.21 Paneles con numeración impar: Intensidad de fluorescencia en la banda del monómero en el pico I (372nm, negro) y pico III (384nm, gris). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.11). En línea discontinua la fracción  $X_b$  de pireno en el interior de micelas. La línea vertical indica el valor de la  $cmc$  del ajuste. Paneles numeración par: Relación de intensidades (relación espectral) de fluorescencia  $SR^{(2,1)} = I(384m)/I(372nm)$ , ( $I_{III}/I_I$ , cuadrados). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.13). La línea vertical indica el valor de la  $cmc$  del ajuste. En gris, perfiles de la concentración de micelas  $[M]$  en  $\mu M$  y la curva Gaussiana indicando el ancho  $r$  del intervalo de transición.

## 6.4 Resultados

### 6.4.1.3 Surfactantes C12E<sub>i</sub>

El grupo de surfactantes neutros “C12E<sub>i</sub>” están representados por C12E7 y C12E10. Compararemos la *cmc* determinada con datos bibliográficos. El procedimiento a realizar es análogo al seguido para el TX-100.

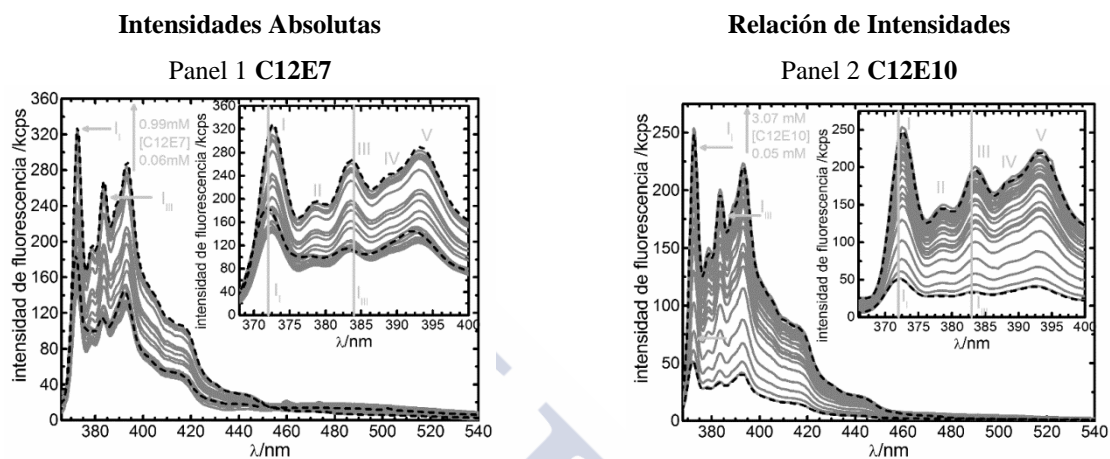


Figura 6.22 Espectros de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones acuosas de C12E7 (Panel 1) y C12E10 (Panel 2). Espectros de Fluorescencia (gris) y Espectros de fluorescencia de mayor y menor concentración de surfactante en línea discontinua. Gráfica insertada: escala reducida de la gráfica principal. Panel 1: [C12E7] = 0.03mM – 0.99mM ([Pireno]=  $5.9 \times 10^{-7}$  M), Panel 2: [C12E10] = 0.05mM – 3.07mM ([Pireno]=  $5.9 \times 10^{-7}$  M).

En la Figura 6.23, en el panel de la izquierda podemos observar como la intensidad de fluorescencia varia con la concentración de surfactante. En una primera etapa la intensidad de fluorescencia disminuye (C12E7) o se mantiene constante (C12E10), posteriormente la intensidad aumenta hasta un valor superior al inicial que corresponde con la intensidad de fluorescencia de las micelas. En el panel de la derecha podemos observar como la relación de intensidad aumenta desde antes de la *cmc* y continúa en la región de transición hasta alcanzar el valor final correspondiente a la presencia de micelas. Igual que en el caso de los Brij, la relación de intensidades presenta regiones de transición grandes ( $r > 0.2$ ).

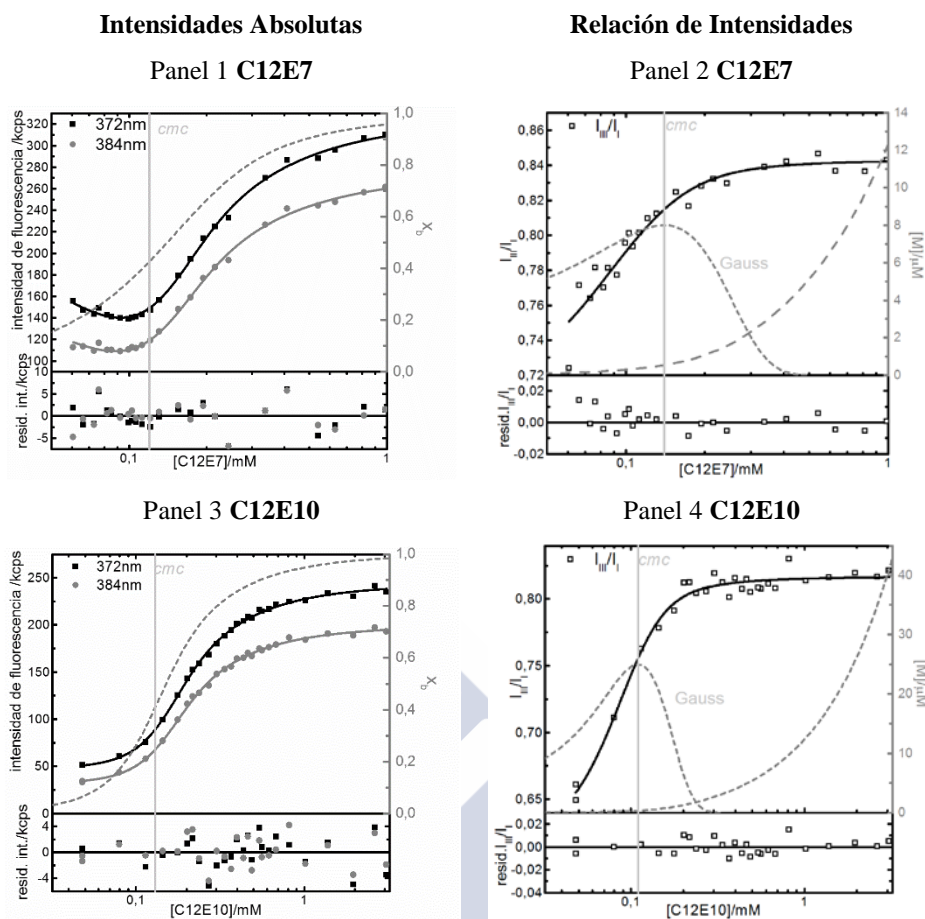


Figura 6.23 Paneles por la izquierda: Intensidad de fluorescencia en la banda del monómero en el pico I (372nm, negro) y pico III (384nm, gris). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.11). En líneas discontinuas la fracción  $X_b$  de pireno en el interior de micelas. La línea vertical indica el valor de la *cmc* del ajuste. Paneles por la derecha: Relación de intensidades (relación espectral) de fluorescencia  $SR^{(2,1)} = I(384m)/I(372nm)$ , ( $I_{III}/I_I$ , cuadrados). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.13). La línea vertical indica el valor de la *cmc* del ajuste. En gris, perfiles de la concentración de micelas [M] en  $\mu M$  y la curva Gaussiana indicando el ancho  $r$  del intervalo de transición.

## 6.4.2 Surfactantes iónicos

Se van a describir los surfactantes iónicos que se han estudiado en este apartado: surfactantes con carga positiva (catiónico): DTAB y CTAB y con carga negativa (aniónico): SDS, SOS, STS, FAES y LAS

### 6.4.2.1 Surfactante Catiónicos

A continuación vamos a proceder a presentar los resultados obtenidos para los surfactantes catiónicos. La *cmc* obtenida por fluorescencia del pireno podrá ser comparada con una técnica no fluorescente, gracias a la posibilidad de medir la conductividad y estudiar cómo cambia entre la fase monomérica y la fase micelizada. El procedimiento a realizar es similar al realizado con el TX100.

## 6.4 Resultados

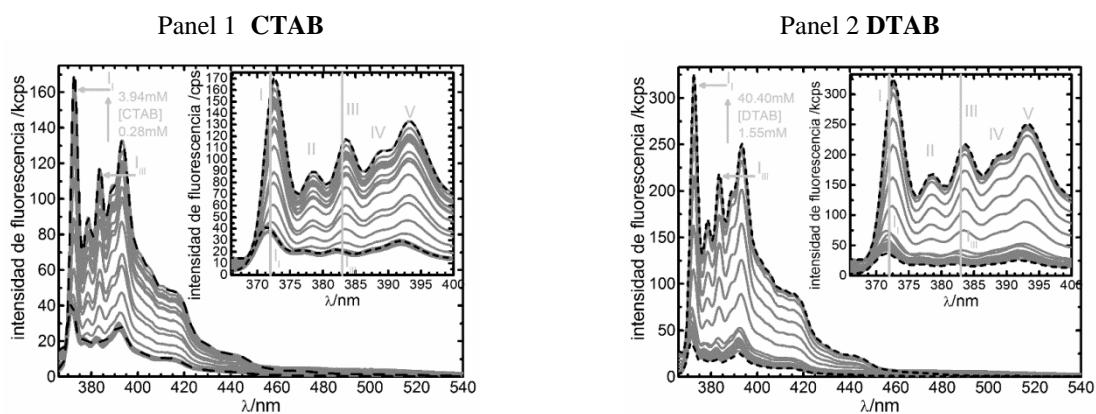


Figura 6.24 Espectros de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones acuosas de CTAB (Panel 1) y DTAB (Panel 2) (curvas en gris) Los espectros de menor y mayor concentración de surfactante se indican a trazos. Gráfica insertada: escala reducida de la gráfica principal. Panel 1: [CTAB] = 0.28mM – 3.94mM ([Pireno]=  $5.8 \times 10^{-7}$  M), Panel 2: [DTAB] = 1.55mM – 40.40mM ([Pireno]=  $6.0 \times 10^{-7}$  M)

En la Figura 6.25, en el panel de la izquierda podemos observar como la intensidad de fluorescencia varía con la concentración de surfactante. En una primera etapa la intensidad de fluorescencia se mantiene constante, posteriormente la intensidad aumenta hasta un valor superior al inicial que corresponde con la intensidad de fluorescencia de las micelas. En el panel de la derecha podemos observar como la relación de intensidad aumenta desde antes de la *cmc* y continúa en la región de transición hasta alcanzar el valor final correspondiente a la presencia de micelas. Indicar que la relación de intensidad presenta perfiles de intensidad como en este caso cuando la región de transición es muy grande ( $r > 0.2$ ).

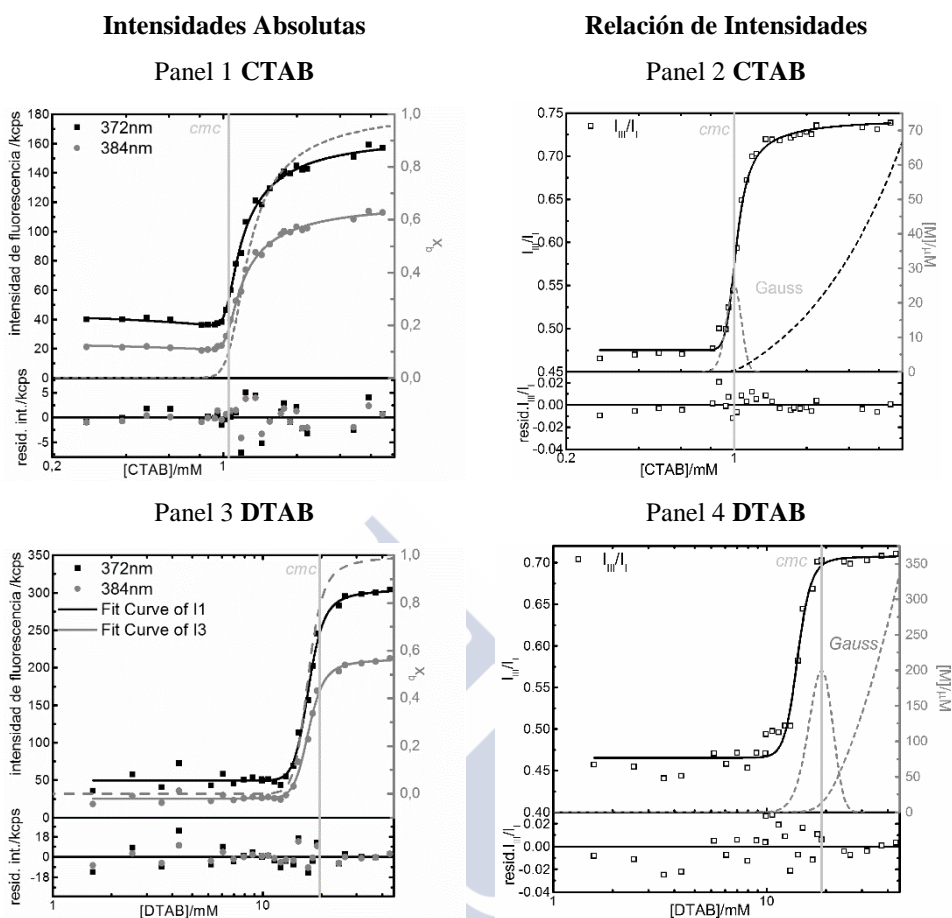


Figura 6.25 Paneles por la izquierda: Intensidad de fluorescencia en la banda del monómero en el pico I (372nm, negro) y pico III (384nm, gris). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.11). En líneas discontinuas la fracción  $X_b$  de pireno en el interior de micelas. La línea vertical indica el valor de la *cmc* del ajuste. Paneles por la derecha: Relación de intensidades (relación espectral) de fluorescencia  $SR^{(2,1)} = I(384m)/I(372nm)$ , ( $I_{III}/I_I$ , cuadrados). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.13). La línea vertical indica el valor de la *cmc* del ajuste. En gris, perfiles de la concentración de micelas [M] en  $\mu M$  y la curva Gaussiana indicando el ancho  $r$  del intervalo de transición.

## 6.4 Resultados

### Medidas de conductividad eléctrica

En Figura 6.26, se puede observar como varía la conductividad de los surfactantes con la concentración. La conductividad aumenta con la concentración con una pendiente  $k_1$  hasta la  $cmc$  y posteriormente tiene lugar un cambio de la pendiente a su valor dentro de las micelas denominada  $k_2$ .

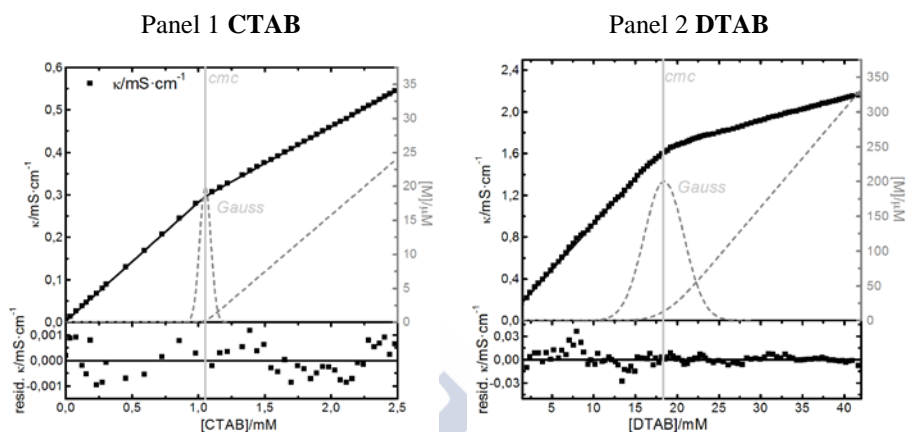


Figura 6.26 Conductividad (puntos negros) de CTAB y DTAB. Ajuste global de la ecuación (6.16) (líneas continuas). La línea vertical indica el valor de la  $cmc$  ajustado. En gris, perfiles de la concentración de micelas  $[M]$  en  $\mu\text{M}$  y perfil de la distribución Gaussiana.  $[\text{CTAB}] = 0.0\text{--}2.5\text{mM}$  y  $[\text{DTAB}] = 0.0\text{--}39.5\text{mM}$ .

#### 6.4.2.2 Surfactantes Aniónicos

A continuación vamos a proceder a presentar los resultados obtenidos para los surfactantes iónicos. Indicar que se ha estudiado otro surfactante aniónico en el capítulo 5.1 y que se estudia también en el actual capítulo (diferente concentración para asegurar la ausencia de excímero. El procedimiento a realizar es análogo al seguido para el TX-100.

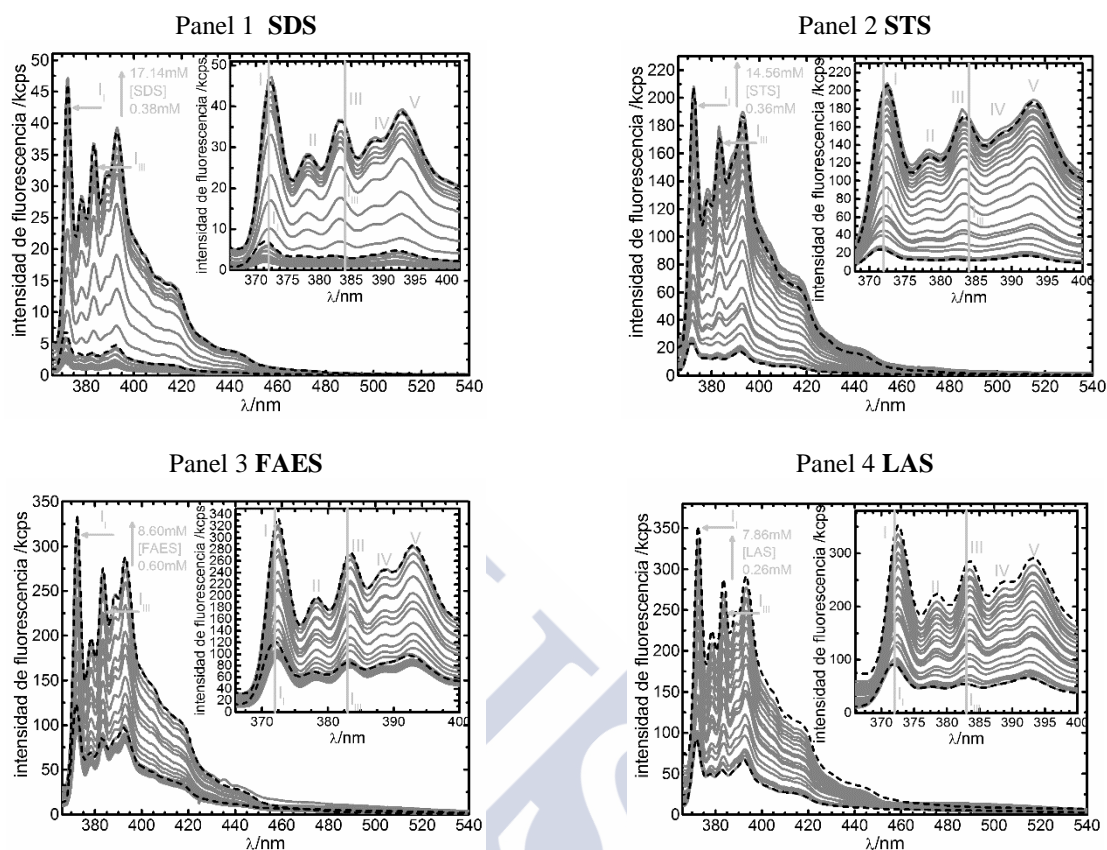


Figura 6.27 Espectros de emisión de fluorescencia del pireno en disoluciones acuosas de CTAB (Panel 1) y DTAB (Panel 2) (curvas continuas en gris). Los espectros de menor y mayor concentración de surfactante se indican a trazos. Gráfica insertada: escala reducida de la gráfica principal. Panel 1: [SDS] = 0.38mM – 17.14mM ([Pireno]=  $8.7 \times 10^{-8}$  M), Panel 2: [STS] = 0.36mM – 14.56mM ([Pireno]=  $6.0 \times 10^{-7}$  M), Panel 3: [FAES] = 0.60mM – 8.60mM ([Pireno]=  $5.9 \times 10^{-7}$  M), Panel 4: [LAS] = 0.26mM – 7.86mM ([Pireno]=  $6.7 \times 10^{-7}$  M); [SOS] = 0.11mM – 1.22mM ([Pireno]=  $6.0 \times 10^{-7}$  M).

En la Figura 6.28, en el panel con numeración impar podemos observar como la intensidad de fluorescencia varía con la concentración de surfactante. En una primera etapa la intensidad de fluorescencia se mantiene constante salvo en el caso del FAES que presenta cierto quenching observado como una disminución de la intensidad de fluorescencia, posteriormente la intensidad aumenta hasta un valor superior al inicial que corresponde con la intensidad de fluorescencia de las micelas. En el panel con numeración par podemos observar como la relación de intensidad permanece constante antes de la *cmc* y aumenta en la región de transición hasta alcanzar el valor final correspondiente a la presencia de micelas. Indicar que la relación de intensidad para el surfactante FAES presenta perfiles de intensidad típicos para una región de transición muy grande ( $r > 0.2$ ).

## 6.4 Resultados

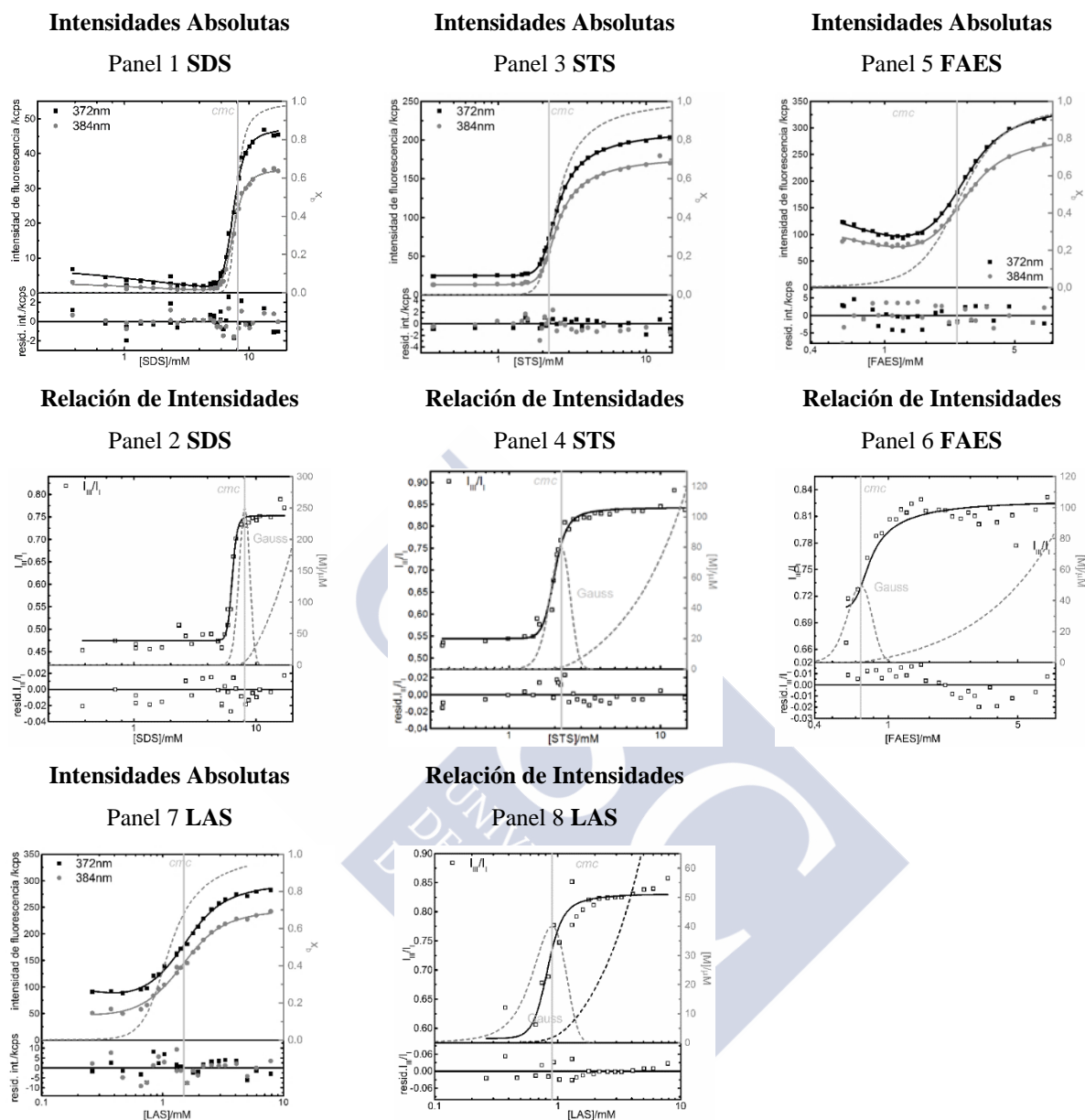


Figura 6.28 Paneles con numeración impar: Intensidad de fluorescencia en la banda del monómero en el pico I (372nm, negro) y pico III (384nm, gris). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.11). En líneas discontinuas la fracción  $X_b$  de pireno en el interior de micelas. La línea vertical indica el valor de la  $cmc$  del ajuste. Paneles con numeración par: Relación de intensidades (relación espectral) de fluorescencia  $SR^{(2,1)} = I(384m)/I(372m)$ , ( $I_{III}/I_I$ , cuadrados). Líneas continuas: ajuste global de la ecuación (6.13). La línea vertical indica el valor de la  $cmc$  del ajuste. En gris, perfiles de la concentración de micelas  $[M]$  en  $\mu M$  y la curva Gaussiana indicando el ancho  $r$  del intervalo de transición.

**Medidas de conductividad eléctrica**

En la Figura 6.29, se puede observar como varía la conductividad con la concentración de surfactante. La conductividad aumenta con la concentración con una pendiente  $k_1$  hasta la *cmc* y posteriormente tiene lugar un cambio de la pendiente a su valor dentro de las micelas denominada  $k_2$ .

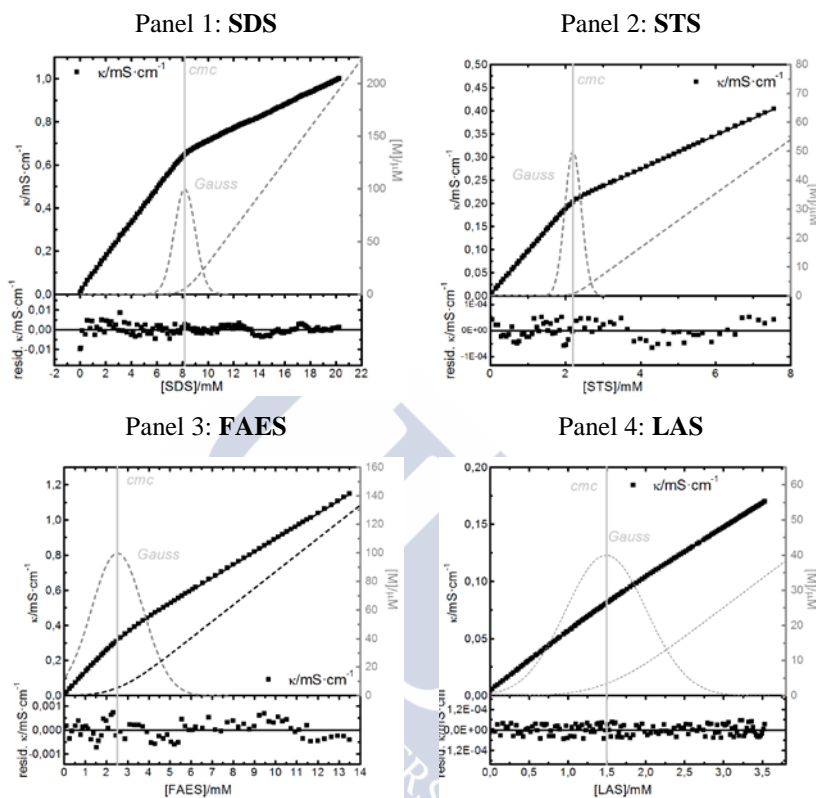


Figura 6.29 Conductividad (puntos negros). Ajuste global de la ecuación (6.16) (líneas continuas). La línea vertical indica el valor de la *cmc* ajustado. En gris, perfiles de la concentración de micelas [M] en  $\mu\text{M}$  y perfil de la distribución Gaussiana. [SDS]=0.00-20.25mM, [SOS]=0.00-0.75mM, [STS]=0.00-7.55mM, [FAES]=0.0-13.5mM, [LAS]=0.0-3.5mM

**6.5 Discusión**

Como hemos explicado se ha realizado el estudio para un grupo numeroso de surfactantes con diferente carga para comprobar la validez del modelo de concentraciones “APN” para determinar la *cmc* de un surfactante desconocido con pireno como sonda fluorescente. Se han estudiado surfactantes iónicos mediante emisión de fluorescencia y mediante una técnica que no requería la presencia de pireno: la conductividad eléctrica. También se han estudiado surfactantes neutros usando el pireno como sonda fluorescente y en el caso del TX-100 hemos utilizado su propia absorción electrónica para determinar su *cmc*.

## 6.5 Discusión

En adelante los superíndices “F”, “SR”, “NF” y “e” indican que los parámetros son obtenidos en ajustes utilizando datos de la intensidad absoluta de fluorescencia del pireno, de la relación de intensidades de fluorescencia del pireno, de propiedades no fluorescentes y estimada mediante expresiones adecuadas, respectivamente. En algunos casos comparamos además con valores bibliográficos.

### Determinación de la cmc utilizando las intensidades absolutas

En la tabla 6.2 se resumen los datos obtenidos del análisis de las intensidades de fluorescencia absoluta (“F”).

Tabla 6.2 Resultados de los ajustes obtenidos utilizando el modelo APN para las intensidades de fluorescencia y utilizando los espectros de emisión de fluorescencia para diferentes surfactantes. El valor de la constante de equilibrio se obtiene del análisis global de la intensidad absoluta de emisión de fluorescencia con la ecuación (6.11) (Función APNModel\_PyreneFluorIntensity) a dos longitudes de onda (1): 372nm y (2): 384nm. El número de agregación utilizado se indica en la tabla 6.1. La concentración de pireno ( $[D]_0=cD0$ ) fue fijada.  $K_q$  es la constante de quenching  $K_q$  entre el surfactante monomérico y el pireno. El valor de la constante de formación de excímero  $K_{eV}$  se fija en uno para tener en cuenta una pequeña contribución de excímero.  $I_{fL} = I^{(\lambda)}$  es la intensidad de fluorescencia de emisión absoluta.  $q_{bmfL} = q_{bmf}^{(\lambda)}$  es la relación de intensidades entre el pireno dentro de las micelas y fuera de ellas. El valor de  $q_{befL} = q_{bef}^{(\lambda)}$  se fija.

Tabla 6.2									
Surfactante	$cmc^F/mM$	$r^F/mM$	$K^F/mM^{-1}$	$Kq/mM^{-1}$	$I_{fL}(1)/kcps$	$I_{fL}(2)/kcps$	$q_{bmfL}(1)$	$q_{bmfL}(2)$	$cD0/10^{-7}M$
Surfactantes neutros									
TX100	0.28±0.01	0.20±0.01	3300±200	15.81±2.61	120±10	57±6	0.80±0.09	1.21±0.14	(5.4)
BRIJ58	0.08±0.01	0.29±0.06	1520±180	3.8±1.2	460±18	3420±12	1.27±0.05	1.34±0.05	(5.4)
BRIJ56	0.04±0.01	0.36±0.08	2430±150	(0)	194±2	142±2	2.33±0.04	2.71±0.06	(5.9)
BRIJ35	0.11±0.01	(0.15)	460±30	11.87±2.60	25±2	13±1	3.00±0.23	4.31±0.36	(2.6)
BRIJ S10	0.017±0.010	0.29±0.05	3170±380	(0)	4.68±0.07	2.85±0.07	5.06±0.10	7.06±0.21	(5.9)
C12E7	0.13±0.01	0.39±0.05	1790±120	12.4±6.3	260±54	197±40	1.25±0.25	1.40±0.28	(5.9)
C12E10	0.13±0.01	0.44±0.01	1480±140	(0)	47±3	30±2	5.21±0.27	6.64±0.50	(5.9)
Surfactantes iónicos									
CTAB	1.04±0.12	0.06±0.01	350±30	(0)	44±3	24±2	3.72±0.26	5.6±0.4	(5.8)
DTAB	18.6±0.1	0.14±0.02	230±40	(0)	49±2	23±2	6.18±0.25	9.26±0.77	(6.0)
SDS	8.13±0.10	0.16±0.01	230±20	0.67±0.26	7±1	3.3±0.7	6.75±1.27	11.88±2.80	(0.9)
STS	2.18±0.05	0.15±0.02	285±10	(0)	24.7±0.3	12.3±0.5	8.51±0.19	14.0±0.4	(6.0)
FAES	2.4±0.2	0.35±0.01	200±50	1.3±0.30	208±24	158±18	1.66±0.20	1.79±0.21	(5.9)
LAS	1.45±0.05	0.57±0.03	220±10	2.24±0.69	132±41	60±15	2.24±0.69	4.14±1.05	(6.7)

Observamos en la tabla 6.2 que la constante de equilibrio  $K$  varía entre valor de 200  $350 \text{ mM}^{-1}$  para los surfactantes iónicos y 460 – 3300  $\text{mM}^{-1}$  para los neutros. El ancho relativo del intervalo de transición  $r$  tiene valores típicos de 0.10-0.20 para tensioactivos monodispersos y valores mayores para los polidispersos. Analizaremos estos valores en más detalle.

En la Figura 6.30 representamos la dependencia de la constante  $K$  y del parámetro  $r$  de la  $cmc$  para los surfactantes estudiados. Observamos una fuerte dependencia entre  $K$  y la  $cmc$ , mientras poca o ninguna correlación entre  $r$  y  $cmc$ . Se obtienen constantes  $K$  altas cuando la  $cmc$  es baja y cuando aumentamos la  $cmc$ , la constante obtenida presenta un valor cada vez menor. Observamos también dos grupos: si tenemos constantes de equilibrio elevadas, estaremos hablando de surfactantes neutros, pero si tenemos  $K$  más bajas, tenemos más posibilidades de que estemos hablando de surfactantes iónicos. Para el parámetro  $r$ , observamos que su valor varía con la  $cmc$  pero sin un patrón aparente, ni en cuanto a la carga del surfactante ni al valor de la  $cmc$ .

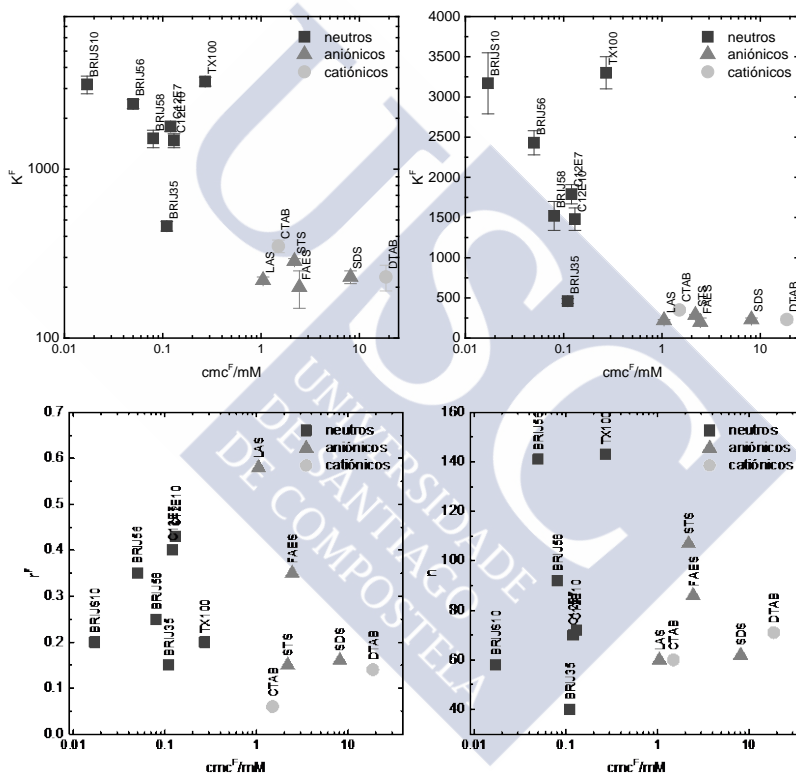


Figura 6.30 Comparación de la dependencia de los parámetros  $K^F$ ,  $r^F$  y  $n$  frente a  $cmc^F$ . Arriba  $K^F$  en representación doble-logarítmica y semi-logarítmica. Abajo a la izquierda  $r^F$  y a la derecha  $n$ , ambos en representación semi-logarítmica. Los valores de  $K^F$ ,  $cmc^F$  y  $r^F$  son los de la tabla 6.2. Los valores de  $n$  son de la tabla 6.1.

## 6.5 Discusión

### *Posición relativa de la curva de intensidades absolutas frente a la cmc*

Aquí podemos aclarar una observación interesante con respecto a la posición relativa entre la *cmc* y la curva de las intensidades absolutas del pireno. Para ciertos surfactantes la intensidad del pireno aumenta ya a concentraciones mucho más bajas que la *cmc*, coincidiendo esta prácticamente con el final de la zona de cambio, como por ejemplo en el caso del DTAB (Figura 6.25, panel 3). Al contrario, en otros sistemas como en el SDS o STS la variación ocurre a concentraciones más altas, cerca de la *cmc* (Figura 6.28). Cuando la curva de las intensidades (y por ejemplo su punto de inflexión) se encuentra desplazada hacia concentraciones menores con respecto a la *cmc*, nos indica que la afinidad entre el pireno y las micelas es muy elevada. La implicación de una mayor afinidad es entendida como una mayor interacción entre el pireno y las micelas del surfactante. En el momento que aparezcan las primeras micelas, dada la elevada afinidad (constante  $K$ ), la fracción de pireno unido a las micelas aumenta. Sin embargo, para entender este efecto no es suficiente comparar las constantes de equilibrio  $K$  sino también la concentración de micelas cerca de la *cmc*.

Para ejemplificar el efecto aquí expuesto se escogen los surfactantes DTAB y CTAB. En el caso del DTAB la curva de intensidad de fluorescencia aumenta ya mucho antes de la *cmc*, mientras en el caso del CTAB la variación no empieza hasta una concentración muy cerca de la *cmc*. Esta diferencia en el comportamiento indicaría una mayor afinidad del pireno hacia micelas de DTAB que de CTAB. A primera vista esto puede sorprender ya que las constantes de equilibrio  $K$  de DTAB y CTAB son parecidas ( $220$  vs  $350 \text{ mM}^{-1}$ ), con la constante del CTAB incluso mayor que la del DTAB. Sin embargo, debemos tener en cuenta que la *cmc* del DTAB es  $18.6 \text{ mM}$  frente a  $1.5 \text{ mM}$  (el número de agregación apenas presenta diferencias). Si calculamos la concentración de micelas en la *cmc* ( $[M](cmc)$ ) observamos que en el caso del DTAB hay  $14.6 \text{ }\mu\text{M}$  de micelas mientras que en el CTAB tendríamos solamente  $0.60 \text{ }\mu\text{M}$  (vea tabla 6.3). Las fracciones de pireno unido a micelas  $x_b = K[M] / (1 + K[M])$  a concentraciones de surfactante cercanas a la *cmc* son por ello muy diferente para el DTAB y el CTAB, a pesar de las constantes de equilibrio parecidas (justo en la *cmc* los valores de  $X_b(cmc)$  son  $0.77$  y  $0.17$  para el DTAB y el CTAB, respectivamente (tabla 6.3)).

Tabla 6.3 Valores de diferentes concentraciones y constantes de los surfactantes estudiados.  $cmc^F$  y  $K^F$ : valores repetidos de la tabla 6.2.  $[M](cmc)$  y  $X_b(cmc)$ : concentración micelar y fracción de pireno micelizado para  $[S]_0=cmc$ .  $K^*=K^F \cdot cmc/n$ : constante de equilibrio normalizada.  $K^F \cdot [M](cmc) = [D_b]/[D_f]$ : relación entre las concentraciones de pireno micelizado y libre en la  $cmc$ .

Surfactante	$cmc^F/mM$	$K^F/mM^{-1}$	$[M](cmc)/\mu M$	$X_b(cmc)$	$K^*=K^F \cdot cmc/n$	$K^F \cdot [M](cmc)$
TX100	0.28±0.01	3300±200	0,15	0,33	6,23±0.44	0,50
BRIJ58	0.08±0.01	1520±180	0,09	0,12	1,32±0.23	0,12
BRIJ56	0.04±0.01	2430±150	0,05	0,11	0,86±0.18	0,13
BRIJ35	0.13±0.01	460±30	0,16	0,07	1,27±0.14	0,08
BRIJ510	0.017±0.01	3170±380	0,02	0,07	0,93±0.56	0,07
C12E7	0.13±0.01	1790±300	0,27	0,33	3,07±0.33	0,49
C12E10	0.13±0.01	1480±130	0,31	0,31	2,67±0.33	0,46
CTAB	1.04±0.12	350±30	0,60	0,17	8.75±1.39	0,21
DTAB	18.6±0.3	230±20	14,63	0,77	60,25±10.48	3,37
SDS	8.13±0.10	230±40	8,34	0,66	30,05±2.84	1,92
STS	2.18±0.05	285±10	1,22	0,26	5,81±2.84	0,35
FAES	2.45±0.2	200±50	3,98	0,44	5,70±1.50	0,80
LAS	1.5±0.2	220±10	4,01	0,47	3.85±0.25	0.88

Con el fin de poder comparar mejor las constantes de equilibrio  $K$  de diferentes surfactantes definimos una constante de equilibrio  $K^* = K^F \cdot cmc/n$  "normalizada" y adimensional, multiplicando  $K$  por la  $cmc$  y dividiendo entre el número de agregación. El divisor  $cmc/n$  es aproximadamente proporcional a la concentración de micelas en la  $cmc$ , despreciando la influencia del parámetro  $r$  (vea eq. 7 del capítulo 5.1). Otras magnitudes más precisas para evaluar la afinidad del pireno a las micelas serían  $X_b(cmc)$  o  $[D_b]/[D_f] = K \cdot [M](cmc)$ , pero ambos requieren el valor del parámetro  $r$  para su cálculo).

Los valores de  $K^*$  se presentan en la tabla 6.3 y en la Figura 6.31. Observamos una dependencia aproximadamente lineal entre  $K^*$  y la  $cmc$  con  $K^* \approx 3 \cdot cmc + 1.5$ . Los valores de  $X_b(cmc)$  y  $K \cdot [M](cmc)$  presentan menor linealidad frente a la  $cmc$ .

El valor  $K^*$  del DTAB ( $K^*=60$ ) es mucho mayor que el del CTAB ( $K^*=9$ ), y en efecto es el mas alto de todos los surfactantes estudiados. Resumiendo, las altas  $cmc$  del DTAB o SDS se traducen también en altas concentraciones micelares  $[M]$  cerca de la  $cmc$ . A pesar de valores de la constante de equilibrio  $K$  moderados, el equilibrio de reparto del pireno se desplaza hacia una alta fracción de pireno unido a las micelas, y en consecuencia se observa una subida de la curva de fluorescencia ya a concentraciones mucho más bajas que la  $cmc$ .

## 6.5 Discusión

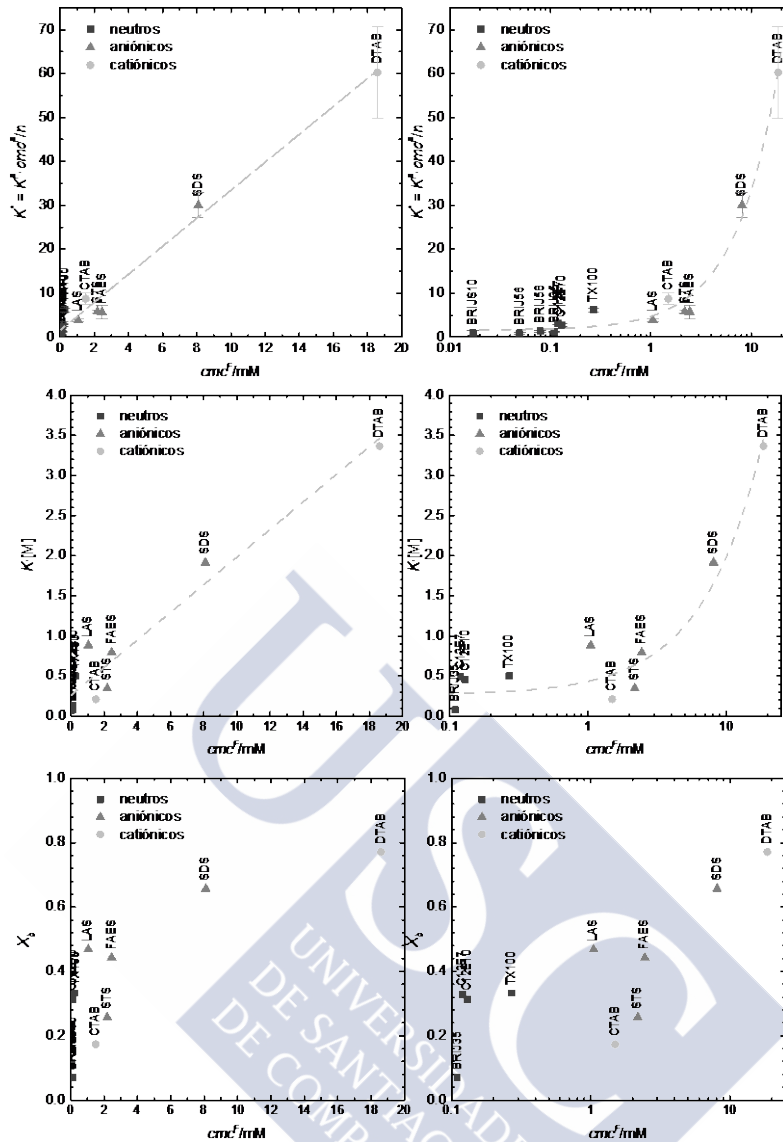


Figura 6.31 Comparación de la dependencia de  $K^*$ ,  $K \cdot [M](cmc)$  y  $X_b(cmc)$  de la  $cmc$ . Izquierda: representación lineal. Derecha: representación semi-logarítmica de los mismos datos. Los valores se dan en la tabla 6.3. Cuadrados negros: surfactantes neutros. Triángulos grises: surfactantes aniónicos. Círculos grises claros: surfactantes catiónicos. Las líneas a trazos son ajustes lineales con  $K^* \approx 3.2 \cdot cmc/mM + 1.6$  y  $K^F \cdot [M](cmc) \approx 0.17 \cdot cmc/mM + 0.26$ .

### Determinación de la $cmc$ utilizando técnicas no fluorescentes

En la tabla 6.4 resumimos los valores de la  $cmc^{NF}$  determinados de técnicas no fluorescentes presentados en el capítulo de resultados.

Tabla 6.4 Resultados de los ajustes obtenidos utilizando el modelo APN para medidas de la conductividad utilizando la función de ajuste `apnmodel_conductivity.fdf` y la absorción, utilizando el modelo `apnmodel_absorptionbandratio.fdf`. Los parámetros asociados a las medidas de absorción:  $q_1$  es la relación de absorciones molares a dos longitudes de onda diferentes en presencia de monómeros de surfactantes ( $S_1$ ),  $q_m$  es la relación de absorciones molares a dos longitudes de onda diferentes en presencia de micelas ( $S_m$ ),  $q_a$  es la relación de absorciones molares entre micelas y monómeros a la misma longitud de onda. Para los datos de conductividad: la pendiente del monómero se denomina  $k_1$  y la pendiente de las micelas se denomina  $k_2$ ; el valor de  $k_0$  se corresponde a la conductividad residual del agua.

Surfactante	$cmc^{NF}/mM$	$r^{NF}/mM$	$q_1$	$q_m$	$q_a$	$k_1$	$k_2$	$k_0$
Surfactantes Neutros								
TX100 <sup>(1)</sup>	0.27±0.01	0.11±0.01	0.64±0.02	1.08±0.22	0.99±1.74	-	-	-
Surfactantes iónicos								
CTAB	1.05±0.02	0.04±0.05	-	-	-	280.1±0.6	171.7±0.3	3.5±0.3
DTAB	18.4±0.1	0.12±0.01	-	-	-	114.5±0.4	28.3±0.2	48±3
SDS	8.16±0.02	0.10±0.01	-	-	-	79.1±0.2	27.9±0.1	15.1±0.7
STS	2.21±0.01	0.10±0.01	-	-	-	93.24±0.02	36.72±0.01	2.12±0.02
FAES	2.72±0.01	0.35±0.01	-	-	-	128.9±0.3	73.44±0.05	6.2±0.4
LAS	1.50±0.05	0.35±0.02	-	-	-	52.59±0.03	42.70±0.01	4.22±0.01

(1) Datos presentados en el capítulo 4.1, "Figure 2".

*Verificación de la determinación de la cmc mediante intensidades absolutas*

Para evaluar la calidad de los métodos fluorométricos (F y SR) para la determinación de la *cmc* comparamos los resultados con los obtenidos mediante métodos no fluorimétricos (NF) (tabla 6.4) o, a falta de estos, con datos bibliográficos (tabla 6.1). Para ello definimos las siguientes relaciones como indicadores de la calidad de determinación de la *cmc*:

$$I^{SR} = \frac{cmc^{SR}}{cmc^F} \quad I^{NF} = \frac{cmc^{NF}}{cmc^F} \quad I^{SRe} = \frac{cmc^{SRe}}{cmc^{SR}} \tag{6.22}$$

La Figura 6.32 representa la relación  $I^{NF}$  para todos los surfactantes frente a la *cmc*. Observamos que en su mayoría los valores se encuentran en torno al valor central de 1, lo que indica que ambas técnicas (técnica de intensidades de fluorescencia absolutas y técnicas no fluorescentes) proporcionan valores concordantes de la *cmc*. La excepción es el FAES que desvía un 10% del valor obtenido en las medidas de conductividad.

Para los surfactantes para los que no disponemos de valores de la *cmc* determinados por métodos no fluorescentes tomamos como  $cmc^{NF}$  el valor bibliográfico de la tabla 6.1. La desviación es menor del 10% para los valores bibliográficos excepto para los surfactantes neutros Brij S10, Brij 35 y C12E7 que desvían hasta un 50%.

Podemos indicar entonces que el procedimiento para obtener la *cmc* donde se utiliza la intensidad de emisión de fluorescencia del pireno proporciona valores de la *cmc* para los surfactantes estudiados coherentes con técnicas directas.



Capítulo 6 Determinación de la cmc usando pireno como sonda fluorescente

Tabla 6.5 Resultados de los ajustes obtenidos utilizando el modelo APN para la relación de intensidades de fluorescencia y utilizando los espectros de emisión de fluorescencia para diferentes surfactantes. Se aplicó la función APNModel\_PyreneFluorSRMon para 2 longitudes de onda (372nm, 384nm). El valor de la constante de equilibrio y el valor de  $Kq$  se obtiene de los análisis utilizando la intensidad absoluta de emisión de fluorescencia. El número de agregación utilizado es el de la tabla 6.1.  $Kq$  es la constante de quenching entre el surfactante monomérico y el pireno.  $SR_f^{(2,1)}$  se define como la relación de intensidades entre el pireno libre a 2 longitudes de onda,  $SR_b^{(2,1)}$  es la relación de intensidades entre el pireno dentro de las micelas 2 longitudes de onda distintas y  $qbfm1$  es la relación de intensidades entre dentro de las micelas y fuera a una longitud de onda fija (Las longitudes de onda son 372nm y 384nm. El valor de  $qbf1 = q_{b,f}^{(1)}$  fijado es el obtenido mediante el ajuste con APNModel\_PyreneFluorIntensity indicado en la tabla 6.2.

Surfactante	$cmc^{SR}/mM$	$r^{SR}/mM$	$K^F/mM^{-1}$	$Kq/mM^{-1}$	SRf21	SRb21	qbf1
Surfactantes Neutros							
TX100	0.24±0.01	0.09±0.01	(3300)	(15.81)	0.48±0.01	0.72±0.01	(0.80)
BRIJ58	0.05±0.01	(0.15)	(1520)	(3.8)	0.74±0.01	0.79±0.01	(1.27)
BRIJ56	0.05±0.04	0.63±0.17	(2430)	(0)	0.71±0.01	0.87±0.01	(2.34)
BRIJ35	0.10±0.01	0.82±0.19	(460)	(11.87)	0.46±0.01	0.74±0.01	(3.00)
BRIJ S10	0.017±0.01	0.73±0.29	(3170)	(0)	0.59±0.01	0.92±0.01	(5.06)
C12E7	0.14±0.01	0.69±0.18	(1790)	(16.86)	0.65±0.01	0.85±0.01	(1.25)
C12E10	0.11±0.05	0.50±0.10	(1490)	(0)	0.63±0.01	0.83±0.01	(5.21)
Surfactantes iónicos							
CTAB	1.00±0.01	0.07±0.01	(350)	(0)	0.48±0.01	0.74±0.01	(3.72)
DTAB	18.1±0.2	0.13±0.01	(230)	(0)	0.46±0.01	0.70±0.01	(6.18)
SDS	8.10±0.30	0.10±0.01	(230)	(0.67)	0.47±0.01	0.75±0.01	(6.75)
STS	2.2±0.1	0.14±0.02	(285)	(0)	0.51±0.01	0.82±0.01	(8.51)
FAES	0.70±0.05	0.15±0.05	(200)	(1.33)	0.70±0.03	0.82±0.01	(4.7)
LAS	0.9±0.1	0.22±0.07	(220)	(2.24)	0.58±0.02	0.83±0.01	(2.24)

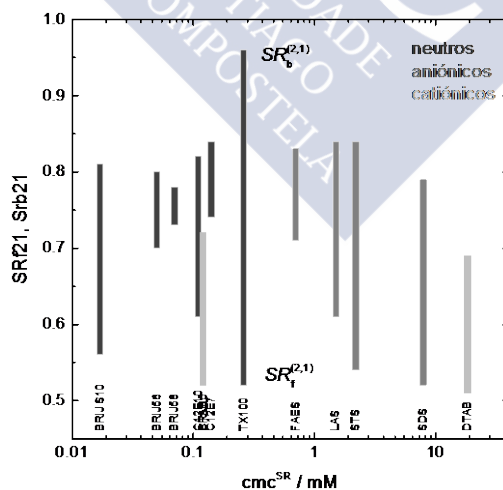


Figura 6.33 Dependencia de las relaciones espectrales SRf21 y SRb21 de la cmc. Los resultados se resumen en la tabla 6.5.

## 6.5 Discusión

Finalmente analizamos en la Figura 6.34 la relación de “calidad”  $l^{SR} = cmc^{SR}/cmc^F$  que compara los valores de la  $cmc$  obtenida de intensidades absolutas y de las relaciones espectrales. Se encuentran en torno al valor central de uno, lo que nos quiere indicar que ambas técnicas proporcionan  $cmc$  similares. Por otro lado destacar el valor anómalo del FAES, con valores de la  $cmc$  muy diferentes para cada procedimiento. No hemos encontrado razón alguna para esta discrepancia (la repetición de las medidas resolvió que no correspondía a un procedimiento de preparación anómalo). Se requiere estudiar más profundamente el caso del FAES y utilizar otras técnicas para confirmar esta disparidad. Añadir que la incertidumbre aumenta al disminuir la  $cmc$ , puesto que a menores  $cmc$  obtenemos una mayor incertidumbre en la determinación de las concentraciones (problemas en la preparación). También debemos añadir que la determinación de la  $cmc$  de surfactantes con  $cmc$  bajas acarrea mayor incertidumbre observada en los resultados que hemos obtenido bibliográficamente (en algunos caso ni procede la aportación del valor de la incertidumbre).

Podemos indicar entonces que el procedimiento para obtener la  $cmc$  donde se utiliza la relación de intensidades de emisión de fluorescencia del pireno proporciona valores de la  $cmc$  para los surfactantes estudiados coherentes con de emisión de intensidad absoluta y por lo tanto podremos utilizar la relación de intensidades del pireno para determinar la  $cmc$ .

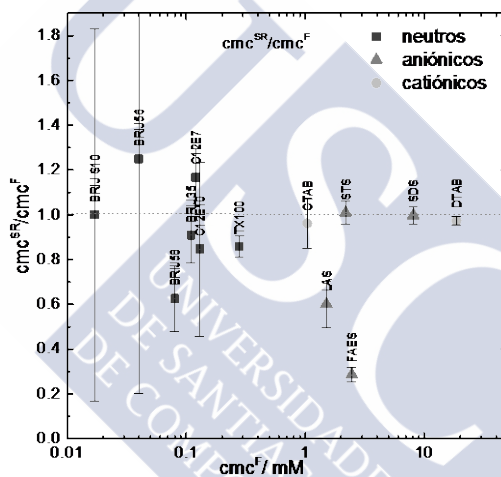


Figura 6.34 Relación  $l^{SR}$  frente a la  $cmc^F$ . Los resultados se resumen en la tabla 6.5.

### Estimación de la constante de equilibrio $K$

El análisis de las curvas de las relaciones espectrales  $SR$  con las ecuaciones de ajuste correspondientes se complica por la fuerte correlación entre los parámetros de ajuste, en especial entre la constante de equilibrio  $K$  y la  $cmc$ . El ajuste de las curvas de  $SR$  no permite en general determinar ambos parámetros simultáneamente. Para determinar la  $cmc$  de las relaciones  $SR$  es necesario conocer la constante  $K$  con cierta precisión y fijarla en el ajuste. Esto no es el caso en los ajustes de las intensidades absolutas, que si permiten determinar ambos valores.

Sin embargo, titulaciones de intensidades absolutas requieren mayor cuidado en los experimentos para mantener la concentración del pireno constante y un análisis global algo más complejo. Para la determinación rutinaria de la  $cmc$  es preferible poder usar las relaciones

espectrales, que son menos sensibles a variaciones en la concentración de pireno a lo largo de las titulaciones. Entonces es necesaria una estimación de la constante de equilibrio  $K$  sin ser necesario la utilización de las intensidades absolutas.

Proponemos basar esta estimación en la dependencia entre la constante de equilibrio y la estructura del monómero del tensioactivo, en concreto en el número de carbonos alquílicos y el número de carbonos alquil-éter de la cadena secundaria. Los resultados parecen indicar que un mayor número de carbonos alquílicos incrementa el valor de la constante de equilibrio y cuando incrementamos el valor del número de carbonos alquil-eter el efecto se invierte: un mayor número implica una menor constante.

Podemos observar que la presencia de carga en el monómero influye en su comportamiento por lo que dividiremos los surfactantes en dos grupos: iónicos y neutros.

En el caso de los surfactantes iónicos podemos obtener fácilmente una expresión que relaciona la longitud de la cadena del monómero del surfactante (número de carbonos:  $NC$ ) con el valor de la constante  $K$ . La relación entre estas dos variables es lineal como se puede observar en la Figura 6.35 . Proponemos la siguiente expresión:

$$K^e = K_0 + b \cdot NC \tag{6.23}$$

Siendo  $K_0$  una constante de “amortiguamiento” sin significado físico y  $b$  la variación de la constante de equilibrio con el número de carbonos,  $NC$ . Los resultados del ajuste lineal de esta ecuación a los datos  $K^F$  de la tabla 6.2 son:  $K_0 = -144 \pm 30 \text{ mM}^{-1}$ ,  $b = 31 \pm 2 \text{ mM}^{-1}$

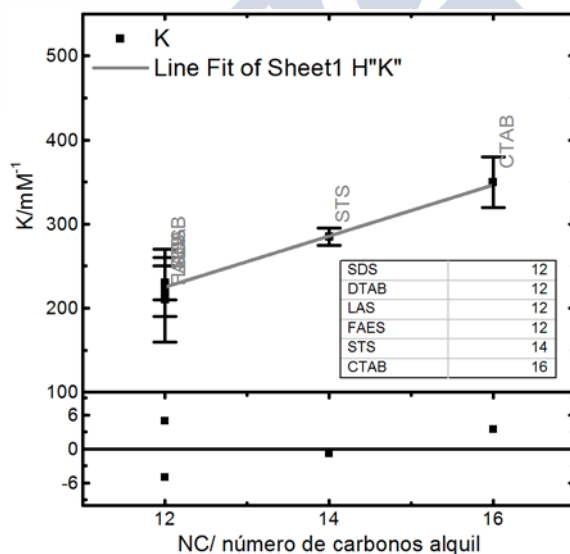


Figura 6.35 Ajuste lineal de la ecuación (6.23) a los datos  $K^F$  de la tabla 6.2 en función del número de carbonos alquílicos de los surfactantes iónicos  $NC$ :  $K^e = -(144 \pm 30) \text{ mM}^{-1} + (31 \pm 2) \text{ mM}^{-1} \cdot NC$

En el caso de los surfactantes neutros, la obtención de un modelo que describa la correlación entre la constante de equilibrio y la estructura del surfactante es ligeramente más complicada. Ahora

## 6.5 Discusión

no tenemos solamente una cadena principal sino que tenemos otra cadena secundaria que como ya hemos indicado presenta un comportamiento contrario al efecto que ejerce en el valor de la constante el número de elementos que componen la cadena. La correlación entre la constante y la longitud de las dos cadenas, alquílica y alquil-éter, requiere la adición de un factor a mayores que denominaremos  $fc$ . Este factor da idea de cuánto compensa la adición de un carbono en la cadena lateral el efecto de la cadena principal. Añadiendo estas modificaciones, se obtiene la siguiente expresión:

$$K^e = K_0 + b \cdot (NC - NE \cdot fc) \quad (6.24)$$

Siendo  $K_0$  otra vez una constante de “amortiguamiento” sin significado físico,  $b$  la variación de la constante de equilibrio con el número de carbonos,  $NC$  el número de carbonos alquílicos,  $NE$  el número de carbonos alquil-éter y  $fc$  el factor de compensación de los carbonos alquil-éter. Indicar que el número de carbonos alquil éter  $NE$  se indica cómo numero de “pares de carbonos”. La explicación es que cuando se habla de carbonos en la cadena lateral con carácter alquil éter se denomina como  $E_x$  siendo  $x$  pares de carbonos. Se puede observar por ejemplo en C12E7 donde hay  $2 \times 7 = 14$  carbonos en la cadena lateral. Para el C12E7 tendríamos entonces  $NC = 12$  y  $NE = 7$ .

Para obtener los valores de los parámetros de la ecuación (6.24) realizamos ajustes lineales a los datos de  $K^F$  de la tabla 6.2, representado en la siguiente Figura 6.36. Los resultados dependen ligeramente del procedimiento del ajuste y como se tienen en cuenta las incertidumbres de los  $K$ . El resultado del ajuste directo de la ecuación (6.24) con dos variables independientes ( $NC$  y  $NE$ ) es  $K_0 = -365 \pm 243 \text{ mM}^{-1}$ ,  $b = 226 \pm 17 \text{ mM}^{-1}$ ,  $fc = 0.36 \pm 0.04$  ( $r^2 = 0.996$ ). El valor de  $K_0$  es poco definido debido a la fuerte extrapolación hacia  $NC = NE = 0$ . Sin afectar el resultado de la estimación de forma significativa podemos fijar  $K_0$  al valor  $K_0 = -144 \text{ mM}^{-1}$  obtenido para los surfactantes iónicos:  $K_0 = -144 \text{ mM}^{-1}$ ,  $b = 212 \pm 9 \text{ mM}^{-1}$ ,  $fc = 0.40 \pm 0.03$  ( $r^2 = 0.996$ ).

Debido a la peculiaridad de la estructura del TX-100 (presencia de un grupo aromático) no se puede incluir en esta estimación de su constante de equilibrio.

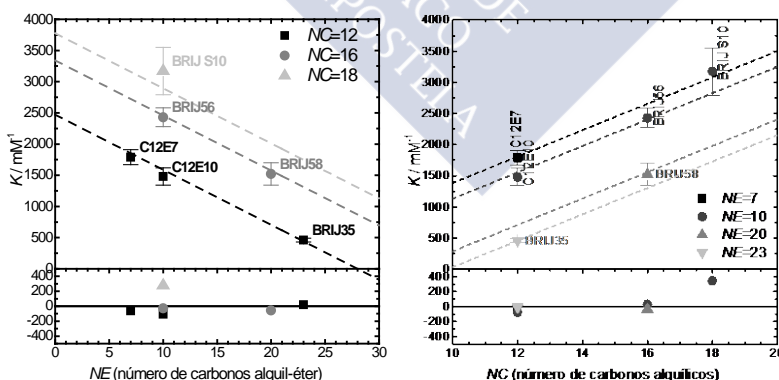


Figura 6.36 Ajuste lineal de las constantes  $K^F$  con la expresión (6.24). Izquierda representación frente al número de carbonos alquiléter. A la derecha representación frente al número de carbonos alquílicos.

## Capítulo 6 Determinación de la cmc usando pireno como sonda fluorescente

Una vez obtenido un modelo que permite estimar la constante de equilibrio mediante la estructura del monómero de surfactante deberemos comprobar la fiabilidad de la determinación. En la tabla 6.6 compararemos los valores de la constante de equilibrio obtenida mediante las expresiones (6.23) y (6.24). Podemos observar que las constantes estimadas y las constantes obtenidas del ajuste de las intensidades absolutas presentan muy buena concordancia.

Tabla 6.6 Comparación entre la estimación de la constante de equilibrio y el valor determinado mediante el ajuste de intensidades absolutas.

Tabla 6.6		
Surfactante	$K^e / \text{mM}^{-1}$	$K^f / \text{mM}^{-1}$
Surfactantes neutros		
TX100	-	3300±200
BRIJ58	1600±90	1520±180
BRIJ56	2460±60	2430±150
BRIJ35	450±90	460±30
BRIJ S10	2900±70	3170±380
C12E7	1860±40	1790±120
C12E10	1600±50	1480±140
Surfactantes iónicos		
CTAB	360±30	350±30
DTAB	230±30	230±40
SDS	230±30	230±20
STS	290±30	285±10
FAES	230±30	200±50
LAS	230±30	220±10

En la tabla 6.7 describimos finalmente los resultados de la  $\text{cmc}^{\text{SRe}}$  que se define como la  $\text{cmc}$  obtenida del ajuste de la relación de intensidades donde se ha fijado el valor de la constante de equilibrio en el valor estimado mediante la expresión (6.23) y (6.24) dado en la tabla 6.6. La función de ajuste es APNModel\_PyreneFluorRatioMonomers.fdf

## 6.5 Discusión

Tabla 6.7 Resultados de los ajustes obtenidos utilizando el modelo APN para la relación de intensidades de fluorescencia. El valor de la constante de equilibrio es estimado mediante las expresiones (6.23) y (6.24). El valor de  $r$  es el obtenido en el ajuste de las relaciones de intensidad de fluorescencia usando la expresión APNModel\_PyreneFluorRatioMonomers.fdf. El valor de  $Kq$  se obtiene de los análisis utilizando la intensidad absoluta de emisión de fluorescencia: Función APNModel\_PyreneFluorIntensity para 2 longitudes de onda (372nm, 384nm): se describe en la tabla 6.2. Número de agregación utilizado de la tabla 6.1.  $cD0$  (concentración de pireno) fijada proveniente de la descripción de los resultados de la sección 6.3. El valor de la constante de formación de excímero  $K_e$  se fija en uno para tener en cuenta una pequeña contribución de excímero. El valor de  $q_{bmf1}$  fijado es el obtenido mediante el ajuste con APNModel\_PyreneFluorIntensity dado en la tabla 6.2.

Tabla 6.7							
Surfactante	$cmc^{SRe}/mM$	$r^{SR}/mM$	$K^e/mM^{-1}$	$Kq/mM^{-1}$	$q_{bmfL(1)}$	$q_{bmfL(2)}$	$q_{bmf1}$
Surfactantes Neutros							
TX100*	0.24±0.01	(0.09)	(3300)	(15.81)	0.48±0.01	0.72±0.01	(0.80)
BRIJ58	0.05±0.01	(0.15)	(1596)	(3.8)	0.74±0.01	0.79±0.01	(1.27)
BRIJ56	0.05±0.04	0.63±0.15	(2464)	(0)	0.71±0.01	0.87±0.01	(2.34)
BRIJ35	0.10±0.01	0.82±0.10	(468)	(11.87)	0.46±0.01	0.74±0.01	(3.00)
BRIJ S10	0.02±0.01	0.73±0.19	(2898)	(0)	0.59±0.01	0.92±0.01	(5.06)
C12E7	0.14±0.05	0.69±0.30	(1856)	(16.86)	0.65±0.01	0.85±0.01	(1.25)
C12E10	0.10±0.05	0.51±0.13	(1596)	(0)	0.63±0.01	0.83±0.01	(5.21)
Surfactantes iónicos							
CTAB	1.00±0.01	0.07±0.01	(356)	(0)	0.48±0.01	0.74±0.01	(3.72)
DTAB	18.1±0.2	0.14±0.01	(232)	(0)	0.46±0.01	0.70±0.01	(6.18)
SDS	8.10±0.30	0.10±0.01	(232)	(0.67)	0.47±0.01	0.75±0.01	(6.75)
STS	2.2±0.1	0.15±0.02	(294)	(0)	0.51±0.01	0.82±0.01	(8.51)
FAES	0.70±0.05	0.10±0.05	(232)	(1.33)	0.70±0.03	0.82±0.01	(4.7)
LAS	0.94±0.11	0.22±0.07	(232)	(2.24)	0.58±0.02	0.83±0.01	(2.24)

\*El valor utilizado para el TX100 no ha sido estimado por lo que se utiliza el valor proporcionado por la intensidad de fluorescencia absoluta usando la expresión APNModel\_PyreneFluorIntensity. El dato proviene de la tabla 6.2.

Podemos indicar entonces que el procedimiento para obtener la  $cmc$  donde se utiliza la relación de intensidades de emisión de fluorescencia del pireno utilizando la constante de equilibrio estimadas proporciona valores de la  $cmc$  para los surfactantes estudiados coherentes con los demás datos.

Hemos obtenido un procedimiento para determinar la  $cmc$  para surfactantes iónicos o neutros mediante un procedimiento sencillo y robusto. El procedimiento consta de las siguientes partes:

- Definimos la estructura de nuestro surfactante: número de carbonos alquílicos y alquileter. Además definimos que tipo de surfactante es: iónico o neutro.
- Utilizamos la expresión adecuada para estimar la  $cmc$ : (6.23) ó (6.24).

- Utilizamos los espectros o las intensidades en los picos I y III.
- Ajustamos la relación de las intensidades obtenidas en el apartado anterior.
- Usamos la expresión APNModel\_PyreneFluorRatioMonomers.fdf para ajustar los resultados.
- Obtenemos el valor de la *cmc* y *r*. El valor del número de agregación se obtiene bibliográficamente. El valor de la concentración del pireno se puede obtener estimada (orden de magnitud). No es necesario el valor exacto.

## 6.6 Conclusiones

En este capítulo hemos descrito un procedimiento para determinar la *cmc* a partir de la relación de intensidades de fluorescencia de pireno como sonda. Hemos podido determinar mediante el modelo APN la *cmc* para diferentes surfactantes independientemente de su carga o de sus propiedades. Para ello proponemos un modelo para estimar la constante de equilibrio de reparto del pireno para diferentes surfactantes una vez que conocemos su estructura. Usamos dos modelos distintos para cada tipo de surfactante: iónicos y neutros. Los primeros compuestos de una sola cadena linear presentan propiedades de inclusión distintas a los segundos que presentan cadenas laterales que se entrecruzan dificultando la entrada y salida de un fluoróforo (con la determinación del factor *fc* podemos indicar las diferencias entre los surfactantes que tengan o no esa cadena). Finalmente hemos comprobado la validez del método que podrá ser utilizado para el diseño de un pequeño programa que automatice el procedimiento (como entrada las intensidades de emisión de fluorescencia para una concentración dada, la estructura del surfactante, número de agregación del mismo y concentración de pireno, y obtendremos como salida el valor de la *cmc* y el parámetro del ancho del intervalo de transición *r*).

También hemos puesto de manifiesto las limitaciones del método de la determinación de la *cmc* de la relación de intensidades *SR*. Surfactantes de elevada polidispersidad muestra curvas *SR* atípicas que no pueden ser explicados con el modelo APN desarrollado para surfactantes monodispersos.

En un siguiente paso se podrá analizar como el modelo se comporta con mezclas de surfactantes o en presencia de sales y el resultante desplazamiento de la *cmc*.



## Capítulo 7. Conclusiones globales

En el desarrollo de esta tesis doctoral se han estudiado diversos sistemas supramoleculares formados por la agregación de tensioactivos mediante técnicas directas y el uso de distintos huéspedes fluorescentes con el fin de analizar el proceso de formación de las estructuras micelares y su interacción con moléculas de distinta hidrofobicidad.

Para este fin se ha desarrollado un modelo de concentraciones de tensioactivos cerca de la *cmc*, denominado *modelo APN*. Este modelo permite calcular la concentración de cada especie en función de la concentración total de surfactante. Permite obtener de técnicas como la conductividad eléctrica o la espectroscopia de fluorescencia valores precisos de los parámetros que los caracterizan. A pesar de ser un modelo empírico, deducido de observaciones generalmente aceptadas, y no de principios físico-químicos fundamentales, el modelo tiene un valor importante normalizador su gran valor reside en que permite deducir ecuaciones para una multitud de propiedades de las disoluciones de tensioactivos de una forma objetiva y universal. De este modo sustituye a una variedad de métodos aislados propuestos para el análisis de una u otra técnica, en general sin coherencia entre ellos. El modelo representa una definición empírica de la *cmc* que se puede aplicar en una multitud de técnicas de forma coherente. El modelo también evita la discontinuidad en la *cmc*, y describe la coexistencia de tensioactivos monoméricos y de micelas en el intervalo de transición alrededor de la *cmc* con un solo nuevo parámetro, el *ancho relativo del intervalo de transición r*.

El modelo se ha corroborado con resultados obtenidos mediante técnicas de fluorescencia y conductividad realizadas en nuestro grupo y se han comparado los resultados con datos obtenidos con otras técnicas obtenidas de la bibliografía. Se ha comprobado que el modelo representa los datos experimentales con muy alta precisión y que permite determinar la *cmc* de forma consistente. Los resultados presentan una muy buena concordancia con los obtenidos de la bibliografía. Estos resultados han sido publicados en la revista *Journal of Colloid and Interface Science*, 370(1), 102–10, 2012.

Una vez conocido la validez del modelo se comprobó su utilidad en la descripción del equilibrio de reparto de colorantes en disoluciones de micelas estudiados mediante la intensidad de emisión de fluorescencia y la determinación del coeficiente de difusión mediante la espectroscopia de correlación de fluorescencia. Se discute la importancia de tener en cuenta la constante de reparto para obtener valores de la *cmc* coherentes con otras técnicas. Los resultados obtenidos son excelentes obteniendo buena determinación de la *cmc* en ambas técnicas además de la constante de

equilibrio o de la constante de difusión de todas las especies estudiadas. Este trabajo llevó a una publicación en *Soft Matter*, 9(45), 10779, 2013.

En el siguiente paso se decidió avanzar un poco más, tratando el pireno, un colorante con elevada complejidad dadas sus características fotofísicas especiales. El número de procesos que tienen lugar aumentan además con el número de especies presentes. Se ha podido describir la formación de excímero, el quenching del pireno por parte del tensioactivo, el equilibrio de reparto del pireno entre la fase acuosa y las micelas, tanto en medidas de estado estacionario como con resolución temporal. Se han obtenido excelentes ajustes con parámetros que concuerdan con los valores esperados. La descripción detallada se ha publicado en un artículo de revisión en la revista de alto impacto *Advances in Colloid and Interface Science*, 215, 1–12, 2015.

Uno de los usos del pireno más habitual es utilizarlo como colorante para el estudio de la *cmc* mediante la relación de intensidades en dos picos distintos de su espectro de fluorescencia. Se ha desarrollado un método para analizar esta relación de intensidades de forma objetiva y se ha comprobado su validez con tensioactivos neutros e iónicos. Hemos discutido la importancia de la dependencia entre la *cmc* y la constante de equilibrio y como resolverla. Se ha desarrollado un modelo que describe como la constante de equilibrio parece estar afectada por la estructura de las micelas y que permitan estimar la constante de equilibrio para determinados clases de micelas. Se ha puesto de manifiesto la influencia de la polidispersidad de algunos surfactantes comerciales que aún no se ha incluido en el modelo APN.



## Bibliografía

La lista bibliográfica que se da a continuación corresponde a las referencias dadas en los capítulos generales (introducción y metodología) y Capítulo 6 correspondientes al trabajo aún no publicado. Las referencias de cada uno de los artículos publicados se listan al final del capítulo correspondiente.

Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J. y Ruiz, C.C. 2003, "On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method", *Journal of colloid and interface science*, vol. 258, no. 1, pp. 116-122.

Almgren, M., Grieser, F. y Thomas, J.K. 1979, "Dynamic and static aspects of solubilization of neutral arenes in ionic micellar solutions", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 101, no. 2, pp. 279-291.

Al-Soufi, W., Piñeiro, L. y Novo, M. 2012, "A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: Application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tension data", *Journal of colloid and interface science*, vol. 370, no. 1, pp. 102-110.

Ananthapadmanabhan, K.P., Goddard, E.D., Turro, N.J. y Kuo, P.L. 1985, "Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration", *Langmuir*, vol. 1, no. 3, pp. 352-355.

Anthony, O. y Zana, R. 1994, "Fluorescence investigation of the binding of pyrene to hydrophobic microdomains in aqueous solutions of polysoaps", *Macromolecules*, vol. 27, no. 14, pp. 3885-3891.

Athawale, V.D. 2007, *Experimental Physical Chemistry*, New Age International.

Bales, B.L. y Zana, R. 2002, "Characterization of micelles of quaternary ammonium surfactants as reaction media I: dodecyltrimethylammonium bromide and chloride", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 8, pp. 1926-1939.

Bilia, A.R., Scalise, L., Bergonzi, M.C. y Vincieri, F. 2008, "Effect of Surfactants and Solutes (Glucose and NaCl) on Solubility of Kavain—A Technical Note", *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 2, pp. 444-448.

Blankschtein, D., Shiloach, A. y Zoeller, N. 1997, "Thermodynamic theories of micellar and vesicular systems", *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 2, no. 3, pp. 294-300.

Bordello, J., Novo, M., y Al Soufi, W. 2010, "Exchange-Dynamics of a Neutral Hydrophobic Dye in Micellar Solutions Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Journal of colloid and interface science*, vol. 345, no. 1, pp. 369-376.

Brown, D.G. y Al Nuaimi, K.S. 2005, "Nonionic surfactant sorption onto the bacterial cell surface: a multi-interaction isotherm", *Langmuir*, vol. 21, no. 24, pp. 11368-11372.

## Bibliografía

- Caetano, W. y Tabak, M. 2000, "Interaction of Chlorpromazine and Trifluoperazine with Anionic Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Micelles: Electronic Absorption and Fluorescence Studies", *Journal of colloid and interface science*, vol. 225, no. 1, pp. 69-81.
- Capek, I. 2002, "Fate of excited probes in micellar systems", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 97, no. 1, pp. 91-149.
- De Schryver, F., Croonen, Y., Geladé, E., Van der Auweraer, M., Dederen, J., Roelants, E. y Boens, N. 1984, "Fluorescence Quenching in Micellar Systems" en *Surfactants in Solution* Springer, , pp. 663-672.
- Dorrance, R. y Hunter, T. 1972, "Absorption and emission studies of solubilization in micelles. Part 1.—Pyrene in long-chain cationic micelles", *J.Chem.Soc., Faraday Trans.1*, vol. 68, pp. 1312-1321.
- Förster, T. y Selinger, B. 1964, "Der Konzentrationsumschlag der Fluoreszenz aromatischer Kohlenwasserstoffe in mizell-kolloidaler Lösung", *Zeitschrift Naturforschung Teil A*, vol. 19, pp. 38.
- Freire, S., Bordello, J., Granadero, D., Al Soufi, W. y Novo, M. 2010, "Role of Electrostatic and Hydrophobic Forces in the Interaction of Ionic Dyes with Charged Micelles", *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 9, pp. 687-696.
- Frindi, M., Michels, B. y Zana, R. 1992, "Ultrasonic absorption studies of surfactant exchange between micelles and bulk phase in aqueous micellar solutions of nonionic surfactants with a short alkyl chain. 3. Surfactants with a sugar head group", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 96, no. 20, pp. 8137-8141.
- Gezae Daful, A., Baulin, V., Avalos, J. y Mackie, A. 2011, "Accurate Critical Micelle Concentrations from a Microscopic Surfactant Model", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 13, pp. 3434-3443.
- Glushko, V., Thaler, M.S. y Karp, C.D. 1981, "Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions: behavior in model solvents", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 210, no. 1, pp. 33-42.
- Goon, P., Manohar, C. y Kumar, V. 1997, "Determination of critical micelle concentration of anionic surfactants: comparison of internal and external fluorescent probes", *Journal of colloid and interface science*, vol. 189, no. 1, pp. 177-180.
- Graetzel, M. y Thomas, J. 1976, "The application of fluorescence techniques to the study of micellar systems", *Modern fluorescence spectroscopy*, vol. 2, no. LPI-CHAPTER-1976-014, pp. 169-216.
- Hadgiivanova, R. y Diamant, H. 2007, "Premicellar aggregation of amphiphilic molecules", *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 30, pp. 8854-8859.
- Hauser, M. y Klein, U. 1973, "Fluorescence and excimer kinetics in micellar detergent solutions", *Acta Physica Et Chemica*, vol. 19, no. 4, pp. 363-373.
- Hiemenz, P.C. y Rajagopalan, R. 1997, *Principles of colloid and surface chemistry*, Marcel Dekker, New York.
- Holmberg, K. 2001, *Handbook of applied surface & colloid chemistry*, John Wiley & Sons Inc.
- Hu, C., Li, R., Yang, H. y Wang, J. 2011, "Properties of binary surfactant systems of nonionic surfactants C 12 E 10, C 12 E 23, and C 12 E 42 with a cationic gemini surfactant in aqueous solutions", *Journal of colloid and interface science*, vol. 356, no. 2, pp. 605-613.

- Infelta, P.P. y Grätzel, M. 1979, "Statistics of solubilize distribution and its application to pyrene fluorescence in micellar systems. A concise kinetic model", *The Journal of chemical physics*, vol. 70, no. 1, pp. 179-186.
- Israelachvili, J.N. 2010, *Intermolecular and surface forces*, 3rd edn, Academic Press, New York.
- Jeong, J., Yang, S. y Kim, J. 2002, "Micellar aggregation and structure of dodecyl heptaethoxylates (C12E7) with different oxyethylene distributions in aqueous media", *Langmuir*, vol. 18, no. 23, pp. 8749-8755.
- Kalyanasundaram, K. y Thomas, J. 1977, "Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 99, no. 7, pp. 2039-2044.
- Kalyanasundaram, K. 1987, *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, Academic Press, New York.
- Kang, K. y Lim, K. 2011, "A SANS study for structural transition of micelles of cationic octadecyl trimethyl ammonium chloride and anionic ammonium dodecyl sulfate surfactants in aqueous solutions", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 391, no. 1, pp. 69-79.
- Kapusta, P. 2010, "Absolute diffusion coefficients: compilation of reference data for FCS calibration", *Application note*, .
- Karpovich, D.S. y Blanchard, G.J. 1995, "Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the py polarity scale", *The Journal of physical chemistry*, vol. 99, no. 12, pp. 3951-3958.
- Lindman, B. y Wennerstrom, H. 1980, "Miceles. Amphiphile aggregation in aqueous solution", *Topics in current chemistry*, vol. 87, pp. 1-83.
- Malliaris, A. 1988, "Fluorescence probing in aqueous micellar systems: an overview", *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 7, no. 2, pp. 95-121.
- Matsuki, H., Aratono, M., Kaneshina, S. y Motomura, K. 1997, "Extremely strong interaction of sodium decyl sulfate and decyltrimethylammonium bromide in molecular aggregates", *Journal of colloid and interface science*, vol. 191, no. 1, pp. 120-130.
- McKelvey, C. y Kaler, E. 2002, "Characterization of nanostructured hollow polymer spheres with small-angle neutron scattering (SANS)", *Journal of colloid and interface science*, vol. 245, no. 1, pp. 68-74.
- Mitsionis, A.I. y Vaimakis, T.C. 2012, "Estimation of AOT and SDS CMC in a methanol using conductometry, viscometry and pyrene fluorescence spectroscopy methods", *Chemical Physics Letters*, .
- Mohr, A., Talbiersky, P., Korth, H., Sustmann, R., Boese, R., Bläser, D. y Rehage, H. 2007, "A new pyrene-based fluorescent probe for the determination of critical micelle concentrations", *The journal of physical chemistry.B*, vol. 111, no. 45, pp. 12985-92.
- Moore, S.A., Harris, A.A. y Palepu, R.M. 2007, "Spectroscopic investigations on the binding of ammonium salt of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid with non-ionic surfactant micelles in aqueous media", *Fluid Phase Equilibria*, vol. 251, no. 2, pp. 110-113.
- Mukerjee, P. y Mysels, K.J. 1971, *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*, NIST National Institute of Standards and Technology, Washington D.C. USA.

## Bibliografía

- Patrick, H.N., Warr, G.G., Manne, S. y Aksay, I.A. 1997, "Self-assembly structures of nonionic surfactants at graphite/solution interfaces", *Langmuir*, vol. 13, no. 16, pp. 4349-4356.
- Piñeiro, L., Freire, S., Bordello, J., Novo, M. y Al-Soufi, W. 2013, "Dye exchange in micellar solutions. Quantitative analysis of bulk and single molecule fluorescence titrations", *Soft Matter*, vol. 9, no. 45, pp. 10779-10790.
- Piñeiro, L., Novo, M. y Al-Soufi, W. 2015, "Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 215, no. 0, pp. 1-12.
- Ranganathan, R., Tran, L. y Bales, B.L. 2000, "Surfactant-and salt-induced growth of normal sodium alkyl sulfate micelles well above their critical micelle concentrations", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, no. 10, pp. 2260-2264.
- Ray, P., Bhattacharya, S.C. y Moulik, S. 1998, "Role of Brij micelles in the quenching of fluorescence of Safranin T by inorganic ions", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 116, no. 1, pp. 85-89.
- Regev, O. y Zana, R. 1999, "Aggregation behavior of Tyloxapol, a nonionic surfactant oligomer, in aqueous solution", *Journal of colloid and interface science*, vol. 210, no. 1, pp. 8-17.
- Rharbi, Y. y Winnik, M.A. 2001, "Solute Exchange Between Surfactant Micelles by Micelle Fragmentation and Fusion", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 89, pp. 25-46.
- Ribeiro, M.E., de Moura, C.L., Vieira, M.G., Gramosa, N.V., Chaibundit, C., de Mattos, M.C., Attwood, D., Yeates, S.G., Nixon, S.K. y Ricardo, N.M. 2012, "Solubilisation capacity of Brij surfactants", *International journal of pharmaceutics*, vol. 436, no. 1, pp. 631-635.
- Sammalkorpi, M., Sanders, S., Panagiotopoulos, A., Karttunen, M. y Haataja, M. 2011, "Simulations of Micellization of Sodium Hexyl Sulfate", *The Journal of Physical Chemistry B*, .
- Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V. y Bernhard, F. 2007, "Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies", *Methods*, vol. 41, no. 4, pp. 355-369.
- Selinger, B. y Watkins, A. 1982, "Pyrene excimer kinetics in micelles of non-ionic surfactants", *Journal of Photochemistry*, vol. 20, no. 4, pp. 319-325.
- Singer, L.A. 1982, "Fluorescence Probes of Micellar Systems—An Overview" en *Solution Behavior of surfactants* Springer, , pp. 73-112.
- Singh, H. y Hinze, W.L. 1982, "Micellar enhanced spectrofluorometric methods: application to the determination of pyrene", *Analytical Letters*, vol. 15, pp. 221-243.
- Stephenson, B.C., Beers, K. y Blankschtein, D. 2006, "Complementary use of simulations and molecular-thermodynamic theory to model micellization", *Langmuir*, vol. 22, no. 4, pp. 1500-1513.
- Sulthana, S.B., Rao, P., Bhat, S. y Rakshit, A. 1998, "Interfacial and thermodynamic properties of SDBS-C12E10 mixed micelles in aqueous media: effect of additives", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, no. 48, pp. 9653-9660.
- Tadros, T.F. 2005, *Applied surfactants: principles and applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Topel, O., Cakir, B.A., Budama, L. y Hoda, N. 2013, "Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering", *Journal of Molecular Liquids*, vol. 177, pp. 40-43.

- Tóth, G. y Madarász, Á. 2006, "Structure of BRIJ-35 nonionic surfactant in water: a reverse Monte Carlo study", *Langmuir*, vol. 22, no. 2, pp. 590-597.
- Turro, N.J. y Yekta, A. 1978, "Luminescent probes for detergent solutions. A simple procedure for determination of the mean aggregation number of micelles", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 100, no. 18, pp. 5951-5952.
- Verma, A. y Purkait, M.K. 2010, "Synthesis, characterization and physical properties studies of an anionic surfactant", *Indian J Chem Technol*, vol. 17, pp. 233-237.
- Wong, J., Duchscherer, T., Pietraru, G. y Cramb, D. 1999, "Novel fluorescence spectral deconvolution method for determination of critical micelle concentrations using the fluorescence probe PRODAN", *Langmuir*, vol. 15, no. 19, pp. 6181-6186.
- Zana, R., Levy, H. y Kwetkat, K. 1998, "Mixed micellization of dimeric (gemini) surfactants and conventional surfactants. I. Mixtures of an anionic dimeric surfactant and of the nonionic surfactants C 12 E 5 and C 12 E 8", *Journal of colloid and interface science*, vol. 197, no. 2, pp. 370-376.
- Zana, R. 2005, *Dynamics of Surfactant Self-assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases*, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton.





# Resúmenes

## Resumen

En el desarrollo de esta tesis doctoral se han estudiado diversos sistemas supramoleculares formados por la agregación de tensioactivos mediante el uso de distintos huéspedes fluorescentes con el fin de analizar el proceso de formación de las estructuras micelares y su interacción con moléculas de distinta hidrofobicidad.

Se ha propuesto un modelo, denominado modelo *APN*, para describir la formación de las micelas que permite realizar un análisis cuantitativo de cada una de las especies que son responsables de la formación de las mismas. Este modelo permite calcular la concentración de cada especie en función de la concentración total de surfactante y obtener el valor de la *cmc* para cualquier tensioactivo independientemente de la técnica empleada. La *cmc* es uno de los parámetros necesarios para la utilización de los surfactantes en sus diversas aplicaciones. Las expresiones utilizadas para estudiar la formación de las micelas mediante el modelo *APN* son precisas y sencillas, y evitan la discontinuidad en la *cmc* que presentan los modelos tradicionales; para cada concentración de surfactante todas las especies, monómeros y agregados, coexisten. Para dar cuenta del paso de estado monomérico a micelar se define un parámetro de transición *r*, cuyo valor refleja la anchura de dicho intervalo de transición y da información acerca de la estructura y de las fuerzas de interacción de las micelas.

La validez del modelo para diversos tensioactivos con diferentes características estructurales se ha demostrado tanto con datos obtenidos en nuestro grupo mediante técnicas de fluorescencia y de conductividad eléctrica, como con datos de la bibliografía medidos con otras técnicas. Aprovechando las posibilidades que ofrece el modelo *APN* estudiamos el comportamiento del pireno, que es el fluoróforo más utilizado en la caracterización de sistemas micelares, pero que presenta una elevada complejidad dadas sus características fotofísicas especiales. Con el modelo *APN* es posible explicar todos los procesos implicados conjuntamente, como son la formación de excímero, el quenching del pireno por parte del tensioactivo o el equilibrio de partición entre el pireno y las micelas. Hemos obtenido excelentes ajustes de los datos de fluorescencia de estado estacionario que hemos corroborado mediante medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo. La utilización de la relación de intensidades en 2 picos del espectro de emisión del pireno es un procedimiento habitual para la caracterización de los sistemas micelares. Sin embargo, nuestro trabajo demuestra que éste es un método poco preciso y que el valor obtenido para la *cmc* está influido la elevada correlación entre los parámetros de ajuste, especialmente entre la *cmc* y la constante de equilibrio de interacción entre el pireno y las micelas. No obstante, los estudios realizados con diversos tipos de surfactantes nos han permitido establecer tendencias generales de cómo la constante de equilibrio cambia dependiendo de la estructura de los tensioactivos que forman las micelas, avanzando hacia una mejor comprensión de la interacción de moléculas hidrofóbicas con las micelas de tensioactivos.

## Resumo

No desenvolvemento desta tese estudamos varios sistemas supramoleculares formados pola agregación de surfactantes usando diferentes hospedes fluorescentes, a fin de analizar o proceso de formación de estruturas micelares e a súa interacción con outras moléculas hidrofóbicas.

Propuxemos un modelo chamado modelo *APN* para describir a formación de micelas, permitindo una análise cuantitativa de cada unha das especies que son responsables da formación das mesmas. Este modelo calcula a concentración de cada unha das especies, dependendo da concentración total de axente tensioactivo e obter o valor da *cmc* para calquera axente tensioactivo, independentemente da técnica utilizada. A *cmc* é un dos parámetros necesarios para a utilización de axentes tensioactivos nas súas diversas aplicacións. As expresións utilizadas para estudar a formación de micelas polo modelo *APN* son precisas e simples, e evitan a descontinuidade na *cmc* que presentan os modelos tradicionais; para cada concentración de surfactante totalas especies, monómeros e agregados, coexisten. Para ter en conta o paso dunha transición de estado micelar monomérica defínese un parámetro de transición  $r$ , un parámetro cuxo valor reflicte o ancho do rango de transición e dá información sobre a estrutura e as forzas de interacción das micelas.

A validez do modelo para varios axentes tensioactivos con diferentes características estruturais foi demostrada tanto cos datos obtidos no noso grupo utilizando técnicas de fluorescencia e de condutividade eléctrica, como con datos da bibliografía medidos por outras técnicas. Aproveitándose das posibilidades que ofrece o modelo *APN* estudamos o comportamento do pireno, que é o fluoróforo máis utilizado na caracterización dos sistemas micelares, pero ten unha alta complexidade debido ás súas propiedades fotofísicas especiais. Co modelo *APN* pódese explicar todos os procesos implicados en conxunto, como a formación excímero, o quenching do pireno por parte do surfactante ou o equilibrio de partición entre pireno e micelas. Obtivemos excelentes axustes de datos de fluorescencia en estado estacionario que se corroboraron con medidas de fluorescencia resoltas no tempo. A utilización da relación de intensidades en dous picos do espectro de emisión do pireno é un procedemento habitual para a caracterización de sistemas micelares. Con todo, o noso traballo demostra que este é un método impreciso e o valor obtido para o *cmc* está influenciada pola elevada correlación entre os parámetros de axuste, especialmente entre a *cmc* e a constante de equilibrio de interacción entre o pireno e as micelas. Sen embargo, os estudos con varios tipos de axentes tensioactivos permitiron establecer tendencias xerais de como as constantes de equilibrio cambian dependendo da estrutura dos axentes tensioactivos que forman micelas, movendose no sentido de unha mellor comprensión da interacción de moléculas hidrófobas con micelas de tensioactivos.

## Summary

In the development of this thesis, we studied several supramolecular systems formed by the aggregation of surfactants with different fluorescent guests in order to analyse the process of formation of micellar structures and their interaction with other hydrophobic molecules.

We proposed a model called *APN model* to describe the formation of micelles giving a quantitative analysis of each of the species that are responsible for its formation. This model calculates the concentration of each species depending on the total concentration of surfactant and it obtains the value of the *cmc* for any surfactant independent on which technique is used. The *cmc* is one of the parameters necessary for the use of surfactants in its various applications. The expressions used to study the formation of micelles by the *APN* model are accurate and simple, and they avoid the discontinuity of the *cmc* employed in traditional models; for each concentration of surfactant, all species, monomers and aggregates coexist. In order to take into account the transition from the monomeric to the micellar state, *r* is defined as a parameter whose value reflects the width of the transition interval and it gives information about the structure and interaction forces of micelles.

The validity of the model for several surfactants with different structural characteristics has been demonstrated with data obtained in our group using fluorescence and electrical conductivity techniques, and with literature data obtained by other techniques. Taking advantage of the possibilities offered by the *APN* model we can study the behaviour of pyrene, which is the fluorophore most widely used in the characterization of micellar systems, but has a high complexity which is due to its special photophysical properties. With the *APN* model, we can explain all the processes involved such as excimer formation, the quenching of pyrene by the surfactant or the equilibrium of the partition of pyrene between water and micelles. We obtained excellent data fittings in steady state fluorescence and which were corroborated with measurements of time-resolved fluorescence. The ratio of intensities at two peaks of the emission spectrum of pyrene is a usual method for the characterization of micellar systems. Our work shows that this method is inaccurate and that the value obtained for the *cmc* is influenced by the high correlation between the fit parameters, especially between the *cmc* and the equilibrium constant which defines the interaction between the pyrene and micelles. However, our studies with several surfactants allowed us to determine general correlations which define how the equilibrium constant changes depending on the structure of the surfactants which form micelles, and they direct us towards a better understanding of the interaction of hydrophobic molecules with micelles surfactant.



## Artículos de investigación

Esta tesis doctoral se presenta como un compendio de artículos de investigación, que han sido indicados durante el desarrollo de la misma. A continuación se exponen las publicaciones incluidas en este trabajo mostrándolas según su formato original, que los capítulos anteriores se modificó para su mejor visualización.

### **ARTÍCULO 1**

Al-Soufi, W., **Piñeiro, L.**, Novo, M., & Soufi, W. Al. (2012). A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tension data. *Journal of Colloid and Interface Science*, 370(1), 102–10. doi:10.1016/j.jcis.2011.12.037, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.037>

### **ARTÍCULO 2**

**Piñeiro, L.**, Freire, S., Bordello, J., Novo, M., & Al-Soufi, W. (2013). Dye exchange in micellar solutions. Quantitative analysis of bulk and single molecule fluorescence titrations. *Soft Matter*, 9(45), 10779. doi:10.1039/c3sm52092g, <http://dx.doi.org/10.1039/c3sm52092g>

### **ARTÍCULO 3**

**Piñeiro, L.**, Novo, M., & Al-Soufi, W. (2015). Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 215, 1–12. doi:10.1016/j.cis.2014.10.010 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.010>