



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL EN CIENCIAS
Y TECNOLOGÍAS DE LA USC

Sonia
González Fernández

Tesis doctoral

*Caracterización fotofísica
de la sonda fluorescente
proflavina. Complejación
con macrociclos y procesos
de desactivación*

Santiago de Compostela, 2020





TESIS DE DOCTORADO

**CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA
DE LA SONDA FLUORESCENTE
PROFLAVINA. COMPLEJACIÓN
CON MACROCICLOS Y PROCESOS
DE DESACTIVACIÓN**

Sonia González Fernández

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS DE LA USC

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020





DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

Caracterización fotofísica de la sonda fluorescente proflavina.

Complejación con macrociclos y procesos de desactivación

Dña. Sonia González Fernández

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 28 de septiembre de 2020.

Fdo. Sonia González Fernández



AUTORIZACIÓN DEL TUTOR DE LA TESIS

**Caracterización fotofísica de la sonda fluorescente proflavina.
Complejación con macrociclos y procesos de desactivación**

D. Manuel Mosquera González

INFORMA:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Sonia González Fernández, bajo mi tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como tutor de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 28 de septiembre de 2020.

Fdo. Manuel Mosquera González



AUTORIZACIÓN DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

**Caracterización fotofísica de la sonda fluorescente proflavina.
Complejación con macrociclos y procesos de desactivación**

Dña. María del Carmen Ríos Rodríguez

Dña. María de la Flor Rodríguez Prieto

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Sonia González Fernández, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 28 de septiembre de 2020.

Fdo. María del Carmen Ríos Rodríguez

Fdo. María de la Flor Rodríguez Prieto



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada en el Grupo de Fotoquímica del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS) bajo la dirección de las profesoras María de la Flor Rodríguez Prieto y María del Carmen Ríos Rodríguez, a quienes quiero agradecer su gran dedicación y ayuda, pues me han apoyado y animado a seguir adelante en todo momento. También quiero agradecer al profesor Manuel Mosquera González su paciencia y toda su ayuda en el laboratorio, así como las innumerables horas frente al ordenador trabajando con SigmaPlot.

También gracias a mis compañeros de laboratorio (Sara, Jorge, Viky) que han hecho que todas las horas de laboratorio fuesen mucho más amenas, haciendo que el ambiente de trabajo fuese perfecto.

A todos mis amigos por darme ánimos y apoyo, en especial a Cris (mi hermana), que lleva quince años a mi lado, en los buenos y en los malos momentos, gracias por estar siempre ahí.

A Dani, que durante todos estos años me ha apoyado en todo momento, animándome y confiando en que podría terminar todo este trabajo, gracias por tu infinita paciencia y cariño.

Por último, quiero dar las gracias a mis padres, sin el apoyo de los cuales no podría haber llevado a cabo esta tesis. Quiero agradecerles toda su confianza y por creer en mí cuando ni yo misma lo hacía. Gracias por cada consejo que me han dado, por todo su apoyo y cariño. El hecho de haber llegado hasta aquí se lo debo a ellos.



A mis padres





GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Molécula aceptora de electrones
A*	Molécula aceptora de electrones en estado excitado
	Especie emisora A (referido al apartado 9.3)
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
B*	Especie emisora B (referido al apartado 9.3)
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
C*	Especie emisora C (referido al apartado 9.3)
COM	Complejo 1:1 de 4-sulfocalix[6]areno y proflavina (referido al apartado 8.1)
COM1	Complejo 1:1 de 4-sulfocalix[4]areno y proflavina (referido al apartado 8.2)
COM*	Complejo 1:1 de 4-sulfocalix[6]areno y proflavina en estado excitado (referido al apartado 8.1)
COM1*	Complejo 1:1 de 4-sulfocalix[4]areno y proflavina en estado excitado (referido al apartado 8.2)
COM2	Complejo 1:2 de dos moléculas de 4-sulfocalix[6]areno y una de proflavina (referido al apartado 8.1)
	Complejo 1:2 de dos moléculas de 4-sulfocalix[4]areno y una de proflavina (referido al apartado 8.2)
COM2*	Complejo 1:2 de dos moléculas de 4-sulfocalix[6]areno y una de proflavina en estado excitado (referido al apartado 8.1)
	Complejo 1:2 de dos moléculas de 4-sulfocalix[4]areno y una de proflavina en estado excitado (referido al apartado 8.2)
D	Molécula dadora de electrones
D*	Molécula dadora de electrones en estado excitado
(DA)*	Excíplejo entre dador D y aceptor A
DC	Especie dicatiónica de la proflavina
DFT	Teoría del funcional de la densidad (<i>density functional theory</i>)
DMA	Dimetilanilina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	1,3-Dimetiltiourea
E*	Excíplejo
EI	Energía de ionización
EtOH	Etanol

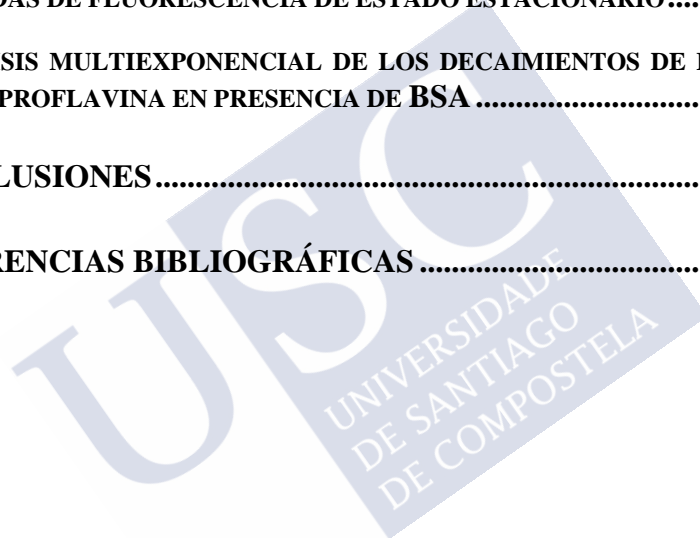
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HSA	Seroalbúmina humana (<i>human serum albumin</i>)
LUMO	Orbital molecular no ocupado de menor energía (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MCA	Analizador multicanal (<i>multichannel analyzer</i>)
MeOH	Metanol
MT	Metiltiourea
N	Forma neutra de la proflavina
N*	Forma neutra de la proflavina en estado excitado
P	Forma protonada en el N del anillo aromático de la proflavina
P*	Forma protonada de la proflavina en estado excitado
PCA	Análisis de componentes principales (<i>principal component analysis</i>)
PCGA	Análisis global de componentes principales (<i>principal component global analysis</i>)
PD	Especie protonada dimérica de la proflavina
PET	Transferencia electrónica fotoinducida (<i>photoinduced electron transfer</i>)
PF	Proflavina
Phe	Fenilalanina
PU	Complejo proflavina-tioureas en estado fundamental
Q	Desactivador o quencher
S/R	Señal/referencia
SCX4	4-Sulfocalix[4]areno
SCX6	4-Sulfocalix[6]areno
SS	Estado estacionario (<i>steady state</i>)
T	Tiourea
TAC	Convertidor tiempo-amplitud (<i>Time-to-amplitude converter</i>)
TCSPC	Recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo (<i>time-correlated single-photon counting</i>)
TMT	Tetrametiltiourea
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
U	Tioureas
UV-Vis	Ultravioleta-visible
X*	Especie emisora X (referido al apartado 9.3)

TABLA DE CONTENIDO

1.	RESÚMENES	1
1.1	CASTELLANO	1
1.2	GALLEGO	2
1.3	INGLÉS	3
2.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	5
3.	INFORME BIBLIOGRÁFICO	7
3.1	ASPECTOS GENERALES DE LA FLUORESCENCIA	7
3.2	TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA FOTOINDUCIDA	9
3.3	PROFLAVINA	11
3.4	CALIXARENOS.....	12
3.5	SEROALBÚMINA BOVINA (BSA)	13
4.	TÉCNICAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	15
4.1	MATERIALES.....	15
4.2	MEDIDAS DE ABSORCIÓN UV-VIS.....	15
4.3	ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA DE ESTADO ESTACIONARIO	16
4.4	MEDIDAS DE TIEMPOS DE VIDA DE FLUORESCENCIA.....	18
4.4.1	Técnica de recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo (TCSPC)	18
4.5	DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE FLUORESCENCIA.....	19
4.6	RELACIÓN ENTRE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y EXCITACIÓN.....	21
4.7	TRATAMIENTO DE DATOS	22
4.7.1	Análisis de componentes principales (PCA) y análisis global de componentes principales (PCGA).....	22
4.7.2	Determinación de tiempos de vida de fluorescencia. Método de deconvolución.	24
5.	CARACTERIZACIÓN DE LA PROFLAVINA: ESPECTROS DE ABSORCIÓN	27
5.1	SERIE DE ABSORCIÓN EN MEDIO ÁCIDO	27

5.2	SERIE DE ABSORCIÓN EN MEDIO BÁSICO	30
5.3	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROFLAVINA	33
5.3.1	Agua.....	33
5.3.2	Agua en medio básico.....	39
5.3.3	Etanol	43
5.3.4	Etanol en medio básico	46
5.4	ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA PROFLAVINA EN VARIOS DISOLVENTES ..	50
6.	CARACTERIZACIÓN DE LA PROFLAVINA: ESPECTROS DE FLUORESCENCIA	53
6.1	FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO EN DISTINTOS DISOLVENTES .	53
6.1.1	Agua.....	53
6.1.2	Etanol	54
6.1.3	Metanol.....	55
6.1.4	1-Propanol.....	55
6.1.5	Acetonitrilo	56
6.1.6	Dimetilsulfóxido.....	56
6.2	RENDIMIENTO CUÁNTICO DE FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA EN DISTINTOS DISOLVENTES	57
7.	DESACTIVACIÓN DE LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA POR DIFERENTES COMPUESTOS	59
7.1	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DIFERENTES ANIONES EN LA FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA	59
7.1.1	Espectros de emisión	59
7.1.2	Tiempos de vida de fluorescencia	64
7.1.3	Modelo de desactivación	71
7.2	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DIFERENTES UREAS Y TIUREAS EN LA FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA	84
7.2.1	Espectros de emisión	84
7.2.2	Tiempos de vida de fluorescencia	89
7.2.3	Modelo de desactivación	92
8.	COMPORTAMIENTO DE LA PROFLAVINA CON MACROCICLOS....	101
8.1	4-SULFOCALIX[6]ARENO (SCX6)	101

8.1.1	Serie de absorción	101
8.1.2	Serie de fluorescencia.....	105
8.1.3	Tiempos de vida de fluorescencia	112
8.2	4-SULFOCALIX[4]ARENO (SCX4)	117
8.2.1	Serie absorción	117
8.2.2	Serie de fluorescencia.....	120
8.2.3	Tiempos de vida de fluorescencia	126
9.	COMPORTAMIENTO DE LA PROFLAVINA EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA BSA	133
9.1	MEDIDAS DE ABSORCIÓN.....	133
9.2	MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DE ESTADO ESTACIONARIO.....	137
9.3	ANÁLISIS MULTIEXPONENCIAL DE LOS DECAIMIENTOS DE FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA EN PRESENCIA DE BSA	139
10.	CONCLUSIONES.....	149
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151





1. RESÚMENES

1.1 CASTELLANO

Las técnicas basadas en la medida de fluorescencia tienen cada vez un papel más destacado en distintos ámbitos de la ciencia y la tecnología. Para su utilización se requieren con frecuencia sondas fluorescentes, moléculas cuyas propiedades emisivas dependen de forma muy sensible del medio en el que se encuentren. En esta tesis se ha estudiado el comportamiento de la sonda fluorescente proflavina. La sonda se caracterizó mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y fluorescencia en distintos medios y se ha investigado también la influencia de la concentración de proflavina. Se ha concluido que tanto la forma neutra como la protonada forman agregados diméricos en etanol y en agua a concentraciones bastante bajas. La interacción entre las unidades de proflavina del dímero es débil e independiente de la carga de la molécula.

Se ha estudiado la desactivación de la fluorescencia de la proflavina por aniones inorgánicos y tioureas. La desactivación por aniones ocurre a través de un mecanismo que incluye la formación de un excíplejo de menor rendimiento cuántico de fluorescencia, cuya constante de equilibrio de formación se incrementa con su carácter de transferencia de carga. En el caso de las tioureas, la desactivación ocurre probablemente por transferencia electrónica, tras el encuentro de la tiourea con la proflavina excitada, y por la formación de un complejo no emisor entre la proflavina y la tiourea en estado fundamental.

Por último, se ha analizado el comportamiento de la proflavina con los macrociclos 4-sulfocalix[6]areno y 4-sulfocalix[4]areno, así como con la proteína seroalbúmina bovina. Se han encontrado complejos proflavina/macrocielo en estado fundamental de estequiometría 1:1 y 1:2, cuyos espectros y constantes de equilibrio han sido determinados. También la proteína forma un complejo con la proflavina, cuyos espectros y constante de equilibrio han podido determinarse, habiéndose comprobado que la proflavina complejada emite desde distintos estados de relajación.

Palabras clave: Dimerización, desactivación de fluorescencia, transferencia electrónica fotoinducida, calixarenos, seroalbúmina bovina.

1.2 GALLEGO

As técnicas baseadas na medición da fluorescencia teñen un papel cada vez máis destacado en diferentes campos da ciencia e da tecnoloxía. A miúdo son necesarias sondas fluorescentes para o seu uso, moléculas cuxas propiedades emisivas dependen moi sensiblemente do ambiente no que se atopan. Nesta tese estudouse o comportamento da sonda fluorescente de proflavina. A sonda caracterizouse por espectroscopia de absorción UV-Vis e fluorescencia en diferentes medios e tamén se investigou a influencia da concentración de proflavina. Concluíuse que tanto a forma neutra como a protonada forman agregados diméricos en etanol e auga a concentracións bastante baixas. A interacción entre as unidades de proflavina do dímero é débil e independente da carga da molécula.

Estudouse a desactivación da fluorescencia de proflavina por aniións inorgánicos e tioureas. A desactivación do aniión prodúcese a través dun mecanismo que inclúe a formación dun excíplexo de menor rendemento cuántico de fluorescencia, cuxa constante de equilibrio de formación aumenta co seu carácter de transferencia de carga. No caso das tioureas, a desactivación prodúcese probablemente por transferencia electrónica, despois do encontro da tiourea coa proflavina excitada e pola formación dun complexo non emisivo entre a proflavina e a tiourea en estado fundamental.

Finalmente, analizouse o comportamento da proflavina cos macrociclos 4-sulfocalix[6]areno e 4-sulfocalix[4]areno, así como coa proteína da albumina sérica bovina. Atopáronse complexos proflavina/macrocielo no estado fundamental de estequiometría 1:1 e 1:2, cuxos espectros e constantes de equilibrio foron determinados. A proteína tamén forma un complexo coa proflavina, cuxos espectros e constante de equilibrio foron asimismo determinados, e comprobouse que a proflavina complexada emite desde diferentes estados de relaxación.

Palabras chave: Dimerización, desactivación de fluorescencia, transferencia electrónica fotoinducida, calixarenos, seroalbúmina bovina.

1.3 INGLÉS

Techniques based on the measurement of fluorescence have an increasingly prominent role in different fields of science and technology. Fluorescent probes, molecules whose emissive properties depend very sensitively on their environment, are often required for the use of these techniques. In this thesis, the behaviour of a fluorescent probe, proflavine, has been studied. The probe was characterized by UV-Vis absorption spectroscopy and fluorescence in different media, and the influence of the proflavine concentration has also been investigated. We concluded that both the neutral and protonated proflavine form dimeric aggregates in ethanol and in water at fairly low concentrations. The interaction between the proflavine units of the dimer is weak and independent of the charge of the molecule.

The deactivation of proflavine fluorescence by inorganic anions and thioureas has been studied. Anion deactivation occurs through a mechanism that includes the formation of an exciplex with a lower fluorescence quantum yield, whose formation equilibrium constant increases with its charge-transfer character. In the case of thioureas, the deactivation probably occurs by electron transfer upon the encounter of the thiourea with the excited proflavine, and by the formation of a non-emissive complex between thiourea and proflavine in the electronic ground state.

Finally, the behaviour of proflavine with the 4-sulfocalix[6]arene and 4-sulfocalix[4]arene macrocycles has been analysed, as well as with the bovine serum albumin protein. We found that ground-state proflavine/macrocycle complexes of 1:1 and 1:2 stoichiometry are formed, whose spectra and equilibrium constants have been determined. The protein also forms a complex with proflavine, whose spectrum and equilibrium constant have also been determined. We established that proflavine complexed with the bovine serum albumin protein emits from different relaxation states.

Keywords: Dimerization, fluorescence quenching, photoinduced electron transfer, calixarenes, bovine serum albumin.



2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las últimas décadas se ha incrementado de modo notable el uso de la fluorescencia para estudiar distintos fenómenos químicos o biológicos. Un ejemplo señalado lo constituye la proteína de fluorescencia verde, cuyo descubrimiento y desarrollo fue reconocido con el Premio Nobel de Química en 2008¹. La introducción del gen que la codifica en un organismo vivo se utiliza para estudiar multitud de procesos biológicos, como por ejemplo la expresión de proteínas, el desarrollo embrionario, etc.

Otra importante aplicación de la fluorescencia está en el campo de la microscopía. Los avances en este campo han llevado al desarrollo de técnicas especializadas que han permitido la investigación de moléculas individuales y han conseguido sobrepasar el límite de difracción. El progreso en estas técnicas, que ha merecido la concesión del Premio Nobel de Química en 2014², ha conseguido cambiar nuestra visión de muchos procesos químicos o bioquímicos, pues suministra información al nivel de moléculas individuales que con frecuencia queda oculta al realizar las medidas convencionales promediadas sobre un gran conjunto de moléculas^{3,4}.

El diseño y caracterización de sustancias fluorescentes está de plena actualidad, dadas las amplias aplicaciones en diversos campos. Cuando las sustancias a estudiar no presentan fluorescencia, es habitual utilizar sondas fluorescentes que puedan unirse convenientemente al sistema objeto de estudio para investigar sus propiedades. Estas sondas se utilizan en múltiples áreas, desde la secuenciación comercial de ADN⁵ al estudio químico de la formación de complejos y estructuras supramoleculares⁶ o la caracterización de orgánulos celulares⁷.

La utilidad de las sondas fluorescentes deriva de la gran sensibilidad de la fluorescencia a las propiedades del entorno de la especie emisiva. Si esta especie presenta una afinidad selectiva por un lugar específico en una estructura compleja, a partir de sus características fluorescentes pueden deducirse las propiedades del entorno de la sonda⁸.

Una sonda fluorescente que se viene utilizando desde hace años es la 3,6-diaminoacridina o proflavina, que es objeto de estudio en este trabajo. En disolución acuosa neutra, esta especie se encuentra mayoritariamente en forma catiónica, protonada en el N aromático (Figura 2.1).



Figura 2.1. Estructura de la proflavina neutra y protonada.

La proflavina se ha utilizado desde principios del siglo XX como agente desinfectante y como colorante para la tinción de muestras biológicas. Se conoce desde hace años que forma complejos con el ADN, lo que se relacionó con sus propiedades bacteriostáticas⁹. Medidas iniciales de intensidad y tiempos de vida de fluorescencia proporcionaron información relevante para conocer el modo de interacción¹⁰, e iniciaron un amplio campo de investigación con la utilización de la proflavina y especies relacionadas como sondas fluorescentes para estudiar las características de la unión al ADN¹¹. Hoy en día se sabe que la proflavina interacciona con el ADN formando complejos de intercalación entre sus pares de bases, favorecidos por la interacción entre los grupos aromáticos (π - π *stacking*)¹². Además, se ha propuesto que este tipo de moléculas podrían haber jugado un papel clave en el ensamblaje y replicación de los polímeros precursores de los actuales

ADN y ARN en las primeras etapas de la vida en la Tierra, e incluso haber influenciado la selección de nucleobases como consecuencia de su capacidad para formar estructuras más estables con esta clase de moléculas¹³. Por otra parte, la capacidad de la proflavina y otros derivados de la acridina para intercalarse en el ADN e inhibir las enzimas topoisomerasa y telomerasa ha estimulado la investigación sobre su uso medicinal, habiéndose demostrado su capacidad de actuación como anticancerígenos, antibacterianos y antiprotozoarios¹⁴.

La proflavina tiene también amplio uso en reacciones de transferencia electrónica fotoinducidas. Así, por ejemplo, se ha demostrado su capacidad para actuar como fotosensibilizador para la producción de hidrógeno a partir de agua¹⁵, o para la regeneración inducida por luz visible de la forma activa de cofactores enzimáticos para biocatálisis¹⁶. Algunas investigaciones han mostrado la complejidad de sus equilibrios ácido-base y redox en estados excitados^{17,18}, pero existen pocos estudios acerca del mecanismo de desactivación de su fluorescencia por diferentes especies, y la posible intervención de procesos de transferencia electrónica en el proceso.

La proflavina pertenece a un grupo de colorantes fluorescentes solubles en agua que actúan como huéspedes para anfitriones macrocíclicos en medio acuoso. La caracterización de estos complejos está de plena actualidad, dada su utilidad para determinar la localización y modo de interacción del anfitrión en el huésped, así como las características termodinámicas y cinéticas del proceso de complejación. Además, se utilizan también como indicadores para estudiar la complejación de especies no fluorescentes, utilizando metodologías de desplazamiento⁶.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo general de esta tesis doctoral es dilucidar los mecanismos de interacción de la proflavina en estado electrónico fundamental y excitado con distintos compuestos y caracterizar las propiedades espectroscópicas de la proflavina y de los complejos formados con diferentes especies. Este objetivo puede dividirse en los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar el comportamiento fotofísico de la proflavina en diferentes medios mediante espectroscopía de absorción Vis-UV y fluorescencia. Se estudiará la influencia del disolvente y la acidez sobre los espectros de absorción y fluorescencia, con objeto de determinar las propiedades espectroscópicas de la proflavina neutra y protonada. También se investigará la influencia de la concentración de proflavina para dilucidar su posible dimerización.
2. Analizar la desactivación de la fluorescencia de la proflavina por distintos compuestos: aniones inorgánicos, ureas y tioureas. A partir de medidas espectrales de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal, se estudiará la cinética y mecanismo de la desactivación, así como la posible implicación de procesos de transferencia electrónica en el mecanismo de quenching.
3. Determinar el mecanismo de complejación de la proflavina con macrociclos. Se investigará la estequiometría y las características fluorescentes de los complejos formados con calixarenos, así como la cinética de su formación y las constantes de velocidad y equilibrio.
4. Conocer la interacción de la proflavina con la proteína seroalbúmina bovina. Se determinarán las propiedades espectroscópicas del complejo formado y su equilibrio de asociación. Se establecerá la cinética de los procesos de desactivación del complejo en el estado excitado.

3. INFORME BIBLIOGRÁFICO

3.1 ASPECTOS GENERALES DE LA FLUORESCENCIA

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica utilizada en muchas disciplinas que abarcan desde la química y la ciencia de materiales a la biología y la medicina, y sus aplicaciones no paran de crecer. Así, se emplea la fluorescencia, por ejemplo, para obtener información estructural y dinámica de proteínas y otras macromoléculas, para identificar las bases en la secuenciación del ADN, o en la detección de células cancerígenas y anomalías genéticas.

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia, que consiste en la emisión de luz desde un estado electrónico excitado, alcanzado mediante la absorción de radiación, al estado electrónico fundamental, teniendo ambos estados la misma multiplicidad¹⁹. El proceso se suele visualizar mediante un esquema de niveles de energía, que se conoce como diagrama de Jablonski^{20,21,22} (ver la Figura 3.1), en el que se representan el estado electrónico fundamental de una molécula (S_0) y los distintos estados electrónicos excitados singlete (S_1, S_2, \dots) y triplete (T_1, T_2, \dots), junto con los niveles de energía vibracional de cada uno de estos estados. En el diagrama, se muestran los distintos procesos que experimenta una molécula desde que esta es excitada hasta que se produce su desactivación al estado fundamental.

La absorción de radiación UV-Vis es un proceso muy rápido (10^{-15} s) que conduce una molécula a un nivel vibracional dado del estado electrónico S_1 o bien de un estado electrónico superior (S_2, S_3, \dots). Se observa en la Figura 3.1 que, si se alcanza el estado S_2 , la molécula excitada pierde la energía vibracional (por colisión con las moléculas del disolvente) en un proceso no radiante llamado relajación vibracional que ocurre en 10^{-12} - 10^{-10} s, terminando en el nivel vibracional más bajo de S_2 . A continuación experimenta un proceso no radiante llamado conversión interna (10^{-11} - 10^{-9} s), que lleva a la molécula desde el nivel vibracional más bajo de S_2 a un nivel vibracional excitado del estado S_1 de la misma energía, seguido de relajación vibracional, alcanzando el nivel vibracional fundamental de S_1 .

La emisión espontánea de radiación desde el estado S_1 a distintos estados vibracionales de S_0 se denomina fluorescencia y ocurre en una escala de tiempos de 10^{-10} - 10^{-7} s. Además de la fluorescencia, puede tener lugar un cruce entre sistemas (10^{-12} - 10^{-6} s), proceso isoenergético en el que se produce un cambio de espín, llevando a la molécula hasta un nivel vibracional excitado del estado triplete T_1 . Posteriormente, la relajación vibracional conduce al nivel vibracional fundamental del estado T_1 . La emisión espontánea desde el estado triplete T_1 al estado S_0 se denomina fosforescencia y es un proceso más lento (10^{-6} - 10 s) que la fluorescencia porque se trata de una transición no permitida.

El tiempo de vida de fluorescencia representa el tiempo promedio que la molécula pasa en el estado excitado antes de regresar al estado fundamental, y viene dado por la inversa de la suma de sus constantes de velocidad de desactivación radiante y no radiantes (conversión interna y cruce entre sistemas).

Salvo raras excepciones, no se observa fluorescencia desde S_2 (ni desde estados electrónicos superiores) porque la diferencia de energía entre S_2 y S_1 es mucho menor que entre S_1 y S_0 . Como consecuencia, en S_2 la desactivación no radiante (relajación

vibracional y conversión interna) es más rápida que la fluorescencia. Por ello, tanto si la molécula es excitada al estado S_1 como a un estado electrónico superior, la emisión se produce normalmente desde el nivel vibracional más bajo del estado S_1 (regla de Kasha¹⁹) y, como consecuencia, el espectro de fluorescencia es generalmente independiente de la longitud de onda de excitación. Además, dado que tras la absorción de radiación se produce una pérdida de energía previa a la emisión, los espectros de fluorescencia siempre aparecen a mayor longitud de onda que los de absorción. Por otra parte, el espaciado entre los niveles de energía vibracionales suele ser semejante en S_0 y S_1 por lo que, cuando se representa en escala de energía, un espectro de fluorescencia suele ser imagen especular de la banda de absorción $S_0 \rightarrow S_1$.

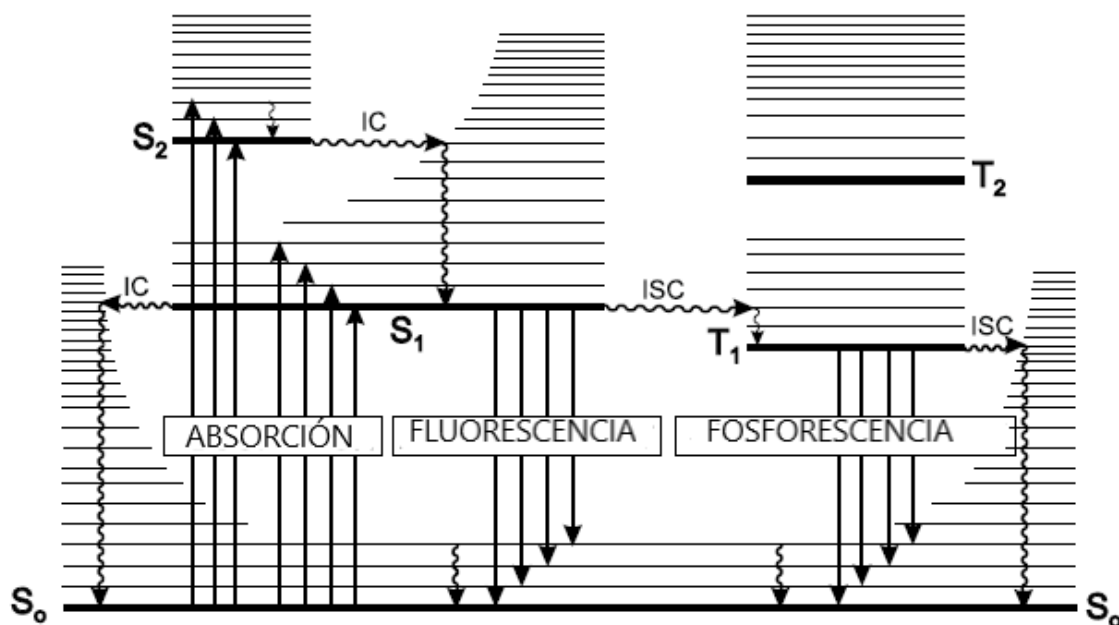


Figura 3.1. Diagrama de Jablonski²¹.

El espectro de fluorescencia de una sustancia depende de su estructura molecular. Las sustancias fluorescentes, o fluoróforos, típicas son hidrocarburos aromáticos como el naftaleno o el antraceno para los que las transiciones electrónicas de menor energía son de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, aunque si presentan heteroátomos en el anillo aromático pueden ser de tipo $n \rightarrow \pi^*$. La naturaleza y posición de los sustituyentes sobre los anillos aromáticos modifican la posición del espectro de emisión de estas moléculas, por lo que cada fluoróforo presenta un espectro de fluorescencia característico. Esto, junto con la gran sensibilidad de la fluorescencia, hace que muchas técnicas analíticas dispongan de sistemas de detección por fluorescencia.

La emisión de muchas moléculas depende del medio en el que está presente el fluoróforo. La interacción entre el fluoróforo y las moléculas del disolvente puede modificar la diferencia de energía entre S_0 y S_1 . Así, al aumentar la polaridad del disolvente, los espectros de emisión de las moléculas polares pueden mostrar un desplazamiento al rojo (batocrómico), si el estado S_1 se estabiliza más que el S_0 , o bien al azul (hipsocrómico), si ocurre lo contrario. Por otra parte, la fluorescencia de las moléculas que presentan grupos ácidos y básicos puede verse condicionada por el pH del medio. Esto hace que muchas sustancias fluorescentes puedan suministrar información del microentorno en el que se encuentran.

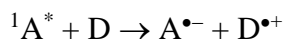
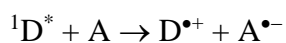
La emisión de fluorescencia puede verse afectada también por la presencia de otras especies en disolución. La adición de una segunda especie Q al medio en el que se encuentra una molécula fluorescente M puede provocar una disminución de la intensidad de fluorescencia de M^* , efecto que se conoce como quenching de fluorescencia. El mecanismo del quenching puede ser de dos tipos²³. El quenching colisional o dinámico implica que, durante el tiempo de vida del fluoróforo excitado, el quencher Q colisiona con M^* provocando su desactivación, por lo que la intensidad y el tiempo de vida de fluorescencia de M^* disminuyen. Este proceso está controlado por difusión si el proceso es muy efectivo y frecuentemente se debe a una reacción de transferencia electrónica, protónica o de energía entre M^* y Q.

El descenso de intensidad de emisión en presencia de Q puede ser originado también por la formación de un complejo no fluorescente en el estado fundamental entre M y Q. Esto provoca una disminución de la concentración de M en el estado fundamental, y por tanto de M^* , a medida que aumenta la concentración de Q, pero el tiempo de vida de fluorescencia de M^* permanece constante. Se trata en este caso de un quenching estático. Ambos tipos de quenching pueden tener lugar simultáneamente.

3.2 TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA FOTOINDUCIDA

La excitación electrónica provoca un cambio en la densidad electrónica de las moléculas, por lo que su reactividad en el estado excitado es muy distinta a la que tenían en el estado fundamental. En particular, la capacidad de una molécula para actuar como dador o aceptor de electrones se ve incrementada, por lo que en el estado electrónico excitado se observan procesos de transferencia electrónica que no ocurren en el estado fundamental^{24,25}. Las reacciones de transferencia electrónica fotoinducida (PET) son clave en fenómenos tan importantes como la fotosíntesis, en la que la luz solar induce una serie de reacciones de transferencia electrónica en cascada, acopladas a una transferencia protónica, que permiten almacenar energía que es utilizada para sintetizar ATP, y tienen, entre otras, aplicaciones tecnológicas en sensores luminiscentes²⁶ o en células solares orgánicas²⁷.

En una reacción de transferencia electrónica fotoinducida, la especie excitada puede ser tanto el dador como el aceptor de electrones y la reacción conduce a la formación de los iones radicales $D^{\bullet+}$ y $A^{\bullet-}$ a través de uno de los procesos²⁸.



Como ya se ha indicado en el apartado 3.1, el proceso PET provoca un quenching de fluorescencia en la molécula excitada. La Figura 3.2 muestra el diagrama de orbitales moleculares del dador y aceptor de electrones para el caso en el que la especie excitada sea el aceptor. Se observa que, tras la excitación de un electrón del orbital HOMO al LUMO de A, se genera un hueco en el HOMO del aceptor, por lo que la transferencia electrónica de D a A^* está muy favorecida respecto al proceso hipotético en el estado fundamental. Además, dado que la reacción implica un intercambio de electrones entre A^* y D, es necesario que haya un solapamiento de los orbitales de ambas especies, para lo que A^* y D deben estar en contacto²⁴. Como consecuencia de ello, la velocidad máxima del proceso estará controlada por la difusión de los reactivos. El requerimiento de que el dador y el aceptor de electrones estén próximos para que tenga lugar el quenching de

fluorescencia por PET se puede utilizar para monitorizar la dinámica conformacional en macromoléculas²⁹.

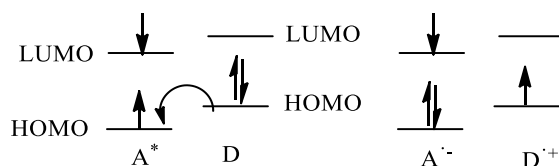


Figura 3.2. Representación esquemática de un proceso de transferencia electrónica.

En muchas reacciones de transferencia electrónica fotoinducida la aproximación de D a A^* conduce directamente a la formación de los iones radicales $D^{\bullet+}$ y $A^{\bullet-}$. En otros casos, la reacción PET transcurre a través de un complejo excitado intermedio $(DA)^*$ denominado excíplejo, en el que la carga está compartida entre el dador y el aceptor, y que puede ser o no fluorescente^{30,31}. Un ejemplo lo constituye el complejo formado por el antraceno excitado y la N,N-dietilanilina. El espectro de emisión de un excíplejo aparece con frecuencia a mayor longitud de onda que el correspondiente a la molécula excitada. Al aumentar la polaridad del disolvente, disminuye la diferencia de energía S_1-S_0 para el excíplejo, por lo que su banda de emisión se desplaza al rojo y su rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye.

De acuerdo con la termodinámica, para que la reacción de transferencia electrónica fotoinducida tenga lugar, el valor de la energía de Gibbs estándar de la reacción, ΔG_r^0 , debe ser negativo. Se puede estimar el valor de ΔG_r^0 para la reacción ${}^1A^* + D \rightarrow A^{\bullet-} + D^{\bullet+}$ si se conoce el valor de los potenciales estándar de reducción de los radicales, $E^0(D^{\bullet+}/D)$ y $E^0(A/A^{\bullet-})$, así como de la energía de la transición electrónica 0-0, E_{00} , del aceptor (o del dador, si esta es la especie excitada) a partir de la ecuación de Rehm-Weller^{25,32}:

$$\Delta G_r^0 = N_A e [E^0(D^{\bullet+}/D) - E^0(A/A^{\bullet-})] + E_c - E_{00} \quad (3.1)$$

donde E_c tiene en cuenta la energía de interacción electrostática (de Coulomb) del par iónico resultante de la reacción y generalmente es negativa.

De acuerdo con la ecuación (3.1), si la molécula excitada es un aceptor de electrones, el proceso PET será tanto más favorable cuanto más bajo sea el valor del potencial de reducción $E^0(D^{\bullet+}/D)$ correspondiente al dador. Las moléculas aromáticas dadoras de electrones típicas en las reacciones PET son aminas como la dimetilanilina, capaces de ceder electrones a una gran variedad de hidrocarburos aromáticos polinucleares. En el caso de los aceptores de electrones, estos tienen sobre el anillo aromático sustituyentes que retiran carga, como los grupos ciano o nitro.

Generalmente las reacciones de transferencia electrónica se estudian en el marco de la teoría clásica de Marcus^{28,32,33}, que predice que el valor de la energía libre de activación para la reacción, ΔG_r^\ddagger , depende del cuadrado de ΔG_r^0 , y la constante de velocidad para la transferencia electrónica k_{TE} viene dada por la expresión de Arrhenius:

$$k_{TE} = A \exp[-\Delta G_r^\ddagger / (k_B T)] \quad (3.2)$$

donde A es un factor preexponencial y k_B la constante de Boltzmann.

El modelo predice que la representación de $\ln k_{TE}$ frente a ΔG_r^0 es una parábola en la que se observan dos regiones. En la región "normal" $\ln k_{TE}$ aumenta al reducirse el valor de ΔG_r^0 hasta alcanzar el valor de $\ln k_{ET}$ correspondiente al control por difusión. Esta dependencia ha sido corroborada experimentalmente para multitud de sistemas. Si ΔG_r^0

sigue disminuyendo ($\Delta G_r^0 \ll 0$), la constante de velocidad k_{TE} debe comenzar a descender (región “invertida”) como consecuencia de que ΔG_r^\ddagger aumenta de nuevo, aunque se ha observado experimentalmente que la constante de quenching por PET permanece constante en estas condiciones²⁸.

3.3 PROFLAVINA

Entre los derivados de la acridina de mayor importancia destacan las aminoacridinas, y en particular la 3,6-diaminoacridina o proflavina (ver Figura 2.1). Estas especies han sido bastante estudiadas, particularmente en los campos de la biología y de la medicina. La razón por la que las aminoacridinas despiertan tanto interés es debido a su importante actividad biológica. Browing descubrió las valiosas propiedades antibacterianas de la proflavina en 1913, mientras que los investigadores Mauss y Mietzsch describieron las propiedades antimaláricas de algunas aminoacridinas en 1930³⁴. Más recientemente, la proflavina y otros derivados de la acridina se siguen investigando por sus propiedades antitumorales, antibacterianas y antiprotozoarias, utilizándose algunos de ellos en tratamientos de quimioterapia^{14,35,36}.

La naturaleza de la interacción de los derivados de la acridina, en especial las aminoacridinas, con ácidos nucleicos ha hecho que sean objeto de numerosos estudios. Diaminoacridinas como la proflavina, acriflavina y naranja de acridina son muy utilizadas para la tinción de núcleos de células, pudiéndose utilizar incluso con células vivas³⁷. En fecha reciente también se ha propuesto su uso como agente de contraste fluorescente para citologías rápidas en los puntos de atención médica, demostrándose su utilidad para el análisis de células cancerosas en la cavidad oral³⁸.

La proflavina, al igual que otros derivados de la acridina, se compleja con el ADN y el ARN, principalmente por un mecanismo de intercalación, provocando el desenrollamiento de la doble hélice y afectando de ese modo a numerosos procesos biológicos como la replicación y la transcripción^{39,40,41,42}. La estructura plana de tres anillos que conforman la proflavina tiene una gran importancia en los procesos de intercalación, mientras que los dos grupos amino contribuyen a la interacción electrostática con los grupos fosfato presentes en el ADN⁴³.

Estudios realizados utilizando difracción de rayos X y Teoría del funcional de la densidad (DFT) han puesto de manifiesto que los grupos amino de la proflavina tienen carácter hidrofílico^{44,45}. Además, dichos estudios han mostrado que los grupos CH de la proflavina muestran un comportamiento hidrofóbico cuando la molécula está intercalada o fijada al ADN⁴⁶.

Las propiedades espectroscópicas y fotofísicas de la proflavina han sido descritas por varios autores^{47,48,49,50,51}. Algunas investigaciones han concluido que la proflavina forma dímeros en disolución a concentraciones superiores a 10^{-4} mol dm^{-3} , así como grandes agregados a concentraciones superiores a 10^{-2} mol dm^{-3} ^{47,52,53,54,55}. Sin embargo, otros autores han discutido esas conclusiones, afirmando que los cambios espectrales corresponden a equilibrios ácido-base⁵⁶.

Las propiedades ácido-base de la proflavina en estado electrónico fundamental y excitado han sido también objeto de interés, ya que la basicidad del N aromático se incrementa notablemente en el primer estado singlete excitado, dando lugar a su protonación en condiciones experimentales adecuadas^{18,57,58}. Tras la protonación, se ha

propuesto que la molécula excitada cede un protón de uno de los grupos amino primarios⁵⁸.

3.4 CALIXARENOS

Los calixarenos son una clase de oligómeros cíclicos formados por la condensación de un fenol, sustituido en la posición 4, y un formaldehído⁵⁹. Pueden adoptar distintas conformaciones dependiendo del tamaño y sustituyentes del macrociclo^{60,61,62}. En la conformación rígida, los anillos fenólicos se disponen formando un cono con los grupos hidroxilo situados en el borde inferior y los sustituyentes del anillo fenólico en el borde superior, dotando al calixareno de una cavidad interior cuyo tamaño depende del número de monómeros fenólicos. Esta propiedad hace que los calixarenos puedan actuar como moléculas anfitrión tanto de otras moléculas como de iones, por lo que se pueden utilizar como catalizadores y sensores.

La incorporación de una molécula huésped al hueco del calixareno está condicionada por el tamaño de la cavidad y la naturaleza de la interacción entre el huésped y los grupos sustituyentes de los bordes del macrociclo. La utilización de sondas fluorescentes como huéspedes permite obtener información sobre la naturaleza de las interacciones y el mecanismo de la complejación del calixareno con la sonda⁶.

La solubilidad de los calixarenos en distintos medios depende de los sustituyentes de sus anillos fenólicos. Los derivados solubles en agua tienen gran interés y entre ellos destacan los calixarenos sulfonados introducidos por Shinkai^{63,64} (ver Figura 3.3). Estos derivados están cargados negativamente en su borde superior debido a sus grupos sulfonato, lo que los hace muy adecuados para complejar cationes fluorescentes. Se ha observado que con frecuencia estas sondas experimentan un quenching de fluorescencia cuando se complejan con el calixareno, lo que se atribuye a una transferencia electrónica desde los grupos hidroxilo fenólicos del calixareno al catión excitado⁶.

El calixareno con cuatro monómeros, 4-Sulfocalix[4]areno, presenta una conformación de cono, mientras que los derivados con 6 y 8 anillos presentan un mayor número de conformaciones⁶⁵. Algunos de estos derivados como los 4-Sulfocalix[6]arenos, tienen tendencia a formar complejos huésped/calixareno de estequiometría 2:1, porque se disponen en conformaciones alternadas.

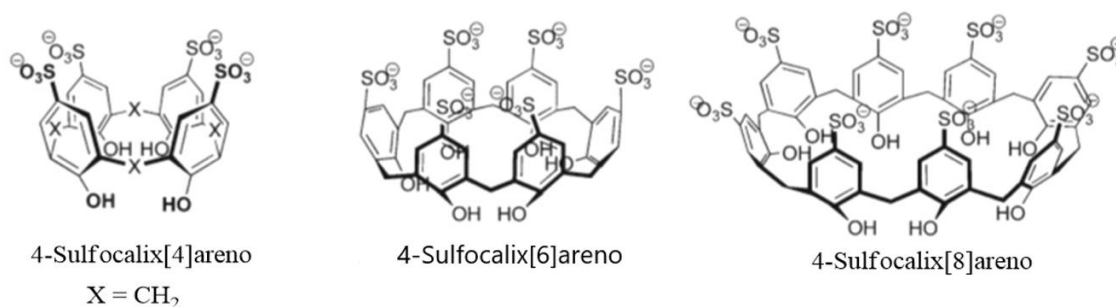


Figura 3.3. Ejemplos de calixarenos sulfonados.

Se han preparado también otros calixarenos solubles en agua de carácter catiónico, por ejemplo, con grupos (trimetilamonio)metilo en el borde superior⁶⁶, así como derivados sin carga⁶⁷, que se asocian con aniones y moléculas neutras respectivamente.

Además, se han desarrollado calixarenos funcionalizados con un fluoróforo, para su aplicación, por ejemplo, como sensores fluorescentes^{68,62}.

3.5 SEROALBÚMINA BOVINA (BSA)

Las seroalbúminas son las proteínas más abundantes del sistema circulatorio⁶⁹. Su principal función es el transporte de ácidos grasos, una gran variedad de metabolitos y medicamentos como por ejemplo anticoagulantes, tranquilizantes y anestésicos⁷⁰. Un fármaco ha de poder enlazarse a la proteína para que pueda ser transportado por ella, por lo que el estudio de los factores que determinan la asociación de las seroalbúminas con diversos tipos de moléculas es un campo de gran interés en química, biología y farmacia⁷¹.

La proteína BSA, que tiene un tamaño de 66382 Da, ha sido una de las más investigadas porque su secuencia muestra una homología del 80 % con la correspondiente a la seroalbúmina humana (HSA). La estructura primaria de ambas seroalbúminas es bien conocida y su estructura terciaria ha sido determinada mediante cristalografía de rayos-X^{72,73}.

La BSA está formada por 582 aminoácidos. Su fluorescencia intrínseca está originada por sus 20 residuos tirosínicos y sus dos triptófanos localizados en las posiciones 134 y 212 (ver Figura 3.4). El triptófano 134 se sitúa en superficie de la proteína, mientras que el triptófano 212 se encuentra encerrado en una cavidad hidrofóbica, en un entorno similar al del triptófano 214 de la seroalbúmina humana (HSA)⁷⁴.

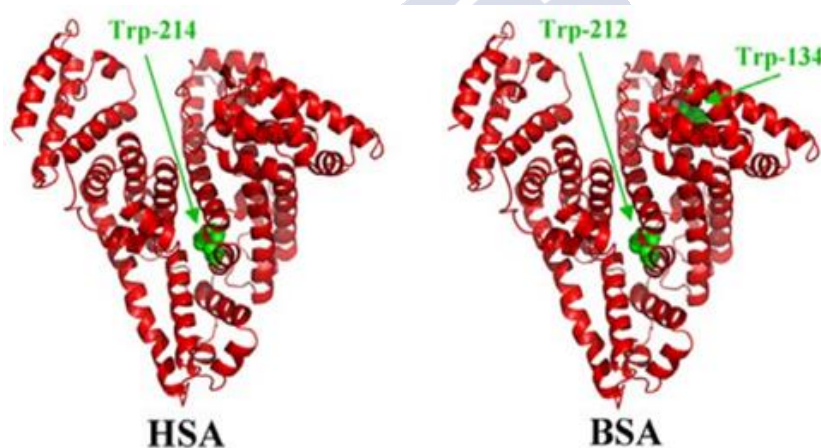


Figura 3.4. Representación de la estructura tridimensional de la HSA y BSA⁷⁴.

La molécula de BSA tiene forma de corazón debido al modo en que se ensamblan sus tres dominios helicoidales (I, II y III) en su estructura tridimensional. Cada uno de esos dominios tiene a su vez diez hélices y está dividido en seis hélices antiparalelas y cuatro subdominios unidos mediante 17 puentes disulfuro⁷⁵.

Las moléculas aromáticas se asocian a la BSA en dos posiciones de enlace situadas en los subdominios IIA y IIIA. El subdominio IIA es el de mayor amplitud, y su capacidad de unión es debida en su mayor parte a interacciones hidrofóbicas. El IIIA es más estrecho y de menor flexibilidad que el IIA y se enlaza mediante interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y enlaces por puentes de hidrógeno⁷⁶.

La fluorescencia intrínseca de la BSA se debe fundamentalmente a sus dos residuos de triptófano, ya que la tirosina tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia muy inferior. El triptófano es un derivado del indol (ver la Figura 3.5). Su espectro de emisión en agua tiene el máximo en torno a 350 nm, pero muestra una gran dependencia con la polaridad del disolvente y se ve afectado también por la formación de enlaces de hidrógeno del indol con el disolvente y otras especies próticas. Además, la presencia de

otras moléculas en el medio puede provocar quenching de fluorescencia del triptófano, frecuentemente por transferencia electrónica o bien de energía del triptófano excitado al quencher.

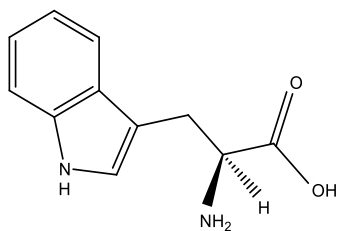


Figura 3.5. Estructura molecular del triptófano.

La gran sensibilidad de la fluorescencia del triptófano al entorno en el que se encuentra hace que este sea un fluoróforo adecuado para obtener información estructural y dinámica de proteínas. Así, la monitorización de la fluorescencia del triptófano de la BSA en presencia de una serie de sustancias bioactivas ha permitido adquirir datos sobre la interacción de estos fármacos con la BSA⁷¹.



4. TÉCNICAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

4.1 MATERIALES

En esta tesis se trabajó con la sonda proflavina (3,6-Diaminoacridine hydrochloride) de la firma Aldrich, con una pureza del 95%. Se prepararon disoluciones stock de dicha sonda en etanol (Scharlau para espectroscopia) de concentración $\sim 10^{-4}$ mol dm⁻³ a partir de las que se prepararon disoluciones diluidas con la concentración de PF adecuada para realizar las medidas de absorción y fluorescencia ($\sim 10^{-5}$ y 10^{-6} mol dm⁻³ respectivamente).

En este trabajo se utilizaron los siguientes disolventes: metanol (Alfa Aesar), etanol (Scharlau), 1-propanol (Aldrich), dimetilsulfoxido (Alfa Aesar) y acetonitrilo (Scharlau), todos los disolventes son de grado espectroscópico o para cromatografía. El agua utilizada fue Agua Milli-Q® obtenida a partir de agua potable pasando por un sistema de purificación de agua ultrapura de Merck Millipore, saliendo siempre agua con una conductividad aproximada de 18.2 mol dm⁻³ Ω cm a 25°C. Se comprobó que los disolventes utilizados no presentaban absorción ni fluorescencia en las condiciones de trabajo experimentales. Además, se utilizaron disoluciones acuosas de NaOH (Aldrich) y ácido perclórico (60% Aristar) cuando fue necesario modificar el pH del medio.

Se ha empleado también nitrito sódico (Emsure ACS, Reag), tiocianato sódico (Panreac) del 98% de pureza, azida sódica (Sigma Aldrich) del 99% de pureza, yoduro sódico (Sigma Aldrich), bromuro de sodio (Scharlau), cloruro sódico (Sigma Aldrich) y sulfato de quinina (Vorquímica). Las tioureas usadas fueron la tetrametiltiourea (Fluka AG), la 1,3-dimetiltiourea (Merck), metiltiourea (Merck) y tiourea (Merck).

Los macrociclos 4-Sulfocalix[6]areno hidratado (Acros Organics) con una pureza del 95% y el 4-Sulfocalix[4]areno (Sigma Aldrich) con una pureza del 97% y seroalbúmina bovina (BSA) de la casa comercial Sigma Aldrich, del 98% de pureza y pH 7.

4.2 MEDIDAS DE ABSORCIÓN UV-VIS

Para recoger espectros de absorción, hemos utilizado un espectrofotómetro de doble haz de la marca Varian modelo CARY 3E (ver Figura 4.1) que permite recoger espectros de absorción entre 900 y 190 nm, con una resolución espectral máxima de 0.2 nm y en un intervalo de absorbancias comprendido entre 1×10^{-4} y 3.

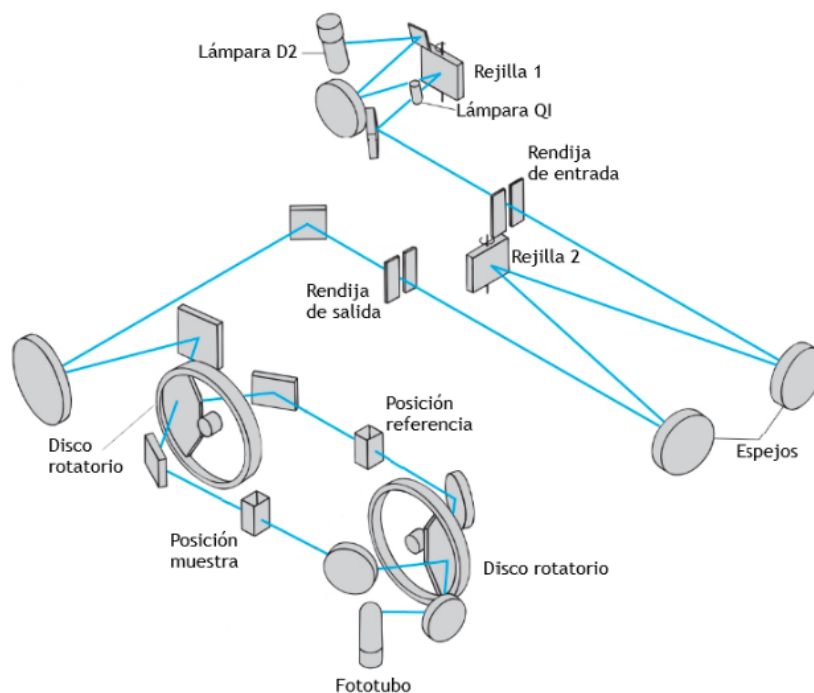


Figura 4.1. Esquema óptico del espectrofotómetro UV-Vis Varian modelo Cary 3E.

El espectrofotómetro está provisto de dos fuentes de luz, una lámpara halógena para la región del visible, y otra de deuterio para la región del ultravioleta. La selección de la longitud de onda se realiza mediante el uso de un premonocromador y un monocromador, que cuenta con rendijas de ancho variable entre 0.2 y 4 nm. Un chopper divide el haz de excitación en dos para hacer incidir la radiación sobre la muestra y la referencia. Un segundo chopper, sincronizado con el primero, permite seleccionar de forma alterna la radiación procedente de la muestra o la referencia, que llega a un tubo fotomultiplicador que actúa como detector.

El modo normal de operación se describe a continuación. El primer paso consiste en registrar la línea base llenando la cubeta de la muestra y la referencia con el disolvente. A continuación, se vacía la cubeta de la muestra y se llena con la disolución que queremos medir. Para ambas medidas, línea base y muestra, empleamos las mismas condiciones experimentales: el equipo se configuró para que el cambio entre las fuentes de excitación se produjese a 360 nm, se emplearon rendijas de 1 nm, y se promedió la señal durante 1 segundo en pasos de 0.5 nm.

4.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE ESTADO ESTACIONARIO

Los espectros de excitación y emisión que se presentan en esta tesis han sido registrados con un espectrofluorímetro Spex, modelo Fluorolog-2 FL340 E1 T1. El esquema óptico se muestra en la Figura 4.2. El equipo se compone de una lámpara de xenón de 450 W que emite en continuo, un monocromador de excitación y otro de emisión (ambos están equipados con rendijas variables y un poder de dispersión 1.5 nm/mm) y un contador cuántico para poder registrar la señal de la referencia. Dispone además de dos tubos fotomultiplicadores, uno para la muestra y otro para la referencia, que emplea como detectores.

El modo usual de operación se describe a continuación. El primer paso sería hacer el calibrado del monocromador de excitación, registrando el espectro de la lámpara de xenón e identificando la posición a la que aparece el pico de 467 nm característico del xenón. Para medir las muestras empleamos absorbancias lo más bajas posibles y siempre menores que 0.05. Generalmente seleccionamos rendijas de 1.25 mm para la excitación y de 0.5 mm para la emisión, un tiempo de adquisición de 1 segundo y pasos de 0.5 nm. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico con las cuatro caras pulidas. La detección se realizó a 90 grados respecto al haz de excitación.

La técnica de fluorescencia en estado estacionario permite registrar dos tipos de espectros: de emisión y de excitación. Los espectros de excitación se obtienen fijando el monocromador de emisión en una determinada longitud de onda y detectando la intensidad de fluorescencia a distintas longitudes de onda de excitación. Para obtener el espectro de emisión se fija el monocromador de excitación a una longitud de onda y se registra la intensidad de fluorescencia en un intervalo de longitudes de onda de emisión.

Los espectros de excitación se registraron en el modo S/R (señal/referencia) para evitar obtener espectros distorsionados por la dependencia de la intensidad de la lámpara de Xe con la longitud de onda. Los espectros de emisión correspondientes a una serie también se recogieron en el modo S/R para que la intensidad de emisión registrada fuera independiente de la oscilación de la intensidad de la lámpara de Xe durante el tiempo de medida de los espectros de la serie.

Por último, tras obtener los espectros empleamos funciones de corrección (específicas para el espectro de excitación o emisión), que corrigen la diferencia del camino óptico hacia los detectores de la muestra y la referencia (excitación), y la dependencia con la longitud de onda de la transmisión de los monocromadores (excitación y emisión) y de la sensibilidad del detector (emisión).

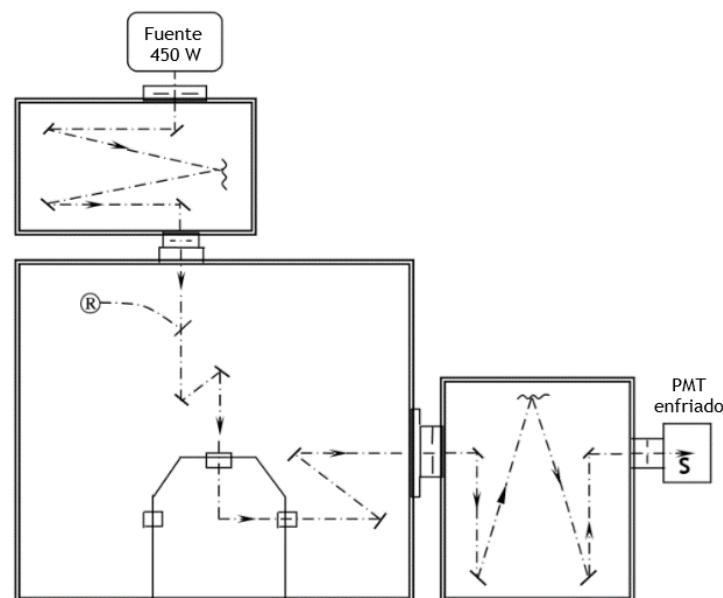


Figura 4.2. Esquema óptico del espectrofotómetro de fluorescencia Spex Fluorolog-2 FL340 E1 T1.

4.4 MEDIDAS DE TIEMPOS DE VIDA DE FLUORESCENCIA

Los tiempos de vida de fluorescencia se midieron mediante la técnica de recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo (TCSPC: Time-Correlated Single-Photon Counting) con un espectrómetro de la marca Edimburgh Instruments modelo FL-900CD, totalmente computerizado de manera que permite el control de los dispositivos del aparato y el posterior tratamiento de los datos mediante el método de deconvolución.

Se utilizó como fuente de excitación un láser de diodo de 370 nm de la firma PicoQuant. La resolución temporal del equipo es de ~ 50 ps.

La luz láser está polarizada, por lo que las medidas se realizaron a ángulo mágico (44.7° respecto a la vertical) para evitar el efecto que tendría la despolarización en los decaimientos de la sonda. Se registraron los decaimientos de fluorescencia hasta alcanzar 5000 cuentas en el máximo.

4.4.1 Técnica de recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo (TCSPC)

En esta técnica se mide el tiempo que tarda en llegar al detector el primer fotón emitido por una muestra tras el pulso de excitación que originó ese fotón, de modo que se registra un solo fotón (o ninguno) por pulso y este está ligado temporalmente a su pulso de excitación, de ahí el nombre del método.

La Figura 4.3 muestra un esquema de un equipo de TCSPC. La muestra se excita con una fuente de luz pulsada, que puede ser proporcionada por una lámpara de destello, un diodo o un láser. El pulso de luz no solo se utiliza para excitar la muestra, sino que simultáneamente este es detectado por el fotomultiplicador de inicio, que en ese instante proporciona una señal eléctrica que dispara el convertidor tiempo-amplitud (TAC) poniendo en marcha el “cronómetro”. El TAC genera un voltaje que aumenta linealmente con el tiempo hasta que se detiene cuando llega el primer fotón emitido por la muestra al fotomultiplicador de parada, parando el “cronómetro”, y permanece inactivo mientras se prepara para el siguiente pulso de excitación. De este modo, el voltaje generado será proporcional al intervalo de tiempo entre los pulsos de inicio y parada. El analizador multicanal (MCA) realiza entonces la conversión del voltaje acumulado a tiempo y almacena una cuenta en el canal de tiempo que le corresponde.

Para registrar el decaimiento de fluorescencia de la muestra es necesario excitar la misma muchas veces, generalmente hasta que se detectan 5000–10000 cuentas en el canal del máximo. Se obtiene así un histograma (ver Figura 4.3) que representa el decaimiento de fluorescencia.

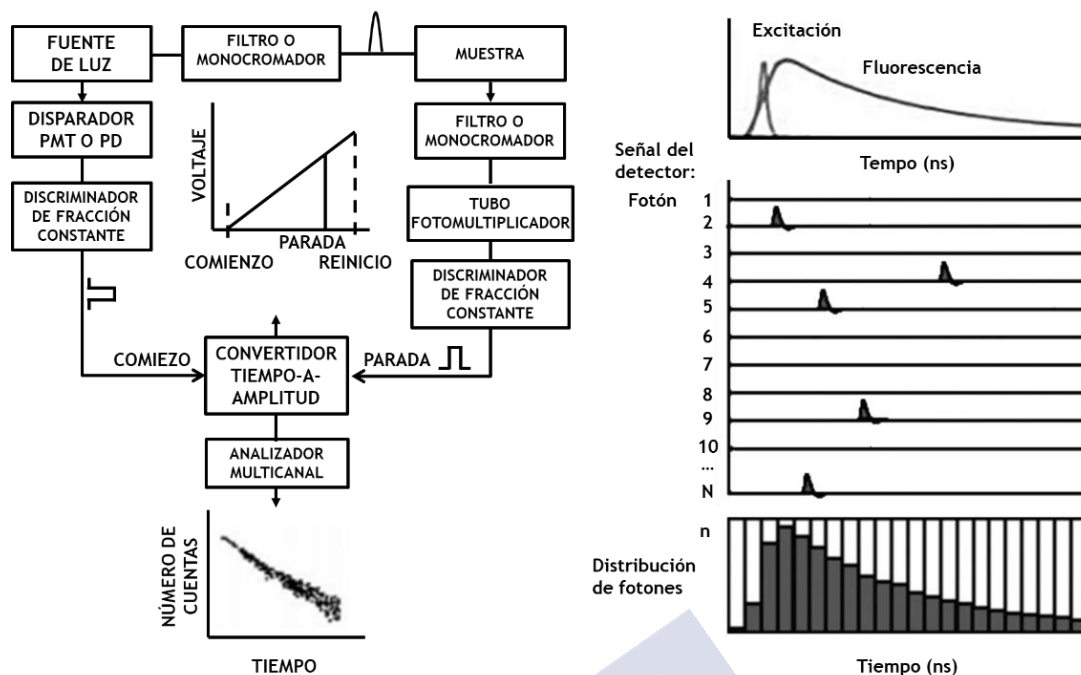


Figura 4.3. Esquema del instrumento de recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo y fundamento de la formación del histograma de probabilidades.

Una ventaja importante de este método es que el recuento de fotones obedece a una distribución de Poisson, lo que simplifica mucho el análisis de datos, ya que para esta distribución está perfectamente definida la desviación estándar, siendo igual a la raíz cuadrada del número de cuentas. Además, dado que el método se basa en el recuento de fotones individuales, la técnica es muy sensible.

A la hora de realizar un experimento de TCSP hay que tener en cuenta que la frecuencia a la que se detectan los fotones emitidos no puede ser superior al 2 % de la frecuencia de excitación, para evitar el efecto denominado “pile-up”. Si tras un pulso de excitación llega al fotomultiplicador de parada más de un fotón solo se va a detectar el primero, el de tiempo más corto, ya que cuando llega el segundo fotón el TAC estará inactivo. En este caso se obtendría una curva de decaimiento desplazada a tiempos más cortos que los reales (“pile-up”).

4.5 DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE FLUORESCENCIA

El rendimiento cuántico de fluorescencia ϕ_F de una sustancia es el cociente entre el número de fotones emitidos y absorbidos por esa sustancia, lo que equivale a la relación entre la intensidad de luz emitida, I_F , y absorbida, I_a :

$$\phi_F = \frac{I_F}{I_a} \quad (4.1)$$

Se puede determinar ϕ_F evaluando el número total de fotones emitidos por la muestra problema tras la absorción de I_a , pero es más sencillo utilizar el método relativo, que consiste en comparar la emisión de la sustancia problema X con la de una sustancia R de valor de ϕ_F conocido que actúa como referencia. Para ello se prepara una disolución de X y otra de R, ambas lo suficientemente diluidas para que se cumpla que $A < 0.05$ a la longitud de onda de excitación λ (la misma para ambas disoluciones), y se registran sus

espectros de absorción, A continuación, se recogen los espectros de emisión de X y R a esa longitud de onda de excitación, utilizando el mismo equipo, y bajo idénticas condiciones instrumentales (rendijas, voltaje de los fotomultiplicadores, etc.). El área bajo el espectro de fluorescencia corregido de cada especie es proporcional al producto $I_a^\lambda \times \phi_F$ y la constante de proporcionalidad es la misma para X y R, ya que se han utilizado las mismas condiciones instrumentales para registrar los espectros. Además, I_a^λ se relaciona con la intensidad de luz incidente I_0^λ y la absorbancia A^λ a la longitud de onda de excitación λ mediante la ecuación (4.2):

$$I_a^\lambda = I_0^\lambda (1 - 10^{-A^\lambda}) \quad (4.2)$$

Teniendo en cuenta que, en las condiciones del experimento, I_0^λ es la misma para X y R, el cociente entre las áreas de los espectros de emisión de X y R será:

$$\frac{\text{Área emisión (X)}}{\text{Área emisión (R)}} = \frac{n_R^2}{n_X^2} \times \frac{1 - 10^{-A_X^\lambda}}{1 - 10^{-A_R^\lambda}} \times \frac{\phi_F(X)}{\phi_F(R)} \quad (4.3)$$

donde A_X^λ y A_R^λ representan las absorbancias de X y R respectivamente a la longitud de onda de excitación λ , y $\phi_F(X)$ y $\phi_F(R)$ son sus rendimientos cuánticos de fluorescencia. El término de índices de refracción n_R^2/n_X^2 es una corrección que es necesario introducir si la disolución de la sustancia problema y la referencia tienen disolventes distintos.

Si conocemos el rendimiento cuántico de fluorescencia de R podemos calcular directamente el rendimiento cuántico de X utilizando la ecuación (4.4):

$$\phi_F(X) = \phi_F(R) \times \frac{\text{Área emisión (X)}}{\text{Área emisión (R)}} \times \frac{1 - 10^{-A_R^\lambda}}{1 - 10^{-A_X^\lambda}} \times \frac{n_X^2}{n_R^2} \quad (4.4)$$

Una de las disoluciones estándar más comúnmente empleadas es el sulfato de quinina en ácido sulfúrico diluido. El rendimiento cuántico de fluorescencia absoluto para el sulfato de quinina en ácido sulfúrico 1 mol dm⁻³ fue determinado por Melhuish⁷⁷, obteniendo un valor de 0.508 con una concentración de 5 × 10⁻³ mol dm⁻³, correspondiéndole a dilución infinita un valor para el rendimiento cuántico de 0.546 a 25 °C y de 0.533 a 20 °C. Otras sustancias que pueden ser empleadas como referencia son por ejemplo el antraceno o la rodamina B. Para poder registrar los espectros de fluorescencia de la sustancia problema y el estándar utilizando las mismas condiciones del espectrofluorímetro, conviene elegir una sustancia de referencia que emita en la misma región del espectro y tenga un rendimiento cuántico de fluorescencia del mismo orden de magnitud que la sustancia problema a estudiar.

En esta tesis, se han determinado los rendimientos cuánticos relativos de la proflavina utilizando como sustancia de referencia el sulfato de quinina en disolución acuosa de ácido perclórico 1 mol dm⁻³, cuyo rendimiento cuántico, como ya se indicó, tiene un valor de 0.546 a 25 °C.

En las figuras siguientes (Figura 4.4 y Figura 4.5) se muestran los espectros de absorción y emisión del sulfato de quinina en ácido perclórico 1 mol dm⁻³. En cada disolvente en el que se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia de la proflavina, se seleccionó una longitud de onda de excitación lo más próxima posible a los máximos de absorción tanto de la sustancia de referencia como de la PF.

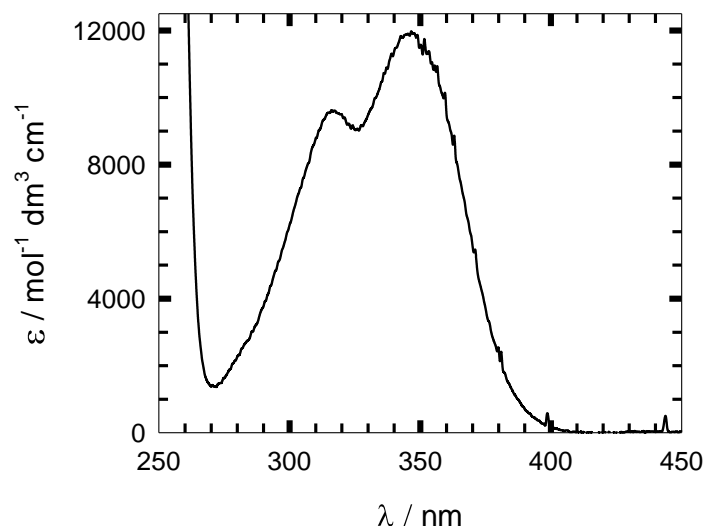


Figura 4.4. Espectro de absorción de sulfato de quinina en disolución acuosa de ácido perclórico 1 mol dm^{-3} .

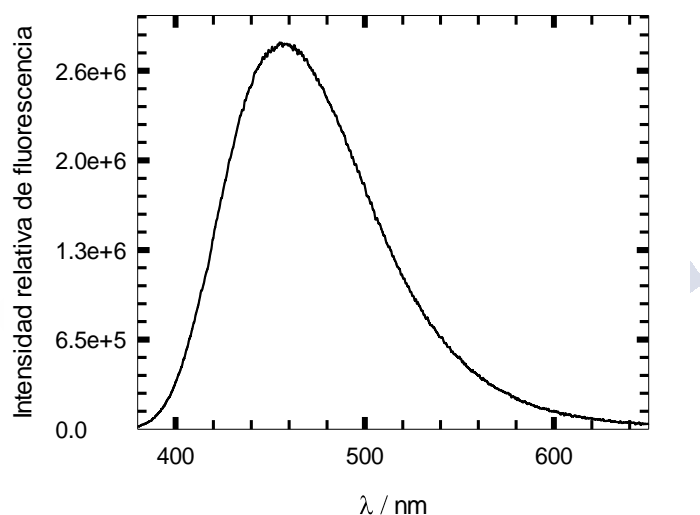


Figura 4.5. Espectro de fluorescencia para el sulfato de quinina en disolución acuosa de ácido perclórico 1 mol dm^{-3} .

4.6 RELACIÓN ENTRE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y EXCITACIÓN

Cuando se registra un espectro de excitación, se mide la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda dada en función de la longitud de onda de excitación λ . Hemos visto anteriormente que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la intensidad de luz absorbida I_a^λ (ecuación (4.1)) y que a su vez I_a^λ viene dada por la ecuación (4.2), que se puede reescribir como:

$$I_a^\lambda = I_0^\lambda \left(1 - e^{-2.303 \times A^\lambda}\right) \quad (4.5)$$

donde la intensidad de luz incidente I_0^λ es constante, puesto que los espectros de excitación se han registrado en el modo S/R.

La ecuación anterior se puede simplificar si la disolución es lo suficientemente diluida para que se cumpla que $2.303 \times A^\lambda < 0.1$. En ese caso, el término exponencial se puede aproximar por un desarrollo en serie de Taylor, y truncar la serie en el término de primer

grado, obteniéndose la ecuación (4.6). Esta ecuación nos indica que, si la absorbancia de la disolución es baja ($A < 0.05$), la intensidad de luz absorbida a cada λ será directamente proporcional a la absorbancia a esa longitud de onda y entonces el espectro de excitación del fluoróforo tendrá la misma forma que su espectro de absorción.

$$I_a^\lambda \simeq I_0^\lambda A^\lambda \quad (4.6)$$

La comparación de los espectros de excitación y absorción normalizados permite obtener información sobre el número de especies químicas presentes en la disolución, por lo que es un procedimiento habitual cuando se mide fluorescencia. Así, cuando los espectros de excitación y absorción no coinciden, podemos concluir que existe al menos otra especie química en disolución, que puede ser una impureza, pero también otra forma del fluoróforo, por ejemplo, una forma protonada o desprotonada del mismo, un tautómero, un dímero, etc.

4.7 TRATAMIENTO DE DATOS

En esta tesis se ha utilizado frecuentemente el método de análisis de componentes principales, que se describe a continuación, con el fin de determinar el número mínimo de componentes necesarios para poder reproducir una serie de espectros, de absorción o emisión, o de decaimientos de fluorescencia de la PF en la que se varía un parámetro. A partir de esta información, se han propuesto modelos de comportamiento de la PF y las ecuaciones derivadas de los mismos han sido ajustadas a los datos experimentales mediante un análisis global de componentes principales ejecutado con Matlab R2012a para Windows. El resto de los ajustes se realizaron con el programa comercial Sigma-Plot 10.0, que utiliza del algoritmo de Marquardt como método de minimización.

4.7.1 Análisis de componentes principales (PCA) y análisis global de componentes principales (PCGA)

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica estadística basada en el álgebra de matrices que es muy utilizada en distintas áreas científicas porque permite determinar el número mínimo de componentes, llamados componentes principales, que son necesarios para reproducir un conjunto de datos experimentales, reduciendo así la dimensión del sistema experimental.

En esta tesis, se han registrado series de espectros de absorción y fluorescencia en las cuales se ha ido modificando una variable (por ejemplo, el pH de la disolución o la concentración de un reactivo). La aplicación del método PCA al conjunto de espectros experimentales permite averiguar el número mínimo de componentes espectrales necesarios para reconstruir todos los espectros de la serie. Generalmente un componente espectral coincide con el espectro puro de una especie química, pero si la contribución espectral de dos especies químicas a los espectros de una serie muestra la misma dependencia con la variable externa, ambas especies generarán un único componente espectral combinación de los dos espectros puros.

Supongamos que hemos obtenido una serie de s espectros, cada uno de ellos con valores a l longitudes de onda, y construimos una matriz de datos experimentales \mathbf{Y}_e (dimensión $l \times s$) en las columnas contienen los distintos espectros (ecuación (4.7)).

$$\underbrace{\mathbf{Y}_e}_{l \times s} = \begin{pmatrix} y_{1,1} & \dots & y_{1,s} \\ \dots & \dots & \dots \\ y_{l,1} & \dots & y_{l,s} \end{pmatrix} \quad (4.7)$$

De acuerdo con el análisis PCA, si el sistema tiene c componentes principales se puede generar la matriz teórica de espectros \mathbf{Y}_t como producto de la matriz \mathbf{V}_c , formada por c autovectores, y la traspuesta de la matriz de coeficientes de esos autovectores \mathbf{Z}^T (donde el superíndice T indica la traspuesta de la matriz \mathbf{Z}):

$$\underbrace{\mathbf{Y}_t}_{l \times s} = \underbrace{\mathbf{V}_c}_{l \times c} \cdot \underbrace{\mathbf{Z}^T}_{c \times s} = \begin{pmatrix} v_{1,1} & \dots & v_{1,c} \\ \dots & \dots & \dots \\ v_{l,1} & \dots & v_{l,c} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} z_{1,1} & \vdots & z_{1,s} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ z_{c,1} & \vdots & z_{c,s} \end{pmatrix} \quad (4.8)$$

La matriz \mathbf{V}_c representa la base mínima de vectores linealmente independientes y ortonormales que permite generar la matriz de espectros \mathbf{Y}_t .

El primer paso para obtener la base mínima de vectores es construir la matriz cuadrada y simétrica $\mathbf{Y}_e \cdot \mathbf{Y}_e^T$, llamada matriz de correlación, y obtener los autovalores λ_i y sus autovectores V_i resolviendo la ecuación de valores propios:

$$\underbrace{\mathbf{V}^T}_{s \times l} \cdot \underbrace{\mathbf{Y}_e \cdot \mathbf{Y}_e^T}_{l \times l} = \underbrace{\mathbf{\Lambda}}_{s \times s} \cdot \underbrace{\mathbf{V}^T}_{s \times l} \quad (4.9)$$

donde la matriz \mathbf{V} contiene los autovectores V_i , y los elementos λ_i de la matriz diagonal $\mathbf{\Lambda}$ son los autovalores correspondientes a los autovectores V_i , ordenados de mayor (λ_1) a menor valor. En este punto hay que analizar cuántos autovalores son realmente necesarios para poder reproducir la matriz experimental \mathbf{Y}_e . El resto de autovalores solo reflejan el ruido y errores instrumentales. Una vez conocido el número mínimo de componentes (c) se puede truncar la matriz de autovectores \mathbf{V} y obtener la matriz teórica de espectros \mathbf{Y}_t a partir de la matriz reducida \mathbf{V}_c (ecuación (4.8)).

El PCA nos permite determinar el número de componentes espectrales independientes necesarios para generar los espectros experimentales de la serie, sin embargo, los autovectores no tienen significado físico. Sabemos que cada espectro de absorción experimental debe ser igual a la suma del producto del coeficiente de absorción molar de cada componente y su concentración. Análogamente, cada espectro de emisión vendrá dado por la suma del producto del espectro de emisión de cada componente por su contribución. Si se ha hecho una hipótesis sobre el modelo que explica el comportamiento experimental observado, se pueden derivar las expresiones matemáticas de los coeficientes que multiplican los espectros componentes y realizar un análisis global de componentes principales (PCGA)⁷⁸. El método PCGA combina el análisis global no lineal con el análisis de componentes principales, y permite obtener no solo el número de componentes espectrales independientes, sino también los espectros componentes y los valores de los parámetros involucrados en el modelo planteado.

De forma general, podemos decir que la matriz teórica de espectros \mathbf{Y}_t debe ser igual al producto de la matriz de espectros componentes \mathbf{E}_c y la traspuesta de la matriz de coeficientes de esos espectros \mathbf{C}^T :

$$\underbrace{\mathbf{Y}_t}_{l \times s} = \underbrace{\mathbf{E}_c}_{l \times c} \cdot \underbrace{\mathbf{C}^T}_{c \times s} = \begin{pmatrix} e_{1,1} & \dots & e_{1,c} \\ \dots & \dots & \dots \\ e_{l,1} & \dots & e_{l,c} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_{1,1} & \vdots & c_{1,s} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ c_{c,1} & \vdots & c_{c,s} \end{pmatrix} \quad (4.10)$$

Resolver el problema planteado implica encontrar la matriz de espectros \mathbf{E}_c (y de coeficientes) que cumplen la ecuación anterior. Para ello, hay que tener en cuenta que la matriz \mathbf{E}_c está relacionada con la de autovectores \mathbf{V}_c mediante una matriz de rotación \mathbf{R} :

$$\underbrace{\mathbf{E}_c}_{l \times c} = \underbrace{\mathbf{V}_c}_{l \times c} \cdot \underbrace{\mathbf{R}^{-1}}_{c \times c} \quad (4.11)$$

donde \mathbf{R}^{-1} es la inversa de la matriz \mathbf{R} .

Análogamente, la matriz de coeficientes de los espectros componentes \mathbf{C} cumple:

$$\underbrace{\mathbf{C}}_{s \times c} = \underbrace{\mathbf{Z}}_{s \times c} \cdot \underbrace{\mathbf{R}^T}_{c \times c} \quad (4.12)$$

Por lo tanto, dado que se conocen \mathbf{V}_c y \mathbf{Z} , para obtener \mathbf{E}_c y \mathbf{C} hay que determinar la matriz de rotación \mathbf{R} .

Los elementos de la matriz \mathbf{C} dependerán de la variable que induce el cambio en los espectros (pH, concentración de reactivo, etc) y de los parámetros del modelo (constantes de equilibrio, constantes cinéticas, etc.). El análisis PCGA consiste en generar una matriz inicial \mathbf{C} utilizando valores estimados de los parámetros del modelo, que después se optimizan mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados, lo que permite obtener las matrices \mathbf{C} y \mathbf{E}_c .

Se ha utilizado también el análisis PCGA para descomponer series de decaimientos de fluorescencia en sus componentes. El procedimiento es análogo al descrito para los espectros.

4.7.2 Determinación de tiempos de vida de fluorescencia. Método de deconvolución.

En un experimento ideal, la fuente de excitación proporcionaría un pulso infinitamente corto (función δ), de modo que la concentración de moléculas excitadas sería máxima en el instante inicial y se registraría directamente el decaimiento de la fluorescencia $D(t)$. Las fuentes de luz pulsada no cumplen esta condición, de modo que se excitan moléculas del fluoróforo durante todo el intervalo de tiempo que dura el pulso de excitación. Salvo que el tiempo de vida de la molécula excitada sea muy superior a la anchura del pulso de excitación, la excitación con un pulso con perfil temporal $L(t)$ generará una función repuesta $F(t)$ que es el producto de convolución de $L(t)$ y $D(t)$ ⁷⁹:

$$F(t) = \int_0^t L(t') D(t - t') dt' \quad (4.13)$$

El análisis de datos utilizado para obtener los parámetros cinéticos asociados al decaimiento de fluorescencia se basa en el método de reconvoluciones iterativas por mínimos cuadrados. Para poder realizar la optimización, es necesario suponer un modelo de decaimiento para el fluoróforo excitado y registrar no solo la respuesta del sistema

$F(t)$ sino también la señal correspondiente al perfil temporal del pulso de excitación, $L(t)$. Generalmente, se admite que $D(t)$ viene dado por una suma de exponenciales:

$$D(t) = \sum_i \alpha_i e^{(-t/\tau_i)} \quad (4.14)$$

donde α_i es el factor preexponencial correspondiente a cada tiempo de vida de fluorescencia τ_i . Para realizar el ajuste hay que estimar valores iniciales para las amplitudes α_i y los tiempos de vida τ_i , con los que se calcula un valor inicial de $D(t)$, que, junto con la señal del pulso de excitación $L(t)$, permite obtener la función respuesta teórica $F_t(t)$ mediante la ecuación (4.13). Los valores de α_i y τ_i se van modificando en un análisis lineal por mínimos cuadrados en el que se minimiza el valor de χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left[\frac{F_t(t_i) - F(t_i)}{\sigma_i} \right]^2 \quad (4.15)$$

donde N es el número de puntos experimentales y σ_i la desviación estándar del dato i , que para una distribución de Poisson viene dada por:

$$\sigma_i = \sqrt{F(t_i)} \quad (4.16)$$

El valor de χ^2 depende del número de datos del decaimiento de fluorescencia, por lo que generalmente se normaliza dividiéndolo por el número de grados de libertad del sistema:

$$\chi_N^2 = \frac{\chi^2}{N - L} \quad (4.17)$$

donde L es el número de parámetros ajustables. El valor de χ_N^2 informa sobre la calidad del ajuste, siendo 1 su valor óptimo (aunque se considera aceptable si se encuentra en el intervalo $0.8 - 1.2$)⁸⁰. A la hora de decidir si el modelo propuesto es adecuado, no es suficiente con fijarse en el valor de χ_N^2 , sino que hay que observar también la representación de los residuos ponderados $R(t_i)$ (ecuación (4.18)), que deben mostrar una distribución aleatoria en torno a cero.

$$R(t_i) = \frac{F_t(t_i) - F(t_i)}{\sigma_i} \quad (4.18)$$

Hay que indicar que el tiempo de respuesta de los fotomultiplicadores depende de la longitud de onda de los fotones que recibe. Esto representa un problema porque el perfil temporal del pulso de excitación se recoge a distinta longitud de onda (generalmente a λ_{exc}) que los decaimientos de fluorescencia. Además, con frecuencia interesa realizar un análisis global de los decaimientos obtenidos para un conjunto de longitudes de onda. Para corregir este efecto es necesario incorporar un parámetro δ ("shift") en las exponenciales de la función a optimizar (ecuación (4.19)), que permite desplazar las curvas de decaimiento en el eje de tiempos.

$$D(t) = \sum_i \alpha_i e^{\left(\frac{-t+\delta}{\tau_i}\right)} \quad (4.19)$$



5. CARACTERIZACIÓN DE LA PROFLAVINA: ESPECTROS DE ABSORCIÓN

5.1 SERIE DE ABSORCIÓN EN MEDIO ÁCIDO

Se registraron los espectros de absorción de la proflavina en agua en medio ácido (ver Figura 5.1). En ausencia de ácido perclórico la primera banda de absorción de la proflavina muestra el máximo a 445 nm. En la Figura 5.1 se observa que, al aumentar la concentración de protones en el medio, la absorbancia a 445 nm disminuye y aparece un hombro a mayores longitudes de onda (~ 490 nm). Además, se observan varios puntos isobésticos (por ejemplo, en torno a 469 nm y 372 nm en la primera banda de absorción), lo que nos indica que existe un equilibrio ácido-base en el estado fundamental entre dos especies.

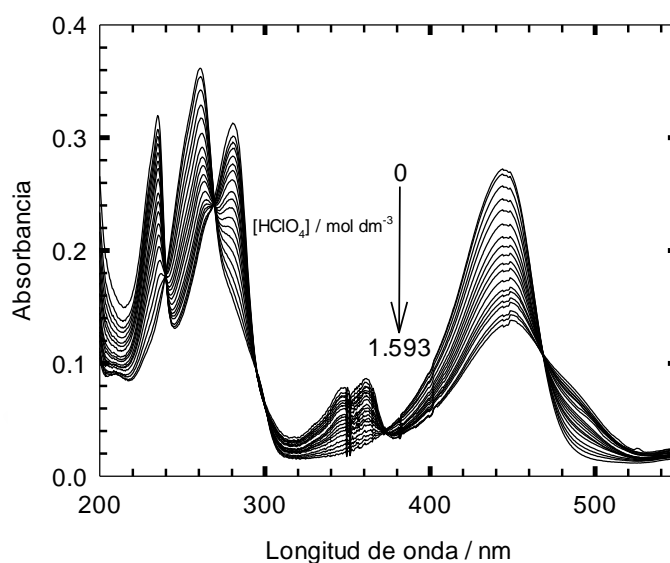
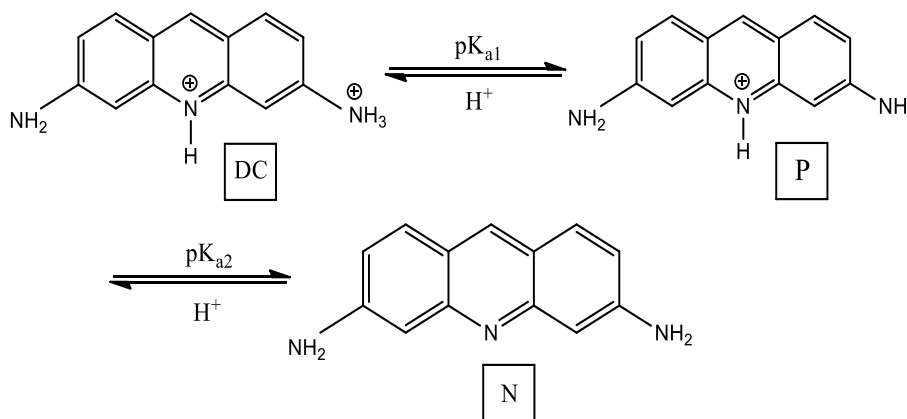


Figura 5.1. Espectros de absorción de la proflavina en agua en medio ácido en el intervalo de HClO_4 de 0 a 1.59 mol dm^{-3} , $[\text{PF}] = 7.56 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

El espectro de absorción que se obtiene cuando la concentración de ácido es 0 debe ser debido a la forma de la proflavina protonada en el N del anillo aromático, P, que al disminuir el pH puede protonarse en un grupo $-\text{NH}_2$ para dar la forma dicatiónica DC, como se muestra en el Esquema 5.1.



Esquema 5.1. Equilibrios ácido-base de la proflavina y estructuras correspondientes a las especies DC, P y N implicadas en los mismos.

De forma simplificada, se puede representar el equilibrio ácido-base de la proflavina en medio neutro-ácido de la siguiente forma:



Su constante de acidez K_{a1} es una constante macroscópica que vendría dada por:

$$K_{a1} = \frac{[\text{P}][\text{H}^+]}{[\text{DC}]} \quad (5.1)$$

Por otra parte, la concentración inicial de proflavina a_0 es la suma de las concentraciones de DC y P (ecuación (5.2)).

$$a_0 = [\text{DC}] + [\text{P}] \quad (5.2)$$

Despejando [DC] de la ecuación (5.1) y sustituyendo el resultado en la ecuación (5.2) se obtiene:

$$[\text{P}] = \frac{K_{a1}a_0}{K_{a1} + [\text{H}^+]} \quad (5.3)$$

La sustitución de la ecuación (5.3) en la ecuación (5.1) conduce a la expresión para [DC].

$$[\text{DC}] = \frac{a_0[\text{H}^+]}{K_{a1} + [\text{H}^+]} \quad (5.4)$$

La absorbancia a cualquier longitud de onda, A^λ , vendrá dada por:

$$A^\lambda = A_{\text{DC}}^\lambda + A_{\text{P}}^\lambda \quad (5.5)$$

donde A_{DC}^λ y A_{P}^λ son las absorbancias del dicatión y el catión P respectivamente.

En toda la serie se cumple la ley de Lambert-Beer, por lo que la absorbancia de DC y P se puede expresar como:

$$A_{\text{DC}}^\lambda = \varepsilon_{\text{DC}}^\lambda l [\text{DC}] \quad (5.6)$$

$$A_{\text{P}}^\lambda = \varepsilon_{\text{P}}^\lambda l [\text{P}] \quad (5.7)$$

donde $\varepsilon_{\text{DC}}^\lambda$ y $\varepsilon_{\text{P}}^\lambda$ son los coeficientes de absorción molar de la forma dicatiónica (DC) y del catión (P) y l el espesor de la cubeta.

Sustituyendo las ecuaciones (5.6) y (5.7) en la ecuación (5.5), obtenemos:

$$A^\lambda = \varepsilon_{\text{DC}}^\lambda l [\text{DC}] + \varepsilon_{\text{P}}^\lambda l [\text{P}] \quad (5.8)$$

Agrupando términos llegamos a la expresión siguiente, que será la ecuación a la que ajustemos nuestros datos experimentales:

$$A^\lambda = \frac{\alpha^\lambda K_{a1} + \beta^\lambda [\text{H}^+]}{K_{a1} + [\text{H}^+]} \quad (5.9)$$

donde α^λ y β^λ representan las absorbancias a la longitud de onda λ que tendría la proflavina si se encuentra totalmente como P y DC respectivamente.

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

En la Figura 5.2 se representa el valor experimental de la absorbancia frente a la concentración de ácido perclórico a diferentes longitudes de onda, así como el ajuste de la ecuación (5.9) a estos datos.

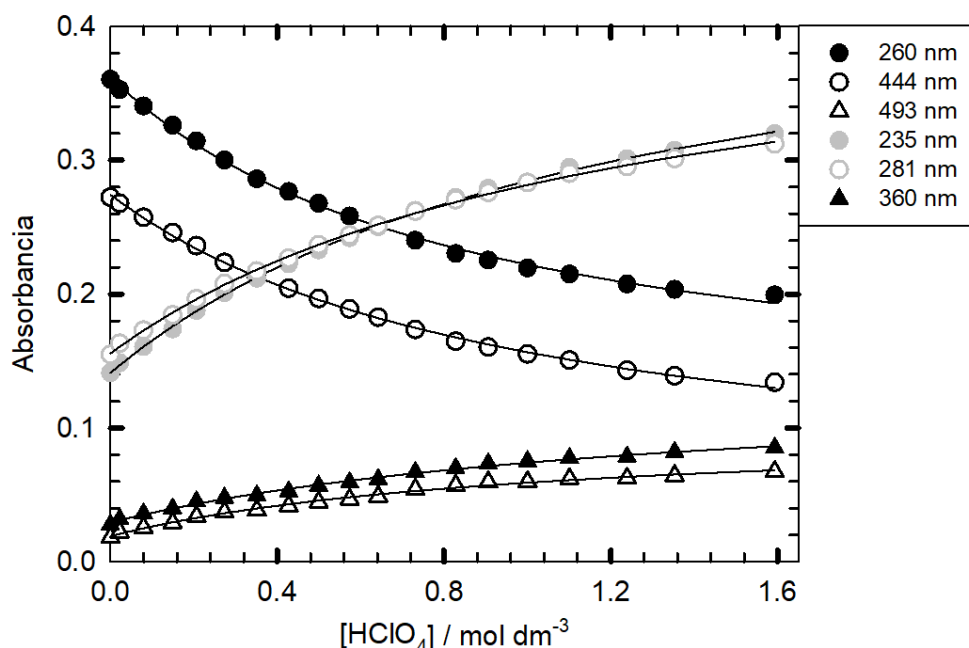


Figura 5.2. Variación de la absorbancia de la proflavina con la concentración de ácido perclórico a 260 nm, 444 nm, 493 nm, 235 nm, 281 nm y 360 nm y ajuste de la ecuación (5.9) a esos datos.

En la Tabla 5.1 se recogen los valores de K_{a1} obtenidos del ajuste de la ecuación (5.9) a los datos de absorbancia frente a la $[HClO_4]$ representados en la Figura 5.2.

Tabla 5.1. Valores de K_{a1} obtenidos a diferentes longitudes de onda.

λ / nm	K_{a1} / mol dm ⁻³
235	1.20(5)
260	0.85(5)
281	1.21(5)
360	1.40(2)
444	0.99(5)
493	1.00(1)

El valor promedio de la constante de equilibrio es de: $\bar{K}_{a1} = 1.11(8)$ mol dm⁻³. Por lo tanto, se obtiene que $\bar{p}K_{a1} = -0.04(7)$, en concordancia con el valor bibliográfico^{81,82} (~ 0.2). A la vista del valor obtenido para el $\bar{p}K_{a1}$ está claro que a $[HClO_4] = 1.593$ mol dm⁻³, concentración más alta de la serie de espectros de absorción, el catión de la proflavina aún no se ha protonado totalmente, por lo que el espectro registrado en estas condiciones de acidez no corresponde a DC sino a la suma de las contribuciones de P y el dicatión.

5.2 SERIE DE ABSORCIÓN EN MEDIO BÁSICO

Se han registrado los espectros de absorción de la proflavina en medio básico (Figura 5.3). A lo largo de toda la serie experimental se observa como al aumentar la concentración de base en el medio la banda a 445 nm, debida a P, va desapareciendo y simultáneamente surge una nueva banda a ~ 400 nm cuya forma permanece invariante a partir de $[\text{NaOH}] \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

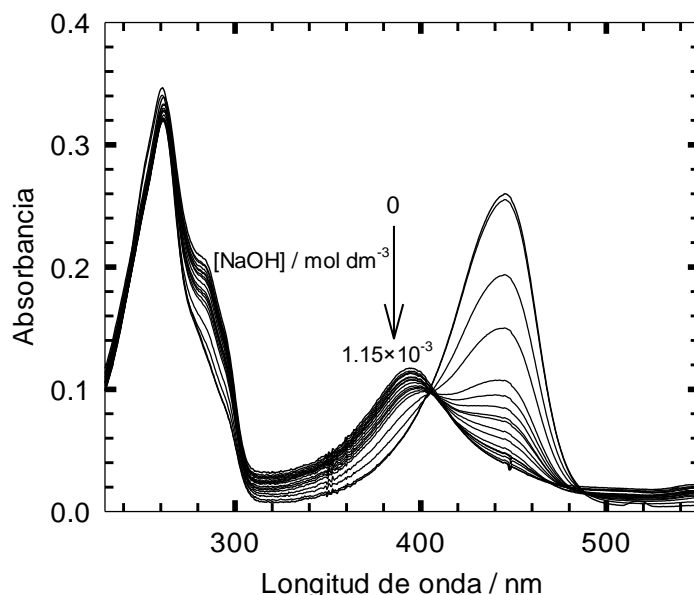


Figura 5.3. Espectros de absorción de la proflavina en agua en medio básico en el intervalo de concentración de NaOH de 0 a $1.15 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. $[\text{PF}] = 7.5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

En esta serie de absorción en presencia de diferentes concentraciones de base en el medio se observa también la aparición de varios puntos isobésticos, que reflejan la existencia de un equilibrio ácido-base en el estado fundamental con dos especies implicadas.

El espectro de absorción que se obtiene cuando la concentración de NaOH es cero corresponde, como se indicó anteriormente, a la forma catiónica P de la proflavina, que en presencia de NaOH debe perder el H unido al nitrógeno del anillo aromático dando lugar a la forma neutra N (ver Esquema 5.1). El espectro que se registra cuando la concentración de base es $1.15 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ha de corresponder por tanto a la forma neutra N de la proflavina).

El equilibrio ácido-base se puede representar como:



donde la constante de equilibrio vendrá dada por:

$$K = \frac{[\text{N}]}{[\text{P}][\text{OH}^-]} \quad (5.10)$$

La concentración inicial de proflavina a_0 es constante en la serie y será la suma de las concentraciones de N y P:

$$a_0 = [\text{N}] + [\text{P}] \quad (5.11)$$

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

Despejando [N] en la ecuación (5.10) y sustituyendo el resultado en la ecuación (5.11) se obtiene la expresión para la concentración de P, ecuación (5.12):

$$[P] = \frac{a_0}{1 + K [\text{OH}^-]} \quad (5.12)$$

La concentración de N se obtiene fácilmente sustituyendo la ecuación (5.12) en la (5.10):

$$[N] = \frac{a_0 K [\text{OH}^-]}{1 + K [\text{OH}^-]} \quad (5.13)$$

La absorbancia a cualquier longitud de onda, A^λ , vendrá dada por:

$$A^\lambda = A_P^\lambda + A_N^\lambda \quad (5.14)$$

donde A_N^λ y A_P^λ son las absorbancias de la forma neutra y protonada respectivamente a cada longitud de onda.

En toda la serie se cumple la ley de Lambert-Beer, por lo que la absorbancia total A^λ se puede expresar como:

$$A^\lambda = \epsilon_P^\lambda l [P] + \epsilon_N^\lambda l [N] \quad (5.15)$$

donde ϵ_N^λ y ϵ_P^λ son los coeficientes de absorción molar de la forma neutra (N) y del catión (P), y l ya ha sido definida anteriormente.

Sustituyendo las expresiones para las concentraciones de P y N en la ecuación (5.15) llegamos a la expresión siguiente que será la ecuación a la que ajustemos nuestros datos experimentales:

$$A^\lambda = \frac{\alpha^\lambda + \beta^\lambda K [\text{OH}^-]}{1 + K [\text{OH}^-]} \quad (5.16)$$

donde α^λ y β^λ son las absorbancias que se obtendrían a λ si la sonda estuviese totalmente como P o bien como N respectivamente.

En la Figura 5.4 se representa el valor experimental de la absorbancia frente a la concentración de NaOH a diferentes longitudes de onda, así como los valores optimizados mediante el ajuste de la ecuación (5.16) a estos datos.

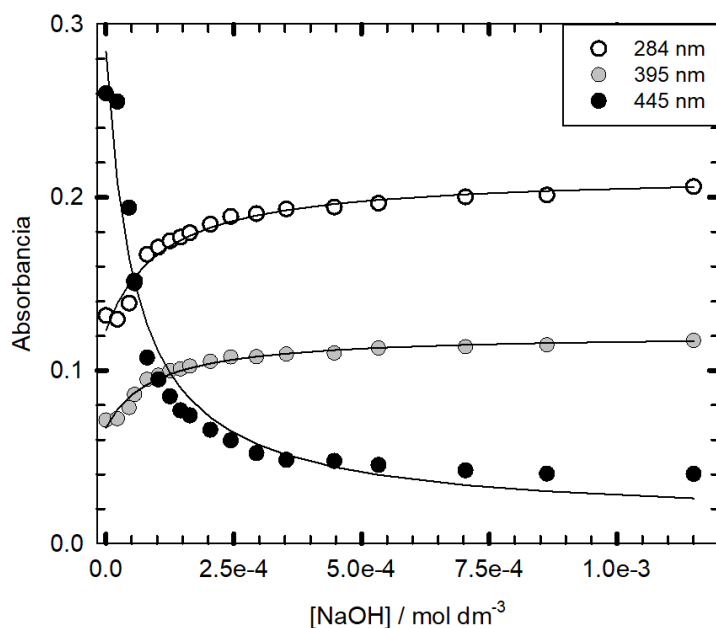


Figura 5.4. Variación de la absorbancia de la proflavina con la concentración de NaOH a 284 nm, 395 nm y 445 nm y ajuste de la ecuación (5.16) a esos datos.

En la Tabla 5.2 se recogen los valores de K obtenidos con del ajuste de la ecuación (5.16) a los datos experimentales de la Figura 5.4.

Tabla 5.2. Valores de K obtenidos a diferentes longitudes de onda.

λ / nm	$K/(10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3)$
284	9.3(2)
395	10.5(2)
445	17.4(4)

De los datos de la Tabla 5.2 se obtiene un valor promedio de K : $\bar{K} = 12(3) \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. Tal y como hemos planteado el equilibrio que tiene lugar en medio básico, la constante de basicidad K_b sería la inversa de la constante K : $K_b = 8(2) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Del valor de K_b y teniendo en cuenta que $\text{p}K_a + \text{p}K_b = 14$, concluimos que el $\text{p}K_{a2}$ tiene un valor de: $\text{p}K_{a2} = 9.9(2)$ (el valor bibliográfico es de 9.65)^{81,83}. Si se conocen las energías correspondientes a las transiciones 0-0 de la forma neutra y el catión se puede estimar el valor del $\text{p}K_{a2}$ correspondiente al estado excitado $\text{p}K_{a2}^*$ a partir de la ecuación del ciclo de Förster⁸⁴:

$$\text{p}K_a^* = \text{p}K_a + 2.1 \times 10^{-3} \text{ cm} \times (\tilde{\nu}_N - \tilde{\nu}_P) \quad (5.17)$$

donde $\tilde{\nu}_N$ y $\tilde{\nu}_P$ representan las energías (en cm^{-1}) de las transiciones electrónicas 0-0 de N y P respectivamente.

No es posible obtener las transiciones 0-0 del espectro de absorción de la proflavina, porque las bandas de N y P no muestran estructura vibracional. Sin embargo, se puede estimar $\tilde{\nu}_N - \tilde{\nu}_P$ como la diferencia entre los números de onda de los máximos de absorción de N y P (25320 cm^{-1} y 22470 cm^{-1} respectivamente). Sustituyendo estos valores y el $\text{p}K_{a2}$ (9.9) en la ecuación (5.17) se obtiene que $\text{p}K_{a2}^* = 16$. Este aumento de ~ 6 unidades del $\text{p}K_{a2}$ tras la excitación electrónica implica que la especie N es mucho más básica en el estado excitado que en el fundamental.

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

De acuerdo con los valores del pK_{a1} (-0.04) y pK_{a2} (9.9) obtenidos para esta sustancia, la forma protonada P es estable en un amplio intervalo de pH, de modo que para obtener la especie P en disolución acuosa será suficiente disolver la PF en agua sin necesidad de utilizar un tampón de pH.

Finalmente, en la Figura 5.5 se recogen los espectros de absorción de las tres formas de la PF: N, P y, en el caso del dicatión, de DC+P puesto que, como ya se indicó, no se ha alcanzado la acidez suficiente para protonar totalmente el catión P.

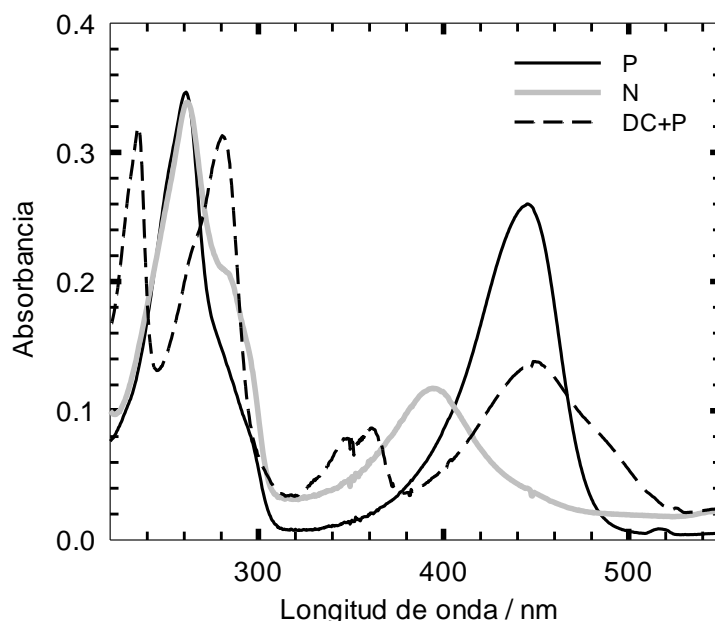


Figura 5.5. Comparación de los espectros de absorción de las especies N, P y DC+P de la proflavina.

5.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROFLAVINA

Las acridinas tienen tendencia a formar agregados en disolución al aumentar su concentración en la misma^{85,86,87,88,89}. La presencia de dímeros y otros agregados además del monómero puede modificar el comportamiento fluorescente de la sonda, por lo que es necesario determinar si el catión y la forma neutra de la PF dan lugar a la formación de agregados y, de ser el caso, en qué condiciones ocurre este proceso. Con este objetivo, en este capítulo se lleva a cabo un estudio detallado de la influencia de la concentración de la proflavina en los espectros de absorción de la sonda, tanto para el catión como para la forma neutra, en agua y etanol.

5.3.1 Agua

Se registró el espectro de absorción de la PF en agua (ver Figura 5.6), condiciones en que está presente como forma protonada P, en una serie en la que se ha ido incrementando progresivamente la concentración de dicho compuesto, desde 2.02×10^{-6} a 6.86×10^{-5} mol dm^{-3} .

La Figura 5.6 muestra que a medida que aumenta la concentración de PF en el medio, la absorbancia de P se ve incrementada y el máximo de absorción de dicha especie, situado en torno a 445 nm, parece no cambiar su posición.

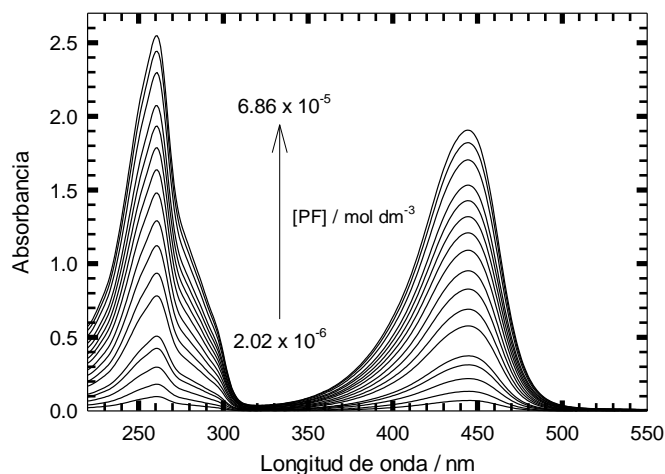


Figura 5.6. Espectros de absorción de proflavina en agua en el intervalo de concentración de PF $2.02 \times 10^{-6} - 6.86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Para comprobar si la relación existente entre la absorbancia de la proflavina y su concentración es lineal, se ha representado la absorbancia frente a la concentración de proflavina a diferentes longitudes de onda (ver Figura 5.7).

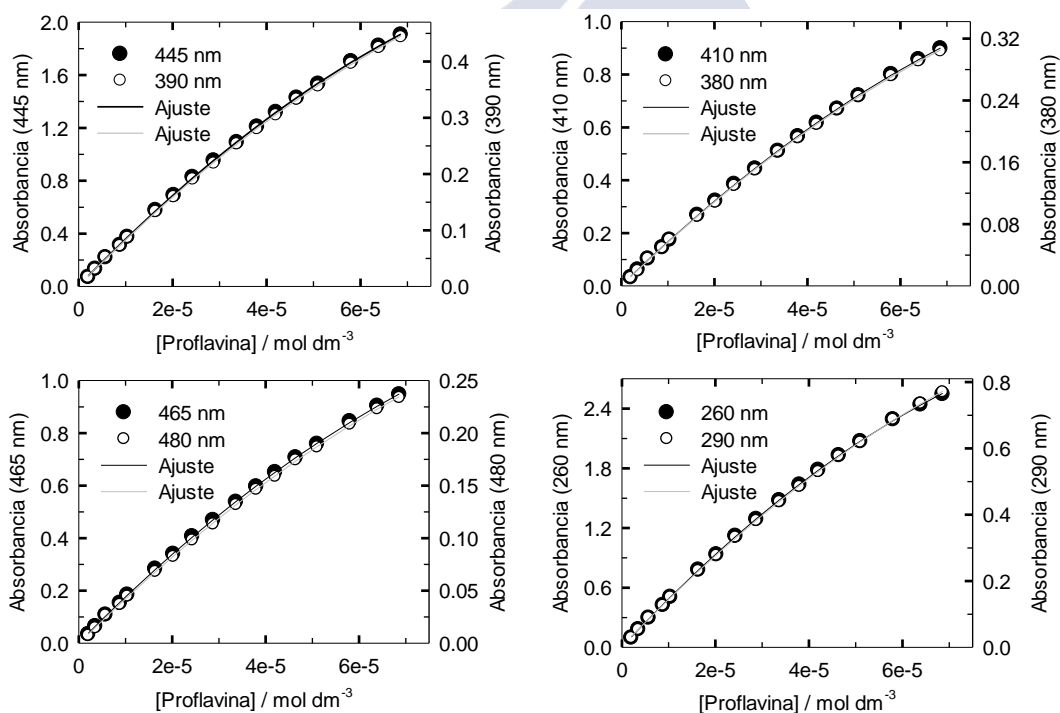


Figura 5.7. Dependencia de la absorbancia experimental de la proflavina con la concentración de PF en agua a diferentes longitudes de onda. Las líneas representan la función polinómica de orden 2 ajustada a los datos.

Podemos observar en la Figura 5.7 que a todas las longitudes de onda mostradas no hay una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de PF y para reproducir los datos experimentales es necesario utilizar una función polinómica de orden dos. Además, en cada gráfica de la Figura 5.7 se muestran datos de absorbancia a dos longitudes de onda: una para la que los valores de absorbancia son altos (eje izquierdo) y otra para la que esos valores son bajos (eje derecho), y se aprecia que ambas series de datos se superponen. Esto permite descartar que la curvatura observada (desviación de la ley de Lambert-Beer) sea originada por trabajar a una absorbancia demasiado alta.

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

La no linealidad entre la absorbancia y la concentración de la sonda debe ser debida a la agregación de la PF. Dadas las bajas concentraciones de esta sustancia ($< 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$) supondremos que se forma únicamente un tipo de agregado dimérico constituido por dos moléculas de forma P de la PF que denominamos PD.

El equilibrio correspondiente a la asociación de dos moléculas de P para formar una molécula de forma protonada dimérica PD viene dado por:



La constante de dimerización K_{PD} será igual a:

$$K_{PD} = \frac{[PD]}{[P]^2} = \frac{x}{(a_0 - 2x)^2} \quad (5.18)$$

donde x es la concentración de dímero y a_0 la concentración total de PF.

Desarrollando el cuadrado del binomio del denominador de la ecuación (5.18) y reagrupando términos llegamos a la siguiente ecuación de segundo grado:

$$4K_{PD}x^2 - x(1 + 4a_0K_{PD}) + K_{PD}a_0^2 = 0 \quad (5.19)$$

Despejando x y resolviendo la ecuación (5.19) se comprobó que la solución correcta es:

$$x = \frac{(1 + 4K_{PD}a_0) - \sqrt{1 + 8a_0K_{PD}}}{8K_{PD}} \quad (5.20)$$

La absorbancia a cualquier longitud de onda vendrá dada por:

$$A^\lambda = A_P^\lambda + A_{PD}^\lambda \quad (5.21)$$

donde A_P^λ y A_{PD}^λ son las absorbancias del catión y del dímero respectivamente.

Asumiendo que tanto P como PD cumplen la ley de Lambert-Beer se obtiene:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda (a_0 - 2x) + \varepsilon_{PD}^\lambda x \quad (5.22)$$

donde ε_P^λ y ε_{PD}^λ son los coeficientes de absorción molar del catión y del dímero catiónico respectivamente.

Reagrupando términos en la ecuación (5.22) obtenemos la ecuación:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda a_0 - x(2\varepsilon_P^\lambda - \varepsilon_{PD}^\lambda) \quad (5.23)$$

Dado que la variación que se observa en los espectros de absorción de la Figura 5.6 es consecuencia de la modificación de la concentración de PF (a_0), la ecuación (5.23) revela que son necesarios dos componentes espectrales (con distinta dependencia de la concentración a_0) para poder reproducir cualquier espectro de absorción experimental de la serie: el espectro del monómero (ε_P) y un segundo espectro ($2\varepsilon_P - \varepsilon_{PD}$) que es combinación de los de P y PD.

Se ha aplicado el método de análisis de componentes principales (PCA) a la serie de espectros de absorción de la proflavina en el intervalo 200 – 550 nm para obtener las matrices de autovectores y de coeficientes que reproducen los espectros experimentales.

Los dos primeros autovectores (V_1 y V_2) y los coeficientes de esos autovectores (Z_1 y Z_2) resultantes del análisis están representados en las Figura 5.8(a) y Figura 5.8(b) respectivamente. Se observa en la Figura 5.8(a) que V_1 presenta la forma del espectro de absorción del catión de la PF, con un coeficiente de participación Z_1 (ver Figura 5.8b) que aumenta significativamente y de forma no lineal con la concentración de la sonda. Por el contrario, el autovector V_2 (ver Figura 5.8b) muestra un coeficiente de participación casi nulo, lo que sugiere que V_2 representa fundamentalmente la contribución a los espectros del ruido y otros errores instrumentales. La Figura 5.8(c) muestra los espectros experimentales y calculados a partir de V_1 y Z_1 para algunas de las concentraciones de proflavina de la serie espectral. Se puede apreciar que un componente es capaz de generar la serie de espectros experimentales con un grado de concordancia muy bueno, por lo que es innecesario considerar el autovector V_2 .

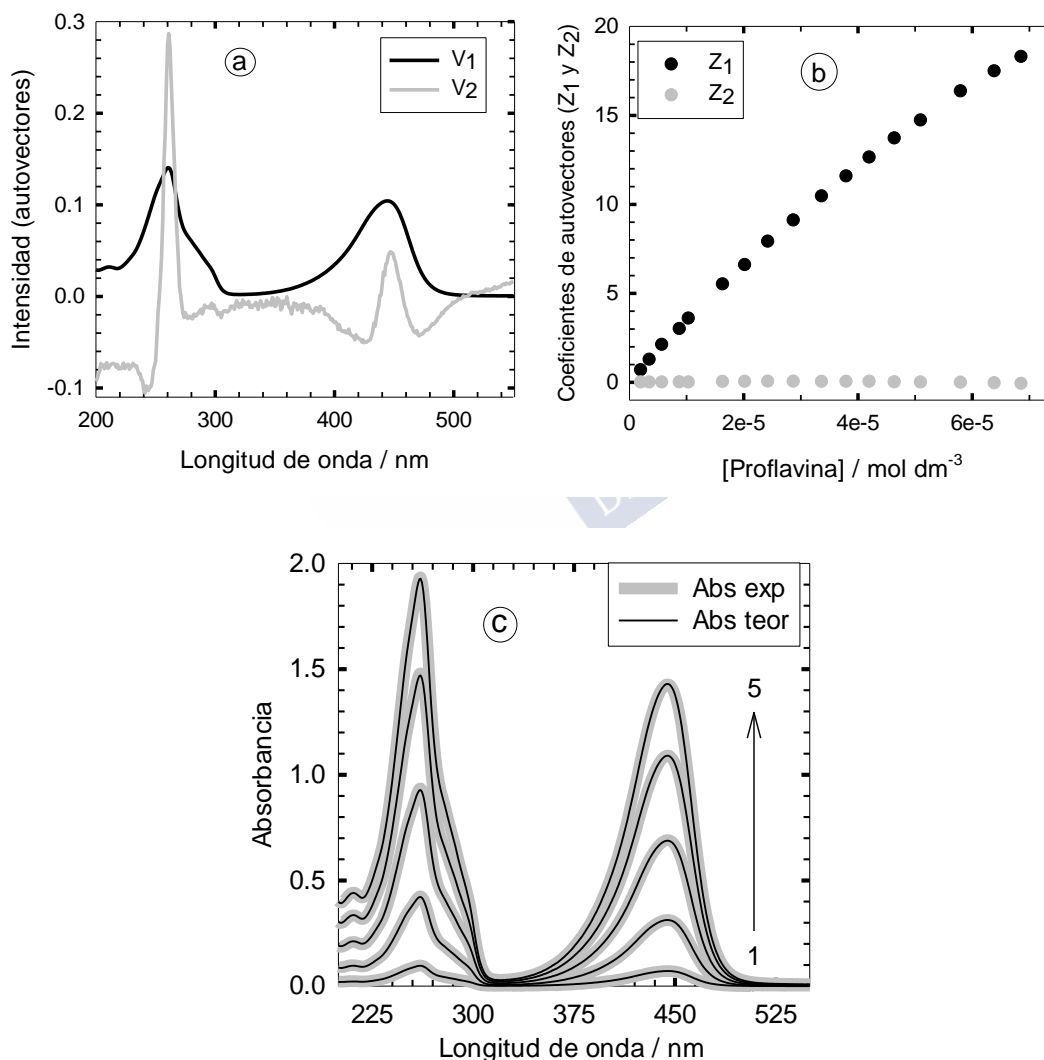


Figura 5.8. Resultados de la aplicación del método PCA a la serie de espectros de absorción de la PF en agua: a) Representación de los dos primeros autovectores V_1 y V_2 en función de λ ; b) Coeficientes Z_1 y Z_2 (asociados a los autovectores V_1 y V_2) frente a la concentración de PF y c) Espectros de absorción experimentales (gris) y calculados a partir del autovector V_1 (negro) para las concentraciones de PF: 2.02×10^{-6} mol dm⁻³ (1), 8.79×10^{-6} mol dm⁻³ (2), 2.02×10^{-5} mol dm⁻³ (3), 3.36×10^{-5} mol dm⁻³ (4) y 4.64×10^{-5} mol dm⁻³ (5).

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

Hemos visto que, de acuerdo con el modelo propuesto, los espectros de absorción experimentales son el resultado de la combinación de las contribuciones espectrales del catión y el dímero. Sin embargo, el análisis PCA indica que un solo componente reproduce todos los espectros experimentales, por lo que se puede concluir que el espectro de absorción del agregado debe ser igual al del catión monomérico (a cualquier λ se cumple que $\epsilon_{PD}^\lambda = \epsilon_P^\lambda$). El hecho de que el catión y el agregado catiónico tengan el mismo espectro de absorción permite descartar que el agregado sea un dímero donde las dos moléculas de PF catiónica se disponen con sus planos moleculares paralelos (tipo “sandwich”), porque en ese caso la interacción π - π resultante provocaría una modificación del coeficiente de absorción molar del catión de la PF, y sugiere que la agregación debe ser el resultado de una interacción débil entre la parte positiva de una molécula de P y un grupo -NH₂ de la segunda molécula de P. Al incidir la radiación sobre un agregado dimérico solo una de las unidades de PF es excitada, por lo que la concentración efectiva de moléculas de P que pueden absorber luz se reduce debido a la agregación.

De acuerdo con lo anterior, teniendo en cuenta la igualdad $\epsilon_{PD}^\lambda = \epsilon_P^\lambda$ la ecuación (5.23) queda:

$$A^\lambda = \epsilon_P^\lambda (a_0 - x) \quad (5.24)$$

Según la ecuación (5.24), cada espectro de absorción de la serie es el producto del espectro del monómero ϵ_P por un coeficiente (concentración) $a_0 - x$, donde a su vez x es función de a_0 y K_{PD} , como se refleja en la ecuación (5.20). Se ha ajustado la ecuación (5.24) a los espectros de absorción experimentales utilizando el método PCGA. La optimización ha proporcionado el espectro del catión monomérico (y del dímero, ya que ambos son iguales) de la PF que se muestra en la Figura 5.9(a) así como los coeficientes experimentales y teóricos representados en la Figura 5.9(b) y un valor de la constante de agregación: $K_{PD} = 2.4(1) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$.

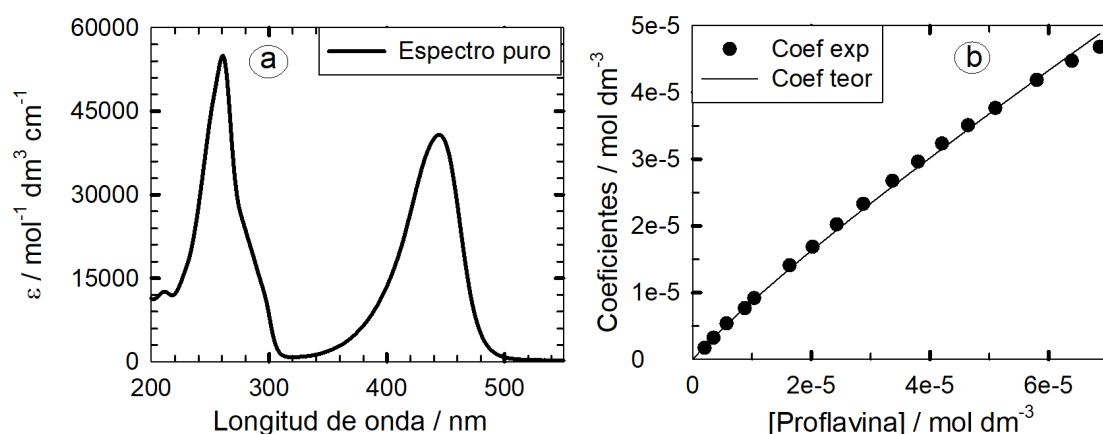


Figura 5.9. Resultados del análisis PCGA de la serie de espectros de absorción de la proflavina en agua: a) Espectro puro obtenido para P y PD y b) Coeficientes experimentales y teóricos (calculados por el modelo) en función de la concentración de PF.

El valor obtenido para el coeficiente de absorción molar del catión monomérico a 445 nm (máximo de la primera banda) fue $4.07 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, concordante con el publicado para el catión de la proflavina ($(3-4.2) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)^{47,90}. Por otra parte, la constante de dimerización del catión de la PF $2.4(1) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ es semejante a la

correspondiente al naranja de acridina^{91,92} ($6.8 \times 10^3 - 1.05 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$), molécula similar a la proflavina, pero con sustituyentes $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ en lugar de grupos amino. Sin embargo, el valor de la constante de agregación es claramente superior que el obtenido para la PF en estudios previos^{47,52,83,90} ($300 - 500 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$). Los distintos autores no realizaron un estudio detallado a concentraciones de la sonda inferiores a $\sim 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, probablemente porque la forma del espectro de absorción de la PF no cambia en disoluciones con concentraciones de sonda tan bajas. Así, para obtener la constante de dimerización realizaron las medidas de absorbancia a concentraciones de PF que generalmente no bajan de $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ y llegan hasta 0.01 mol dm^{-3} y observaron un desplazamiento del espectro de absorción a menor longitud de onda al aumentar la concentración de PF que atribuyeron a la formación de un dímero que debe ser de distinta naturaleza que el agregado detectado en este trabajo.

La Figura 5.10 muestra la contribución de los espectros de P y el agregado PD al espectro de absorción experimental a varias concentraciones de PF. Se puede apreciar como para $[\text{PF}] = 5.71 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ la concentración del dímero es muy baja, mientras que para la concentración más alta de sonda ($6.86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) hay cantidades semejantes de monómero y dímero. Esta información es relevante para los estudios de fluorescencia que se describirán posteriormente. Dado que las medidas de fluorescencia generalmente se realizan en condiciones de $A < 0.1$ se podrá despreciar la contribución del dímero en esos experimentos.

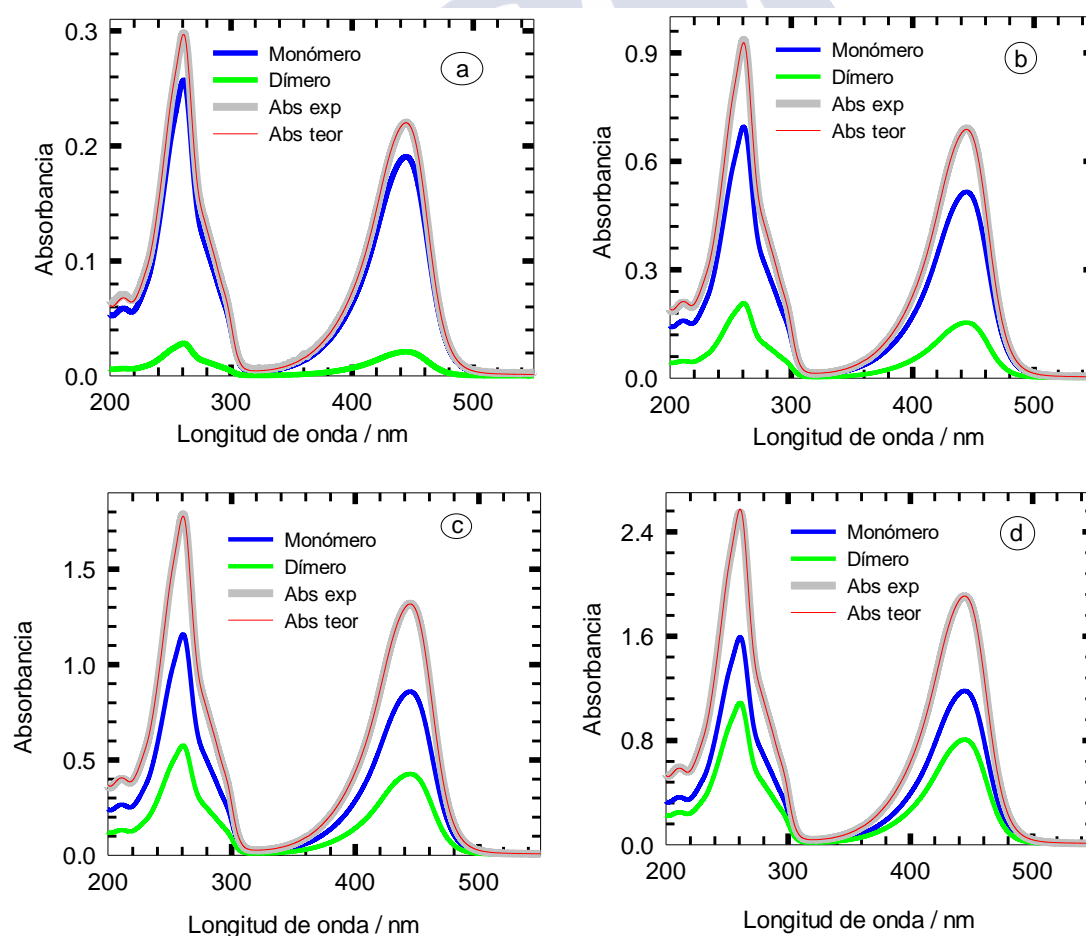


Figura 5.10. Descomposición de algunos de los espectros de absorción de la proflavina en agua. Se muestran el espectro experimental, las contribuciones de P y PD y el espectro teórico suma de ambas contribuciones para las concentraciones de sonda: $5.71 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (a), $2.02 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (b), $4.20 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (c) y $6.86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (d).

5.3.2 Agua en medio básico

La Figura 5.11 muestra el espectro de absorción de la proflavina en agua con una concentración de NaOH $0.010 \text{ mol dm}^{-3}$ en el intervalo de concentración de PF $1.52 \times 10^{-6} - 6.91 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. En estas condiciones de acidez la PF está como forma neutra y, como se aprecia en la figura, la absorbancia aumenta con la concentración de la sonda, pero el máximo de absorción ($\sim 395 \text{ nm}$) parece no cambiar su posición.

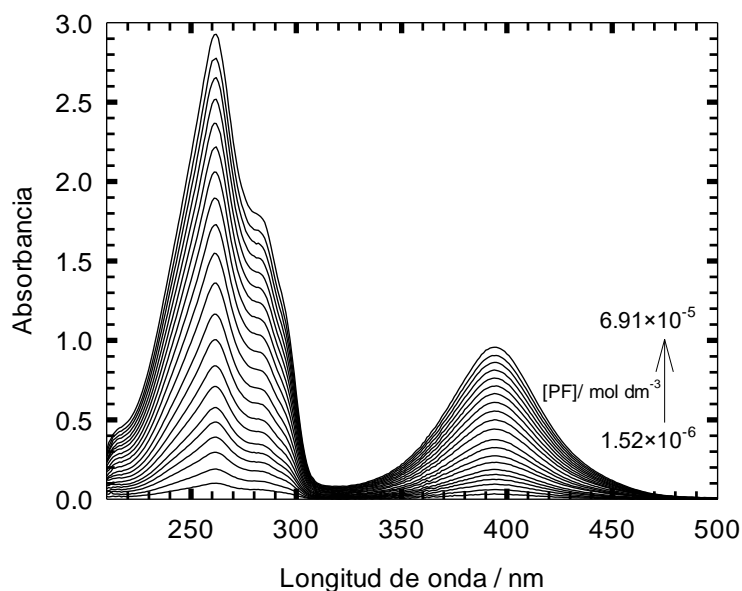


Figura 5.11. Espectros de absorción de la proflavina en agua básica en el intervalo de concentración de PF $1.52 \times 10^{-6} - 6.91 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $[\text{NaOH}] = 0.010 \text{ mol dm}^{-3}$.

La representación de la absorbancia frente a la concentración de la sonda a diferentes longitudes de onda (ver Figura 5.12) muestra, análogamente a lo observado en medio neutro, una relación no lineal incluso a valores de absorbancia menores de 0.1, siendo necesario un polinomio de orden dos para reproducir los datos experimentales. Los mismos argumentos expuestos para explicar la desviación de la linealidad de la absorbancia del catión al aumentar la concentración de PF permiten proponer que la forma N también sufre un proceso de agregación para formar un dímero neutro ND con constante de equilibrio K_{ND} :



Partiendo de la expresión para la constante de equilibrio de agregación K_{ND} y Siguiendo la misma secuencia de pasos descritos previamente para la agregación del catión, se deduce que la absorbancia a cualquier longitud de onda vendrá dada por:

$$A^\lambda = \varepsilon_{\text{N}}^\lambda a_0 - x (2\varepsilon_{\text{N}}^\lambda - \varepsilon_{\text{ND}}^\lambda) \quad (5.25)$$

donde $\varepsilon_{\text{N}}^\lambda$ y $\varepsilon_{\text{ND}}^\lambda$ representan los coeficientes de absorción molar de N y ND respectivamente, a_0 es la concentración total de PF y x la concentración de complejo (ecuación (5.26)).

$$x = \frac{(1 + 4K_{\text{ND}}a_0) - \sqrt{1 + 8a_0K_{\text{ND}}}}{8K_{\text{ND}}} \quad (5.26)$$

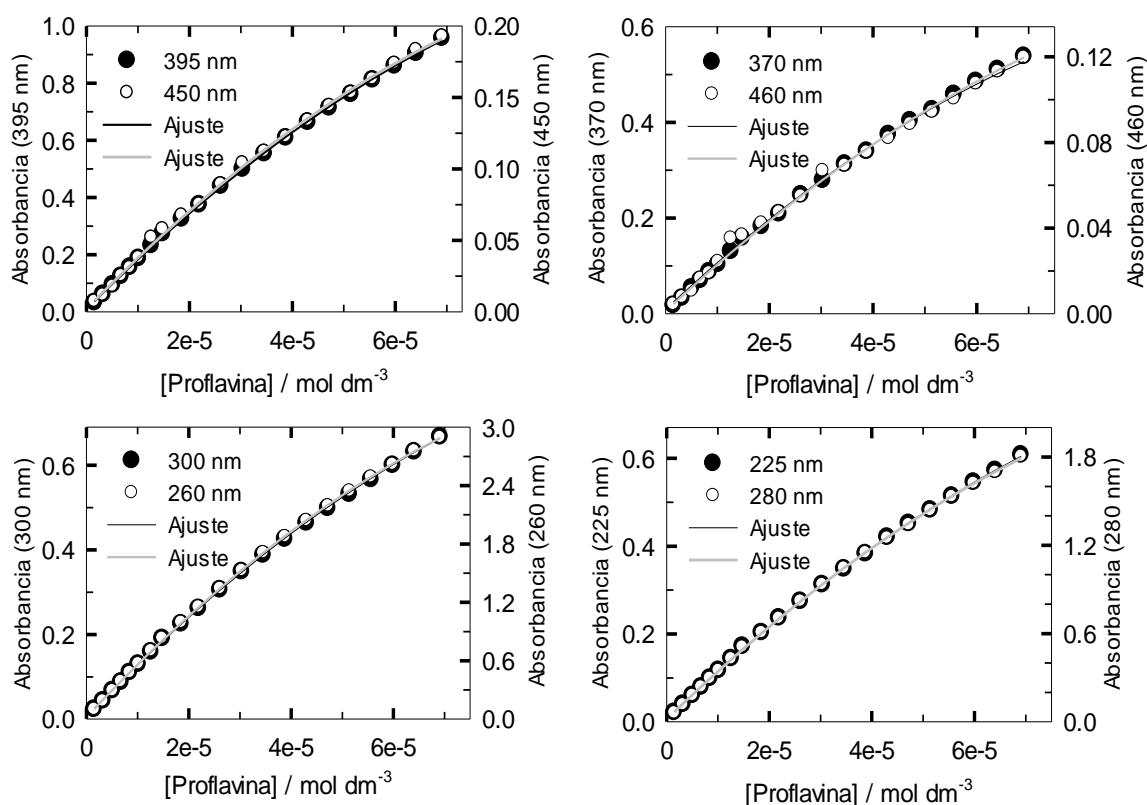


Figura 5.12. Dependencia de la absorbancia experimental de la proflavina en agua básica con la concentración de PF a diferentes longitudes de onda. Las líneas representan la función polinómica de orden 2 ajustada a los datos.

Se analizó la serie de espectros de absorción en el intervalo 200–550 nm mediante el método PCA. La Figura 5.13(a) muestra los dos primeros autovectores (V_1 y V_2) de la matriz mientras que sus coeficientes (Z_1 y Z_2) se representan en la Figura 5.13(b). Al igual que se obtuvo anteriormente para el catión, se aprecia que el coeficiente correspondiente al segundo autovector es despreciable, por lo que se compararon los espectros experimentales con los calculados asumiendo que un solo componente (V_1) es suficiente para reproducir la serie espectral. Como ejemplo se muestran en la Figura 5.13(c) los espectros experimentales y calculados para varias concentraciones de PF. La buena concordancia entre ambos espectros a lo largo de la serie pone de manifiesto que un único componente espectral es capaz de reproducir los espectros experimentales, por lo que podemos concluir que, también para la forma neutra, el agregado tiene el mismo espectro de absorción que el monómero y por tanto la absorbancia a cualquier longitud de onda vendrá dada por:

$$A^\lambda = \epsilon_N^\lambda (a_0 - x) \quad (5.27)$$

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

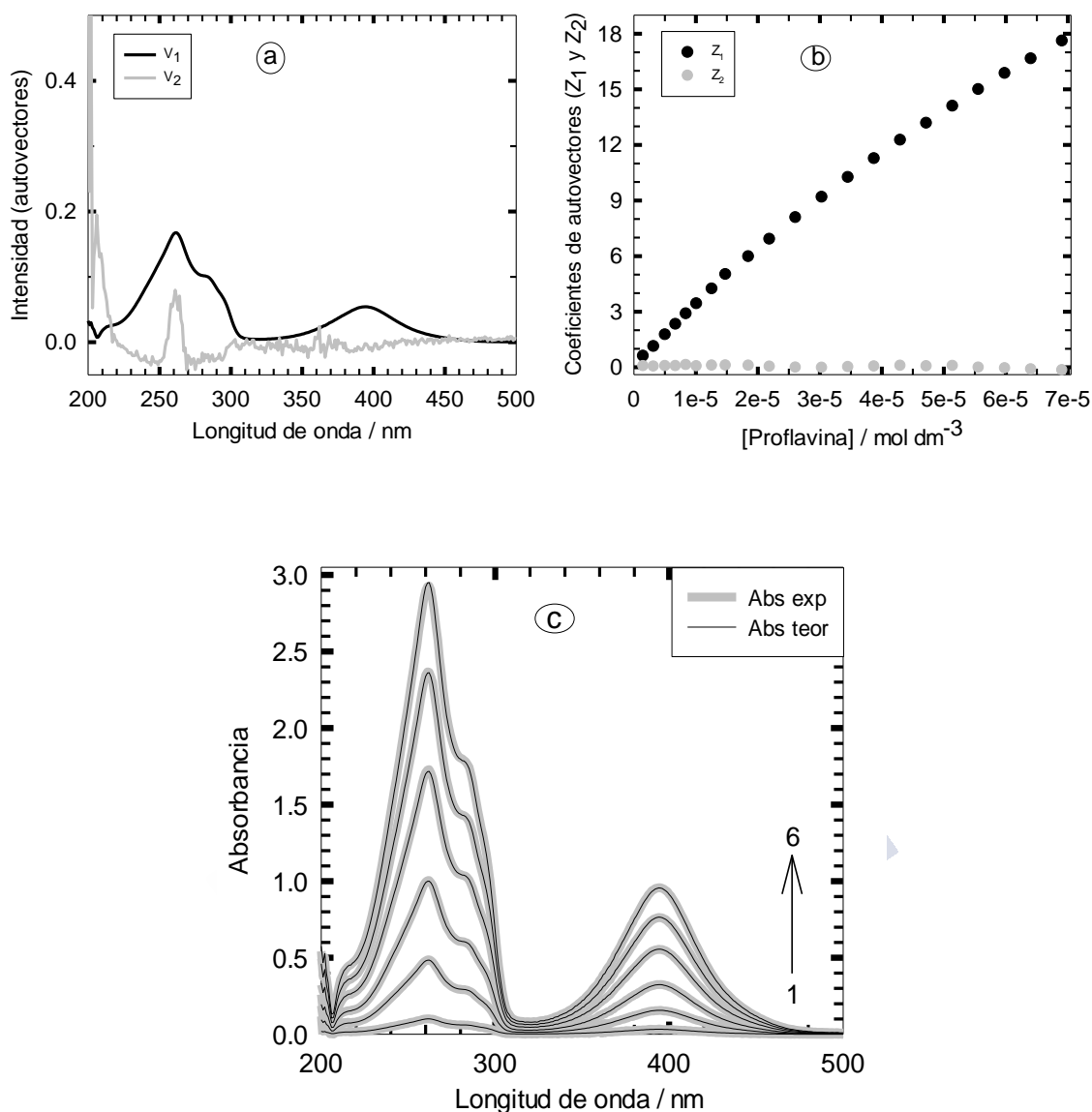


Figura 5.13. Resultados de la aplicación del método PCA a la serie de espectros de absorción de la PF en agua basicada: a) Representación de los dos primeros autovectores V_1 y V_2 en función de λ ; b) Coeficientes Z_1 y Z_2 (asociados a los autovectores V_1 y V_2) frente a la concentración de PF y c) Espectros de absorción experimentales (gris) y calculados a partir del autovector V_1 (negro) para las concentraciones de PF: 1.52×10^{-6} mol dm⁻³ (1), 8.43×10^{-6} mol dm⁻³ (2), 1.85×10^{-5} mol dm⁻³ (3), 3.45×10^{-5} mol dm⁻³ (4), 5.14×10^{-5} mol dm⁻³ (5) y 6.91×10^{-5} mol dm⁻³ (6).

Una vez demostrado que solo hay un componente espectral, la aplicación del método PCGA utilizando la ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración de PF (ecuación (5.27)) permitió obtener el espectro de la forma neutra (y del dímero, ya que son iguales) recogido en la Figura 5.14(a) así como los coeficientes experimentales y teóricos en función de la concentración de PF (ver Figura 5.14b), que muestran una buena concordancia, y la constante de agregación: $K_{ND} = 2.8(2) \times 10^4$ mol⁻¹ dm³. Este valor es muy similar al obtenido para el catión ($2.4(1) \times 10^4$ mol⁻¹ dm³), por lo que la carga de la sonda no parece ser un factor determinante en el proceso de agregación de la PF.

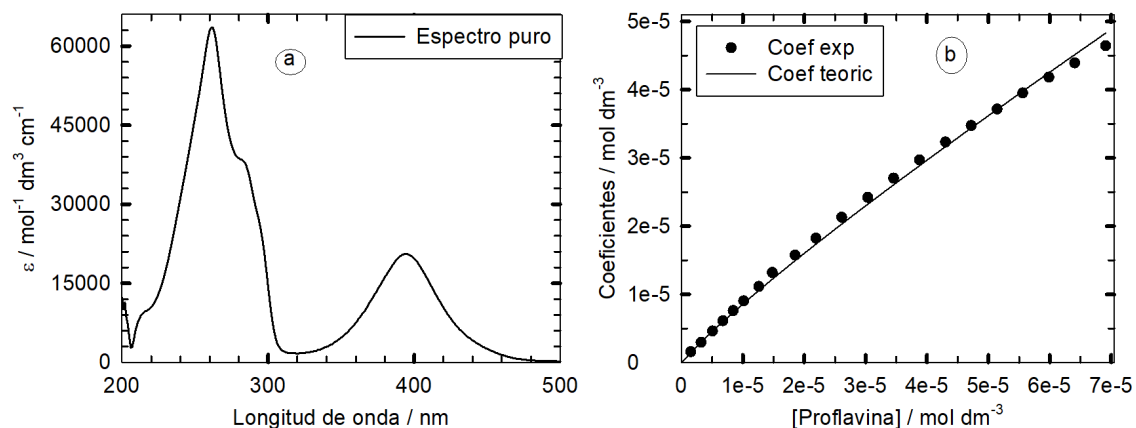


Figura 5.14. Resultados del análisis PCGA de la serie de espectros de absorción de la proflavina en agua basificada: a) Espectro puro obtenido para N y ND; b) Coeficientes experimentales y teóricos (calculados por el modelo) en función de la concentración de PF.

Se ha representado en la Figura 5.15 el espectro de absorción experimental a varias concentraciones de PF junto con las contribuciones de N y ND derivadas del modelo. Se observa que de nuevo hay concentraciones análogas de N y ND a la concentración más alta de PF ($6.91 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), pero la presencia de dímero es muy baja a la concentración más baja analizada ($5.06 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$).

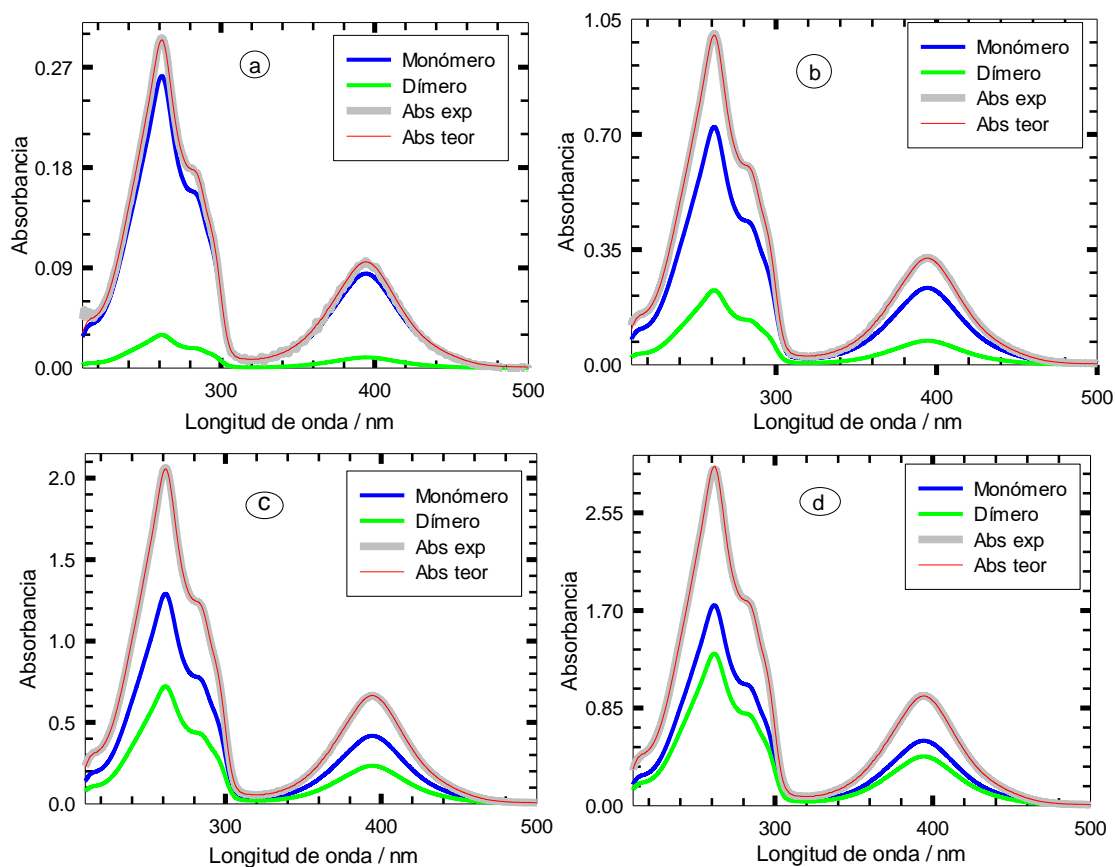


Figura 5.15. Descomposición de algunos de los espectros de absorción de la proflavina en agua básica. Se muestran el espectro experimental, las contribuciones de N y ND y el espectro teórico, suma de ambas contribuciones, para las concentraciones de sonda: $5.06 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (a), $1.85 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (b), $4.30 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (c) y $6.91 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (d).

5.3.3 Etanol

Se estudió también el proceso de dimerización de la PF en etanol. Para ello se registraron los espectros de absorción de la proflavina en este disolvente (ver Figura 5.16) variando la concentración de la sonda desde 2.17×10^{-6} a 6.55×10^{-5} mol dm⁻³.

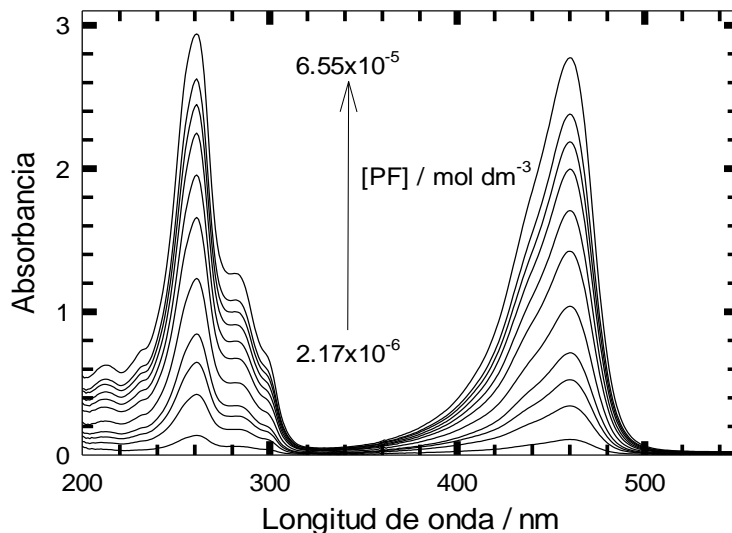


Figura 5.16. Espectros de absorción de la proflavina en etanol en el intervalo de concentración de PF 2.17×10^{-6} – 6.55×10^{-5} mol dm⁻³.

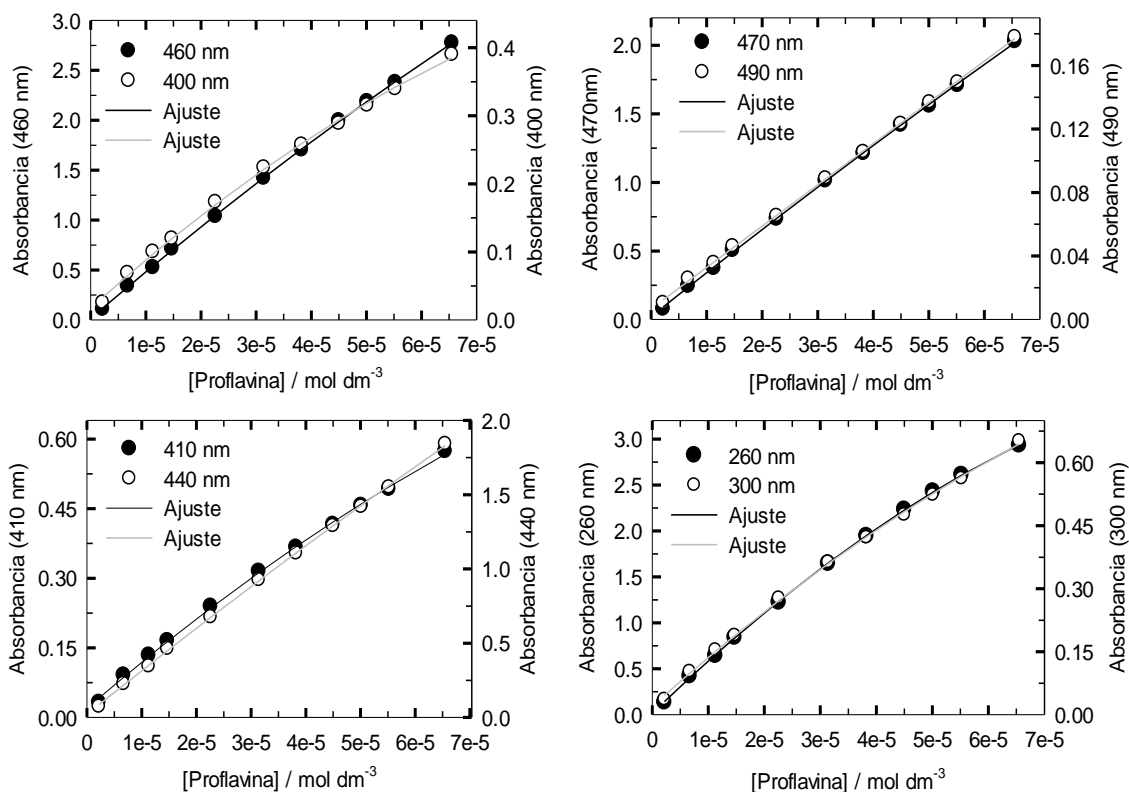


Figura 5.17. Dependencia de la absorbancia experimental de la proflavina en etanol con la concentración de PF a diferentes longitudes de onda. Las líneas representan la función polinómica de orden 2 ajustada a los datos.

Al igual que ocurría en las series realizadas en agua, al aumentar la concentración de PF se produce un incremento de la absorbancia del catión de la PF (ver Figura 5.16) y no se aprecia que ese aumento de absorbancia vaya acompañado de una modificación del espectro. Además, como ya se había observado en agua, la absorbancia no guarda una relación lineal con la concentración de PF (ver Figura 5.17). Sin embargo, en etanol la curvatura de los datos a determinadas longitudes de onda es menos acusada que en las series que se realizaron en agua. Además, contrariamente a lo que ocurría en agua, las curvas no se superponen para algunos de los pares de longitudes de onda representados (ver por ejemplo las de 400 nm y 460 nm en la Figura 5.17). La pequeña diferencia observada parece indicar que en etanol existen dos especies con espectros diferentes. Al igual que en agua, se propone que dos moléculas del catión de la PF se agregan para dar lugar al dímero catiónico PD. De acuerdo con este modelo, la dependencia de la absorbancia a cualquier longitud de onda con la concentración de PF vendrá dada, como para el agua, por:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda a_0 - x (2\varepsilon_P^\lambda - \varepsilon_{PD}^\lambda) \quad (5.28)$$

donde x es función de a_0 y K_{PD} y viene dado por la ecuación (5.20).

Con el fin de dilucidar cuántas componentes son necesarias para reproducir la serie de espectros experimentales de la Figura 5.16 se aplicó al método PCA a dichos espectros en el intervalo 200-550 nm. En la Figura 5.18(a) se han representado los dos primeros autovectores obtenidos, V_1 y V_2 , mientras que la Figura 5.18(b) muestra sus respectivos coeficientes, Z_1 y Z_2 , en función de la concentración de PF. A la vista de los valores de Z_2 se infiere que un solo componente es suficiente para reproducir la serie de espectros de absorción experimentales. Esto se ve corroborado por la buena concordancia observada (ver Figura 5.18(c)) entre los espectros de absorción experimentales y los teóricos calculados a partir de V_1 y Z_1 . De acuerdo con este resultado, también en etanol el espectro del agregado del catión de la PF debe ser igual que el del catión monomérico ($\varepsilon_{PD}^\lambda = \varepsilon_P^\lambda$ en la ecuación (5.28)), por lo que se cumple:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda (a_0 - x) \quad (5.29)$$

Una vez conocida la ecuación del modelo, se utilizó el método PCGA para obtener el espectro puro del catión P (y del dímero), y los coeficientes teóricos ($a_0 - x$), dependientes del valor de K_{PD} , y experimentales que mejor reproducen la serie de espectros de absorción. El espectro obtenido para P se recoge en la Figura 5.19 (a), mientras que la buena coincidencia entre los coeficientes experimentales y teóricos se aprecia en la Figura 5.19(b). El ajuste proporcionó un valor para la constante de agregación: $K_{PD} = 2.08(3) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, muy semejante al obtenido en agua ($2.4(1) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$).

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

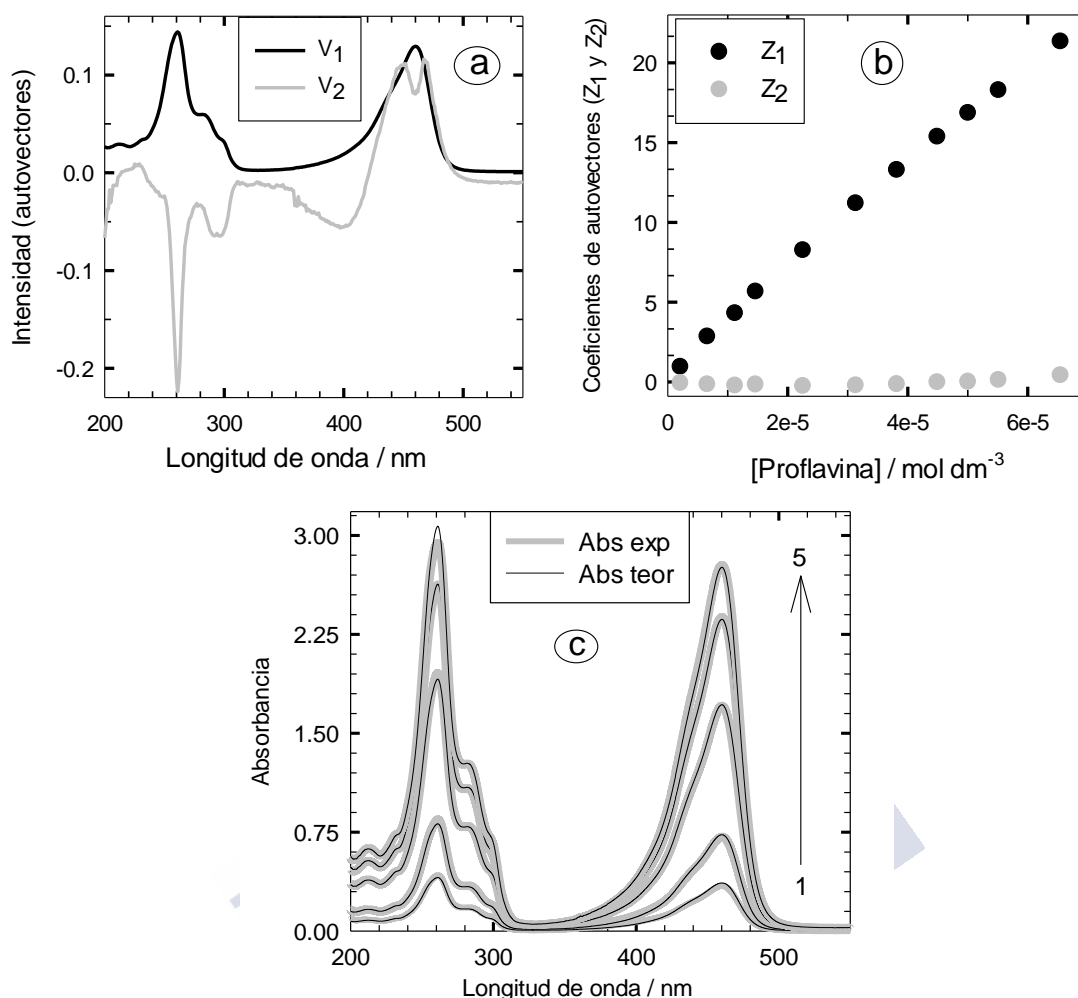


Figura 5.18. Resultados de la aplicación del método PCA a la serie de espectros de absorción de la PF en etanol: a) Representación de los dos primeros autovectores V_1 y V_2 en función de λ ; b) Coeficientes Z_1 y Z_2 (asociados a los autovectores V_1 y V_2) con la concentración de PF y c) Espectros de absorción experimentales (gris) y calculados a partir del autovector V_1 (negro) para las concentraciones de PF: $6.67 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (1), $1.47 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (2), $3.82 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (3), $5.52 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (4) y $6.55 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (5).

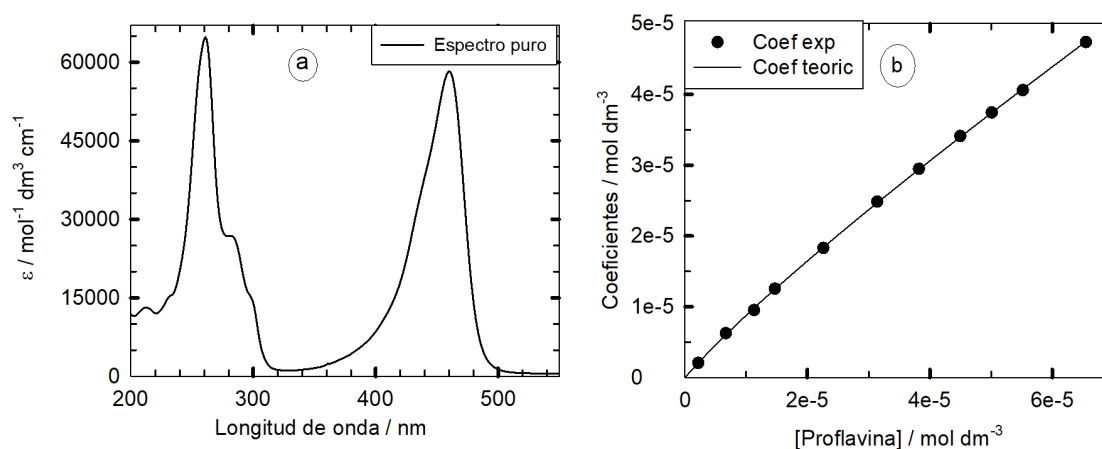


Figura 5.19. Resultados del análisis PCGA de la serie de espectros de absorción de la proflavina en etanol: a) Espectro puro obtenido para P y PD y b) Coeficientes experimentales y teóricos (calculados por el modelo) en función de la concentración de PF.

Finalmente, la Figura 5.20 muestra los espectros de absorción experimentales junto con las contribuciones de P y PD a los mismos y el espectro teórico, suma de las contribuciones, para algunas de las concentraciones de PF de la serie. Se aprecia el aumento de la concentración de dímero al incrementar la concentración de PF y la buena concordancia entre los espectros experimentales y teóricos.

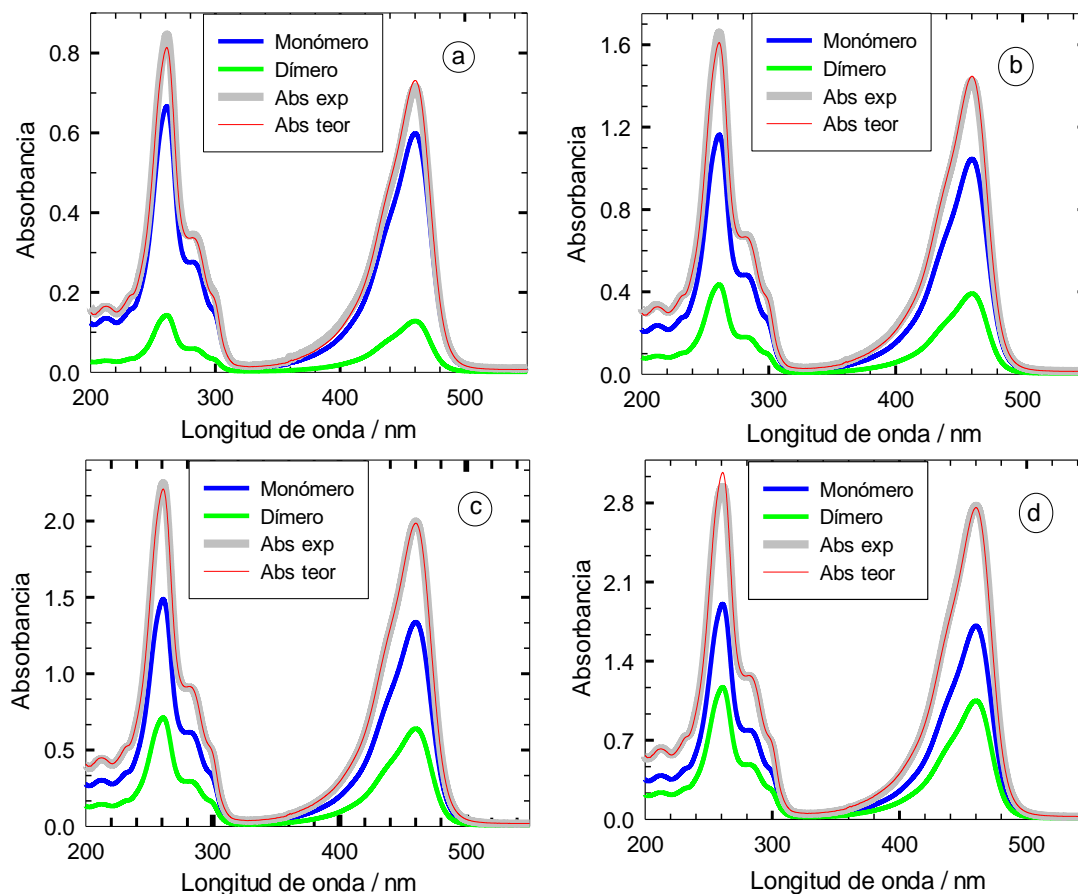


Figura 5.20. Descomposición de algunos de los espectros de absorción de la proflavina en etanol. Se muestran el espectro experimental, las contribuciones de P y PD y el espectro teórico suma de ambas contribuciones para las concentraciones de PF: $1.47 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (a), $3.14 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (b), $4.50 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (c) y $6.55 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (d).

5.3.4 Etanol en medio básico

La Figura 5.21 recoge los espectros de absorción de la proflavina en etanol en presencia de una concentración de NaOH $8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ para el intervalo de concentración de PF $1.58 \times 10^{-6} - 6.57 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Como en agua básica, el aumento de concentración de PF da lugar a un incremento de absorbancia de la forma N de la PF, pero no se observa que la forma del espectro cambie significativamente.

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

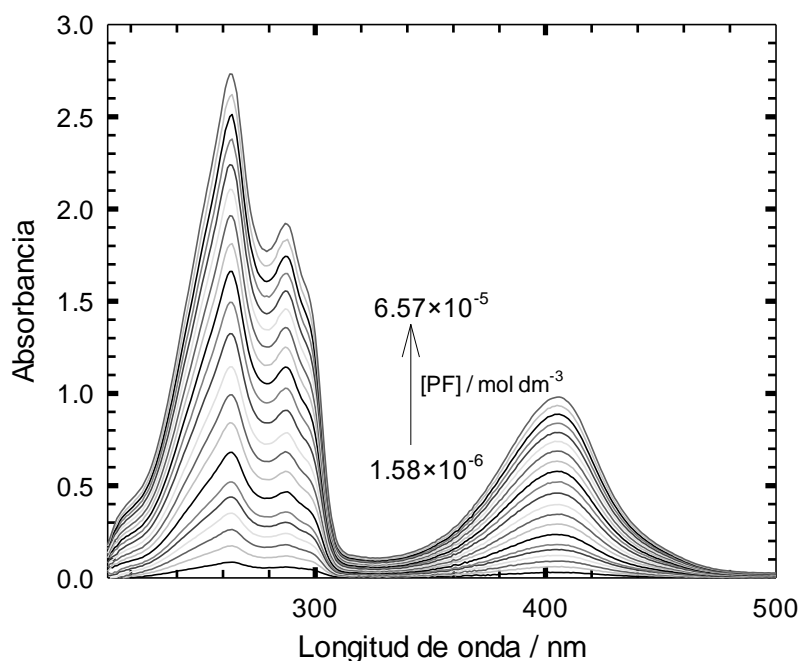


Figura 5.21. Espectros de absorción de la proflavina en etanol basicado en el intervalo de concentración de PF $1.58 \times 10^{-6} - 6.57 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $[\text{NaOH}] = 8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

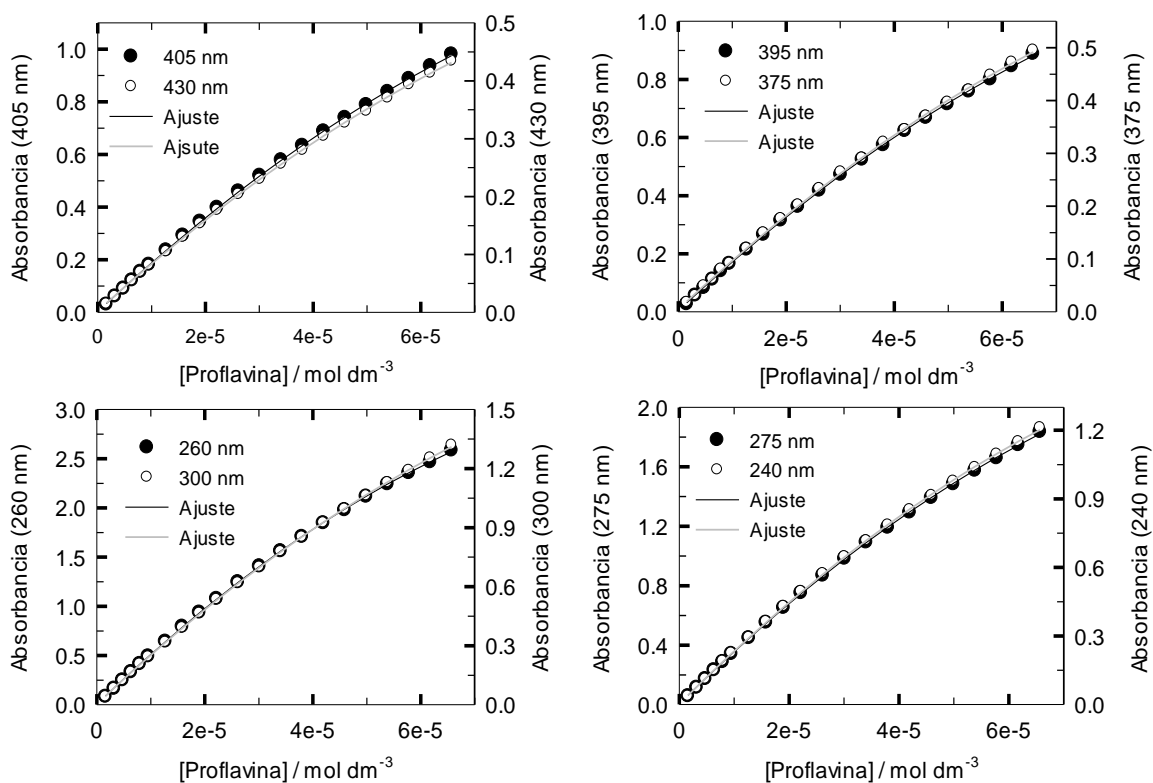


Figura 5.22. Dependencia de la absorbancia experimental de la proflavina en etanol basicado con la concentración de PF a diferentes longitudes de onda. Las líneas representan la función polinómica de orden 2 ajustada a los datos.

De nuevo se puede observar (ver Figura 5.22) que los datos de absorbancia-[PF] no muestran una dependencia lineal, sino que se ajustan a un polinomio de orden 2 y además la desviación de la ley de Lambert-Beer ocurre tanto a valores de absorbancia altos como bajos. La analogía entre el comportamiento observado para la especie N en etanol y agua nos permite proponer que también en etanol dos moléculas de N dan lugar a la formación del agregado ND. La dependencia de la absorbancia con la concentración de PF, a_0 , deducida anteriormente para el caso del agua, será:

$$A^\lambda = \varepsilon_N^\lambda a_0 - x (2\varepsilon_N^\lambda - \varepsilon_{ND}^\lambda) \quad (5.30)$$

donde x depende de a_0 y K_{ND} de acuerdo con la ecuación (5.26).

En la Figura 5.23 se muestran los resultados de aplicar el análisis de PCA a los espectros de absorción de la Figura 5.21. Se han representado solo los dos primeros autovectores, V_1 y V_2 (parte a), y sus coeficientes de participación, Z_1 y Z_2 (parte b). El hecho de que el coeficiente Z_2 del autovector V_2 sea casi nulo y que los espectros experimentales muestren una buena concordancia con los calculados a partir únicamente del componente V_1 (ver parte c de la Figura 5.23) permite concluir, como para el agua, que un solo componente es suficiente para reproducir los espectros experimentales de la serie y que por lo tanto el agregado ND tiene el mismo espectro de absorción que N. De acuerdo con esto, la ecuación (5.30) se convierte en:

$$A^\lambda = \varepsilon_N^\lambda (a_0 - x) \quad (5.31)$$

Una vez definido el modelo de agregación y conocida la ecuación teórica que liga la absorbancia con la concentración de PF (ecuación (5.31)) se utilizó el método PCGA para obtener el espectro de N y el agregado (Figura 5.24a) así como los coeficientes experimentales y teóricos (concentraciones) en función de la concentración de PF (Figura 5.24b). Se observa en la Figura 5.24(b) que hay una buena concordancia entre los coeficientes experimentales y teóricos, lo que confirma el modelo propuesto. La optimización condujo a un valor para la constante de dimerización: $K_{ND} = 2.5(1) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. La constante de agregación obtenida es muy semejante a la correspondiente al catión en etanol ($2.08(3) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$), por lo que, como ocurría en agua, la carga de la PF no parece jugar un papel relevante en el proceso de dimerización de la sonda.

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

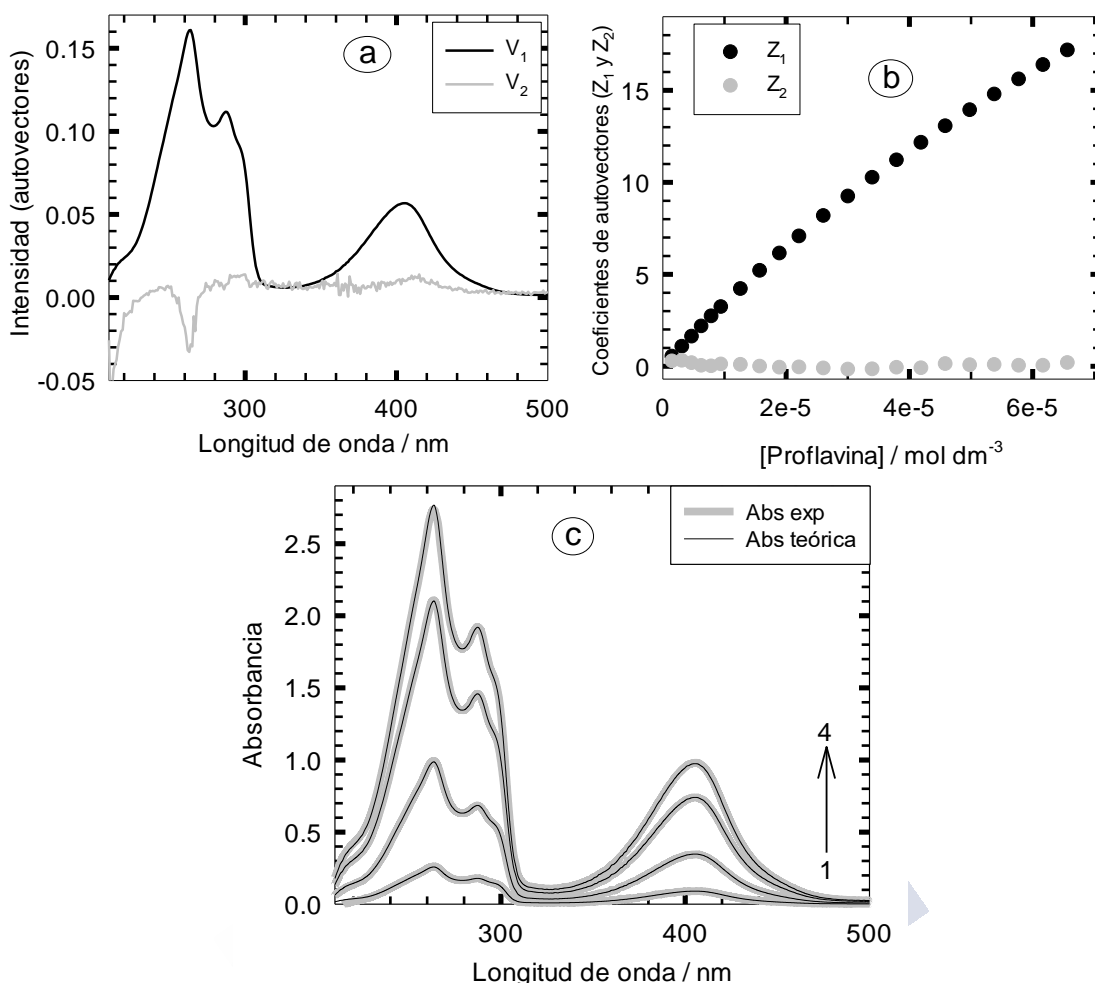


Figura 5.23. Resultados de la aplicación del método PCA a la serie de espectros de absorción de la PF en etanol basicado: a) Representación de los dos primeros autovectores V_1 y V_2 en función de λ ; b) Coeficientes Z_1 y Z_2 (asociados a los autovectores V_1 y V_2) con la concentración de PF y c) Espectros de absorción experimentales (gris) y calculados a partir del autovector V_1 (negro) para las concentraciones de PF: $4.75 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (1), $1.90 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (2), $4.59 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (3) y $6.57 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (4).

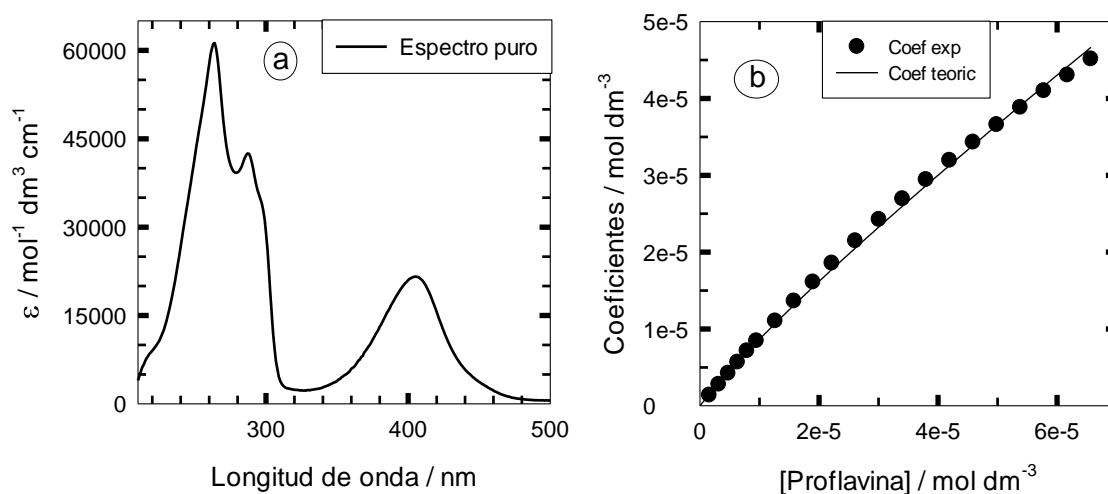


Figura 5.24. Resultados del análisis PCGA de la serie de espectros de absorción de la proflavina en etanol basicado: a) Espectro puro obtenido para N y ND y b) Coeficientes experimentales y teóricos (calculados por el modelo) en función de la concentración de PF.

Finalmente, se muestra en la Figura 5.25 el espectro de absorción experimental a varias concentraciones de PF junto con las contribuciones de N y ND y el espectro teórico (suma de las contribuciones) calculados a partir del modelo. Se aprecia en la figura la buena concordancia entre los espectros de absorción experimental y calculado a todas las concentraciones de PF y que la contribución del agregado es muy baja para $[PF] < 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} , pero es significativa a medida que la concentración de PF aumenta por encima de ese valor.

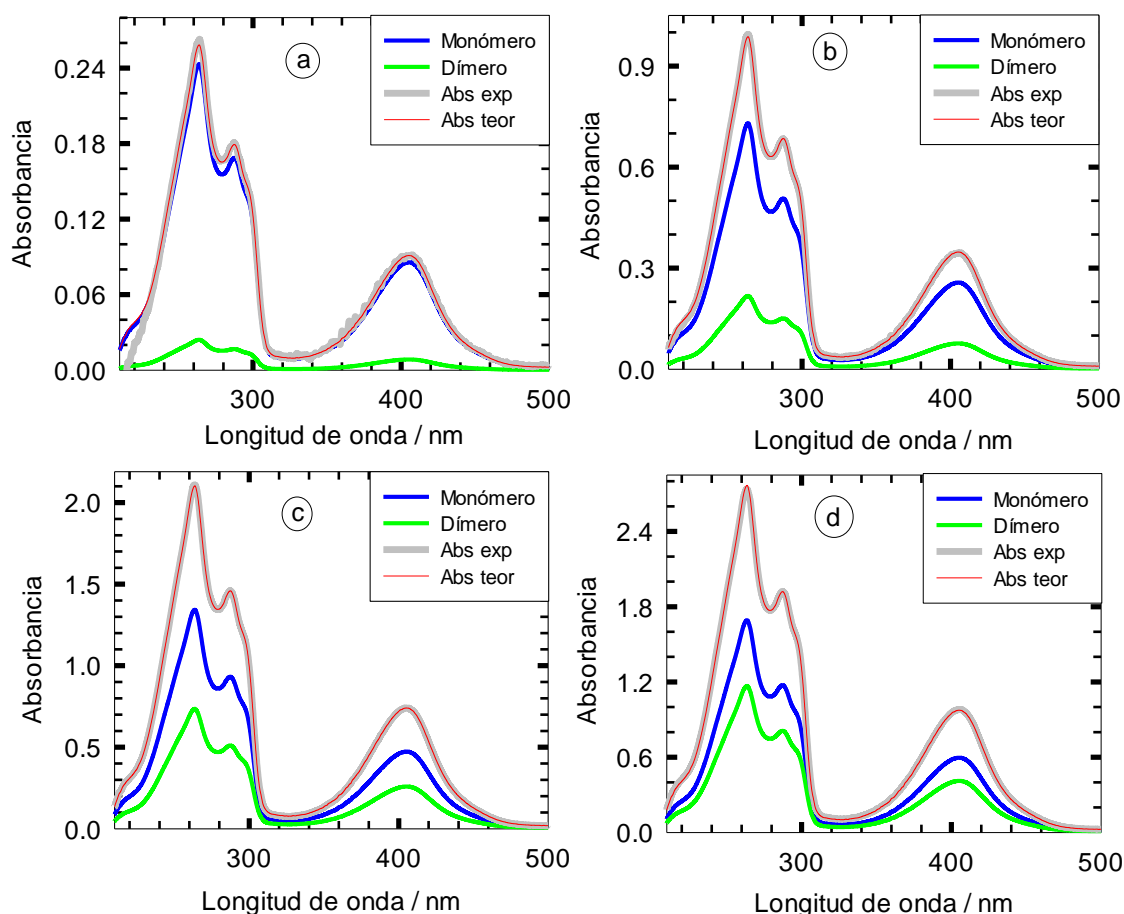


Figura 5.25. Descomposición de algunos de los espectros de absorción de la proflavina en etanol basificado. Se muestran el espectro experimental, las contribuciones de N y ND y el espectro teórico suma de ambas contribuciones para las concentraciones de PF: 4.57×10^{-6} mol dm^{-3} (a), 1.90×10^{-5} mol dm^{-3} (b), 4.59×10^{-5} mol dm^{-3} (c) y 6.57×10^{-5} mol dm^{-3} (d).

5.4 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA PROFLAVINA EN VARIOS DISOLVENTES

La Figura 5.26 muestra los espectros de absorción de la proflavina en agua, etanol, metanol, 1-propanol, acetonitrilo y dimetilsulfóxido. Como se discutió en el apartado 5.1, la especie responsable de los espectros en todos los disolventes es la forma protonada P.

5. Caracterización de la proflavina: espectros de absorción

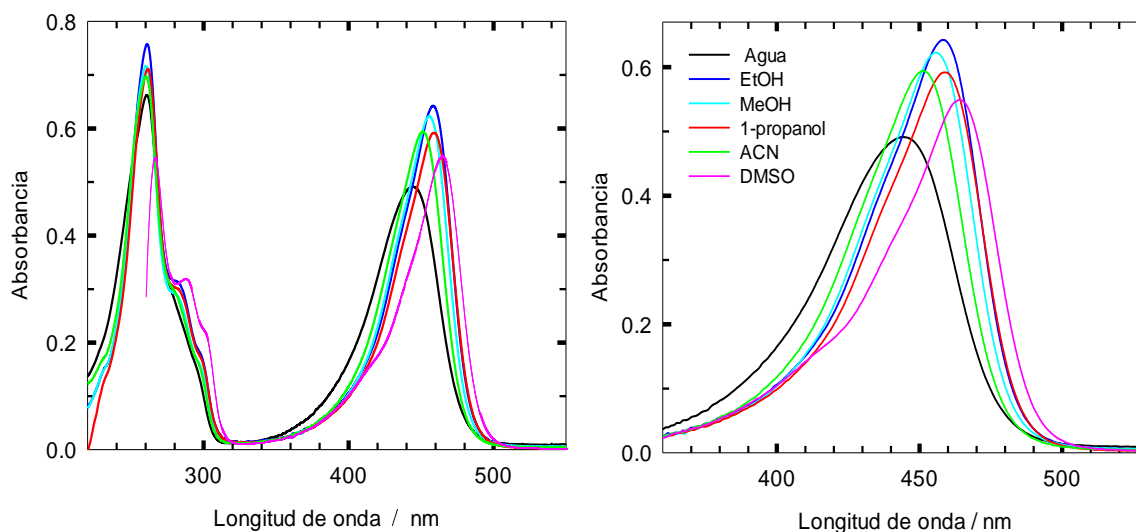


Figura 5.26. Espectros de absorción de la proflavina en diferentes disolventes. $[PF] = 1.72 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Para poder realizar la comparación de los distintos disolventes se han representado los espectros de absorción normalizados en el máximo (Figura 5.27) y se han recogido en la Tabla 5.3 los máximos de la primera banda de absorción en los distintos disolventes junto con el valor de la constante dieléctrica relativa ϵ_r a 25 °C de cada uno de ellos. Se observa que a medida que aumenta la polaridad del disolvente, la banda de absorción de P se desplaza ligeramente hacia longitudes de onda menores (hacia el azul), excepto para el dimetilsulfóxido. El espectro obtenido en DMSO es el que muestra el máximo a mayor longitud de onda (464 nm) a pesar de que este disolvente es más polar que los alcoholes y el acetonitrilo. Esto sugiere que el dimetilsulfóxido da lugar a alguna interacción específica con el catión de la proflavina.

Tabla 5.3. Longitud de onda del máximo de la primera banda de absorción de la proflavina en agua, metanol, etanol, 1-propanol, acetonitrilo y dimetilsulfóxido junto con el valor⁹³ de la constante dieléctrica relativa ϵ_r de cada disolvente a 25 °C.

Disolvente	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} / \text{nm}$	ϵ_r
Agua	445	78.36
Dimetilsulfóxido	464	46.45
Acetonitrilo	451	35.94
Metanol	456	32.66
Etanol	458	24.55
1-propanol	459	20.45

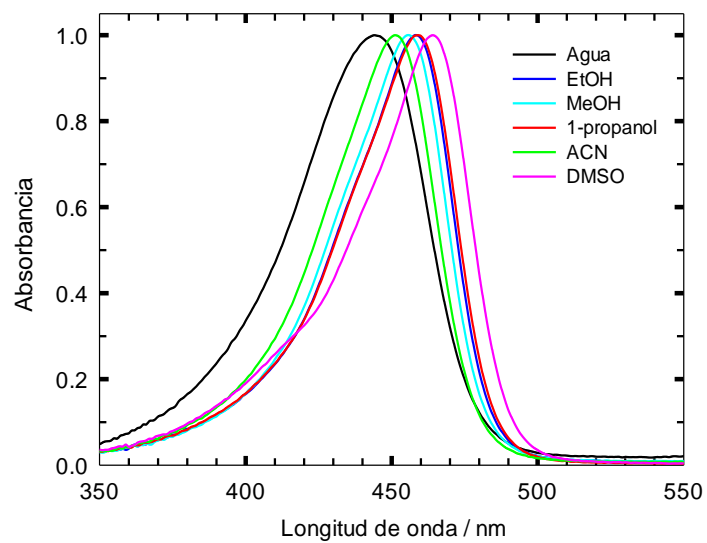


Figura 5.27. Espectros de absorción (primera banda) normalizados en el máximo de la proflavina en diferentes disolventes. $[PF] = 1.72 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.



6. CARACTERIZACIÓN DE LA PROFLAVINA: ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

6.1 FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO EN DISTINTOS DISOLVENTES

6.1.1 Agua

Los espectros de emisión y excitación (normalizados en el máximo) de la proflavina en agua se muestran en la Figura 6.1. Se observa una única banda de emisión (en torno a 510 nm) y de excitación y ambos espectros fueron independientes de las longitudes de onda de detección, lo que implica que hay una sola especie tanto en el estado fundamental como en el excitado. Además, el espectro de excitación se superpone con el de absorción de la forma P de la proflavina, por lo que la especie que se excita es dicho catión. Por otra parte, vemos que la banda de emisión se solapa con su espectro de excitación, debido a P, lo que nos indica que la excitación de P conduce a P*, que emite fluorescencia.

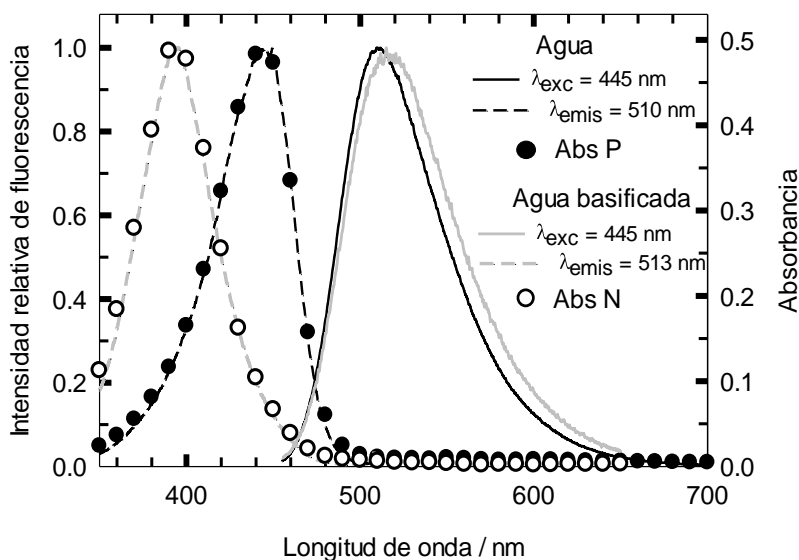


Figura 6.1. Espectros de absorción, excitación y emisión, normalizados en el máximo, de la proflavina en agua y agua basificada. $[PF]=5.74 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[NaOH]=1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Para obtener los espectros de fluorescencia en condiciones en que la PF está como forma neutra, se añadió a la disolución de dicha sonda en agua y en los otros disolventes estudiados la cantidad de NaOH que fue necesaria para obtener el espectro de absorción de N. Con el fin de garantizar que la forma P de la proflavina se hallaba totalmente desprotonada se comprobó además que el espectro de absorción permanecía constante al incrementar más la concentración de sosa. Los espectros de excitación y emisión obtenidos en estas condiciones (Figura 6.1) fueron invariantes con la longitud de onda de detección y presentan una sola banda, por lo que podemos decir que tanto en el estado fundamental como en el excitado hay una única especie. Además, el espectro de excitación coincide con la banda de absorción de la forma neutra de la proflavina por lo que debe corresponder a N. La banda de emisión, con máximo en torno a 517 nm, apenas se solapa con el espectro de excitación de N, dando lugar a un desplazamiento de Stokes

respecto a su espectro de excitación significativamente mayor que el observado en medio neutro. Esto indica que la especie emisora es diferente que la que se excita, por lo que la forma neutra debe sufrir algún cambio estructural en el estado excitado. En el apartado 5.2 se estimó que el valor del pK_{a2} de la proflavina (9.9) aumenta unas 6 unidades en el estado excitado ($pK_{a2}^* \sim 16$), indicando que la forma neutra es mucho más básica tras la excitación electrónica y tendrá tendencia a protonarse en el estado excitado en presencia de especies próticas. Teniendo en cuenta esto, y que el espectro de emisión registrado tras excitar N es casi coincidente con el del catión P^* , se llega a la conclusión de que, tras la excitación, la especie N^* es protonada por el agua en el N del anillo aromático para dar el catión. El pequeño desplazamiento observado entre el espectro de P^* obtenido tras excitar N (agua básica) y el registrado para P^* en agua tras la excitación directa de P se debe a que una pequeña fracción de moléculas de P^* se desprotonan en el grupo $-NH_2$ en presencia de los iones OH^- , conduciendo a un zwitterión, que emite a mayor longitud de onda que la forma protonada⁵⁸.

6.1.2 Etanol

Los espectros de emisión y excitación de la proflavina en etanol se muestran en la Figura 6.2 junto con el espectro de absorción de P en el mismo disolvente. Los espectros en etanol y etanol basificado exhiben las mismas características generales que los obtenidos en agua y agua basificada respectivamente. Por ello, los mismos argumentos expuestos en el apartado 6.1.1 permiten concluir que la excitación de P en etanol neutro conduce a la emisión de P^* , cuya banda de emisión se sitúa en torno a 494 nm. Análogamente, en etanol basificado la especie que se excita es la forma neutra, que, como en disolución acuosa, debe protonarse en el estado excitado para dar P^* . Además, P^* se desprotona en parte para dar el zwitterión, de modo que la banda de emisión obtenida, con máximo a ~ 505 nm, corresponde a la emisión de ambas especies.

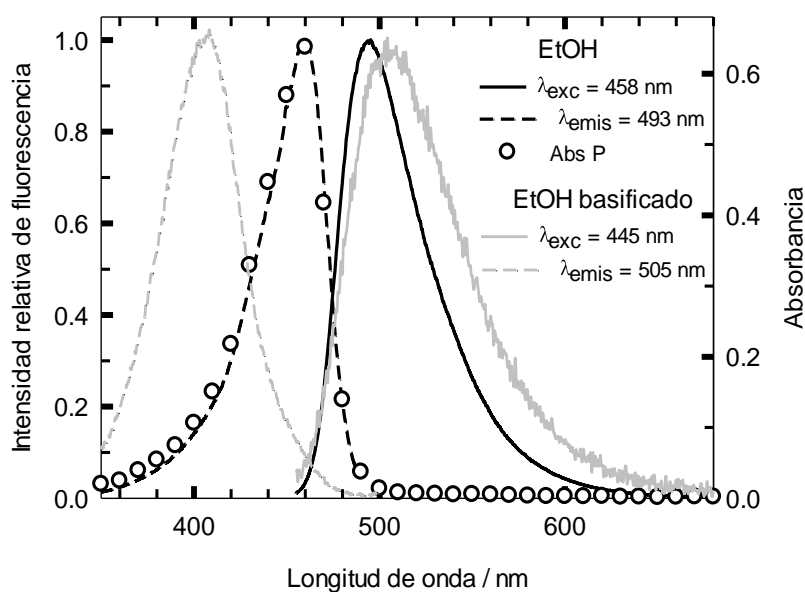


Figura 6.2. Espectros de excitación y emisión, normalizados en el máximo, de la proflavina en etanol y etanol basificado junto con el espectro de absorción del catión de la PF en etanol. $[PF]=5.60 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[NaOH]=1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

6.1.3 Metanol

La Figura 6.3 recoge los espectros de emisión y excitación de fluorescencia de la proflavina registrados en metanol. La analogía entre estos espectros y los obtenidos para P en etanol permite asignar los espectros de la Figura 6.3 también al catión, cuya banda de emisión se sitúa en torno a 496 nm.

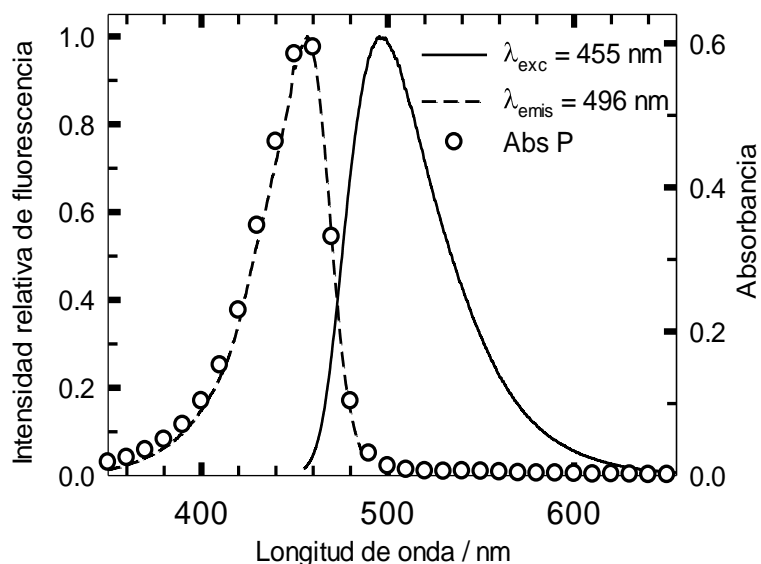


Figura 6.3. Espectros de absorción, excitación y emisión, normalizados en el máximo, de la proflavina en metanol. $[PF]=5.25 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

6.1.4 1-Propanol

En la Figura 6.4 se han representado los espectros de absorción, emisión y excitación de fluorescencia de la proflavina en 1-propanol. Al igual que para los otros alcoholes estudiados, los espectros obtenidos se deben al catión de la proflavina, que en 1-propanol muestra una banda de emisión con máximo en torno a 495 nm.

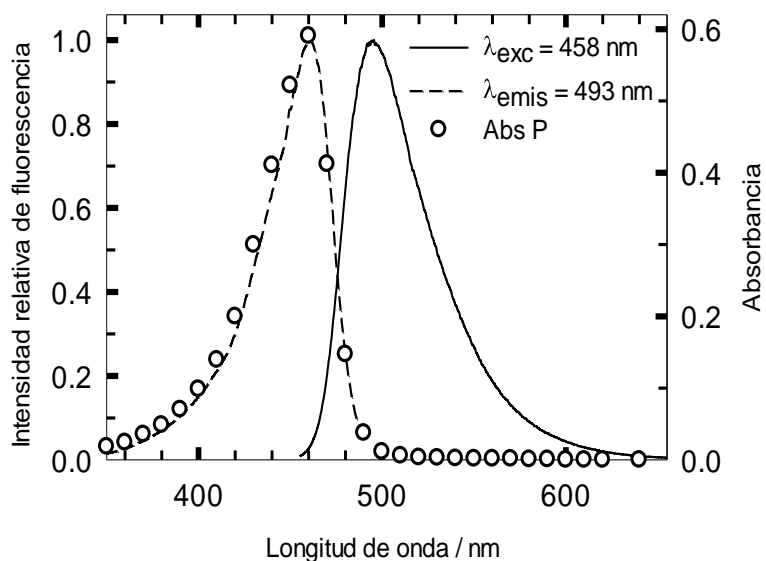


Figura 6.4. Espectros de absorción, excitación y emisión, normalizados en el máximo, de la proflavina en 1-propanol. $[PF]=5.33 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

6.1.5 Acetonitrilo

Los espectros de absorción, emisión y excitación de fluorescencia de la proflavina en acetonitrilo se recogen en la Figura 6.5. Se observa que de nuevo los espectros registrados muestran características análogas a los obtenidos en agua y alcoholes por lo que corresponden también al catión. Se aprecia que en acetonitrilo la banda de emisión se sitúa a ~ 497 nm.

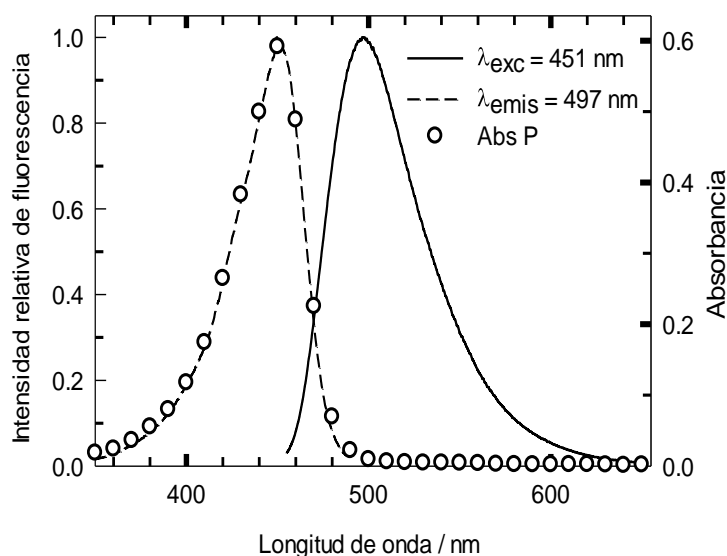


Figura 6.5. Espectros de absorción, excitación y emisión, normalizados en el máximo, de la proflavina en acetonitrilo. $[PF]=5.52 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

6.1.6 Dimetilsulfóxido

La Figura 6.6 muestra los espectros de absorción, emisión y excitación de fluorescencia de la proflavina en dimetilsulfóxido (DMSO) y DMSO basificado. Como en el resto de los disolventes estudiados, los espectros registrados en DMSO corresponden al catión de la proflavina, que presenta una banda de emisión con máximo a ~ 505 nm.

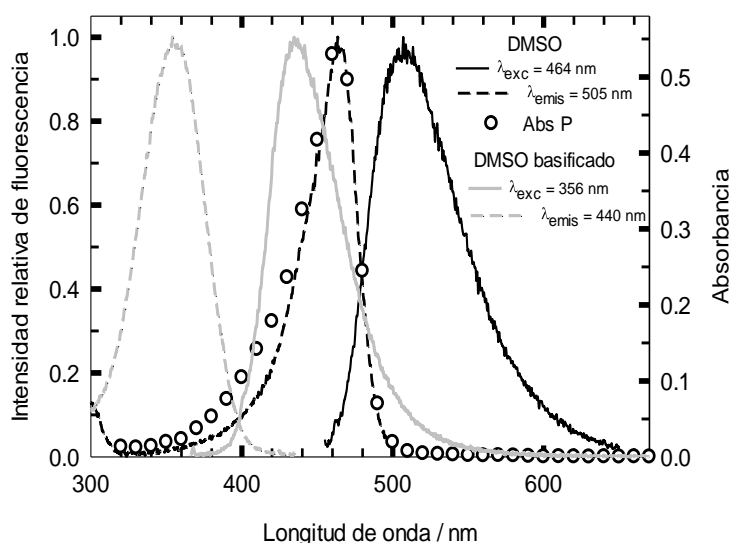


Figura 6.6. Espectros de absorción, excitación y emisión, normalizados en el máximo, de la proflavina en DMSO y DMSO basificado. $[PF]=4.55 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[NaOH] \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

En DMSO basificado (Figura 6.6) la banda de emisión registrada, con máximo a ~ 436 nm, muestra un gran desplazamiento hacia el azul respecto al espectro de emisión del catión en este mismo disolvente. Esto indica que, contrariamente a lo que ocurría en agua y etanol basificados, en DMSO la forma N^* no se protona en el estado excitado para dar el catión, como era de esperar dado que el DMSO es un disolvente aprótico, por lo que se detecta la emisión de N^* . Además, las bandas de excitación y emisión obtenidas para N apenas se solapan y el espectro de excitación de N muestra un gran desplazamiento al azul con respecto a los obtenidos en agua y etanol (Figura 6.1 y Figura 6.2 respectivamente). Esto podría ser debido a una fuerte interacción específica de la proflavina con el DMSO, probablemente enlace de hidrógeno entre los grupos amino y el oxígeno del DMSO.

En la Figura 6.7, se muestran los espectros de emisión, normalizados en el máximo, de la forma P^* de la proflavina en los distintos disolventes para poder analizar el efecto del disolvente en dichos espectros.

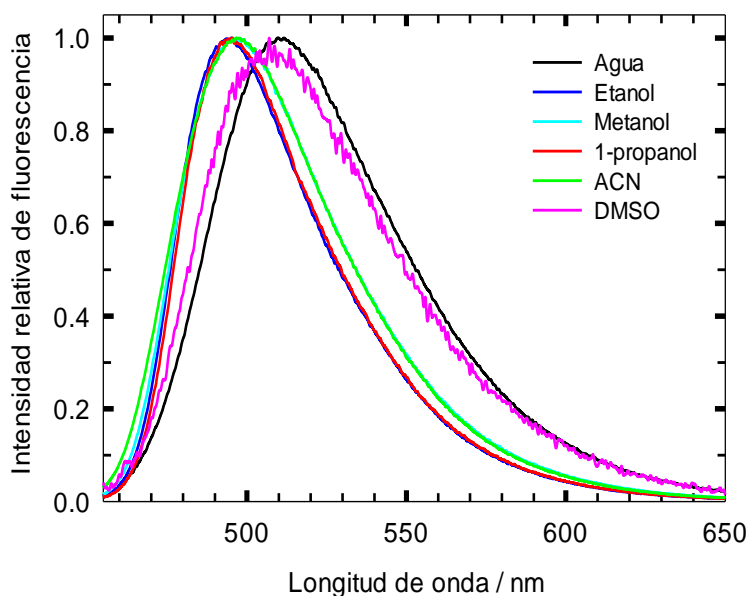


Figura 6.7. Espectros de emisión de fluorescencia, normalizados en el máximo, de la forma P^* de la proflavina en diferentes disolventes.

Observamos que los espectros de emisión de P^* en metanol, etanol y 1-propanol son prácticamente coincidentes y el máximo del espectro de emisión aumenta ligeramente en el orden: alcoholes (495 nm) < acetonitrilo (497 nm) < DMSO (505 nm) < agua (510 nm), orden en el que se eleva la constante dieléctrica ϵ_r de estos disolventes (ver Tabla 5.3). Esto pone de manifiesto que el espectro de emisión de P^* muestra un desplazamiento al rojo al aumentar la polaridad del disolvente.

6.2 RENDIMIENTO CUÁNTICO DE FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA EN DISTINTOS DISOLVENTES

Se han determinado los rendimientos cuánticos de fluorescencia de la proflavina en 1-propanol, etanol, metanol, acetonitrilo y agua empleando como sustancia de referencia el sulfato de quinina disuelto en ácido perclórico 1 mol dm^{-3} de acuerdo con el

procedimiento experimental descrito en el apartado 4.5. Los valores obtenidos en los diferentes disolventes estudiados, que corresponden a P^* , se muestran en la Tabla 6.1.

Los datos de la tabla muestran que el rendimiento cuántico de fluorescencia de P^* disminuye a medida que aumenta la polaridad del disolvente. El valor obtenido para el rendimiento cuántico de fluorescencia de la proflavina en agua coincide con el obtenido por Melhuish⁴⁸ a bajas concentraciones de proflavina.

Tabla 6.1. Valores de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de la proflavina en distintos disolventes.

Disolvente	Φ	[PF] / mol dm ⁻³
1-Propanol	0.52	5.33×10^{-6}
Etanol	0.48	5.60×10^{-6}
Acetonitrilo	0.41	5.52×10^{-6}
Metanol	0.39	5.25×10^{-6}
Agua	0.33	5.74×10^{-6}



7. DESACTIVACIÓN DE LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA POR DIFERENTES COMPUESTOS

7.1 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DIFERENTES ANIONES EN LA FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA

7.1.1 Espectros de emisión

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina variando la concentración de las sales sódicas de yoduro, bromuro, cloruro, azida, nitrito y tiocianato. En todos los casos, al añadir anión, el espectro de emisión de fluorescencia va disminuyendo en intensidad sin que varíe su posición, siendo el quenching más efectivo en el caso de yoduro y tiocianato, mientras que el menos efectivo fue el cloruro (Figuras 7.1 a 7.6).

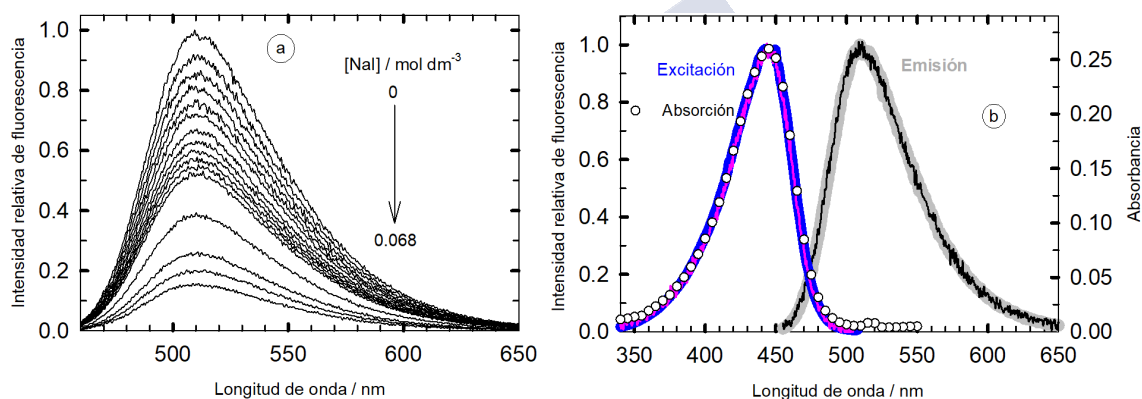


Figura 7.1. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de NaI entre 0 y 0.068 mol dm⁻³, [PF] = 2.57×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de NaI es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.068 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{exc} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de NaI (línea azul) y cuando la concentración del mismo es de 0.068 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{emis} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

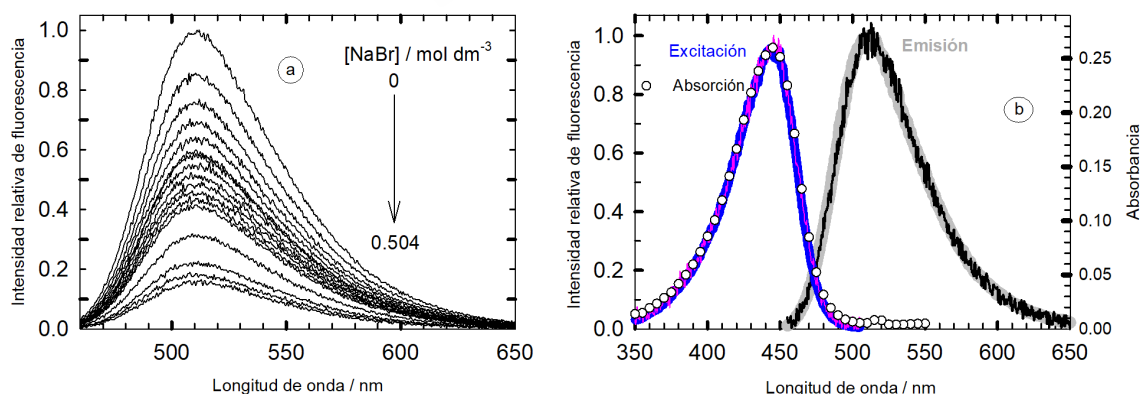


Figura 7.2. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de NaBr entre 0 y 0.504 mol dm⁻³, [PF] = 2.80×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de NaBr es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.504 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{exc} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de NaBr (línea azul) y cuando la concentración del mismo es de 0.504 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{emis} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

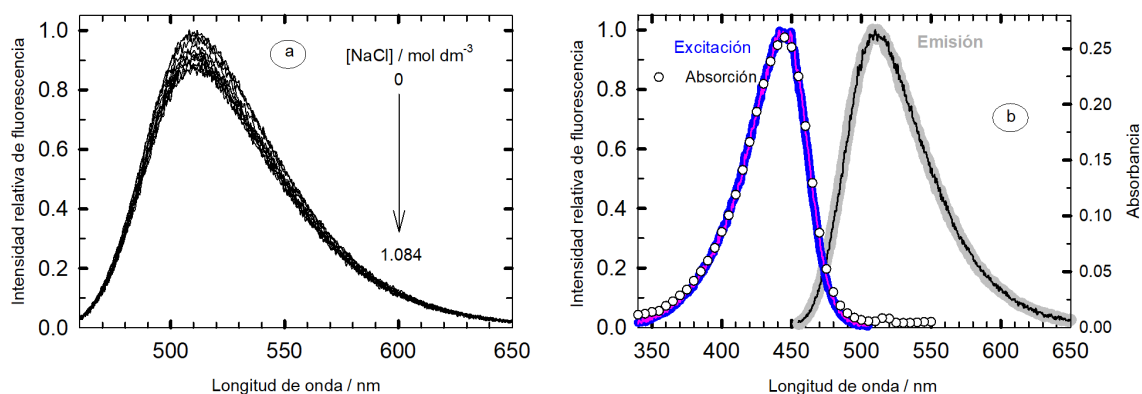


Figura 7.3. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de NaCl entre 0 y 1.084 mol dm⁻³, [PF] = 3.25×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de NaCl es 0 (línea gris) y cuando es igual a 1.084 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{\text{exc}} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de NaCl (línea azul) y cuando la concentración del mismo es de 1.084 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{\text{emis}} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

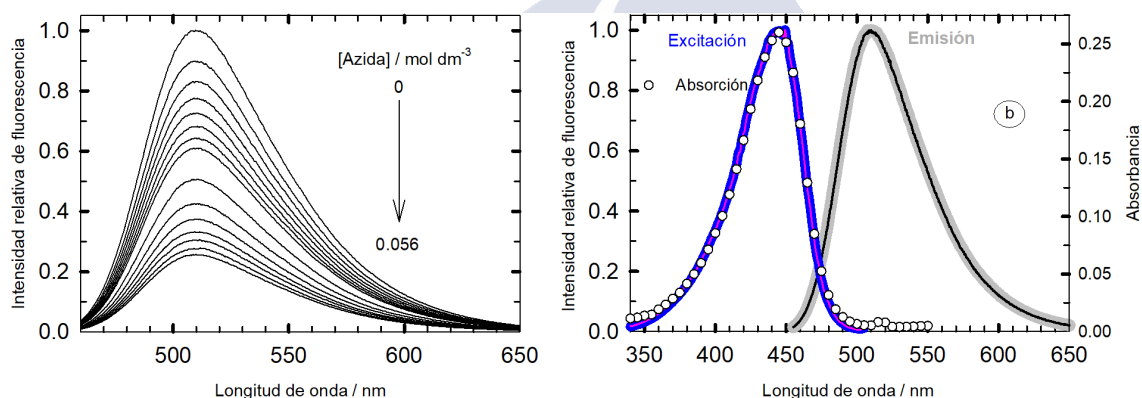


Figura 7.4. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de azida sódica entre 0 y 0.056 mol dm⁻³, [PF] = 2.51×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de azida es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.056 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{\text{exc}} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de azida (línea azul) y cuando la concentración de la misma es de 0.056 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{\text{emis}} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

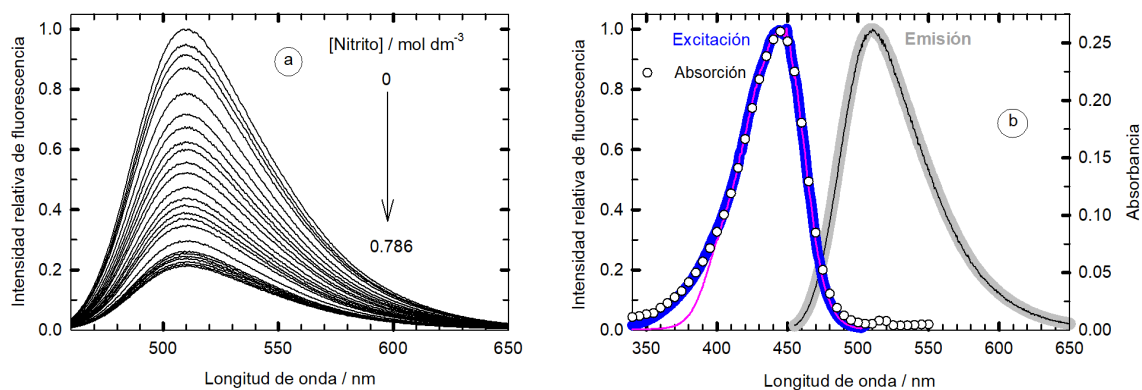


Figura 7.5. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de nitrito sódico entre 0 y $0.786 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{PF}] = 2.83 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de nitrito es 0 (línea gris) y cuando es igual a $0.786 \text{ mol dm}^{-3}$ (línea negra), $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de nitrito (línea azul) y cuando la concentración del mismo es de $0.786 \text{ mol dm}^{-3}$ (línea rosa), $\lambda_{\text{emis}} = 510 \text{ nm}$ y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

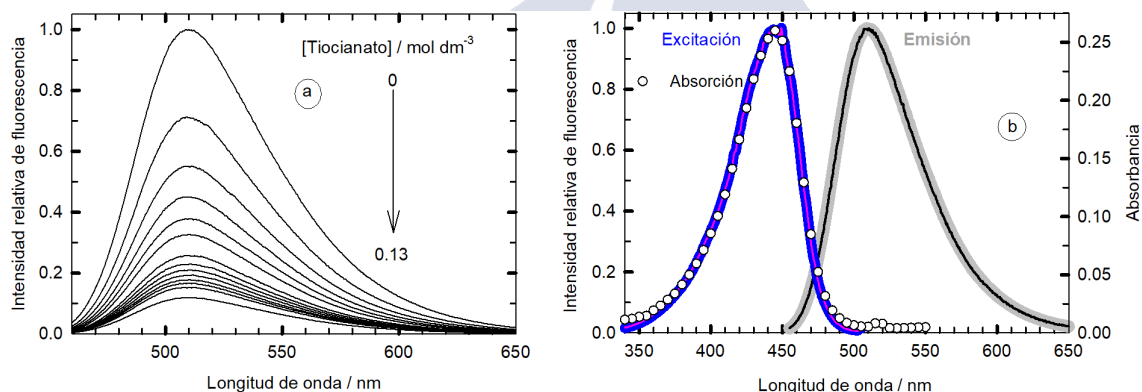


Figura 7.6. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de tiocianato sódico entre 0 y 0.13 mol dm^{-3} , $[\text{PF}] = 2.59 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de tiocianato es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.13 mol dm^{-3} (línea negra), $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de tiocianato (línea azul) y cuando la concentración del mismo es de 0.13 mol dm^{-3} (línea rosa), $\lambda_{\text{emis}} = 510 \text{ nm}$ y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

En todos los casos observamos que los espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de quencher es cero y cuando la concentración del quencher es la más alta de las estudiadas son coincidentes, no se observa ningún cambio espectral. De la misma forma vemos que los espectros de excitación de fluorescencia cuando la concentración de quencher es cero y cuando la concentración es alta coinciden y ambos espectros son coincidentes con el espectro de absorción de la proflavina en agua. Sólo se observa un pequeño cambio en el espectro de excitación a longitudes de onda menores de 400 nm en el caso del nitrito (Figura 7.5). Esto es debido a la absorción de este ion en esa zona, pues presenta un máximo a 350 nm . Al absorber parte de la radiación excitatriz, la proflavina resulta excitada en menor medida, disminuyendo por tanto la intensidad de fluorescencia. Este efecto de filtro interno resulta despreciable a partir de 400 nm , pues la absorción del nitrito

se hace ya muy pequeña, y por tanto esta circunstancia no tiene efecto alguno en la fluorescencia cuando se excita en el máximo de absorción de la proflavina a 445 nm.

En las Figuras 7.7 a 7.12, se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia (F) de la proflavina con la concentración de los diferentes aniones, presentada en la forma habitualmente conocida como representación de Stern-Volmer, a través del cociente F_0/F , siendo F_0 la intensidad de fluorescencia en ausencia de quencher. En estas gráficas puede observarse que los quenchers más efectivos (yoduro y tiocianato) presentan una dependencia lineal de F_0/F con su concentración en el intervalo de concentraciones investigadas, pero el resto de los aniones muestran curvaturas más o menos acentuadas.

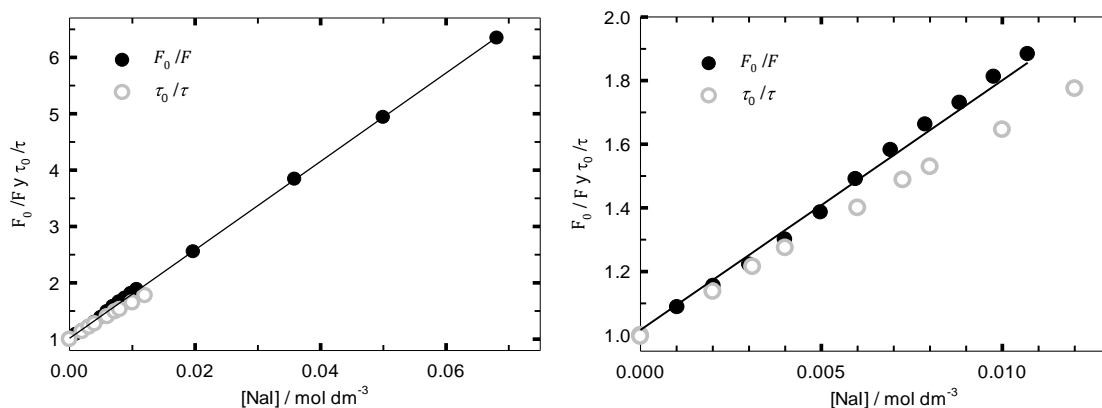


Figura 7.7. Influencia de la concentración de yoduro sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento largos τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de yoduro. Se incluye también el ajuste lineal del cociente de intensidades (línea negra). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.57 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

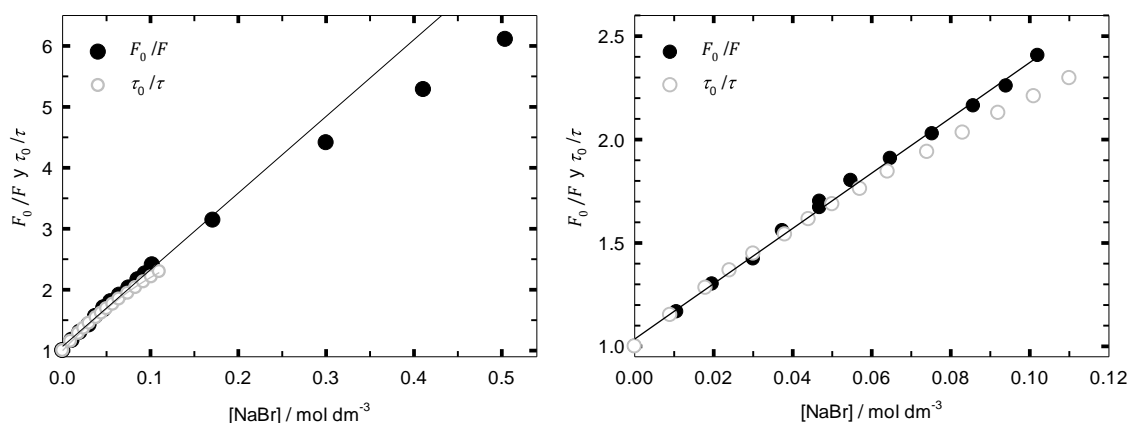


Figura 7.8. Influencia de la concentración de bromuro sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento largos τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de bromuro. Se incluye también el ajuste lineal obtenido a las concentraciones más bajas de desactivador (línea negra). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.80 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.17 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

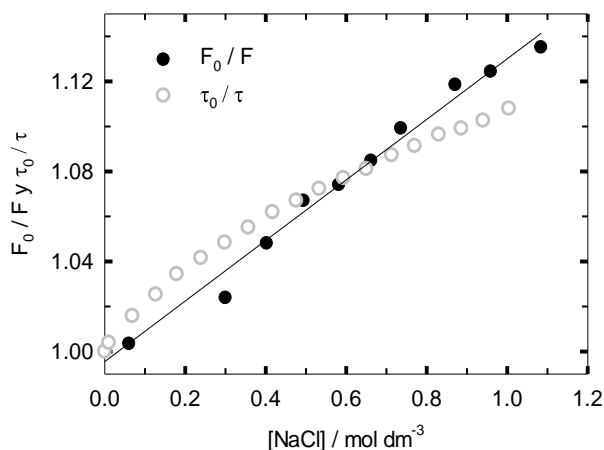


Figura 7.9. Influencia de la concentración de cloruro sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento largos τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de cloruro. Se incluye también el ajuste lineal del cociente de intensidades (línea negra). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $3.25 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.16 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

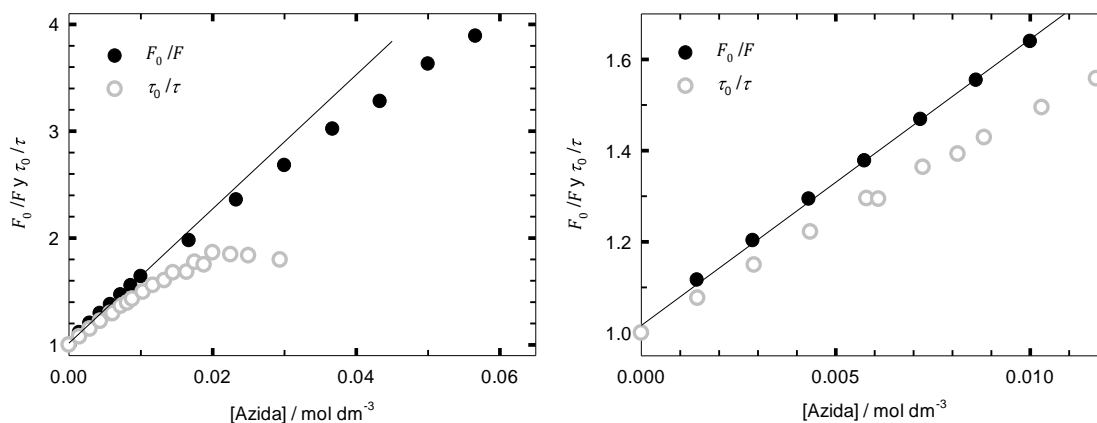


Figura 7.10. Influencia de la concentración de azida sódica en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento largos τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de azida. Se incluye también el ajuste lineal del cociente de intensidades obtenido a las concentraciones más bajas de desactivador (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.51 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.13 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

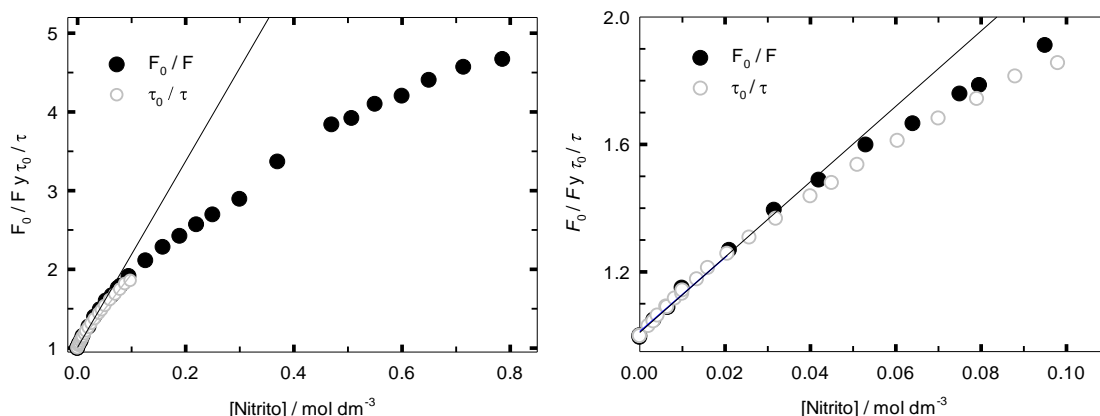


Figura 7.11. Influencia de la concentración de nitrito sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento largos τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de nitrito. Se incluye también el ajuste lineal obtenido a las concentraciones más bajas de desactivador (línea negra). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.83 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.26 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

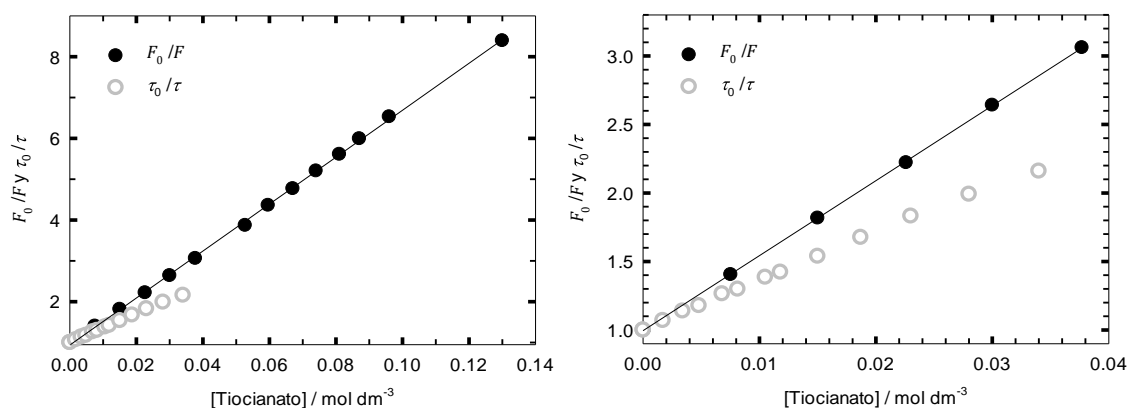


Figura 7.12. Influencia de la concentración de tiocianato sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento largos τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de tiocianato. Se incluye también el ajuste lineal obtenido para el cociente de intensidades (línea negra). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.59 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.21 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

7.1.2 Tiempos de vida de fluorescencia

Se registraron los decaimientos de fluorescencia de la proflavina en agua variando las concentraciones de los distintos desactivadores. Ajustando una función biexponencial a los datos obtenidos se consigue una buena reproducción (Figuras 7.13 a 7.17). En las Tablas 7.1 a 7.6 se recogen los datos de tiempos de decaimiento y amplitudes de las exponenciales a diferentes concentraciones de quenchers. Como se aprecia en estas tablas, la contribución de la exponencial de menor tiempo de decaimiento es en general muy pequeña, aunque se observa una mayor contribución a concentraciones mayores de desactivador. Por esta circunstancia, los tiempos de decaimiento más cortos están sujetos a una gran incertidumbre. En las Figuras 7.7 a 7.12 se han representado los cocientes τ_0/τ correspondientes al tiempo de decaimiento más largo, apreciándose que siguen una tendencia diferente a las intensidades de fluorescencia y observándose en varios casos una dependencia no lineal.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

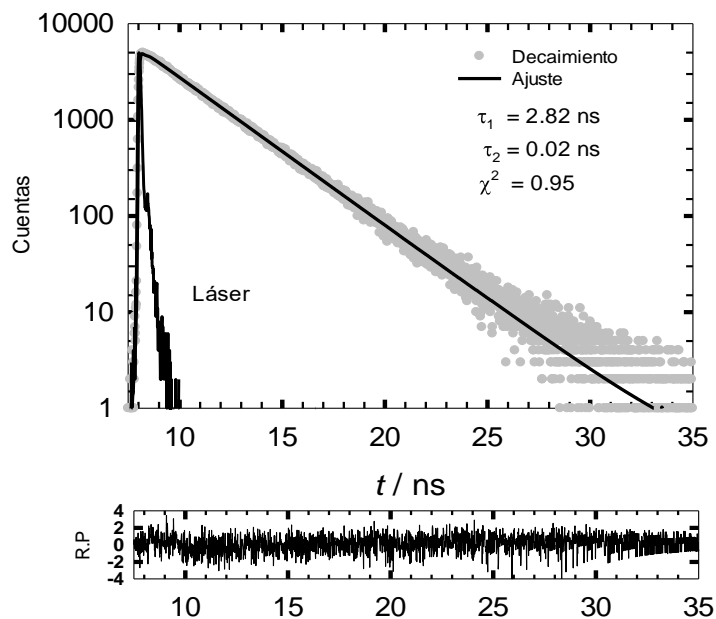


Figura 7.13. Decaimiento de la fluorescencia y función biexponencial de ajuste para la proflavina 4.17×10^{-6} mol dm^{-3} en agua con una concentración de bromuro sódico de 0.057 mol dm^{-3} . La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm.

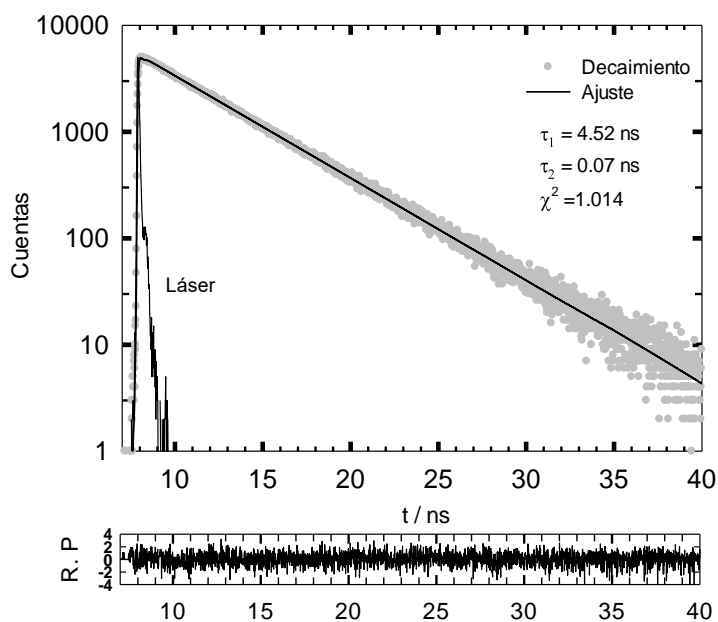


Figura 7.14. Decaimiento de la fluorescencia y función biexponencial de ajuste para la proflavina 4.16×10^{-6} mol dm^{-3} en agua con una concentración de cloruro sódico de 0.94 mol dm^{-3} . La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm.

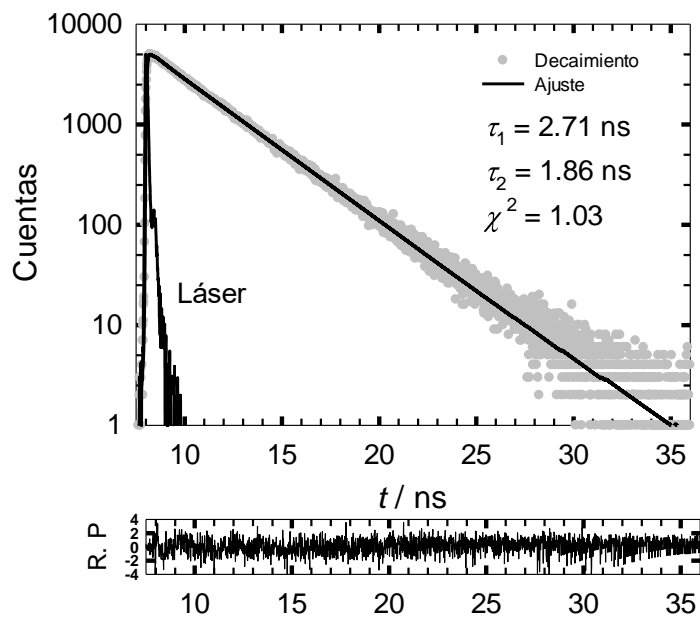


Figura 7.15. Decaimiento de la fluorescencia y función biexponencial de ajuste para la proflavina $4.13 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ en agua con una concentración de azida sódica de $0.025 \text{ mol dm}^{-3}$. La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm.

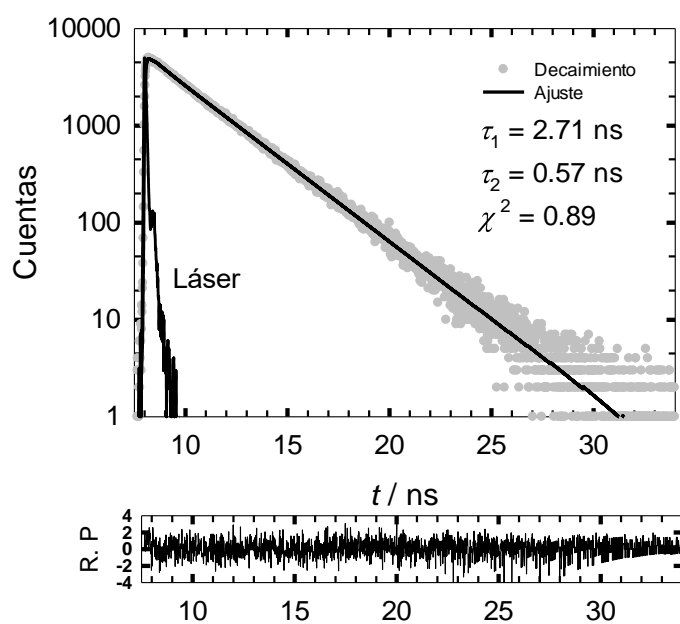


Figura 7.16. Decaimiento de la fluorescencia y función biexponencial de ajuste para la proflavina $4.21 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ en agua con una concentración de tiocianato sódico de $0.023 \text{ mol dm}^{-3}$. La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

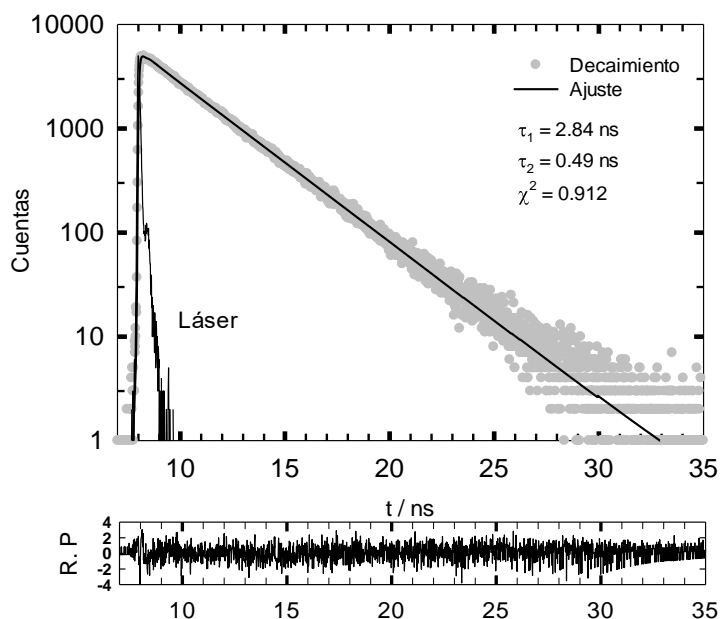


Figura 7.17. Decaimiento de la fluorescencia y función biexponencial de ajuste para la proflavina 4.26×10^{-6} mol dm^{-3} en agua con una concentración de nitrito sódico de 0.079 mol dm^{-3} . La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm.

En las tablas siguientes (Tablas 7.1 a 7.6) se recogen los tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina obtenidos a distintas concentraciones de los diferentes haluros. El tiempo de vida se reduce a medida que aumenta la concentración de haluro en el medio, salvo en el caso del cloruro que apenas hay variación del tiempo de vida.

Tabla 7.1. Tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en agua a distintas concentraciones de bromuro sódico, excitando a 445 nm y recogiendo la emisión a 510 nm. Se muestran también los factores preexponenciales B y el porcentaje de participación de la primera exponencial (entre paréntesis), así como el parámetro de bondad del ajuste χ^2 .

[NaBr] / mol dm^{-3}	τ_1 / ns	τ_2 / ns	B ₁ (%)	B ₂	χ^2
0	4.968(4)	—	0.082 (100)	—	1.02
8.97×10^{-3}	4.313(3)	0.016(3)	0.083 (99.4)	0.141	1.00
0.0179	3.871(3)	0.028(5)	0.082 (99.3)	0.079	1.01
0.024	3.633(3)	0.017(3)	0.083 (99.2)	0.139	0.98
0.03	3.429(3)	0.017(4)	0.082 (99.1)	0.141	0.97
0.038	3.224(3)	0.018(3)	0.083 (99.0)	0.146	1.03
0.044	3.076(3)	0.027(4)	0.083 (99.1)	0.088	1.01
0.050	2.944(3)	0.018(3)	0.082 (99.0)	0.139	1.01
0.057	2.820(3)	0.019(3)	0.083 (99.0)	0.126	0.95
0.064	2.697(3)	0.018(3)	0.084 (98.9)	0.134	1.07
0.074	2.560(2)	0.015(2)	0.085 (98.8)	0.182	1.01
0.083	2.443(2)	0.018(3)	0.084 (98.7)	0.145	1.00
0.092	2.333(2)	0.019(3)	0.085 (98.8)	0.122	0.99
0.101	2.248(2)	0.033(4)	0.083 (98.7)	0.074	1.06
0.11	2.163(2)	0.016(6)	0.084 (98.6)	0.157	1.05

Tabla 7.2. Tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en agua a distintas concentraciones de yoduro sódico, excitando a 445 nm y recogiendo la emisión a 510 nm. Se muestran también los factores preexponenciales B y el porcentaje de participación de la primera exponencial (entre paréntesis), así como el parámetro de bondad del ajuste χ^2 .

[NaI] / mol dm ⁻³	τ_1 / ns	τ_2 / ns	B ₁ (%)	B ₂	χ^2
0	4.973(4)	—	0.098(100)	—	1.03
2.02×10 ⁻³	4.374(3)	0.084(3)	0.102(99.7)	0.005	1.04
3.11×10 ⁻³	4.092(3)	0.19(5)	0.103(99.7)	0.006	1.00
4.05×10 ⁻³	3.905(4)	0.21(5)	0.098(99.3)	0.006	0.98
6.08×10 ⁻³	3.556(4)	0.35(4)	0.100(98.7)	0.007	0.99
7.25×10 ⁻³	3.345(5)	0.54(6)	0.101(98.3)	0.008	0.97
8.03×10 ⁻³	3.254(4)	0.65(6)	0.102(97.7)	0.009	0.95
1.01×10 ⁻²	3.027(5)	0.78(6)	0.101(97.2)	0.009	0.94
1.22×10 ⁻²	2.803(5)	0.79(5)	0.100(99.9)	0.010	0.94

Tabla 7.3. Tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en agua a distintas concentraciones de cloruro sódico, excitando a 445 nm y recogiendo la emisión a 510 nm. Se muestran también los factores preexponenciales B y el porcentaje de participación de la primera exponencial (entre paréntesis), así como el parámetro de bondad del ajuste χ^2 .

[NaCl] / mol dm ⁻³	τ_1 / ns	τ_2 / ns	B ₁ (%)	B ₂	χ^2
0	4.966(4)	—	0.099(100)	—	1.05
0.010	4.946(4)	0.081(8)	0.097(99.5)	0.031	1.02
0.068	4.888(4)	0.085(9)	0.099(99.5)	0.027	0.99
0.127	4.843(4)	0.075(7)	0.097(99.5)	0.034	0.98
0.179	4.800(4)	0.077(8)	0.098(99.5)	0.031	0.97
0.239	4.767(4)	0.055(5)	0.098(99.5)	0.046	1.01
0.298	4.736(4)	0.093(9)	0.099(99.5)	0.026	1.05
0.357	4.706(4)	0.078(8)	0.100(99.5)	0.032	1.01
0.417	4.676(4)	0.070(6)	0.099(99.5)	0.036	1.00
0.476	4.653(4)	0.072(7)	0.099(99.5)	0.034	1.00
0.533	4.631(4)	0.072(7)	0.099(99.4)	0.036	1.00
0.593	4.610(4)	0.092(9)	0.098(99.4)	0.028	0.98
0.650	4.593(4)	0.078(7)	0.098(99.4)	0.034	1.01
0.712	4.567(4)	0.069(7)	0.100(99.5)	0.036	1.01
0.773	4.550(4)	0.069(6)	0.098(99.4)	0.037	1.09
0.830	4.529(4)	0.071(7)	0.100(99.5)	0.034	1.03
0.886	4.518(4)	0.072(7)	0.099(99.4)	0.035	1.01
0.941	4.504(4)	0.098(9)	0.096(99.4)	0.027	0.99
1.004	4.482(4)	0.067(7)	0.098(99.4)	0.037	1.05

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

Tabla 7.4. Tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en agua a distintas concentraciones de azida sódica, excitando a 445 nm y recogiendo la emisión a 510 nm. Se muestran también los factores preexponenciales B y el porcentaje de participación de la primera exponencial (entre paréntesis), así como el parámetro de bondad del ajuste χ^2 .

[Azida] / mol dm ⁻³	τ_1 / ns	τ_2 / ns	B ₁ (%)	B ₂	χ^2
0	4.968(3)	—	0.096 (100)	—	1.02
1.45×10 ⁻³	4.620(4)	0.52(1)	0.096 (99.8)	0.002	1.04
2.90×10 ⁻³	4.328(3)	0.76(1)	0.095 (99.6)	0.002	1.03
4.35×10 ⁻³	4.072(3)	0.82(1)	0.097 (99.4)	0.003	1.04
5.79×10 ⁻³	3.841(3)	0.84(1)	0.097 (99.6)	0.002	0.97
6.10×10 ⁻³	3.845(4)	0.95(2)	0.095 (99.2)	0.003	0.97
7.24×10 ⁻³	3.648(4)	0.78(3)	0.096 (99.1)	0.004	0.92
8.14×10 ⁻³	3.572(4)	0.81(3)	0.095 (99.1)	0.004	0.95
8.82×10 ⁻³	3.482(4)	0.86(4)	0.094 (98.7)	0.005	0.95
0.010	3.328(4)	0.90(5)	0.093 (98.3)	0.006	0.94
0.012	3.193(4)	1.00(4)	0.093 (98.0)	0.006	0.95
0.013	3.104(4)	1.22(4)	0.092 (97.1)	0.007	0.94
0.014	2.970(4)	0.94(4)	0.093 (97.7)	0.007	0.97
0.016	2.958(6)	1.71(6)	0.082 (89.3)	0.017	0.93
0.017	2.804(3)	1.00(4)	0.089 (96.5)	0.009	0.96
0.019	2.843(6)	1.72(6)	0.077 (85.2)	0.022	1.00
0.020	2.670(5)	1.37(4)	0.085 (92.2)	0.014	0.91
0.022	2.696(6)	1.89(6)	0.057 (67.0)	0.040	0.93
0.025	2.710(6)	1.91(5)	0.041 (49.6)	0.059	1.03
0.029	2.770(8)	1.86(4)	0.024 (32.3)	0.075	1.06

Tabla 7.5. Tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en agua a distintas concentraciones de nitrito sódico, excitando a 445 nm y recogiendo la emisión a 510 nm. Se muestran también los factores preexponenciales B y el porcentaje de participación de la primera exponencial (entre paréntesis), así como el parámetro de bondad del ajuste χ^2 .

[Nitrito] / mol dm ⁻³	τ_1 / ns	τ_2 / ns	B ₁ (%)	B ₂	χ^2
0	4.961(4)	—	0.087 (100)	—	1.03
2.04×10 ⁻³	4.809(4)	0.021(4)	0.086 (99.6)	0.091	0.99
3.21×10 ⁻³	4.742(4)	0.08(2)	0.104 (98.4)	0.013	1.02
4.17×10 ⁻³	4.660(4)	0.015(4)	0.087 (99.7)	0.142	1.06
6.21×10 ⁻³	4.538(4)	0.014(3)	0.087 (99.7)	0.143	1.03
6.42×10 ⁻³	4.546(3)	0.11(3)	0.104 (97.7)	0.008	0.98
8.25×10 ⁻³	4.437(3)	0.018(4)	0.088 (99.6)	0.116	1.02
9.93×10 ⁻³	4.378(3)	0.12(2)	0.103 (97.4)	0.009	1.04
0.010	4.338(3)	0.014(3)	0.087 (99.7)	0.169	1.00
0.013	4.209(3)	0.020(3)	0.086 (99.5)	0.112	0.98
0.016	4.086(4)	0.025(4)	0.087 (99.4)	0.078	0.99
0.021	3.941(3)	0.020(3)	0.087 (99.5)	0.104	1.01
0.026	3.787(3)	0.016(5)	0.087 (99.6)	0.142	0.93
0.032	3.624(4)	0.010(3)	0.088 (99.7)	0.185	0.96
0.040	3.446(6)	0.022(3)	0.086 (99.4)	0.093	0.98
0.045	3.349(3)	0.08(1)	0.107 (97.7)	0.018	0.92
0.051	3.225(3)	0.06(1)	0.105 (98.1)	0.021	0.95
0.060	3.074(4)	0.06(1)	0.106 (98.0)	0.023	0.92
0.070	2.946(3)	0.29(2)	0.106 (91.1)	0.007	0.97
0.079	2.842(3)	0.49(1)	0.104 (85.2)	0.007	0.91
0.088	2.731(3)	0.18(2)	0.105 (93.9)	0.011	0.93
0.098	2.670(3)	0.95(2)	0.104 (73.7)	0.007	1.01

Tabla 7.6. Tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en agua a distintas concentraciones de tiocianato sódico, excitando a 445 nm y recogiendo la emisión a 510 nm. Se muestran también los factores preexponenciales B y el porcentaje de participación de la primera exponencial (entre paréntesis), así como el parámetro de bondad del ajuste χ^2 .

[Tiocianato] / mol dm ⁻³	τ_1 / ns	τ_2 / ns	B ₁ (%)	B ₂	χ^2
0	4.957(4)	—	0.102 (100)	—	1.01
1.70×10 ⁻³	4.635(4)	0.092(2)	0.103 (99.7)	0.014	0.96
3.40×10 ⁻³	4.353(4)	0.25(6)	0.103 (99.7)	0.006	1.04
4.80×10 ⁻³	4.208(4)	0.27(6)	0.102 (99.6)	0.006	1.06
6.79×10 ⁻³	3.919(4)	0.64(8)	0.099 (99.0)	0.006	0.98
8.13×10 ⁻³	3.817(4)	0.61(8)	0.102 (99.1)	0.006	0.95
0.010	3.577(5)	0.50(7)	0.102 (99.2)	0.006	0.92
0.012	3.485(5)	0.45(5)	0.100 (99.0)	0.008	0.91
0.015	3.222(4)	0.52(5)	0.101 (98.6)	0.009	0.91
0.019	2.956(4)	0.60(6)	0.102 (98.2)	0.009	0.89
0.023	2.706(4)	0.57(5)	0.100 (97.9)	0.010	0.89
0.028	2.487(4)	0.43(4)	0.100 (98.0)	0.012	0.84
0.034	2.294(4)	0.45(4)	0.102 (97.5)	0.013	0.81

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

A continuación, se analizarán los resultados descritos anteriormente, relativos a la extinción de la fluorescencia de la proflavina por los distintos aniones, y se propondrá un mecanismo capaz de explicar esos resultados. La fluorescencia de la proflavina se ve disminuida por la presencia de los distintos desactivadores estudiados. Estos hechos nos llevan a pensar que la desactivación de la fluorescencia pudiera estar causada por la formación de un excíplejo.

7.1.3 Modelo de desactivación

Como se ha visto en las Figuras 7.7 a 7.12, las representaciones de Stern-Volmer de intensidades y tiempos de fluorescencia no son, en general, lineales, y aún en aquellos casos en los que sí lo son (desactivación por yoduro o tiocianato), no coinciden las pendientes de las rectas de intensidades y tiempos. Esto indica que el mecanismo de desactivación de la fluorescencia por los aniones no es un quenching dinámico simple, que implicaría un comportamiento lineal coincidente para intensidades y tiempos de vida de fluorescencia⁹⁴. Nos planteamos entonces que el mecanismo de desactivación transcurriera a través de un excíplejo intermedio, E*, que podría emitir fluorescencia. En el modelo que proponemos (Esquema 7.1), la proflavina (P) en el estado excitado reacciona con el desactivador o quencher (Q) para formar un excíplejo intermedio (E*) que emite fluorescencia.



Esquema 7.1. Modelo de desactivación de la proflavina por aniones (quencher, Q), con formación de un excíplejo intermedio (E*).

Para comprobar si el modelo propuesto en el Esquema 7.1 permite explicar los datos experimentales, vamos a deducir en primer lugar la ecuación que representa la dependencia de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario con la concentración de quencher. Para ello, escribimos las expresiones que representan las concentraciones en estado estacionario de la proflavina excitada y del excíplejo.

$$[P]_{ss}^* = \frac{I_a + k_2[E]_{ss}^*}{k_p + k_1[Q]} \quad (7.1)$$

$$[E]_{ss}^* = \frac{k_1[P]_{ss}^*[Q]}{k_2 + k_e} \quad (7.2)$$

En estas ecuaciones, I_a representa la velocidad de absorción de fotones por la proflavina (moles absorbidos por unidad de volumen y tiempo). Sustituimos el valor de [E]_{ss}^{*} en la ecuación (7.1) y obtenemos:

$$[P]_{ss}^* = \frac{I_a + \frac{k_2 k_1 [P]_{ss}^* [Q]}{k_2 + k_e}}{k_p + k_1 [Q]} \quad (7.3)$$

De la ecuación (7.3) se deduce que la concentración de proflavina excitada en el estado estacionario viene dada por la siguiente expresión:

$$[P]_{ss}^* = \frac{I_a (k_2 + k_e)}{k_p (k_e + k_2) + k_e k_1 [Q]} \quad (7.4)$$

La expresión anterior puede escribirse también:

$$[P]_{ss}^* = \frac{I_a / k_p}{1 + B[Q]} \quad (7.5)$$

donde:

$$B = \frac{k_e k_1}{k_p (k_e + k_2)} \quad (7.6)$$

Sustituyendo la expresión de la concentración de proflavina excitada en estado estacionario –ecuación (7.5)– en la ecuación (7.2), llegamos a:

$$[E]_{ss}^* = \frac{\frac{I_a k_1 [Q]}{k_p (k_e + k_2)}}{1 + B[Q]} \quad (7.7)$$

Como es sabido, en situaciones de baja absorbancia (valores inferiores aproximadamente a 0.05, condiciones en las que se realizaron las medidas de espectros de fluorescencia), la intensidad de luz absorbida puede considerarse proporcional a la concentración de la especie que absorbe⁹⁵. Así, la intensidad de luz que absorbe la proflavina a una determinada longitud de onda puede expresarse como:

$$I_a = I_0 2.303 \epsilon_p l a_0 \quad (7.8)$$

donde ϵ_p es el coeficiente de absorción molar de la proflavina a la longitud de onda incidente, l es la longitud de paso de luz en la cubeta, I_0 es la intensidad de la radiación incidente y a_0 es la concentración de proflavina en el estado fundamental. Si sustituimos el valor de I_a en las ecuaciones (7.4) y (7.7) obtenemos las siguientes expresiones:

$$[P]_{ss}^* = \frac{I_0 2.303 \epsilon_p l a_0 (k_2 + k_e)}{k_p (k_e + k_2) + k_e k_1 [Q]} \quad (7.9)$$

$$[E]_{ss}^* = \frac{\frac{I_0 2.303 \epsilon_p l a_0 k_1 [Q]}{k_p (k_e + k_2)}}{1 + B[Q]} \quad (7.10)$$

Sabemos que los espectros de fluorescencia, tanto de la proflavina como del excíplejo (F_P y F_E), están relacionados con sus respectivas concentraciones en el estado estacionario según las expresiones:

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

$$\mathbf{F}_P = \chi_P k_r^P [P]_{ss}^* \quad (7.11)$$

$$\mathbf{F}_E = \chi_E k_r^E [E]_{ss}^* \quad (7.12)$$

donde k_r^P y k_r^E son las constantes radiantes de desactivación de la proflavina y del excíplejo, respectivamente, y χ_P y χ_E son dos vectores que incluyen las intensidades relativas de emisión de fluorescencia de P y E a cada longitud de onda.

Sustituyendo las expresiones de las concentraciones de estado estacionario en las ecuaciones (7.11) y (7.12), obtenemos:

$$\mathbf{F}_P = \chi_P \frac{k_r^P}{k_p} I_0 2.303 \epsilon_P l a_0 \frac{1}{1 + B[Q]} \quad (7.13)$$

$$\mathbf{F}_E = \chi_E \frac{k_r^E}{k_e} I_0 2.303 \epsilon_P l a_0 \frac{B[Q]}{1 + B[Q]} \quad (7.14)$$

La relación k_r^P/k_p representa el rendimiento cuántico de fluorescencia de P (ϕ^P) en ausencia de desactivador, mientras que el cociente k_r^E/k_e representa la eficiencia cuántica de fluorescencia del excíplejo (η^E) cuando su disociación para regenerar los reactivos fuera despreciable y desapareciera únicamente por sus procesos de desactivación radiantes y no radiantes. Así, las relaciones anteriores pueden escribirse:

$$\mathbf{F}_P = \chi_P \phi^P I_0 2.303 \epsilon_P l a_0 \frac{1}{1 + B[Q]} \quad (7.15)$$

$$\mathbf{F}_E = \chi_E \eta^E I_0 2.303 \epsilon_P l a_0 \frac{B[Q]}{1 + B[Q]} \quad (7.16)$$

El espectro de fluorescencia de la proflavina en ausencia de desactivador, al cual le llamaremos espectro puro \mathbf{F}_P^0 , se obtiene en la expresión 7.15 a concentración cero de desactivador:

$$\mathbf{F}_P^0 = \chi_P \phi^P I_0 2.303 \epsilon_P l a_0 \quad (7.17)$$

El término equivalente en la ecuación (7.16), que denominaremos espectro puro del excíplejo \mathbf{F}_E^0 , representaría el espectro de fluorescencia que se obtendría para el excíplejo cuando cada fotón absorbido diera lugar a una molécula de excíplejo y este se desactivara directamente al estado fundamental sin disociarse:

$$\mathbf{F}_E^0 = \chi_E \eta^E I_0 2.303 \epsilon_P l a_0 \quad (7.18)$$

A partir de estas definiciones, las ecuaciones (7.15) y (7.16) pueden escribirse:

$$F_P = F_P^0 \frac{1}{1 + B[Q]} \quad (7.19)$$

$$F_E = F_E^0 \frac{B[Q]}{1 + B[Q]} \quad (7.20)$$

El espectro de fluorescencia de la disolución de proflavina en presencia de quencher vendrá dado por:

$$F = F_P + F_E = F_P^0 \frac{1}{1 + B[Q]} + F_E^0 \frac{B[Q]}{1 + B[Q]} \quad (7.21)$$

En las ecuaciones anteriores, los cocientes dependen únicamente de los valores de las constantes de velocidad y de la concentración de quencher, y vienen a representar los coeficientes de participación de cada una de las especies fluorescentes en la emisión de la disolución. Así pues, podemos escribir:

$$F = F_P^0 C_P + F_E^0 C_E \quad (7.22)$$

siendo C_P y C_E los coeficientes de participación de cada especie en el espectro de fluorescencia de la disolución:

$$C_P = \frac{1}{1 + B[Q]} \quad (7.23)$$

$$C_E = \frac{B[Q]}{1 + B[Q]} \quad (7.24)$$

Puesto que hemos visto que no se aprecian diferencias espectrales al aumentar la concentración de los distintos desactivadores (Figuras 7.1 a 7.6), sino que tan solo se observa disminución de la intensidad, suponemos que el espectro del excíplejo no es diferenciable del de la proflavina, al menos en las condiciones de medida estudiadas, es decir, $\chi_E = \chi_P$. Este hecho se ha encontrado en otros muchos casos⁹⁶. De las ecuaciones (7.17) y (7.18) deducimos:

$$F_E^0 = \frac{\eta^E}{\phi^P} F_P^0 = \Phi_r F_P^0 \quad (7.25)$$

donde $\Phi_r = \eta^E/\phi^P$ es una constante que representa la relación de rendimientos cuánticos del excíplejo y la proflavina. Sustituyendo la ecuación (7.25) en la (7.22), obtenemos:

$$F = F_P^0 C_P + \Phi_r F_P^0 C_E \quad (7.26)$$

Así, el espectro de fluorescencia de la disolución vendrá dado por:

$$F = F_P^0 \frac{1 + \Phi_r B[Q]}{1 + B[Q]} \quad (7.27)$$

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

Esta ecuación implica que, a cualquier longitud de onda de emisión, el cociente de la intensidad de fluorescencia en ausencia (F_0) y en presencia (F) de quencher vendrá dada por:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + B[Q]}{1 + \Phi_r B[Q]} \quad (7.28)$$

Esta es la ecuación que utilizaremos más adelante para comprobar si puede reproducir los datos de intensidad de fluorescencia de la proflavina en presencia de distintos desactivadores. En el caso de que la relación de rendimientos cuánticos Φ_r sea muy pequeña (cuando el rendimiento cuántico de fluorescencia del excíplejo es mucho menor que el de la proflavina), se verificaría $1 \gg \Phi_r B[Q]$ lo que implica una dependencia lineal del cociente F_0/F con la concentración de quencher. Esto es lo que se observó en el caso de dos de los desactivadores más efectivos, los iones yoduro y tiocianato (véanse las Figuras 7.7 y 7.12). Es lógico que eso suceda, pues los desactivadores más efectivos incrementarán probablemente la velocidad de los procesos de desactivación no radiantes del excíplejo y por tanto disminuirán su rendimiento cuántico de fluorescencia.

Tras haber derivado las ecuaciones que representan la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de proflavina en presencia de desactivadores según el mecanismo propuesto, vamos a deducir a continuación la dependencia de los tiempos de decaimiento de la fluorescencia con la concentración de quencher. De acuerdo con el modelo propuesto en el Esquema 7.1, las velocidades de desaparición de la proflavina excitada y del excíplejo vienen dadas por:

$$-\frac{d[P^*]}{dt} = (k_p + k_1[Q])[P^*] - k_2[E^*] = X[P^*] - k_2[E^*] \quad (7.29)$$

$$-\frac{d[E^*]}{dt} = (k_2 + k_e)[E^*] - k_1[Q][P^*] = Y[E^*] - k_1[Q][P^*] \quad (7.30)$$

siendo:

$$X = k_p + k_1[Q] \quad (7.31)$$

$$Y = k_2 + k_e \quad (7.32)$$

La solución de este tipo de sistema de ecuaciones diferenciales viene dada por unas ecuaciones en las que las concentraciones de las especies excitadas obedecen a una función suma de dos términos exponenciales dependientes del tiempo:

$$[P^*] = P_1^0 e^{(-\lambda_1 t)} + P_2^0 e^{(-\lambda_2 t)} \quad (7.33)$$

$$[E^*] = E_1^0 e^{(-\lambda_1 t)} + E_2^0 e^{(-\lambda_2 t)} \quad (7.34)$$

Las derivadas de las ecuaciones anteriores vienen dadas por:

$$-\frac{d[P^*]}{dt} = -\lambda_1 P_1^0 e^{(-\lambda_1 t)} - \lambda_2 P_2^0 e^{(-\lambda_2 t)} \quad (7.35)$$

$$-\frac{d[E^*]}{dt} = -\lambda_1 E_1^0 e^{(-\lambda_1 t)} - \lambda_2 E_2^0 e^{(-\lambda_2 t)} \quad (7.36)$$

Sustituimos las ecuaciones (7.33) a (7.36) en (7.29) y (7.30), obteniendo:

$$X \sum_{i=1}^2 P_i^0 e^{-\lambda_i t} - \sum_{i=1}^2 \lambda_i P_i^0 e^{-\lambda_i t} - k_2 \sum_{i=1}^2 E_i^0 e^{-\lambda_i t} = 0 \quad (7.37)$$

$$Y \sum_{i=1}^2 E_i^0 e^{-\lambda_i t} - \sum_{i=1}^2 \lambda_i E_i^0 e^{-\lambda_i t} - k_1 [Q] \sum_{i=1}^2 P_i^0 e^{-\lambda_i t} = 0 \quad (7.38)$$

A continuación, vamos a desarrollar los sumatorios y agruparemos las exponenciales, llegando a:

$$(X P_1^0 - \lambda_1 P_1^0 - k_2 E_1^0) e^{(-\lambda_1 t)} + (X P_2^0 - \lambda_2 P_2^0 - k_2 E_2^0) e^{(-\lambda_2 t)} = 0 \quad (7.39)$$

$$(Y E_1^0 - \lambda_1 E_1^0 - k_1 [Q] P_1^0) e^{(-\lambda_1 t)} + (Y E_2^0 - \lambda_2 E_2^0 - k_1 [Q] P_2^0) e^{(-\lambda_2 t)} = 0 \quad (7.40)$$

Para que las expresiones (7.39) y (7.40) sean iguales a cero a cualquier valor del tiempo es necesario que los factores preexponenciales de cada una de las dos exponenciales por separado sea igual a cero, quedando el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{cases} X P_1^0 - \lambda_1 P_1^0 - k_2 E_1^0 = 0 \\ Y E_1^0 - \lambda_1 E_1^0 - k_1 [Q] P_1^0 = 0 \end{cases} \quad (7.41)$$

$$\begin{cases} X P_2^0 - \lambda_2 P_2^0 - k_2 E_2^0 = 0 \\ Y E_2^0 - \lambda_2 E_2^0 - k_1 [Q] P_2^0 = 0 \end{cases} \quad (7.42)$$

Expresando de forma matricial el sistema de ecuaciones (7.41) y (7.42) llegamos a:

$$\begin{pmatrix} X - \lambda_i & -k_2 \\ -k_1 [Q] & Y - \lambda_i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_i^0 \\ E_i^0 \end{pmatrix} = 0 \quad i = 1, 2 \quad (7.43)$$

Esta ecuación matricial (7.43) tiene dos soluciones: una de ellas sería P_i^0 y E_i^0 igual a cero y la otra posible solución sería que el determinante de la matriz de coeficientes sea cero:

$$\begin{vmatrix} X - \lambda_i & -k_2 \\ -k_1 [Q] & Y - \lambda_i \end{vmatrix} = 0 \quad i = 1, 2 \quad (7.44)$$

Resolviendo el determinante se obtiene la siguiente ecuación de segundo grado:

$$\lambda_i^2 - (X + Y)\lambda_i + (XY - k_1 k_2 [Q]) = 0 \quad i = 1, 2 \quad (7.45)$$

Las dos soluciones de la ecuación (7.45) vienen dadas por:

$$\lambda_i = \frac{(X + Y) \pm \sqrt{(X + Y)^2 - 4XY + 4k_1 k_2 [Q]}}{2} \quad i = 1, 2 \quad (7.46)$$

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

Dado que $(X + Y)^2 - 4XY = (X - Y)^2$, resultan las siguientes expresiones para los tiempos de decaimiento:

$$\tau_i = \frac{1}{\lambda_i} = \frac{2}{X + Y \pm Z} \quad i = 1, 2 \quad (7.47)$$

donde Z viene dado por:

$$Z = \sqrt{(X - Y)^2 + 4k_1k_2[Q]} \quad (7.48)$$

La Ecuación (7.47) implica que los dos tiempos τ_1 y τ_2 son iguales, teniendo cada uno de ellos dos posibles valores, que llamaremos τ_a y τ_b :

$$\tau_a = \frac{2}{X + Y + Z} \quad (7.49)$$

$$\tau_b = \frac{2}{X + Y - Z} \quad (7.50)$$

De acuerdo con estas ecuaciones, las especies excitadas muestran un decaimiento biexponencial, con un tiempo τ_a y un tiempo τ_b . Tomando Z como el valor positivo de la raíz en la ecuación (7.47), se verificará $\tau_a < \tau_b$.

Una vez desarrollado el modelo propuesto, procede ajustar las ecuaciones obtenidas a los datos experimentales para comprobar si son capaces de reproducirlos adecuadamente. Para ello, se han ajustado globalmente las ecuaciones (7.28) y (7.50) a los datos experimentales de cociente de intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher (F_0/F) y tiempos de decaimiento de fluorescencia. Puesto que τ_b es el tiempo más largo, identificamos este tiempo con el de la primera exponencial en los decaimientos experimentales (Tablas 7.1 a 7.6), que es la mayoritaria en los decaimientos. Como ya se ha comentado, la pequeñísima contribución de la segunda exponencial en la mayoría de los decaimientos que se han medido determina su gran incertidumbre, y por tanto hemos optado por no considerar esos valores para los ajustes. En las Figuras 7.18 a 7.23 se muestran los datos experimentales de F_0/F y τ_0/τ obtenidos para los distintos aniones (representando τ el tiempo de decaimiento de la primera exponencial, de contribución mayoritaria, y el 0 la ausencia de quencher), así como las funciones de ajuste obtenidas mediante el ajuste global. En todos los casos se observa una reproducción adecuada de los datos experimentales con el conjunto único de constantes para cada desactivador que se recogen en la Tabla 7.7. Las mayores desviaciones se observan en el caso del ion nitrito, lo que puede deberse a que a las altas concentraciones alcanzadas de este ion podrían aparecer efectos secundarios no contemplados en las funciones de ajuste (efecto salino, por ejemplo, ya que no se mantuvo constante la fuerza iónica de la disolución).

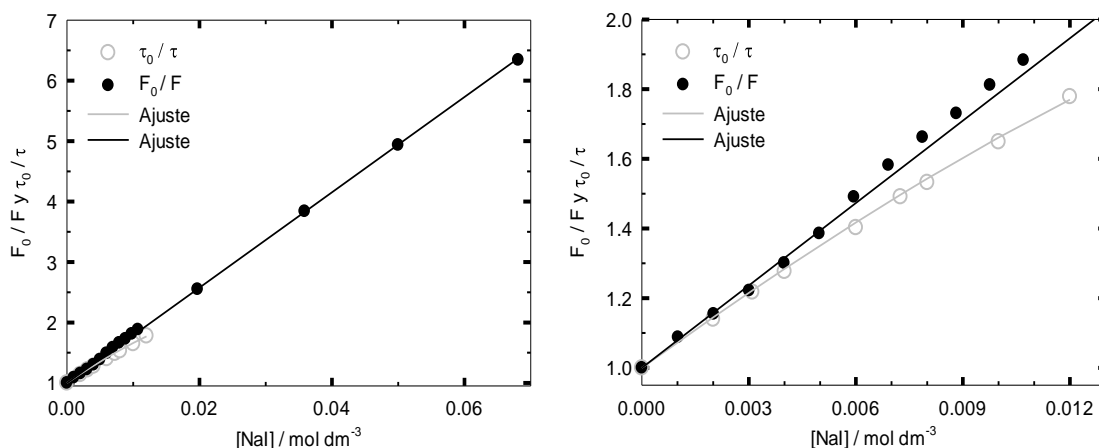


Figura 7.18. Influencia de la concentración de yoduro sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.57 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

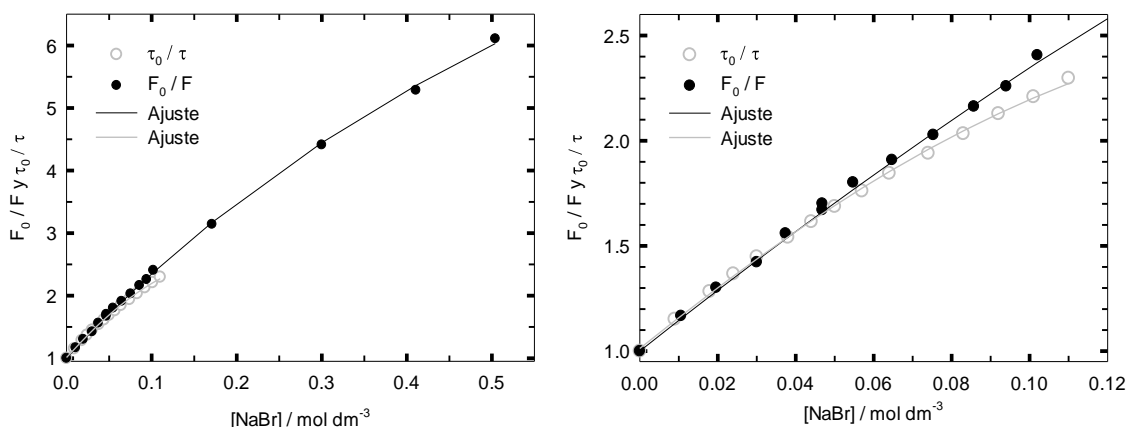


Figura 7.19. Influencia de la concentración de bromuro sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.80 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.17 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

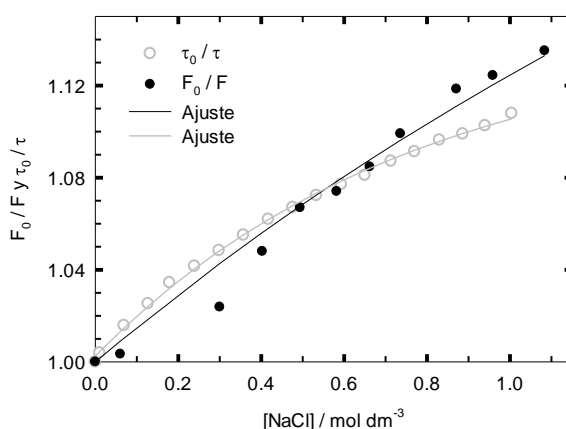


Figura 7.20. Influencia de la concentración de cloruro sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $3.25 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.16 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

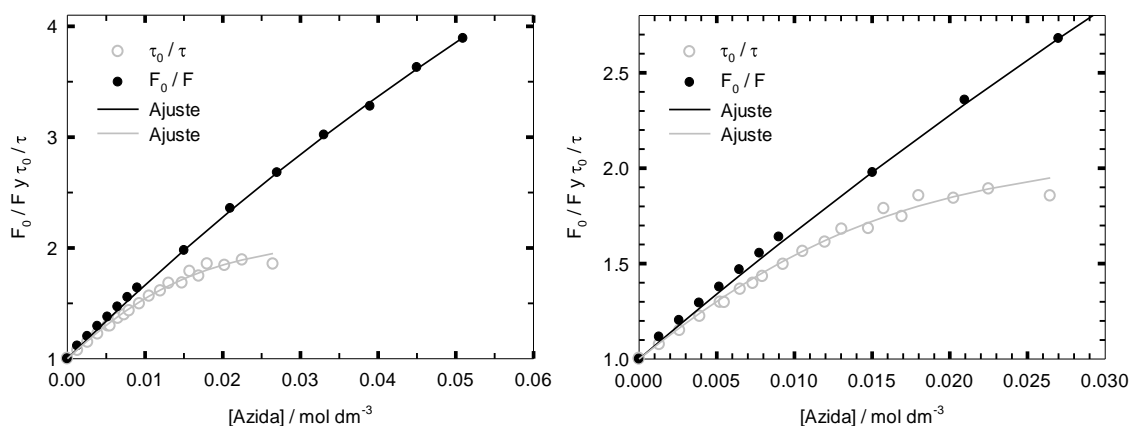


Figura 7.21. Influencia de la concentración de azida sódica en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.51 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.13 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

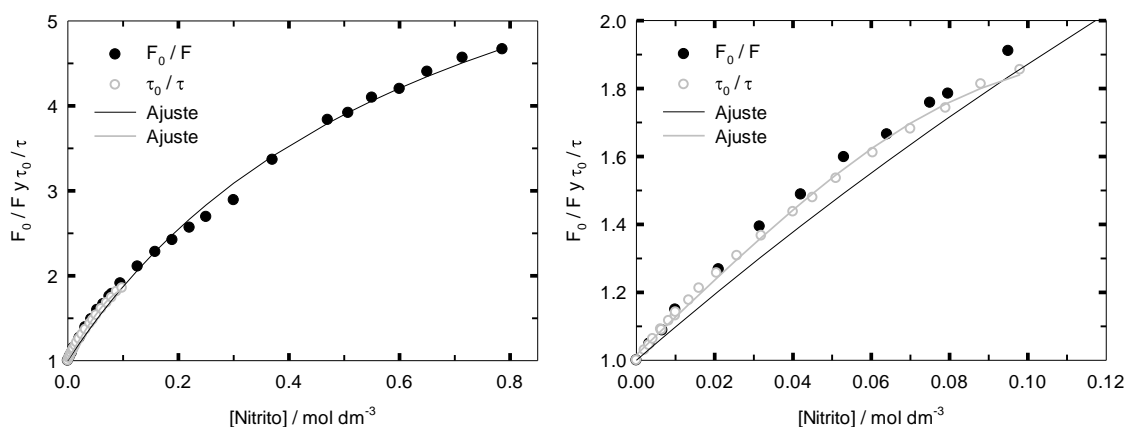


Figura 7.22. Influencia de la concentración de nitrito sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.83 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.26 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

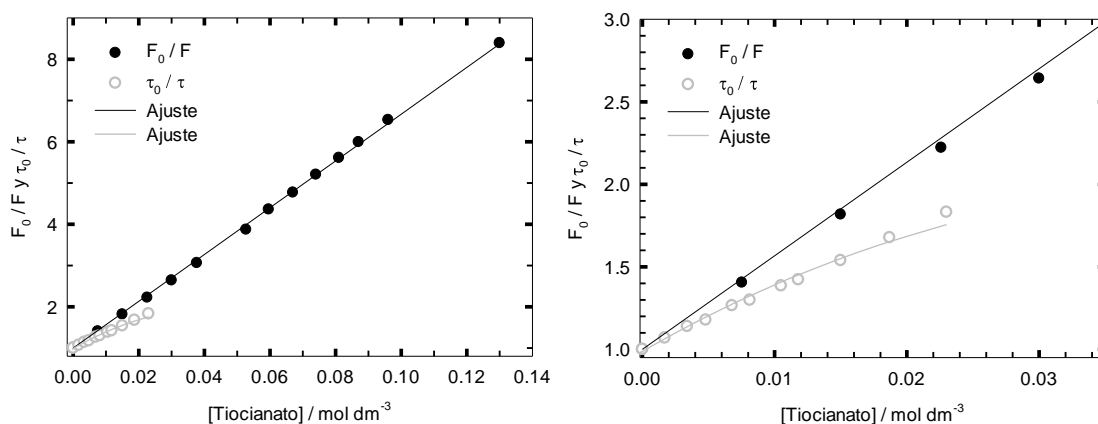


Figura 7.23. Influencia de la concentración de tiocianato sódico en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.59 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.21 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

En la Tabla 7.7 se muestran los valores de las constantes obtenidos del ajuste global de las ecuaciones de intensidades y tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en presencia de distintos desactivadores. En el caso de la azida, se han calculado respecto a la concentración de azida no protonada, que suponemos es el desactivador efectivo, ya que el pK_a de la azida protonada tiene un valor de 4.75 y por tanto se encuentra protonada en parte en nuestras condiciones de medida (disolución acuosa de $pH = 5.9$ por disolución del CO_2 del aire)⁹⁷. Se observó que en los casos del yoduro y del tiocianato existía correlación entre los parámetros, razón por la cual se fijó el valor de la constante k_1 en $18 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ ns}^{-1}$, valor típico de un control por difusión que pudo optimizarse en el caso de la azida. Si se fijaban valores inferiores, se obtenía una peor reproducción de los resultados experimentales.

Tabla 7.7. Constantes de velocidad obtenidas en los ajustes globales de intensidades y tiempos de decaimiento de fluorescencia de la proflavina en agua en presencia de diferentes desactivadores, valores de los potenciales estándar de electrodo de los desactivadores en disolución acuosa y energía libre estándar de la reacción de transferencia electrónica de los aniones a la proflavina protonada en su primer estado electrónico excitado.

Parámetro	NO_2^-	N_3^-	I^-	SCN^-	Br^-	Cl^-
k_p/ns^{-1}	0.2051(9)	0.2000(10)	0.2000(6)	0.1993(12)	0.2038(10)	0.2019(2)
$k_1/mol^{-1} \text{ dm}^3 \text{ ns}^{-1}$	2.44(12)	17.7(1.5)	18 ^a	18 ^a	3.7(3)	0.09(5)
k_2/ns^{-1}	0.015(12)	0.09(3)	0.077(5)	0.33(2)	0.10(6)	0.05(5)
k_e/ns^{-1}	0.41(3)	0.45(2)	0.55(2)	0.55(3)	0.62(7)	0.238(5)
Φ_r	0.127(4)	0.059(9)			0.060(2)	0.59(12)
$K_{12}/(10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3)$	1.6	2.0	2.3	0.55	0.37	0.02
$E^\circ(X^*/X^-)/V^b$	1.04	1.33	1.35	1.61	1.96	2.432
$\Delta G_r^\circ/eV^c$	-1.06	-0.77	-0.75	-0.49	-0.14	+0.34

^a Valor fijo. ^b Valores referidos al electrodo normal de hidrógeno (NHE) Ref. 98. ^c Calculado con $E^\circ(\text{ProflavinaH}^*/\text{ProflavinaH}^+) = -0.50$ vs NHE (Ref. 99) y energía de excitación de la proflavina $E_{00} = 2.60$ eV.

Es conocido que la proflavina protonada excitada actúa frecuentemente como un agente oxidante¹⁰⁰. Es probable, por tanto, que el proceso de quenching de su fluorescencia por los aniones estudiados incluya una transferencia electrónica del anión a la proflavina excitada. La espontaneidad del proceso puede estimarse mediante el cálculo de la variación de energía libre estándar ΔG_r° por aplicación de la ecuación de Rehm-Weller^{101,102,103}, ya comentada en el informe bibliográfico, ecuación (3.1). Esta ecuación permite calcular ΔG_r° para un proceso de transferencia electrónica entre dos especies (un dador D y un aceptor A), una de ellas electrónicamente excitada y la otra en estado fundamental:

$$\Delta G_r^\circ = N_A e [E^\circ(D^{\bullet+}/D) - E^\circ(A/A^{\bullet-})] + E_c - E_{00} \quad (3.1)$$

En la ecuación anterior, e es la carga elemental, $E^\circ(D^{\bullet+}/D)$ y $E^\circ(A/A^{\bullet-})$ son los potenciales de reducción estándar en estado fundamental del dador y del aceptor, respectivamente, E_{00} es la energía de la transición 0-0 de la especie excitada, y E_c corresponde a la variación de energía en el proceso debido a la interacción electrostática entre los reactivos (D, A) y entre los productos ($D^{\bullet+}$, $A^{\bullet-}$)²⁵:

$$E_c = E_c(D^{\bullet+}, A^{\bullet-}) - E_c(D, A) = \frac{z_A z_D e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r d} - \frac{z_A z_D e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r d}$$

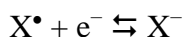
En la ecuación anterior, z representa la carga eléctrica de cada especie, ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío, ϵ_r la constante dieléctrica relativa del disolvente y d la

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

distancia entre el dador y el aceptor. En nuestro caso, los reactivos son especies cargadas, la proflavina protonada (aceptor A) y el anión (dador D), por lo que los productos de la reacción de transferencia electrónica son especies radicalarias sin carga y el término coulombico correspondiente a los productos vale cero. Para calcular el término correspondiente a los reactivos, $E_c(D, A)$, necesitaríamos conocer la distancia de reacción, d . Este término energético suele valer en torno a -0.06 eV en acetonitrilo¹⁰⁷, por lo que en agua tendrá un valor aproximado de -0.03 eV, de acuerdo con las constantes dieléctricas relativas de los dos disolventes (Tabla 5.3). Esta corrección, por tanto, es muy pequeña, e incluso habría de ser modificada teniendo en cuenta la energía de solvatación, que suele tener signo contrario¹⁰⁷. Por esta razón, no tendremos en cuenta este término para el cálculo de ΔG_r^0 . Para aplicar la ecuación (3.1) necesitamos conocer el potencial de reducción de la proflavina protonada en estado fundamental, que se ha determinado como -0.74 V vs SCE⁹⁹, es decir -0.50 vs NHE¹⁰⁴. Además, la energía de excitación de la transición 0-0 de la proflavina protonada la estimamos como la media de los máximos de la primera banda de sus espectros de absorción (445 nm) y emisión (510 nm), resultando en una longitud de onda aproximada para el tránsito 0-0 de 477.5 nm, que corresponde a una energía de $\Delta E_{00} = 2.60$ eV.

Siguiendo el procedimiento que acaba de reseñarse, se calculó la variación de energía libre estándar del proceso de transferencia electrónica de cada uno de los aniones a la proflavina excitada. Los valores obtenidos (Tabla 7.7) muestran que el proceso de transferencia electrónica es espontáneo para todos los aniones excepto para el ion cloruro. Dado que para este ion el efecto de quenching observado es muy pequeño, los cálculos que acabamos de reseñar parecen indicar que la transferencia electrónica puede estar implicada en el proceso de desactivación de la fluorescencia de la proflavina en medio neutro o ácido por los aniones investigados. Debemos indicar, finalmente, que los cálculos anteriores son aproximados, por cuanto el potencial de reducción de la proflavina se ha estimado mediante voltametría cíclica, sin corrección al estado estándar⁹⁹, y además la estimación de la energía de la transición 0-0 es también aproximada por la media de los máximos de absorción y emisión.

Para analizar la influencia de los procesos de transferencia electrónica en el quenching observado, en la Tabla 7.7 hemos ordenado los aniones por orden creciente del valor del potencial estándar de electrodo $E^0(X^*/X^-)$ de la semirreacción:



Los valores de potencial estándar de electrodo mostrados en la Tabla 7.7 indican que el ion nitrito es el compuesto que cede electrones más fácilmente, seguido por los iones azida y yoduro, mientras que el ion cloruro es el que menor tendencia muestra a donar electrones. Experimentalmente se observa (Figura 7.24) que el ion yoduro es el que muestra una mayor efectividad de quenching, seguido de cerca por los iones azida y tiocianato. El ion nitrito muestra una curvatura mayor en los valores del cociente de intensidades F_0/F . El ion cloruro es, con gran diferencia, el desactivador menos eficiente. El análisis de las constantes de velocidad obtenidas (Tabla 7.7) nos permitirá profundizar en las causas de las diferencias observadas.

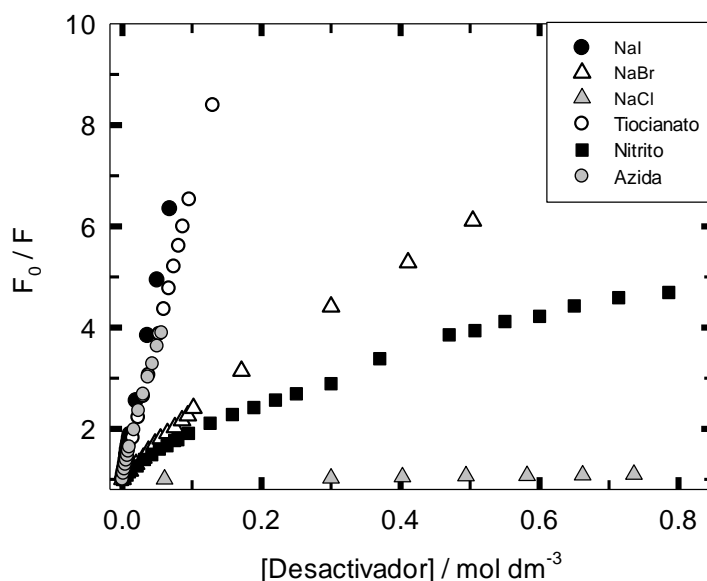


Figura 7.24. Influencia de la concentración de diferentes desactivadores aniónicos en el cociente de intensidades de fluorescencia de la proflavina en agua, en ausencia y presencia de desactivador. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

En la Tabla 7.7 puede observarse la invariabilidad de los valores obtenidos para la constante de desactivación de la proflavina (k_p) en agua. Por su parte, la constante de velocidad de reacción entre la proflavina excitada y el desactivador (k_1) se incrementa desde los desactivadores poco eficientes cloruro y bromuro hasta los más eficientes, tiocianato, azida y yoduro. El valor de k_1 para estos tres aniones ($1.8 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ ns}^{-1}$) muestra el valor esperado para un proceso bimolecular muy rápido, cuya velocidad está controlada por la difusión de los reactivos en el seno de la disolución^{105,106}. Para el ion nitrito, sin embargo, esta constante resulta unas siete veces inferior (Tabla 7.7).

A través de los valores obtenidos de las constantes k_1 y k_2 para los diferentes aniones puede calcularse la constante de equilibrio de formación del excíplejo (K_{12}) en cada uno de los casos:

$$K_{12} = \frac{k_1}{k_2} \quad (7.51)$$

Los valores de K_{12} mostrados en la Tabla 7.7 y su representación gráfica en la Figura 7.25 revelan una tendencia al aumento de la constante de equilibrio de formación del excíplejo al incrementarse la capacidad de ceder electrones del desactivador. Este hecho indica claramente la contribución a la estabilización del excíplejo de la transferencia de carga del desactivador a la proflavina.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

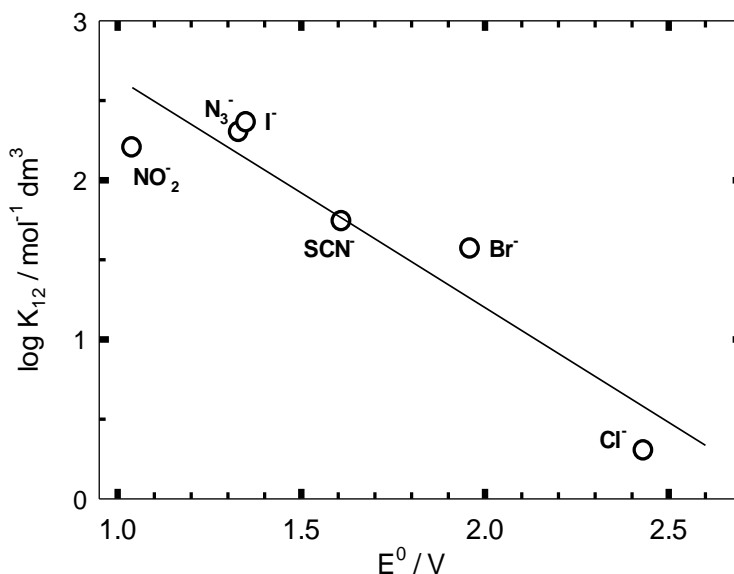


Figura 7.25. Valores del logaritmo de la constante de equilibrio de formación del excíplejo, obtenidos en el estudio del quenching de fluorescencia de la proflavina por diferentes aniones, representados frente al potencial estándar de electrodo del desactivador.

Los valores de la constante de desactivación del excíplejo k_e no muestran una correlación con la capacidad donadora de electrones de los desactivadores (Tabla 7.7), pues los valores extremos aparecen para los dos aniones de menor potencial estándar de electrodo, el cloruro ($k_e = 0.238 \text{ ns}^{-1}$) y el bromuro ($k_e = 0.62 \text{ ns}^{-1}$). Esto puede deberse a que la magnitud de la transferencia de carga tiene efectos diferentes sobre las velocidades de los procesos radiantes y no radiantes que contribuyen a la desactivación del excíplejo. El incremento de la transferencia de carga lleva consigo un aumento de la constante de desactivación no radiante y una disminución de la constante de desactivación radiante en los excíplejos¹⁰². Este hecho puede explicar que no se haya detectado la emisión del excíplejo para yoduro y tiocianato, pues presentan valores altos de sus constantes de desactivación k_e , y deben presentar a su vez un valor bajo de la constante radiante por la notable contribución de la transferencia de carga. Por su parte, el excíplejo del ion bromuro presenta una constante de desactivación k_e mayor que la de yoduro y tiocianato, pero la constante de desactivación radiante debe ser también mayor que para esos excíplejos, razón por la que podría apreciarse su emisión. Además, a la desactivación del excíplejo puede contribuir también el cruce intersistemas hacia el estado triplete. Este proceso debe verse favorecido por el efecto de átomo pesado, principalmente para bromuro y yoduro, que favorecería el acoplamiento espín-órbita y con ello la desactivación no radiante. Este efecto podría contribuir al alto valor observado para k_e en el caso del ion bromuro, pero sin embargo no se pone claramente de manifiesto para el ion yoduro. En definitiva, las contribuciones radiantes y no radiantes a la desactivación del excíplejo varían de diferente forma con la extensión de la transferencia de carga y el tamaño de los desactivadores, lo que hace difícilmente predecible su efecto sobre k_e . Esta misma circunstancia puede explicar también la falta de correlación de la relación de rendimientos cuánticos Φ_r del excíplejo y la proflavina con el potencial estándar de electrodo de los desactivadores, ya que al valor del rendimiento cuántico contribuyen tanto las constantes de desactivación radiantes como no radiantes.

Como conclusión, podemos decir que la desactivación de la proflavina por diferentes aniones transcurre a través de un excíplejo, cuya constante de equilibrio de formación se

incrementa a medida que aumenta su carácter de transferencia de carga, observándose un incremento de dos órdenes de magnitud en el valor de esa constante entre el desactivador más ineficiente (ion cloruro) y el más eficiente (ion yoduro). La eficiencia del quenching se ve también modulada por el valor de las constantes de desactivación radiantes y no radiantes del excíplejo, que varían con la extensión de la transferencia de carga y el tamaño de los quenchers. No obstante, estas constantes varían solamente un factor de 2.6 entre sus valores extremos, por lo que podemos afirmar que el valor de la constante de equilibrio de formación del excíplejo es el factor principal que contribuye a la mayor o menor efectividad de los diferentes desactivadores de la fluorescencia de la proflavina.

Conclusiones en la misma línea que las aquí descritas se han publicado para otras especies con N cuaternarios aromáticos que sufren quenching de fluorescencia por aniones. Así, por ejemplo, el quenching del ion N-metilquinolinio y derivados por varios aniones parece transcurrir por varias vías paralelas, incluyendo un complejo excitado no fluorescente con transferencia de carga, transferencia electrónica directa y quenching por efecto de átomo pesado¹⁰⁶. También para el naranja de acridina protonado se ha propuesto un mecanismo de quenching por haluros que incluye un complejo excitado intermedio de transferencia de carga, acompañado también en el caso del yoduro por la existencia del complejo en estado fundamental⁸⁹. No obstante, debemos señalar que en ninguno de estos estudios se llevó a cabo un análisis cuantitativo detallado como el aquí realizado. También en otros casos de reacciones de transferencia electrónica endergónica o ligeramente exergónica se ha demostrado que la reacción transcurre de forma preferente a través de excíplejos intermedios¹⁰⁷.

7.2 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DIFERENTES UREAS Y TIOUREAS EN LA FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA

7.2.1 Espectros de emisión

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina variando la concentración de diferentes tioureas (tiourea, metiltiourea, 1,3-dimetiltiourea y tetrametiltiourea). En las Figuras 7.26 a 7.29 se aprecia que, en los cuatro casos, al añadir tiourea, el espectro de emisión de fluorescencia va disminuyendo en intensidad sin que varíe su posición ni forma. Esto se aprecia mejor en las gráficas en las que se presentan los espectros normalizados de la proflavina sin añadir tiourea y a la concentración máxima de tiourea. En todos los casos se aprecia coincidencia espectral.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

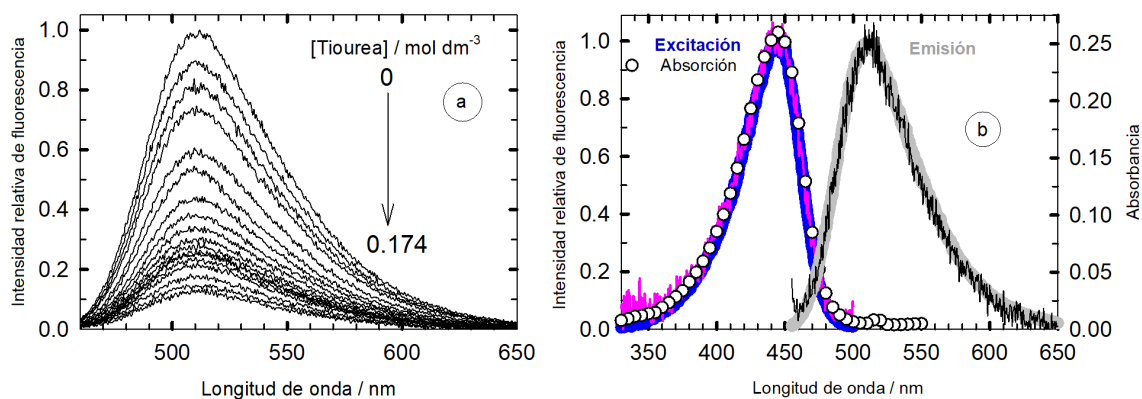


Figura 7.26. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de tiourea entre 0 y 0.17 mol dm⁻³, [PF] = 2.55×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de tiourea es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.17 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{exc} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de tiourea (línea azul) y cuando la concentración de la misma es de 0.17 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{emis} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

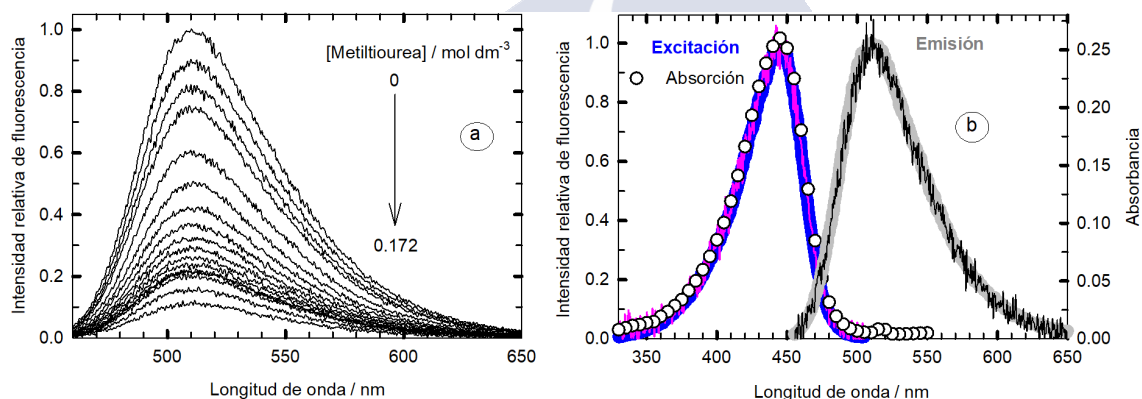


Figura 7.27. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de metiltiourea entre 0 y 0.172 mol dm⁻³, [PF] = 2.76×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de metiltiourea es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.172 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{exc} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de metiltiourea (línea azul) y cuando la concentración de la misma es de 0.172 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{emis} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

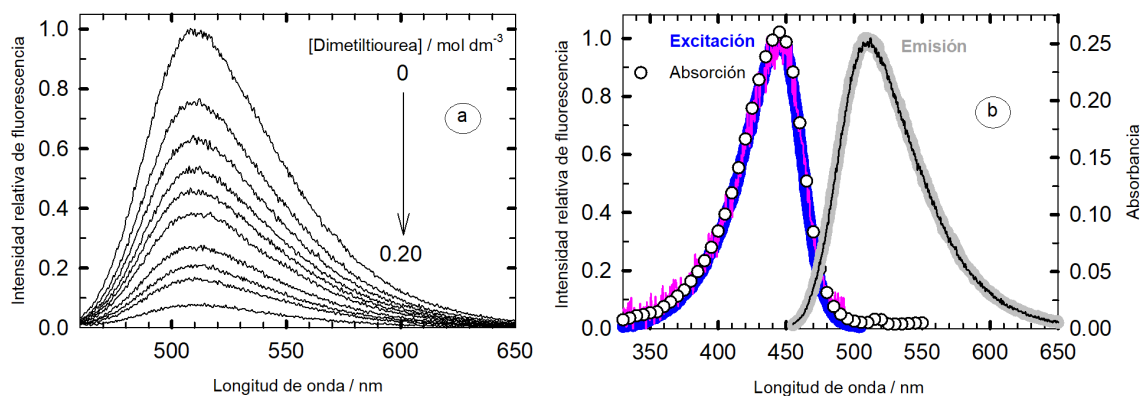


Figura 7.28. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de 1,3-dimetiltiourea entre 0 y 0.20 mol dm⁻³, [PF] = 3.34×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de 1,3-dimetiltiourea es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.20 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{exc} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de 1,3-dimetiltiourea (línea azul) y cuando la concentración de la misma es de 0.20 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{emis} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

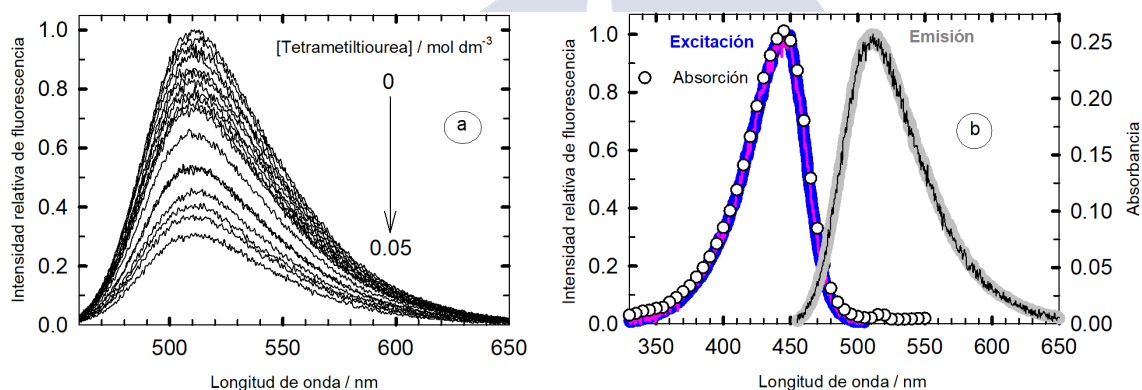


Figura 7.29. a) Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua y variando la concentración de tetrametiltiourea entre 0 y 0.05 mol dm⁻³, [PF] = 3.19×10⁻⁶ mol dm⁻³. b) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de tetrametiltiourea es 0 (línea gris) y cuando es igual a 0.05 mol dm⁻³ (línea negra), $\lambda_{exc} = 445$ nm. En b) se presentan también los espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo cuando no hay presencia de tetrametiltiourea (línea azul) y cuando la concentración de la misma es de 0.05 mol dm⁻³ (línea rosa), $\lambda_{emis} = 510$ nm y el espectro de absorción de la proflavina en agua (puntos blancos).

En todos los casos observamos que los espectros de emisión de fluorescencia normalizados en el máximo cuando la concentración de desactivador es cero y cuando la concentración del mismo es la más alta de las estudiadas son coincidentes, no se observa ningún cambio espectral. Igualmente vemos que los espectros de excitación de fluorescencia cuando la concentración de desactivador es cero y cuando la concentración es alta coinciden y ambos espectros son coincidentes con el espectro de absorción del catión de la proflavina en agua. En resumen, al añadir tioureas a una disolución acuosa de proflavina se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia, pero sin cambio alguno en los espectros de excitación y emisión.

En las Figuras 7.30 a 7.33, se representa la variación de la intensidad de fluorescencia de la proflavina en presencia de tioureas en la forma de la representación de Stern-

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

Volmer. El cociente F_0/F (donde F_0 representa la intensidad de fluorescencia en ausencia de tioureas) muestra una dependencia no lineal con desviación positiva, más acusada en la dimetil y tetrametiltiourea.

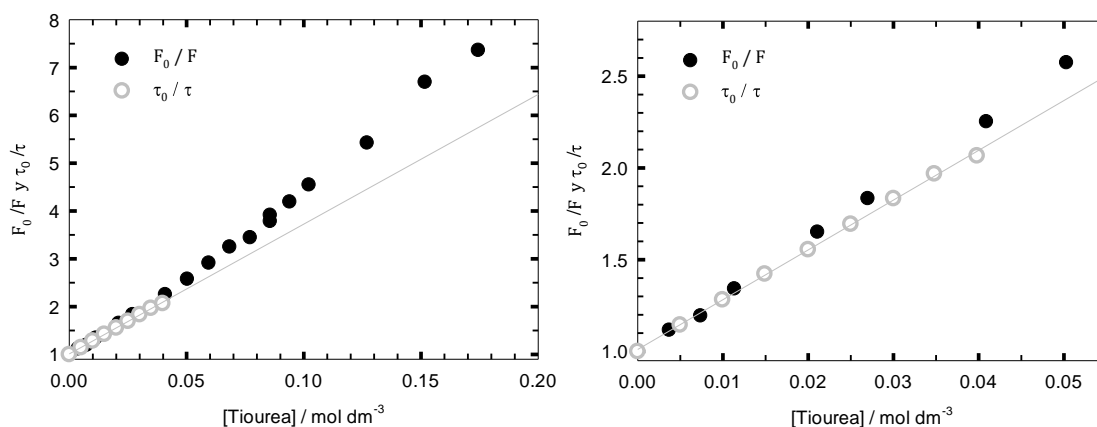


Figura 7.30. Influencia de la concentración de tiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0/F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento τ_0/τ (círculos grises), en ausencia y presencia de tiourea. Se incluye también el ajuste lineal obtenido para los tiempos (línea gris). La concentración de proflavina en estado estacionario es $2.55 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.18 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

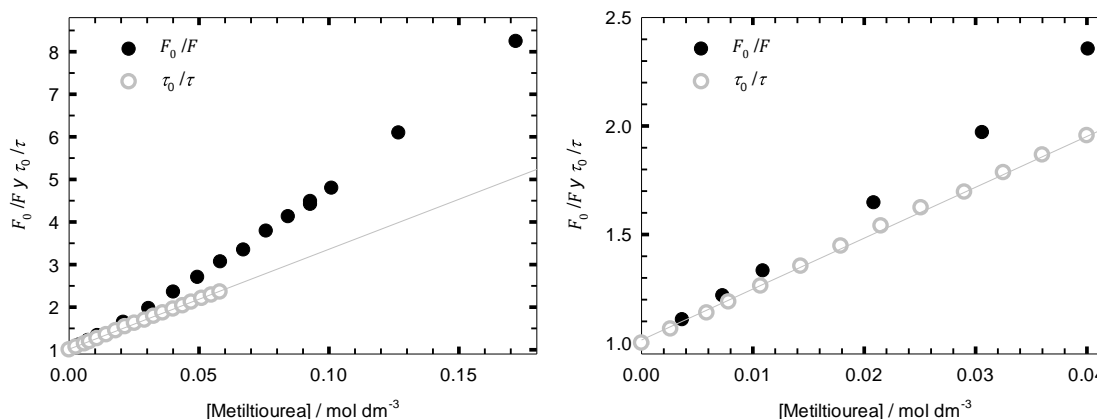


Figura 7.31. Influencia de la concentración de metiltiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0/F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento τ_0/τ (círculos grises), en ausencia y presencia de metiltiourea. Se incluye también el ajuste lineal obtenido para los tiempos (línea gris). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.76 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.15 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

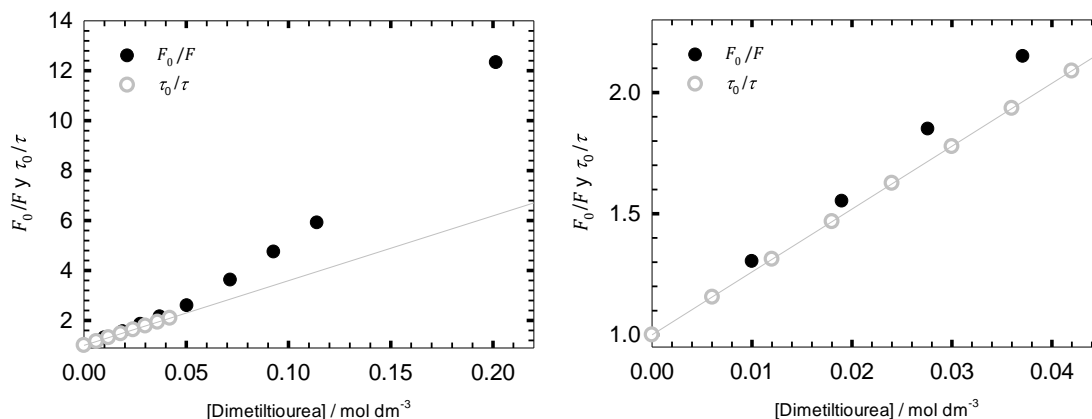


Figura 7.32. Influencia de la concentración de 1,3-dimetiltiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de 1,3-dimetiltiourea. Se incluye también el ajuste lineal obtenido para los tiempos (línea gris). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a 3.34×10^{-6} mol dm⁻³ y para medidas de tiempos de vida es igual a 4.17×10^{-6} mol dm⁻³. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

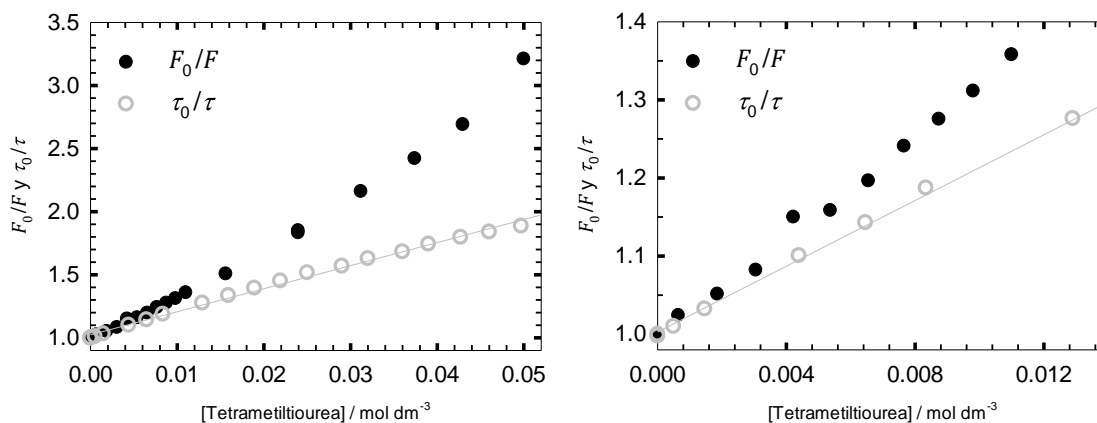


Figura 7.33. Influencia de la concentración de tetrametiltiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de intensidades de fluorescencia F_0 / F (círculos negros) y de tiempos de decaimiento τ_0 / τ (círculos grises), en ausencia y presencia de tetrametiltiourea. Se incluye también el ajuste lineal obtenido para los tiempos (línea gris). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a 3.19×10^{-6} mol dm⁻³ y para medidas de tiempos de vida es igual a 4.17×10^{-6} mol dm⁻³. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

Se ha investigado también la influencia de la metilurea sobre la fluorescencia de la proflavina. Se registró el espectro de fluorescencia de la proflavina en agua en presencia de diferentes concentraciones de metilurea. Se observa que la intensidad de fluorescencia permanece prácticamente invariable al ir aumentando la concentración de metilurea (ver Figura 7.34) apreciándose incluso un pequeño incremento de la intensidad de fluorescencia de la proflavina y no una disminución como en el caso de las tioureas.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

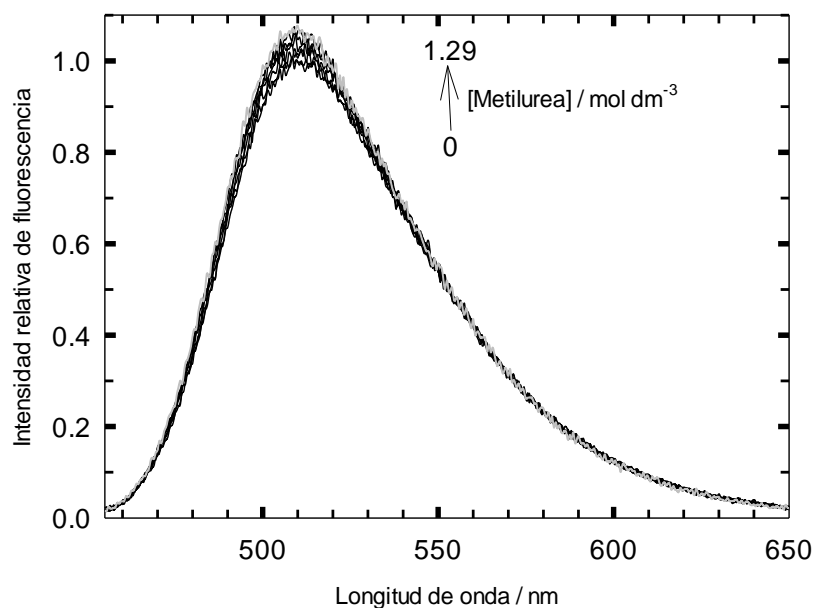


Figura 7.34. Espectros de emisión de fluorescencia de proflavina en agua, en presencia de metilurea en el intervalo de concentración de la misma de 0 a 1,29 mol dm⁻³, [PF] = 3.27×10⁻⁶ mol dm⁻³, λ_{exc} =445 nm.

7.2.2 Tiempos de vida de fluorescencia

Se midió el decaimiento de la fluorescencia de la proflavina en agua con distintas concentraciones de las cuatro tioureas estudiadas. Los decaimientos han sido reproducidos perfectamente por funciones monoexponenciales en todos los casos. En la Figura 7.35 se muestra un ejemplo.

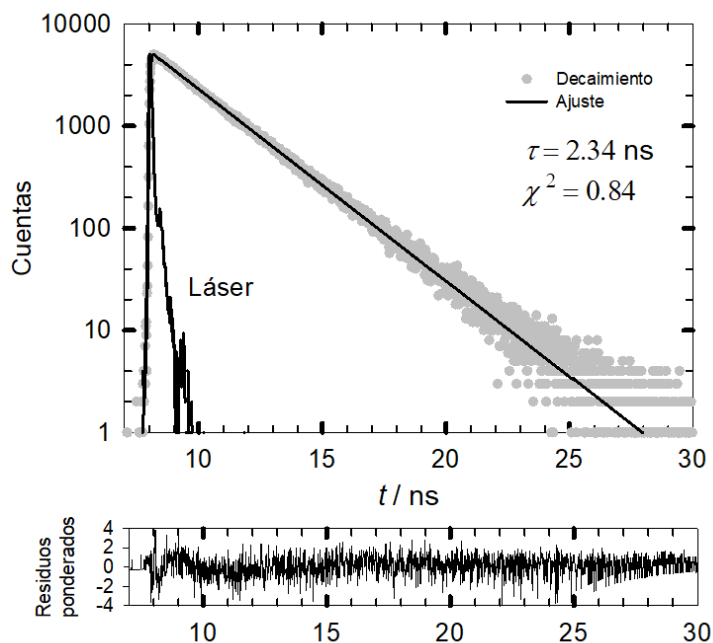


Figura 7.35. Decaimiento de la fluorescencia y función monoexponencial de ajuste para la proflavina 4.15×10⁻⁶ mol dm⁻³ en agua con una concentración de metiltiourea de 0.047 mol dm⁻³. La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm.

En las Tablas 7.8 a 7.11 se recogen los tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina obtenidos a distintas concentraciones de las diferentes tioureas. El tiempo de vida se reduce a medida que aumenta la concentración de tiourea en el medio.

Tabla 7.8. Valores de tiempos de vida de fluorescencia τ y del parámetro de bondad del ajuste χ^2 obtenidos para la proflavina en agua a distintas concentraciones de tiourea. La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm. [PF] = 4.18×10^{-6} mol dm⁻³.

[Tiourea] / mol dm ⁻³	τ / ns	χ^2
0	4.959(3)	1.03
4.97×10^{-3}	4.333(3)	1.01
0.0100	3.868(4)	0.99
0.0149	3.487(4)	0.96
0.0200	3.189(4)	0.96
0.0250	2.928(3)	0.94
0.0300	2.705(4)	0.93
0.0348	2.520(4)	0.93
0.0398	2.400(4)	0.92

Tabla 7.9. Valores de tiempos de vida de fluorescencia τ y del parámetro de bondad del ajuste χ^2 obtenidos para la proflavina en agua a distintas concentraciones de metiltiourea. La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm. [PF] = 4.15×10^{-6} mol dm⁻³.

[Metiltiourea] / mol dm ⁻³	τ / ns	χ^2
0	4.965(4)	1.04
2.61×10^{-3}	4.663(4)	1.05
5.86×10^{-3}	4.359(3)	1.01
7.82×10^{-3}	4.174(3)	1.04
0.0107	3.932(3)	0.99
0.0143	3.666(3)	1.03
0.0179	3.431(3)	0.93
0.0215	3.224(3)	0.93
0.0251	3.058(3)	0.99
0.0290	2.928(3)	0.99
0.0325	2.781(3)	0.97
0.0360	2.660(3)	0.91
0.0400	2.538(6)	0.88
0.0437	2.442(4)	0.89
0.0470	2.343(5)	0.84
0.0510	2.248(5)	0.90
0.0547	2.172(6)	0.94
0.0580	2.106(7)	0.88

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

Tabla 7.10. Valores de tiempos de vida de fluorescencia τ y del parámetro de bondad del ajuste χ^2 obtenidos para la proflavina en agua a distintas concentraciones de 1,3-dimetiltiourea. La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm. [PF] = 4.17×10^{-6} mol dm⁻³.

[DMT] / mol dm ⁻³	τ / ns	χ^2
0	4.972(4)	1.05
6.04×10^{-3}	4.302(4)	1.02
0.0120	3.790(3)	0.99
0.0180	3.386(3)	0.95
0.0240	3.058(3)	0.90
0.0300	2.797(3)	0.94
0.0360	2.570(3)	0.92
0.0420	2.380(3)	0.95

Tabla 7.11. Valores de tiempos de vida de fluorescencia τ y del parámetro de bondad del ajuste χ^2 obtenidos para la proflavina en agua a distintas concentraciones de tetrametiltiourea. La muestra se excita a 445 nm y se recoge la emisión a 510 nm. [PF] = 4.17×10^{-6} mol dm⁻³.

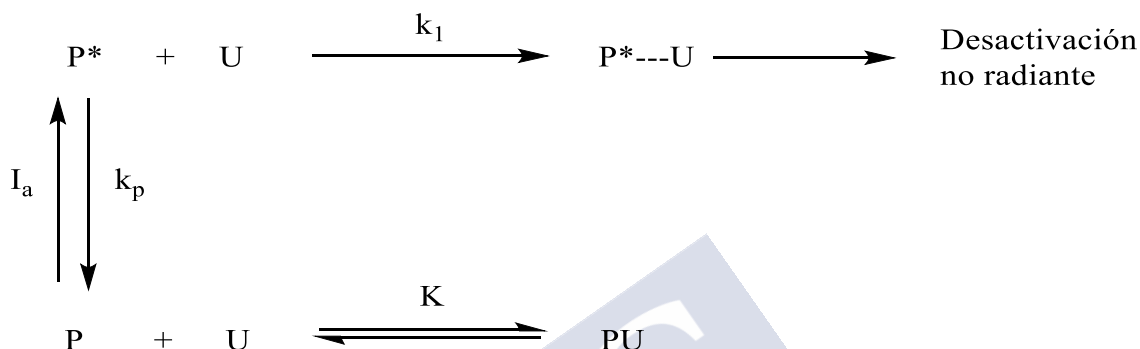
[TMT] / mol dm ⁻³	τ / ns	χ^2
0	4.961(4)	1.03
1.46×10^{-3}	4.794(4)	1.15
2.93×10^{-3}	4.641(4)	0.98
4.39×10^{-3}	4.496(3)	1.02
8.34×10^{-3}	4.168(3)	1.06
0.0129	3.878(3)	1.04
0.0159	3.705(4)	1.01
0.0189	3.550(3)	1.01
0.0219	3.410(3)	0.93
0.0250	3.265(3)	1.05
0.0290	3.155(3)	0.99
0.0320	3.039(3)	1.00
0.0360	2.941(3)	0.97
0.0390	2.838(3)	0.99
0.0427	2.754(3)	0.97
0.0460	2.691(3)	0.92
0.0497	2.624(3)	0.99

En las Figuras 7.30 a 7.33 se representa la variación de los tiempos de vida y de la intensidad de fluorescencia de la proflavina en presencia de tioureas en la forma de la representación de Stern-Volmer. El cociente de tiempos de vida τ_0/τ (siendo τ_0 el tiempo de vida de fluorescencia en ausencia de tioureas) muestra una dependencia lineal con la concentración de cualquiera de las tioureas, a diferencia del cociente F_0/F , que muestra una dependencia no lineal.

A continuación, se analizarán los resultados descritos anteriormente, relativos a la extinción de la fluorescencia de la proflavina por las distintas tioureas, y se propondrá un mecanismo capaz de explicar esos resultados.

7.2.3 Modelo de desactivación

En las Figuras 7.30 a 7.33 se aprecia una dependencia lineal del cociente de tiempos de vida τ_0/τ con la concentración de todas las tioureas investigadas. Ello parece indicar que el proceso de desactivación de la proflavina excitada por las tioureas es un proceso de quenching dinámico. Sin embargo, la gráfica no lineal del cociente de intensidades de fluorescencia F_0/F respecto a la concentración de las tioureas indica que el proceso es más complejo. La desviación positiva de la gráfica de Stern-Volmer podría ser debida a la existencia de un proceso de complejación en el estado fundamental, tal como se presenta en el Esquema 7.2.



Esquema 7.2. Modelo de desactivación de la proflavina (P) por tioureas (U), con formación de un complejo en estado fundamental (PU) y desactivación no radiante en el estado excitado.

En el Esquema 7.2 planteamos que la única especie emisora en las disoluciones de proflavina con tioureas es la proflavina libre. El comportamiento monoexponencial de los decaimientos de fluorescencia apoya esta hipótesis. Proponemos entonces que la interacción con la tiourea provoca la desactivación de la proflavina sin producir nuevas especies emisoras. Por otra parte, la invarianza de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia con la concentración de tiourea indica asimismo que el complejo que se propone en estado fundamental tampoco debe tener una emisión significativa.

Para comprobar si el modelo propuesto es capaz de reproducir los resultados experimentales obtenidos, deducimos a continuación la ecuación que representa la influencia de la concentración de tiourea sobre la intensidad de fluorescencia de la proflavina.

El equilibrio de formación de un complejo propuesto en estado fundamental implica la siguiente relación entre sus concentraciones (dado que se utilizan concentraciones relativamente bajas, suponemos que las actividades son prácticamente iguales a las concentraciones):

$$K = \frac{[\text{PU}]}{[\text{P}][\text{U}]} \quad (7.52)$$

Si llamamos a_0 a la concentración de proflavina total en la disolución, debe verificarse:

$$a_0 = [\text{P}] + [\text{PU}] \quad (7.53)$$

Combinando las ecuaciones (7.52) y (7.53) obtenemos fácilmente las concentraciones de proflavina libre y complejada en la disolución:

$$[\text{P}] = \frac{a_0}{1 + K[\text{U}]} \quad (7.54)$$

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

$$[PU] = \frac{a_0 K [U]}{1 + K [U]} \quad (7.55)$$

En estas ecuaciones, [U] representa la concentración de tiourea total en la disolución, que puede considerarse igual a la de tiourea libre, dado que el gran exceso de concentración de tiourea frente a proflavina implica que la concentración de tiourea complejada es despreciable frente a la de tiourea libre.

Por su parte, la concentración de proflavina excitada en estado estacionario bajo iluminación continua vendrá dada por:

$$[P]_{ss}^* = \frac{I_a}{k_p + k_1 [U]} \quad (7.56)$$

donde I_a representa la velocidad de absorción de fotones por la proflavina (moles absorbidos por unidad de volumen y tiempo).

En situaciones de baja absorbancia (valores inferiores aproximadamente a 0.05, condiciones en las que se realizaron las medidas de espectros de fluorescencia), la intensidad de luz absorbida por la proflavina a una determinada longitud de onda es proporcional a su concentración⁹⁵ y puede expresarse como:

$$I_a = I_0 2.303 \epsilon_p l [P] \quad (7.57)$$

donde I_0 es la intensidad de la radiación incidente, ϵ_p es el coeficiente de absorción molar de la proflavina a la longitud de onda de trabajo y l la longitud de paso de luz en la cubeta. Combinando las ecuaciones (7.54), (7.56) y (7.57) se obtiene:

$$[P]_{ss}^* = \frac{I_0 2.303 \epsilon_p l}{k_p + k_1 [U]} \times \frac{a_0}{1 + K [U]} \quad (7.58)$$

El espectro de fluorescencia de la proflavina (F_P) depende de la concentración de esta especie en el estado excitado según la ecuación:

$$F_P = \chi_P k_r^P [P]_{ss}^* \quad (7.59)$$

en la cual k_r^P es la constante de desactivación radiante de la proflavina y χ_P un vector que incluye las intensidades relativas de emisión de fluorescencia de la proflavina a cada longitud de onda. Sustituyendo (7.58) en (7.59), se obtiene fácilmente la siguiente expresión:

$$F_P = \chi_P \frac{k_r^P}{k_p} I_0 2.303 \epsilon_p l a_0 \frac{1}{\left(1 + \frac{k_1}{k_p} [U]\right) (1 + K [U])} \quad (7.60)$$

Como sabemos, la relación k_r^P/k_p representa el rendimiento cuántico de fluorescencia de P (ϕ^P) en ausencia de desactivador. Así, la relación anterior puede escribirse:

$$F_P = \chi_P \phi^P I_0 2.303 \epsilon_p l a_0 \frac{1}{\left(1 + \frac{k_1}{k_p} [U]\right) (1 + K [U])} \quad (7.61)$$

En ausencia de desactivador, el espectro de fluorescencia de la proflavina (F_P^0) viene dado por:

$$F_p^0 = \chi_p \phi^p I_0 2.303 \epsilon_p l a_0 \quad (7.62)$$

A partir de las dos últimas ecuaciones puede escribirse la siguiente expresión, que representa el espectro de fluorescencia de la disolución que se obtendría a cualquier concentración de tiourea:

$$F_p = F_p^0 \frac{1}{\left(1 + \frac{k_1}{k_p} [U]\right) (1 + K [U])} \quad (7.63)$$

La ecuación (7.63) implica que, a cualquier longitud de onda de emisión, el cociente de la intensidad de fluorescencia en ausencia (F_0) y en presencia (F) de quencher estaría descrita por la siguiente ecuación cuadrática en la concentración de tiourea:

$$\frac{F_0}{F} = \left(1 + \frac{k_1}{k_p} [U]\right) (1 + K [U]) \quad (7.64)$$

que puede escribirse también:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \left(\frac{k_1}{k_p} + K\right) [U] + \frac{k_1}{k_p} K [U]^2 \quad (7.65)$$

Como puede apreciarse en la ecuación (7.65), el cociente de intensidades en ausencia y presencia de desactivador viene dado, según este modelo, por una ecuación cuadrática respecto a la concentración de tiourea, que explicaría la desviación positiva de los datos experimentales respecto al comportamiento lineal de la ecuación de Stern-Volmer (Figuras 7.30 a 7.33).

Para completar el análisis del mecanismo de desactivación de la proflavina por ureas, resta deducir la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración de tioureas. De acuerdo con el mecanismo propuesto en el Esquema 7.2, la velocidad de desaparición de la proflavina excitada viene dada por:

$$-\frac{d[P]^*}{dt} = (k_p + k_1[U])[P]^* \quad (7.66)$$

Esta ecuación puede escribirse:

$$-\frac{d[P]^*}{[P]^*} = (k_p + k_1[U]) dt \quad (7.67)$$

La integración de la ecuación (7.67) proporciona el siguiente resultado para la dependencia temporal de la concentración de la proflavina excitada tras un impulso de luz muy corto:

$$-\ln \frac{[P]^*}{[P]^*0} = (k_p + k_1[U]) t \quad (7.68)$$

En la ecuación anterior, $[P]^*$ representa la concentración de proflavina excitada en cualquier instante de tiempo tras la excitación, mientras que $[P]^*0$ representa la concentración inicialmente excitada por el pulso de luz. Despejando la concentración a cualquier tiempo:

$$[P]^* = [P]^*0 e^{-(k_p + k_1[U])t} \quad (7.69)$$

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

La ecuación (7.69) indica que la concentración de proflavina excitada debe disminuir con el tiempo según una función monoexponencial, tal como se encontró experimentalmente en el estudio del quenching de la fluorescencia de la proflavina por tioureas.

El tiempo de vida τ de la proflavina excitada, según la ecuación (7.69), decrece a medida que aumenta la concentración de tiourea:

$$\tau = \frac{1}{(k_p + k_1[U])} \quad (7.70)$$

Además, llamando τ_0 al tiempo de vida de la proflavina en ausencia de tiourea,

$$\tau_0 = \frac{1}{k_p} \quad (7.71)$$

deducimos que el cociente de tiempos de vida de la proflavina en ausencia y presencia de tiourea debe ser una función lineal de la concentración de tiourea:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \frac{k_1}{k_p} [U] \quad (7.72)$$

La dependencia lineal que predice la ecuación (7.72) coincide con el comportamiento experimental observado para los tiempos de vida de fluorescencia (Figuras 7.30 a 7.33).

Para comprobar la validez del modelo propuesto, procedimos a realizar para cada tiourea un ajuste global de las ecuaciones (7.65) y (7.70) a los datos experimentales del cociente de intensidades de fluorescencia F_0/F en el máximo de emisión (Figuras 7.30 a 7.33) y de los tiempos de vida de fluorescencia (Tablas 7.9 a 7.12), determinados en presencia de distintas concentraciones de cada tiourea. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 7.36 a 7.39. Puede apreciarse la buena concordancia de los valores calculados con los experimentales, tanto de las intensidades como los tiempos de vida de fluorescencia, utilizando el único conjunto de valores optimizados de constantes de velocidad y equilibrio que se muestran en la Tabla 7.12. La buena calidad de los ajustes puede apreciarse también en las Figuras 7.40 a 7.43.

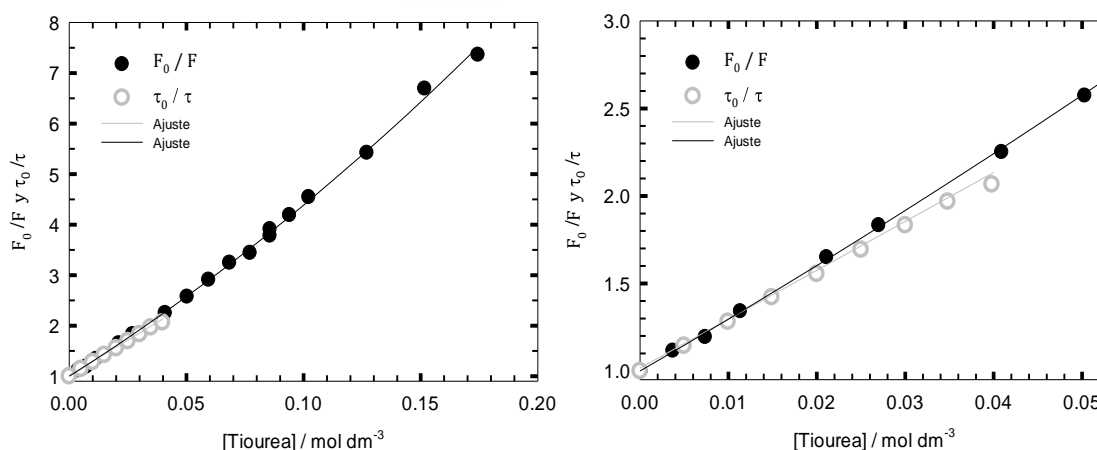


Figura 7.36. Influencia de la concentración de tiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.55 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.18 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

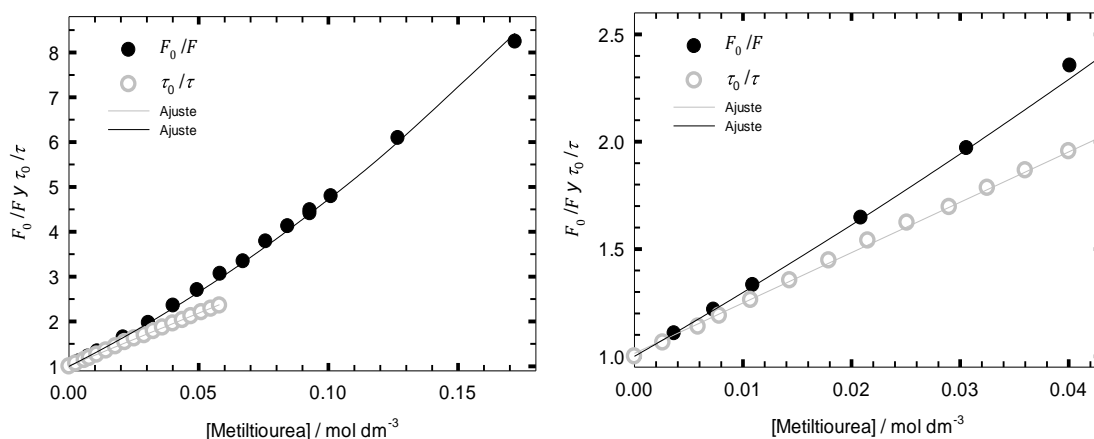


Figura 7.37. Influencia de la concentración de metiltiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $2.76 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.15 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

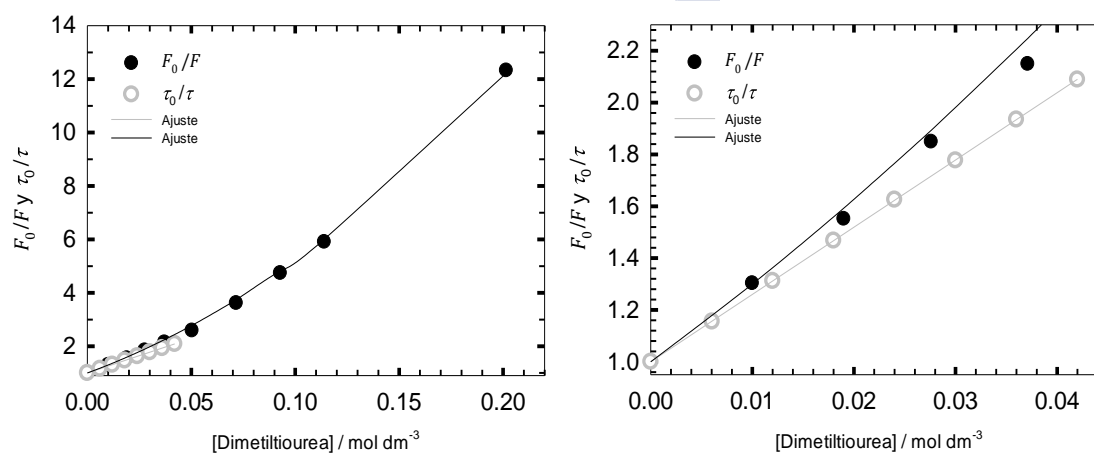


Figura 7.38. Influencia de la concentración de 1,3-dimetiltiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $3.34 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.17 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

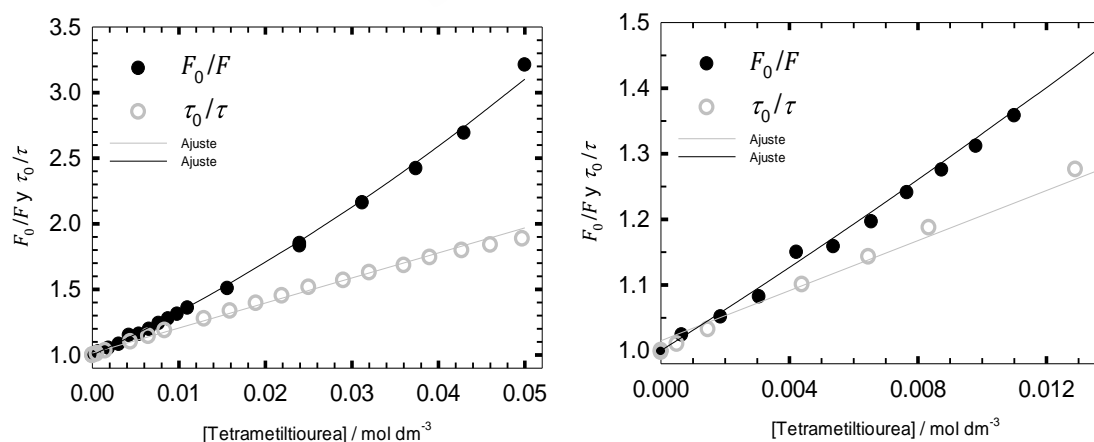
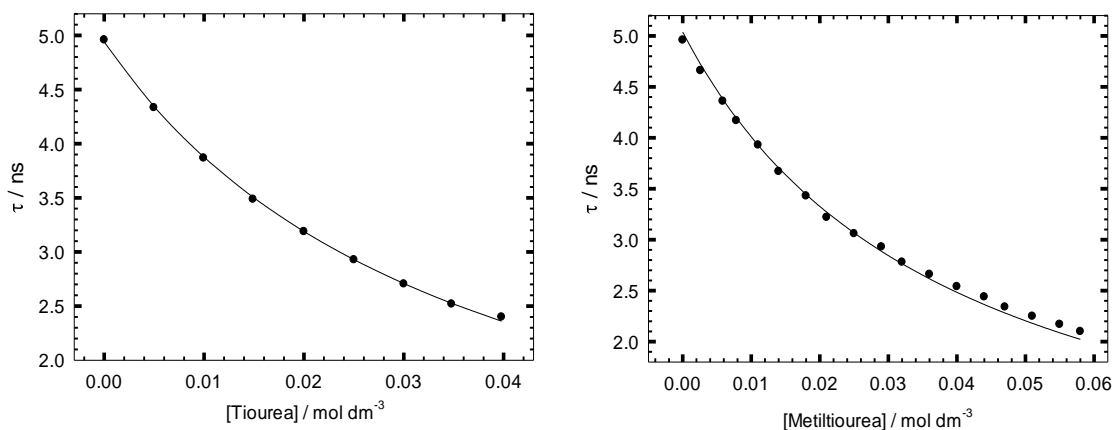


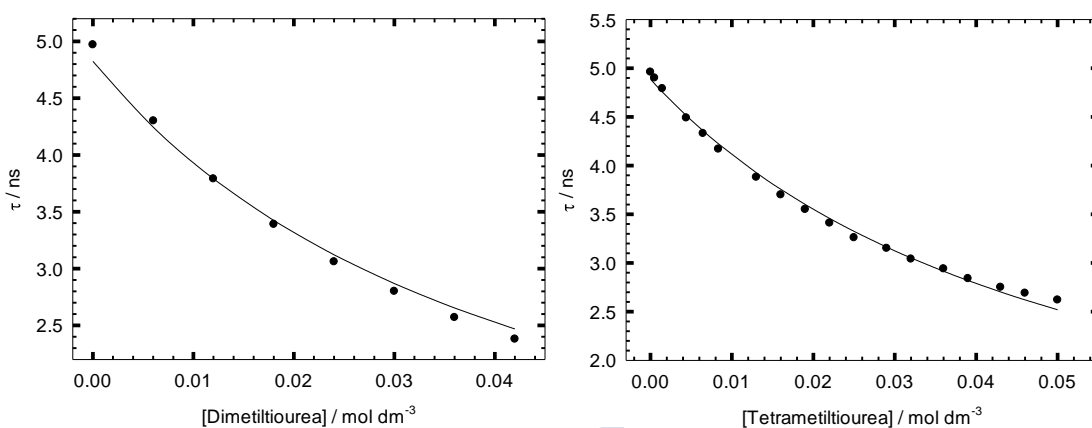
Figura 7.39. Influencia de la concentración de tetrametiltiourea en la fluorescencia de la proflavina en agua. Representación del cociente de F_0 / F (círculos negros), el cociente τ_0 / τ (círculos grises) y el ajuste global para ambos (línea negra y gris respectivamente). La concentración de proflavina en estado estacionario es igual a $3.19 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y para medidas de tiempos de vida es igual a $4.17 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisión a 510 nm y excitación a 445 nm.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

En las Figuras 7.40 a 7.43 se representan gráficamente los tiempos de vida de fluorescencia obtenidos para la proflavina en agua con distintas concentraciones de las cuatro tioureas estudiadas, así como el ajuste global de las ecuaciones (7.65) y (7.70).



Figuras 7.40 y 7.41. Tiempos de vida de fluorescencia experimentales y calculados (obtenidos mediante ajuste global de las ecuaciones (7.65) y (7.70) de la proflavina en agua con distintas concentraciones de tiourea(izquierda) y metiltiourea (derecha)).



Figuras 7.42 y 7.43. Tiempos de vida de fluorescencia experimentales y calculados (obtenidos mediante ajuste global de las ecuaciones (7.65) y (7.70) de la proflavina en agua con distintas concentraciones de 1,3-dimetiltiourea (izquierda) y tetrametiltiourea (derecha)).

Tabla 7.12. Constantes de velocidad y equilibrio obtenidas en los ajustes globales de intensidades y tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en agua en presencia de diferentes tioureas y valores de las energías de ionización (EI) de las tioureas en fase gaseosa.

Parámetro	Tiourea	Metiltiourea	1,3-dimetiltiourea	Tetrametiltiourea
k_p/ns^{-1}	0.2050(25)	0.1985(14)	0.2073(29)	0.2047(9)
$k_1/\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{ns}^{-1}$	5.63(16)	5.105(82)	4.71(18)	3.845(58)
$K/(\text{mol}^{-1} \text{dm}^3)$	1.70(25)	3.22(18)	5.91(44)	12.00(41)
EI/eV ^a	8.5	8.29	8.17	7.82

^a Ref. 108

Los valores de k_p , la constante de desactivación de la proflavina, optimizados en el ajuste global de intensidades y tiempos de vida de fluorescencia de la proflavina en presencia de tioureas, coinciden perfectamente con el valor determinado en ausencia de tioureas (valor promedio de 0.204 ns^{-1} obtenido en los ajustes, frente al valor promedio 0.201 ns^{-1} obtenido en la medida directa).

Los valores obtenidos de la constante de desactivación de la proflavina excitada por las tioureas toman valores altos (k_1 entre $3.8 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ y $5.6 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, Tabla 7.12), que indican un valor próximo al control por difusión¹⁰⁹. Los valores obtenidos son un poco más bajos que el máximo obtenido para los aniones, también controlado por difusión ($1.8 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, Tabla 7.7) lo que puede explicarse fácilmente teniendo en cuenta que la proflavina está protonada y tiene carga positiva, por lo que la velocidad del proceso de encuentro en disolución con los aniones tiene un valor superior al de las especies neutras debido a la atracción electrostática. Ya en estudios del quenching de la fluorescencia de la proflavina por el ion yoduro y por la aliltiourea mediante técnicas de estado estacionario se había propuesto un control por difusión del proceso, basándose en la influencia de la viscosidad en la eficiencia del quenching¹¹⁰.

Valores similares de la constante de quenching k_1 (entre $3.2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ y $4.7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) se han encontrado también en el estudio del quenching de derivados de la acridina por distintos compuestos tioorgánicos neutros (aminoácidos y ácidos carboxílicos) en disolución acuosa¹¹¹. En ese trabajo se comprobó que cuando una acridina con carga positiva era desactivada por un quencher de carga negativa, la constante de quenching aumentaba proporcionalmente al producto de las cargas, lo que indicaba que la difusión era el factor principal de control de la velocidad del proceso.

En la Tabla 7.12 parece apreciarse una disminución de la constante de velocidad k_1 al ir aumentando el número de sustituyentes metilo en la tiourea. Dado el control por difusión del proceso, este hecho seguramente refleja el aumento del tamaño de la tiourea, lo que provoca una disminución de su velocidad de difusión, así como un aumento del factor estérico, si el proceso de desactivación requiere una orientación específica de los reactivos. En estudios de transferencia de carga entre el antraceno excitado y la *N,N*-dietilanilina se pudo demostrar que la reorientación molecular relativa entre los reactivos era esencial en el proceso¹¹².

A pesar de la disminución de la constante de velocidad de reacción de la proflavina excitada con las tioureas al aumentar el número de metilos, la efectividad observada del quenching sigue la tendencia inversa (véase la Figura 7.44). Esto es debido a que la constante de equilibrio K de formación del complejo no fluorescente entre la proflavina en el estado fundamental y la tiourea muestra un claro incremento al aumentar el número de metilos sustituyentes (Tabla 7.12). Este hecho puede ser debido a que la estabilización del complejo tenga un importante componente de transferencia de carga. A mayor número de metilos, mayor facilidad para ceder electrones tiene la tiourea (véanse los valores de energías de ionización que se incluyen en la Tabla 7.12), y por tanto, mayor tendencia a formar complejos de transferencia de carga. En la Figura 7.45 se representa el logaritmo de la constante de equilibrio de complejación frente a la energía de ionización de las tioureas en fase gaseosa. La correlación obtenida apoya la propuesta de que estos complejos resultan estabilizados por transferencia de carga desde las tioureas a la proflavina.

7. Desactivación de la emisión de fluorescencia de la proflavina por diferentes compuestos

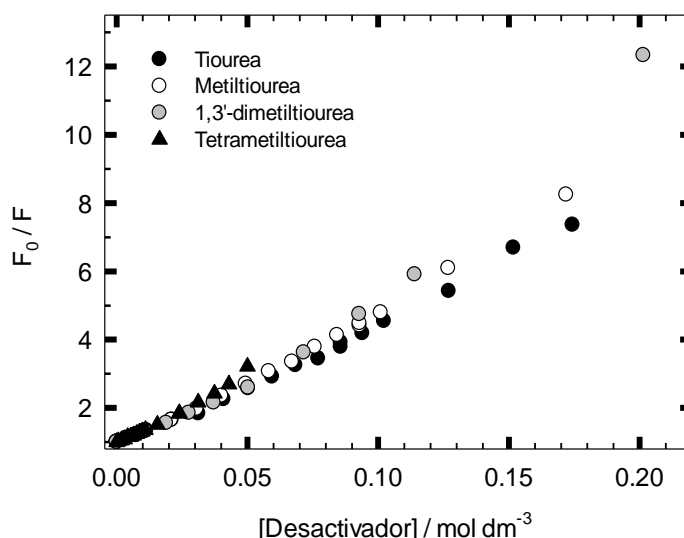


Figura 7.44. Influencia de la concentración de diferentes tioureas sobre el cociente de intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia de tiourea a 510 nm.

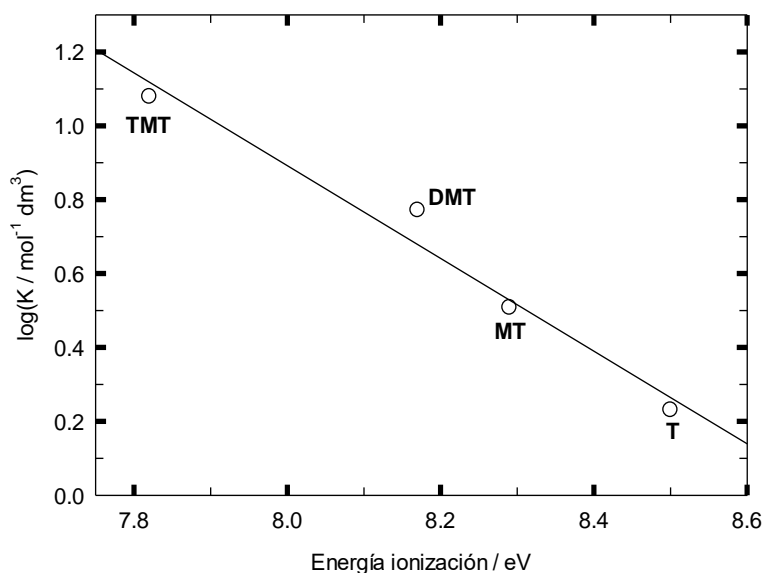


Figura 7.45. Valores del logaritmo de la constante de equilibrio de formación del complejo entre la proflavina y las tioureas en el estado electrónico fundamental, representados frente a la energía de ionización en fase gaseosa de las tioureas (T: tiourea; MT: metiltiourea; DMT: 1,3-dimetiltiourea; TMT: tetrametiltiourea) (valores en la Tabla 7.12).

La comparación de los mecanismos propuestos para explicar la desactivación de la proflavina por aniones y tioureas (Esquemas 7.1 y 7.2) parece indicar una mayor tendencia a formar complejos en el caso de las tioureas (se observa el complejo en estado fundamental para las tioureas, pero no para los aniones), junto a una mayor efectividad de los procesos de desactivación no radiantes. Así, aunque la constante de velocidad de reacción de la proflavina excitada con los aniones azida, yoduro y tiocianato es mayor que con las tioureas, la efectividad del quenching en estado excitado es mayor para estas últimas, al no observarse ni el proceso de regeneración de los reactivos, ni la emisión de un excíplejo. Esto indica una gran efectividad de la desactivación no radiante para los complejos de encuentro de la proflavina excitada con las tioureas. Por otra parte, también el hecho de que no se observe emisión alguna de los complejos proflavina-tioureas existentes en estado fundamental indica la gran efectividad de la desactivación no

radiante. Si un complejo en estado fundamental absorbe un fotón, se desactivará de forma muy efectiva por procesos no radiantes, impidiendo la emisión de fluorescencia.

No podemos conocer con detalle la naturaleza de los procesos no radiantes tan efectivos en los complejos de encuentro de la proflavina con tioureas, pero los hechos apuntan a que puede tratarse de una transferencia electrónica. El único valor publicado que hemos encontrado para el potencial de reducción de la tiourea es igual a $E((\text{NH}_2)_2\text{CS}^{\bullet+}/(\text{NH}_2)_2\text{CS}) = 1.074 \text{ V}$ en acetonitrilo referido al electrodo normal de hidrógeno¹¹³. Este valor fue obtenido por voltametría cíclica, pero la publicación no especifica si el sistema se comporta como reversible. Esta circunstancia, y el hecho de que el potencial se ha obtenido en acetonitrilo, hace que no podamos considerar este valor como una medida del potencial estándar directamente comparable con los potenciales de los aniones que aparecen en la Tabla 7.7. Su valor aproximado, sin embargo, parece indicar que la tiourea podría tener una capacidad reductora similar a la de los aniones más efectivos de la Tabla 7.7. Los hechos experimentales apuntan a que incluso podría ser superior, dada la gran efectividad de la desactivación.

Otro hecho que apunta también a la transferencia electrónica como causa de la desactivación del estado excitado de la proflavina por tioureas es el hecho de que la metilurea no produce desactivación de la fluorescencia de la proflavina. La intensidad de fluorescencia de la proflavina incluso aumenta muy ligeramente al incrementarse la concentración de metilurea hasta 1.3 mol dm^{-3} , tal como se muestra en la Figura 7.34. La diferencia de comportamiento entre la metilurea y las tioureas investigadas es debido probablemente a la inferior capacidad para ceder electrones de las ureas respecto a las tioureas. El potencial de reducción de la urea vale $E((\text{NH}_2)_2\text{CO}^{\bullet+}/(\text{NH}_2)_2\text{CO}) = 3.104 \text{ V}$ en acetonitrilo referido al electrodo normal de hidrógeno¹¹³, mucho mayor que el de la tiourea (1.074 V) medido en las mismas condiciones, lo que refleja la gran diferencia en la capacidad de ceder electrones entre ambos compuestos. Es bien conocido que esto se debe a la superior habilidad del átomo de azufre respecto al oxígeno para estabilizar un catión radical, pero también un anión o un radical, que se hace todavía más notable en el caso de las amidas y ureas debido al enlace más débil C=S respecto al C=O¹¹³.

Los valores de la constante de equilibrio K de formación de los complejos proflavina-tioureas en estado fundamental son entre uno y dos órdenes de magnitud inferiores a los obtenidos para los complejos de la proflavina excitada con los aniones más eficientes como desactivadores (véanse valores en las Tablas 7.7 y 7.12). Si la transferencia de carga es un factor decisivo para la estabilidad de los complejos, este hecho es debido probablemente a la mayor capacidad de transferencia de carga de la proflavina excitada respecto a la misma especie en estado electrónico fundamental.

8. COMPORTAMIENTO DE LA PROFLAVINA CON MACROCICLOS

8.1 4-SULFOCALIX[6]ARENO (SCX6)

8.1.1 Serie de absorción

Se han registrado los espectros de absorción de la proflavina en presencia de 4-sulfocalix[6]areno (SCX6) $1.19 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (ver Figura 8.1), en el intervalo de concentración de la sonda de $0-5.4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

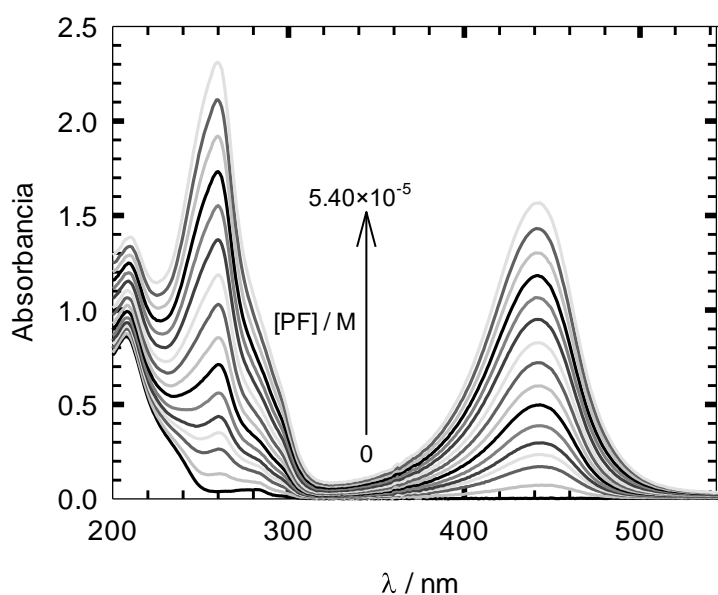
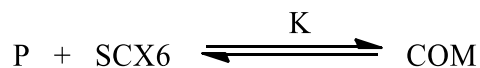


Figura 8.1. Espectros de absorción de la proflavina en agua en presencia de SCX6 para el intervalo de concentración de PF $0-5.4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $[\text{SCX6}] = 1.19 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

En la Figura 8.1 se puede observar que el espectro de absorción del SCX6 ($[\text{PF}] = 0 \text{ mol dm}^{-3}$) muestra una banda situada en torno a 210 nm mientras que la absorbancia del calixareno es despreciable a $\lambda > 330 \text{ nm}$. A medida que aumenta la concentración de PF la banda situada a 445 nm, que corresponde a la forma catiónica de la PF, va aumentando su absorbancia.

El SCX6 tiene densidad de carga negativa en el borde superior debido a sus 6 grupos sulfonato, por lo que puede asociarse con la PF, que se encuentra en su forma protonada P, dando lugar a un complejo 1:1, que llamaremos COM para simplificar la notación, de acuerdo con el equilibrio:



La constante de complejación K sería igual a:

$$K = \frac{[\text{COM}]}{[\text{P}][\text{SCX6}]} = \frac{x}{(a_0 - x)(b_0 - x)} \quad (8.1)$$

donde x es la concentración de complejo y a_0 y b_0 representan las concentraciones totales de PF y SCX6 (esta última constante en la serie) respectivamente.

Dado que las concentraciones a_0 y b_0 son del mismo orden de magnitud, no se puede despreciar la x en ninguno de los términos del denominador. Reagrupando términos en la ecuación (8.1) y simplificando llegamos a la siguiente ecuación de segundo grado:

$$x^2 + x \left(-a_0 - b_0 - \frac{1}{K} \right) + a_0 b_0 = 0 \quad (8.2)$$

Despejando x y resolviendo la ecuación (8.2) se comprobó que la solución correcta era la siguiente:

$$x = \frac{\left(a_0 + b_0 + \frac{1}{K} \right) - \sqrt{\left(-a_0 - b_0 - \frac{1}{K} \right)^2 - 4a_0 b_0}}{2} \quad (8.3)$$

La absorbancia a cualquier longitud de onda λ vendrá dada por:

$$A^\lambda = A_P^\lambda + A_{SCX6}^\lambda + A_{COM}^\lambda \quad (8.4)$$

donde A_P^λ , A_{SCX6}^λ y A_{COM}^λ son las absorbancias del catión de la PF, el SCX6 y el complejo respectivamente a la longitud de onda λ .

Asumiendo que se cumple la ley de Lambert-Beer, de la ecuación (8.4) se obtiene:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda \times l \times [P] + \varepsilon_{SCX6}^\lambda \times l \times [SCX6] + \varepsilon_{COM}^\lambda \times l \times [COM] \quad (8.5)$$

donde ε_P^λ , $\varepsilon_{SCX6}^\lambda$ y $\varepsilon_{COM}^\lambda$ son los coeficientes de absorción molar de P, SCX6 y COM respectivamente.

Sustituyendo [P], [SCX6] y [COM] por su valor llegamos a la siguiente expresión:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda (a_0 - x) + \varepsilon_{SCX6}^\lambda (b_0 - x) + \varepsilon_{COM}^\lambda x \quad (8.6)$$

Reagrupando términos obtenemos la ecuación:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda a_0 + \varepsilon_{SCX6}^\lambda b_0 - x(\varepsilon_P^\lambda + \varepsilon_{SCX6}^\lambda - \varepsilon_{COM}^\lambda) \quad (8.7)$$

De acuerdo con la ecuación (8.7), en ausencia de complejación ($x = 0$) la absorbancia aumentaría linealmente con la concentración total de proflavina (a_0) con una pendiente ε_P^λ , pero a medida que se forma el complejo el aumento de A^λ con a_0 es menor que el dado por la recta anterior como consecuencia del término negativo, por lo que en la representación de A^λ frente a λ debe aparecer una curvatura hacia abajo.

En la Figura 8.2 se ha representado la absorbancia experimental frente a la concentración de proflavina a 260 nm, 400 nm, 440 nm y 470 nm. Se observa claramente que la dependencia de la absorbancia con a_0 no es lineal, sino que muestra una curvatura hacia abajo, lo que soporta la hipótesis de que hay complejación de la sonda con el SCX6.

Se ha comprobado si las ecuaciones (8.3) y (8.7) se ajustan a los datos experimentales de absorbancia-[proflavina]. Primero se ha realizado un ajuste global de las ecuaciones (8.3) y (8.7) a los datos de absorbancia correspondientes a la primera banda de absorción: intervalo 350-550 nm, lectura de un punto cada 10 nm. En la Figura 8.2 se ha representado el valor optimizado de la absorbancia frente a la concentración de PF, a_0 , a 410 nm, 440 nm y 470 nm, poniéndose de manifiesto que las ecuaciones (8.3) y (8.7) ajustan perfectamente los datos experimentales.

8. Comportamiento de la proflavina con macrociclos

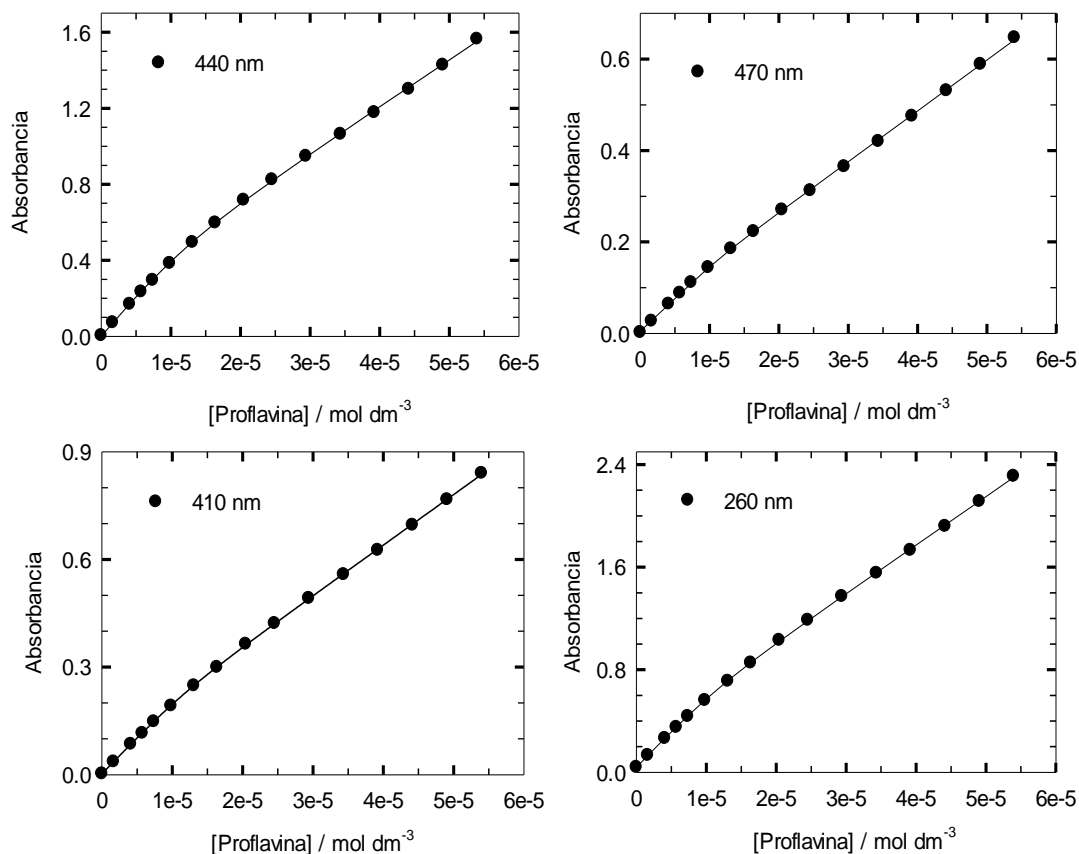


Figura 8.2. Absorbancia de la PF en presencia de SCX6 en función de la concentración de PF a diferentes longitudes de onda y ajuste de las ecuaciones (8.3) y (8.7) a los datos experimentales.

El ajuste global proporciona además los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX6}^λ y ϵ_{COM}^λ en el intervalo de longitud de onda analizado (ver Figura 8.3) y de la constante de complejación K , cuyo valor fue: $K = 7(1) \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$.

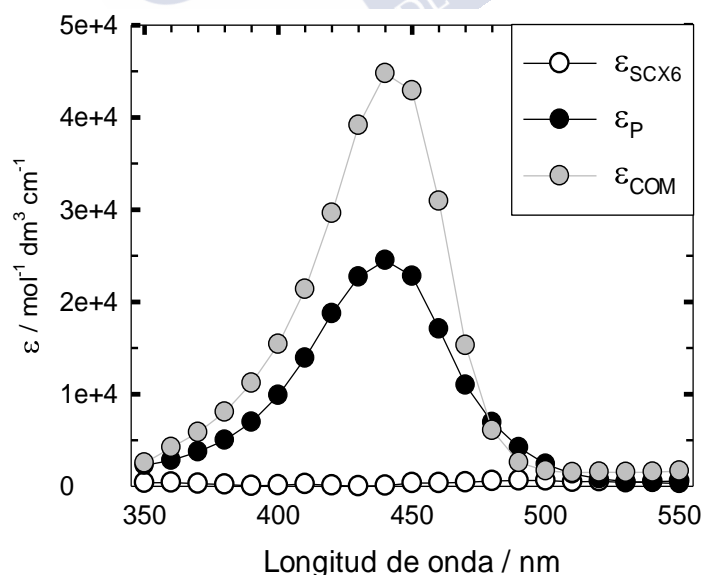


Figura 8.3. Representación de los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX6}^λ y ϵ_{COM}^λ obtenidos del ajuste global de las ecuaciones (8.3) y (8.7) a los datos experimentales de absorbancia-[proflavina] a diferentes longitudes de onda de la primera banda de absorción de la PF.

En la Figura 8.3 se observa que la primera banda de absorción obtenida para el catión complejoado COM, es muy semejante a la de P libre, mientras que el SCX6, como era esperado, no muestra absorción apreciable en ese intervalo de longitud de onda. Hay que indicar que, a pesar de la buena coincidencia entre la absorbancia experimental y calculada (Figura 8.2), el ajuste ha proporcionado un valor para ϵ_P , en el máximo (ver Figura 8.3) muy inferior al obtenido en el capítulo 5 ($4.07 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, ver Figura 5.9) y al bibliográfico ($3 - 4.2 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)^{47,90}.

Seguidamente se ha repetido el análisis global para los datos correspondientes a la segunda banda de absorción de la proflavina: intervalo 205–320 nm, leyendo un punto cada 5 nm. La buena calidad del ajuste se aprecia en la Figura 8.2, que muestra los datos experimentales de absorbancia frente a la concentración de proflavina a 260 nm así como los proporcionados por la optimización. La Figura 8.4 recoge los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX6}^λ y ϵ_{COM}^λ obtenidos del ajuste global de las ecuaciones (8.3) y (8.7) a los datos experimentales de absorbancia correspondientes a la segunda banda de absorción. Se percibe en la Figura 8.4 que el espectro del complejo muestra las contribuciones de P (banda situada a ~255 nm) y SCX6 (hombro a 285 nm y región en torno a 210 nm).

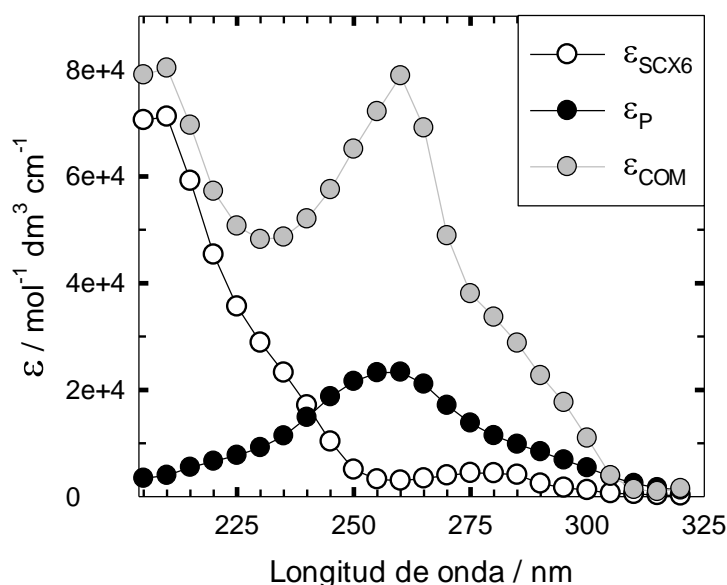


Figura 8.4. Representación de los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX6}^λ y ϵ_{COM}^λ obtenidos del ajuste global de las ecuaciones (8.3) y (8.7) a los datos experimentales de absorbancia-[proflavina] a diferentes longitudes de onda de la segunda banda de absorción de la PF.

La optimización condujo a un valor para la constante de asociación K de $1.71(8) \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. Vemos que este valor de K es significativamente diferente que el obtenido del ajuste de los datos de la primera banda de absorción de la PF ($7(1) \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$). Además, como ya se ha mencionado anteriormente, el valor obtenido para ϵ_P en el máximo de la primera banda de absorción es significativamente inferior al que le corresponde a P. Estos hechos sugieren que el modelo de asociación del SCX6 con P no es tan sencillo como el que hemos propuesto. El estudio de la influencia de la concentración de SCX6 sobre la fluorescencia de P*, que se aborda a continuación, puede proporcionar información relevante sobre el proceso de complejación.

8.1.2 Serie de fluorescencia

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de la PF, a $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$, en agua en presencia de SCX6 (ver Figura 8.5) aumentando progresivamente la concentración del calixareno en el intervalo de 0 a $5.83 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ para una concentración de PF constante de $2.3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

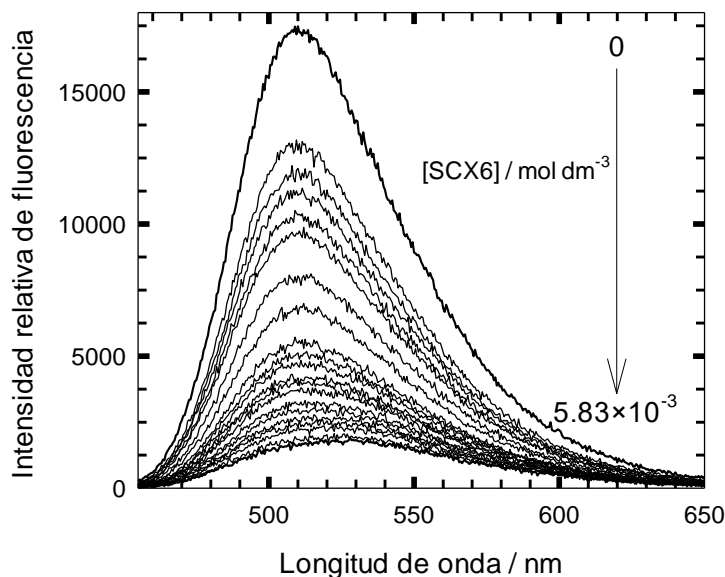


Figura 8.5. Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua, en presencia de SCX6 en el intervalo de concentración $0 - 5.83 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. $[\text{PF}] = 2.3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$.

Observando la Figura 8.5 vemos como a medida que aumenta la concentración de SCX6 la intensidad de fluorescencia de la PF, debida al catión P^* , va disminuyendo y parece que el espectro de emisión se desplaza ligeramente hacia el rojo. El desplazamiento observado para el espectro de emisión de la PF en presencia de SCX6 indica que hay dos especies emisoras distintas en disolución.

Por otra parte, en la Figura 8.6 se han representado los espectros de excitación de la PF sin SCX6 y cuando la concentración de SCX6 es $4.33 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, así como el espectro de absorción de la PF en agua. Observamos que ambos espectros de excitación son distintos, por lo que hay dos especies distintas en el estado fundamental. El espectro de excitación obtenido cuando la concentración de SCX6 es cero se superpone con el espectro de absorción de P, en concordancia con el hecho de que a pH neutro el catión es la forma estable de la proflavina. Sin embargo, el espectro de excitación obtenido para una concentración de SCX6 de $4.33 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ está ligeramente desplazado al rojo respecto al registrado en ausencia de SCX6, lo que indica que existe alguna interacción entre P y el SCX6. Como se discutió en el apartado 8.1.1, dada la estructura de las especies P y SCX6, se produce una interacción electrostática entre las cargas negativas de los 6 grupos sulfonato del SCX6 y la positiva de P que da lugar a la formación de un complejo entre ambos.

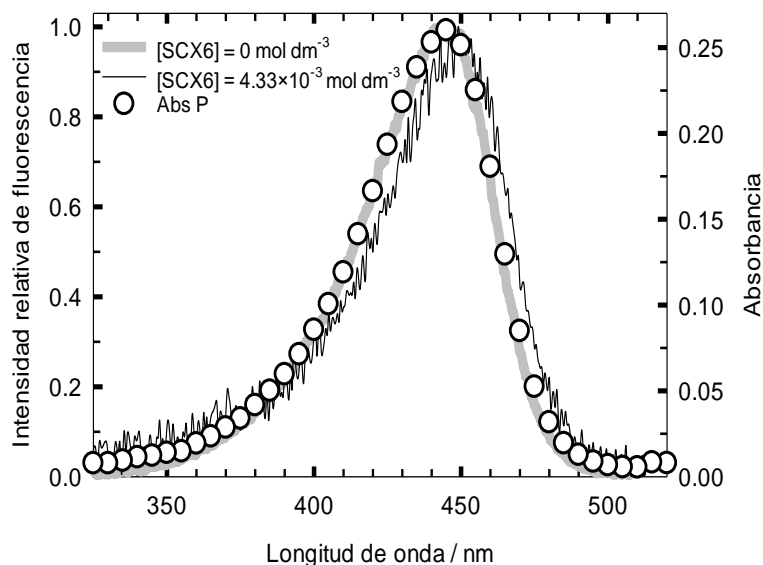


Figura 8.6. Espectros de excitación de fluorescencia normalizados en el máximo ($\lambda_{emis} = 510$ nm) de la proflavina en agua en ausencia de SCX6 y para una $[SCX6] = 4.33 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} junto con el espectro de absorción del catión P de la PF en agua.

En la Figura 8.7 se aprecia que los espectros de emisión normalizados en el máximo de la PF en agua sin SCX6 y para una concentración de SCX6 de 5.83×10^{-3} mol dm^{-3} (el primer y último espectros de emisión de la serie realizada) son diferentes. El espectro con máximo a 510 nm corresponde, como ya se indicó anteriormente, a la forma catiónica P de la PF sin complejar. Por otra parte, la banda de emisión registrada a la concentración de SCX6 más alta de la serie está situada en torno a 528 nm. El hecho de que el espectro de emisión se desplace al rojo al aumentar la concentración de SCX6, y por tanto de complejo, indica que la especie P emite a mayor longitud de onda cuando está asociada al SCX6 que cuando está libre. Además, la intensidad de fluorescencia de la proflavina disminuye apreciablemente a medida que aumenta la concentración de SCX6 (ver Figura 8.5), lo que sugiere que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la sonda es significativamente menor cuando está asociado al SCX6 que cuando está libre.

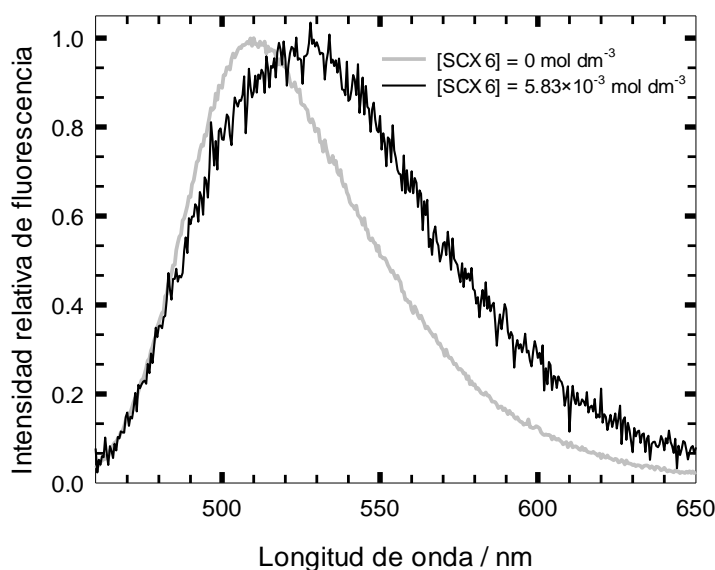
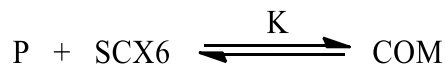


Figura 8.7. Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua normalizados en el máximo en ausencia de SCX6 y para $[SCX6] = 5.83 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} . $\lambda_{exc} = 445$ nm.

De acuerdo con lo anterior, la disminución de intensidad de fluorescencia del catión de la PF en presencia del SCX6 es debida a un proceso de quenching estático, puesto que tiene lugar la asociación de P con el SCX6 en el estado fundamental para dar un complejo COM, que asumiremos inicialmente que tiene estequiometría 1:1, de acuerdo con el equilibrio:



La constante de formación del complejo K se define de la siguiente forma:

$$K = \frac{[COM]}{[P][SCX6]} \quad (8.8)$$

donde [P], [SCX6] y [COM] representan las concentraciones de P, SCX6 y el complejo COM respectivamente. De acuerdo con el equilibrio de asociación se cumple que:

$$[P] = a_0 - [COM] \quad (8.9)$$

donde a_0 es la concentración total de PF, constante en la serie.

Despejando [P] de la ecuación (8.8) y sustituyendo el resultado en la ecuación (8.9) se obtiene:

$$[COM] = \frac{Ka_0[SCX6]}{1 + K[SCX6]} \quad (8.10)$$

La sustitución de la expresión para [COM] en la ecuación (8.9) conduce a:

$$[P] = \frac{a_0}{1 + K[SCX6]} \quad (8.11)$$

Las fracciones molares de complejo y P, x_{COM} y x_P respectivamente, resultan de dividir las ecuaciones (8.10) y (8.11) por la concentración total de PF (a_0):

$$x_{COM} = \frac{K[SCX6]}{1 + K[SCX6]} \quad (8.12)$$

$$x_P = \frac{1}{1 + K[SCX6]} \quad (8.13)$$

Asumiendo que la fluorescencia observada es originada por la emisión de P^* libre y P^* asociado al SCX6 (COM^*), y que no hay quenching dinámico, dado que las concentraciones de calixareno utilizadas ($< 6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) son demasiado bajas para que se produzca el encuentro colisional entre P^* y el SCX6 antes de que P^* se desactive ($\tau \sim 5 \text{ ns}$)^{33,51,114} la intensidad de fluorescencia total a cualquier longitud de onda, F_T^λ , vendrá dada por la ecuación (8.14).

$$F_T^\lambda = F_P^\lambda x_P + F_{COM}^\lambda x_{COM} \quad (8.14)$$

En la ecuación (8.14) F_C^λ y F_{COM}^λ representan las intensidades de fluorescencia que se obtendrían a esa longitud de onda en ausencia de SCX6 y si toda la PF estuviese complejada, respectivamente.

Se aplicó el método PCA a los espectros de emisión de la Figura 8.5. El análisis concluyó que son necesarios dos componentes para reproducir la serie de espectros experimentales. Los autovectores V_1 y V_2 obtenidos se muestran en la Figura 8.8 junto con el valor de sus coeficientes Z_1 y Z_2 a cada concentración de SCX6. Además, en la Figura 8.9 se observa que hay una buena concordancia entre los espectros experimentales y los calculados a partir de los dos autovectores y sus coeficientes, lo que confirma también que dos componentes son suficientes para reproducir los espectros experimentales de la serie.

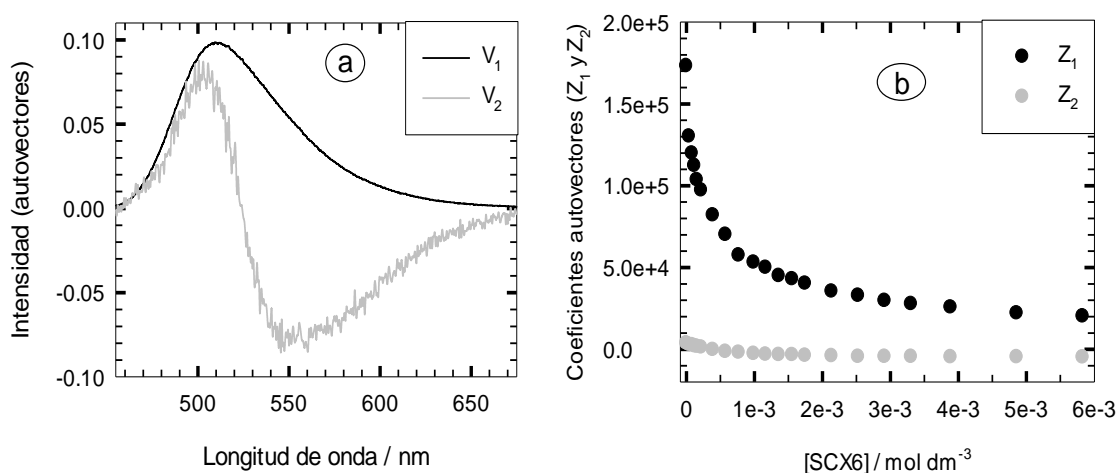


Figura 8.8. (a) Representación de los autovectores V_1 y V_2 asociados a los dos autovalores. (b) Variación de los coeficientes Z_1 y Z_2 de la matriz Z con la concentración de SCX6.

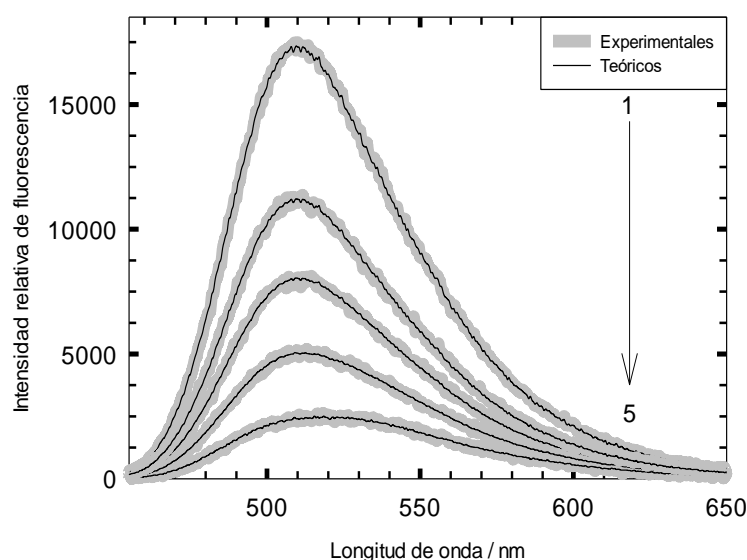


Figura 8.9. Espectros de fluorescencia experimentales de la PF en agua en presencia de SCX6 con concentraciones del mismo de: (1) 0 mol dm^{-3} , (2) $2.20 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, (3) $7.71 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, (4) $2.13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ y (5) $5.83 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, junto con los calculados a partir de los autovectores y coeficientes de la Figura 8.8.

Con el fin de obtener los espectros puros de la proflavina libre y el complejo, así como la constante de asociación, se ha realizado un análisis global de las ecuaciones (8.12)–(8.14) correspondientes al modelo propuesto combinado con el método PCA. El análisis PCGA dio como resultado los espectros puros de P^* y COM^* y los coeficientes experimentales y teóricos que se recogen en la Figura 8.10 así como un valor para la constante de complejación de: $K = 3.0(1) \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$.

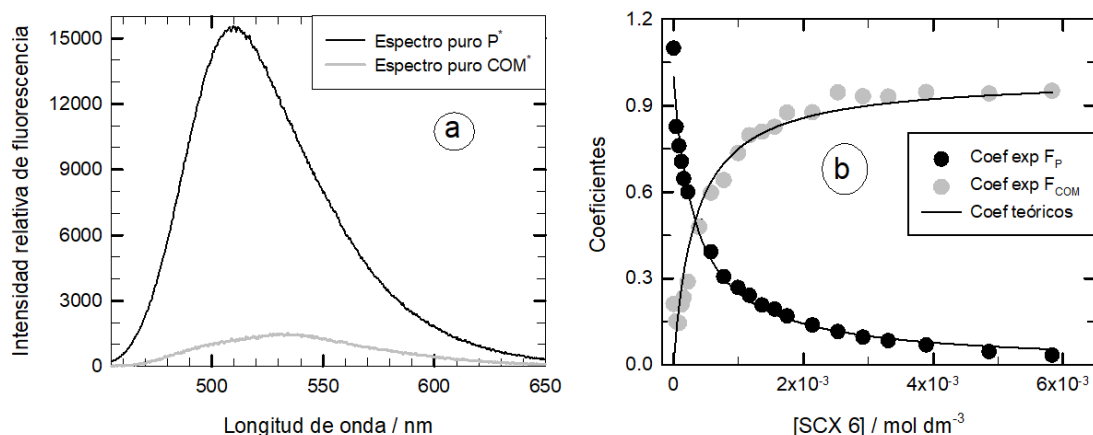
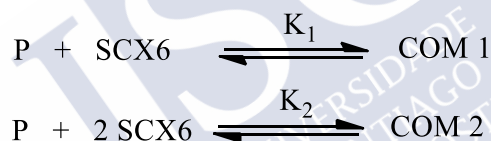


Figura 8.10. (a) Espectros puros de P* y COM* y (b) coeficientes experimentales y calculados resultantes del ajuste PCGA de las ecuaciones (8.12)-(8.14) (modelo de una complejación) a los espectros de la Figura 8.5.

En la Figura 8.10, se aprecia que el modelo propuesto no ajusta bien los datos experimentales: a concentraciones bajas de SCX6 el descenso del coeficiente experimental de P es mucho más acusado de lo que predice el modelo de complejación 1:1. Esto sugiere que a concentraciones bajas de SCX6 hay una primera complejación muy efectiva entre P y una molécula de SCX6 para dar un complejo 1:1, COM1, y al aumentar la concentración de SCX6 se produce una asociación de P con dos moléculas de SCX6 para dar el complejo 1:2, COM2, de acuerdo con los equilibrios:



Por una parte, sabemos que son suficientes dos componentes para reproducir todos los espectros de la serie (ver Figura 8.9). Por otra parte, se observa (ver Figura 8.5) que a bajas concentraciones de SCX6, condiciones en las que la proporción del complejo COM2 debe ser muy pequeña respecto a la de COM1, la intensidad de fluorescencia disminuye, pero la forma del espectro de emisión no cambia, mientras que a concentraciones altas de calixareno, situación en la que debe predominar COM2, se observa un desplazamiento al rojo del espectro de emisión. De acuerdo con esto, parece que el espectro de COM1* debe ser igual que el de P*, pero con menor rendimiento cuántico de fluorescencia que el de éste.

Las constantes de equilibrio de asociación K_1 y K_2 son definidas de la siguiente forma:

$$K_1 = \frac{[COM1]}{[P][SCX6]} \quad (8.16)$$

$$K_2 = \frac{[COM2]}{[P][SCX6]^2} \quad (8.17)$$

donde [P] y [SCX6] ya han sido definidas previamente, y [COM1] y [COM2] son las concentraciones de los complejos COM1 y COM2. Si llamamos a_0 a la concentración total de proflavina se cumple:

$$[P] = a_0 - ([COM1] + [COM2]) \quad (8.18)$$

Despejando [P] en la ecuación (8.16) y [COM2] en la ecuación (8.17) y sustituyendo ambas en la ecuación (8.18) se obtiene [COM1]:

$$[\text{COM1}] = \frac{a_0 K_1 [\text{SCX6}]}{1 + K_1 [\text{SCX6}] + K_2 [\text{SCX6}]^2} \quad (8.19)$$

La sustitución de la ecuación (8.19) en la ecuación (8.17) conduce a:

$$[\text{COM2}] = \frac{a_0 K_2 [\text{SCX6}]^2}{1 + K_1 [\text{SCX6}] + K_2 [\text{SCX6}]^2} \quad (8.20)$$

Introduciendo las expresiones obtenidas para [COM1] y [COM2] en la ecuación (8.18) se obtiene:

$$[\text{P}] = \frac{a_0}{1 + K_1 [\text{SCX6}] + K_2 [\text{SCX6}]^2} \quad (8.21)$$

Dividiendo [COM1], [COM2] y [P] entre a_0 se obtienen las fracciones molares de esas especies (x_{COM1} , x_{COM2} y x_{P}):

$$x_{\text{COM1}} = \frac{K_1 [\text{SCX6}]}{1 + K_1 [\text{SCX6}] + K_2 [\text{SCX6}]^2} \quad (8.22)$$

$$x_{\text{COM2}} = \frac{K_2 [\text{SCX6}]^2}{1 + K_1 [\text{SCX6}] + K_2 [\text{SCX6}]^2} \quad (8.23)$$

$$x_{\text{P}} = \frac{1}{1 + K_1 [\text{SCX6}] + K_2 [\text{SCX6}]^2} \quad (8.24)$$

La fluorescencia total de la PF a cualquier longitud de onda, F_{T}^{λ} , vendrá dada por la suma de la emisión de P^* , y los complejos COM1^* y COM2^* de acuerdo con:

$$F_{\text{T}}^{\lambda} = F_{\text{P}}^{\lambda} x_{\text{P}} + F_{\text{COM1}}^{\lambda} x_{\text{COM1}} + F_{\text{COM2}}^{\lambda} x_{\text{COM2}} = F_{\text{P}}^{\lambda} (x_{\text{P}} + \alpha x_{\text{COM1}}) + F_{\text{COM2}}^{\lambda} x_{\text{COM2}} \quad (8.25)$$

donde F_{P}^{λ} , $F_{\text{COM1}}^{\lambda}$ y $F_{\text{COM2}}^{\lambda}$ son las intensidades de fluorescencia a λ que se obtendrían si todo el catión de la PF estuviese sin complejar, asociado con una molécula de SCX6 o complejo con dos moléculas de SCX6 respectivamente y además se ha supuesto que $F_{\text{COM1}}^{\lambda} = \alpha F_{\text{P}}^{\lambda}$, siendo α una constante de proporcionalidad que refleja la diferencia de rendimientos cuánticos de P^* y COM1^* .

Se ha repetido el análisis PCGA con las ecuaciones (8.22)–(8.25) correspondientes al modelo de dos complejaciones. En la Figura 8.11 se han representado los espectros puros de P^* y COM2^* así como los coeficientes experimentales y teóricos obtenidos. Se puede ver que hay una buena concordancia entre los valores experimentales de los coeficientes y los calculados en todo el intervalo de [SCX6], por lo que el modelo de dos complejaciones planteado justifica el comportamiento experimental de la sonda en presencia de SCX6.

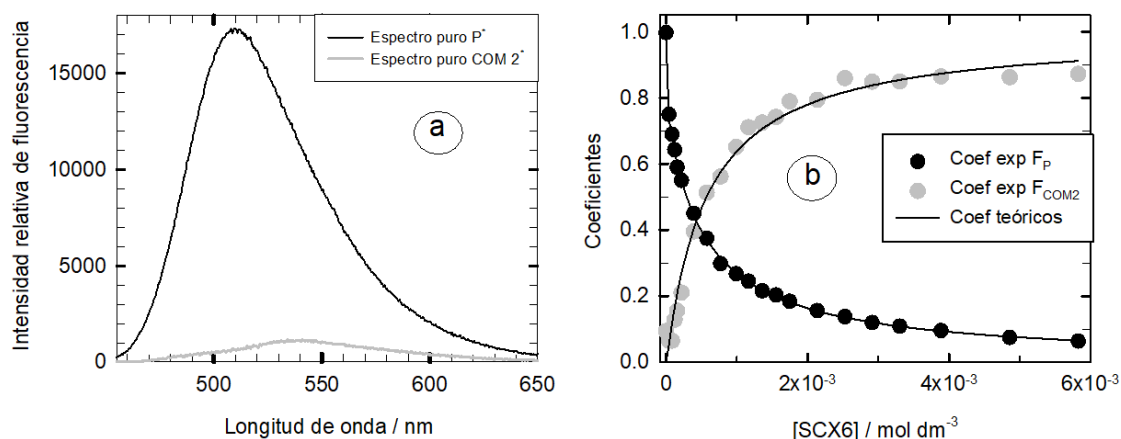


Figura 8.11. (a) Espectros puros de P* y COM2* y (b) coeficientes experimentales y calculados resultantes del ajuste PCGA de las ecuaciones (8.22)-(8.25) (modelo de dos complejaciones) a los espectros de la Figura 8.5.

Los valores de K_1 y K_2 resultantes de la optimización (ver Tabla 8.1) fueron: $K_1 = 9(3) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ y $K_2 = 1.6(5) \times 10^8 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6$. Además, se obtuvo un valor para la relación de rendimientos cuánticos de P* y COM1* (α): $\alpha = 0.74(2)$.

Tabla 8.1. Valores de K_1 y K_2 y α obtenidos mediante el ajuste global PCGA de las ecuaciones (8.22)–(8.25) a los espectros de emisión de la PF en presencia de SCX6.

$K_1 / 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$	$K_2 / 10^8 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6$	α
9(3)	1.6(5)	0.74(2)

El valor de K_1 es algo superior al publicado para la constante de asociación 1:1 del catión de la acridina, molécula análoga a la PF, pero sin los grupos amino, con el SCX6 ($2.5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$)¹¹⁵.

Hemos visto que la formación del complejo 1:1 no modifica la forma ni la posición del espectro de P*, a pesar de que la cavidad del SCX6 es hidrofóbica, lo que sugiere que en COM1* la sonda no está dentro del calixareno, sino que ésta está localizada en la proximidad del borde superior del SCX6, con la carga positiva, que está deslocalizada entre el NH de la acridina y un grupo amino, orientada hacia los grupos sulfonato del SCX6. En el caso del complejo COM2*, la interacción de la sonda con las dos moléculas de SCX6 desplaza la banda de emisión al rojo, como se aprecia en la Figura 8.11(a), lo que nos puede hacer pensar que la sonda se encuentra dentro de la cavidad formada por dos moléculas de SCX6. Sin embargo, teniendo en cuenta el comportamiento del espectro de emisión de P* en diversos disolventes (Figura 6.7) y que la cavidad del SCX6 es hidrofóbica, cabría esperar un desplazamiento del espectro de emisión al azul y no al rojo si la proflavina que forma parte del complejo COM2* se encontrara dentro de la cavidad del SCX6. El desplazamiento espectral observado debe ser originado entonces por una interacción específica de P* con la molécula de SCX6, probablemente enlace de H entre un grupo amino de P* y un hidroxilo del calixareno, y esta interacción puede darse tanto si la sonda está dentro como fuera del SCX6.

Por otra parte, dado que los espectros representados en la Figura 8.11 (a) corresponden a la situación en que toda la PF esté libre o bien formando el complejo COM2, las intensidades que muestran estos espectros serán proporcionales a los coeficientes de absorción molar a la longitud de onda de excitación (445 nm) y los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ) de las especies implicadas. Asumiendo que los coeficientes de

absorción molar de P, COM1 y COM2 son análogos en el máximo, cabe esperar que el valor de ϵ^{445} sea ligeramente inferior para COM2 (y es posible que para COM1) que para la sonda libre ya que se observa un pequeño desplazamiento al rojo del espectro de excitación al aumentar la concentración de SCX6 en el medio (ver Figura 8.6). A pesar de ello, esta pequeña disminución no justifica el gran descenso de intensidad observado en la Figura 8.11 (a) y sugiere que ϕ es significativamente menor para la especie COM2 (y algo menor también para COM1, pues α es menor que 1) que para la sonda libre. Este descenso del rendimiento cuántico de fluorescencia es debido probablemente a un aumento de la constante de velocidad de desactivación no radiante como consecuencia de la interacción de la sonda con el SCX6. En el capítulo 7 se comprobó que la transferencia electrónica juega un papel determinante en la desactivación de la emisión de la PF por distintos quenchers dadores de electrones. Dado que el SCX6 es una molécula rica en electrones^{6,116}, es probable que el descenso del valor del rendimiento cuántico observado para el complejo se deba a una transferencia electrónica del SCX6 a P*.

La existencia de un proceso de desactivación no radiante por interacción de la proflavina con el SCX6 conduciría también a una disminución del tiempo de vida de fluorescencia de la sonda en los complejos COM1 y COM2. Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo permitirán detectar las tres especies emisoras y evidenciar la existencia de dos complejaciones de P con el SCX6.

8.1.3 Tiempos de vida de fluorescencia

Se midió el decaimiento de fluorescencia de la proflavina en agua a 510 nm con distintas concentraciones de SCX6 en el intervalo $0 - 6.66 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ a una $\lambda_{exc} = 370$ nm y en ángulo mágico. Hemos visto en el apartado anterior que en presencia de SCX6 la proflavina da lugar a los complejos COM1 y COM2, que muestran diferente rendimiento cuántico de fluorescencia que la proflavina libre, por lo que cabe esperar que sus tiempos de vida de fluorescencia sean distintos. Además, los tiempos de vida de fluorescencia de estas tres especies deben ser independientes de la concentración de SCX6 porque, como ya se mencionó en el apartado anterior, a las concentraciones de calixareno utilizadas ($< 10^{-3}$ mol dm⁻³) el calixareno no tiene tiempo de aproximarse a P* antes de que éste se desactive al estado fundamental (no hay quenching dinámico).

De acuerdo con lo anterior, una función triexponencial debería ajustar globalmente los decaimientos de fluorescencia registrados en todo el intervalo de concentración de SCX6. Además, el modelo predice que el valor de los tres tiempos de vida debe ser independiente de la concentración de SCX6, mientras que sus amplitudes han de ser función de la concentración de calixareno, ya que esta determina la proporción de P, COM1 y COM2 presente en el estado fundamental. Se comprobó sin embargo que es necesaria una función $F(\lambda, t)$ con cuatro exponenciales (ecuación (8.26)) para reproducir todos los decaimientos de emisión experimentales de la serie. Cada término de la ecuación (8.26) es igual al producto de una amplitud $a_i(\lambda)$, cuyo valor depende de la longitud de onda de emisión (en este caso $\lambda = 510$ nm), por un término exponencial $e^{(-t/\tau_i)}$ dependiente del tiempo y del tiempo de vida de fluorescencia τ_i . La Figura 8.12 recoge los decaimientos experimentales, el pulso de excitación, las funciones tetraexponenciales ajustadas y los residuos ponderados para las concentraciones de SCX6: 0 , 5.33×10^{-5} , 2.44×10^{-4} y 6.66×10^{-4} mol dm⁻³.

$$F(\lambda, t) = a_1(\lambda)e^{(-t/\tau_1)} + a_2(\lambda)e^{(-t/\tau_2)} + a_3(\lambda)e^{(-t/\tau_3)} + a_4(\lambda)e^{(-t/\tau_4)} \quad (8.26)$$

8. Comportamiento de la proflavina con macrociclos

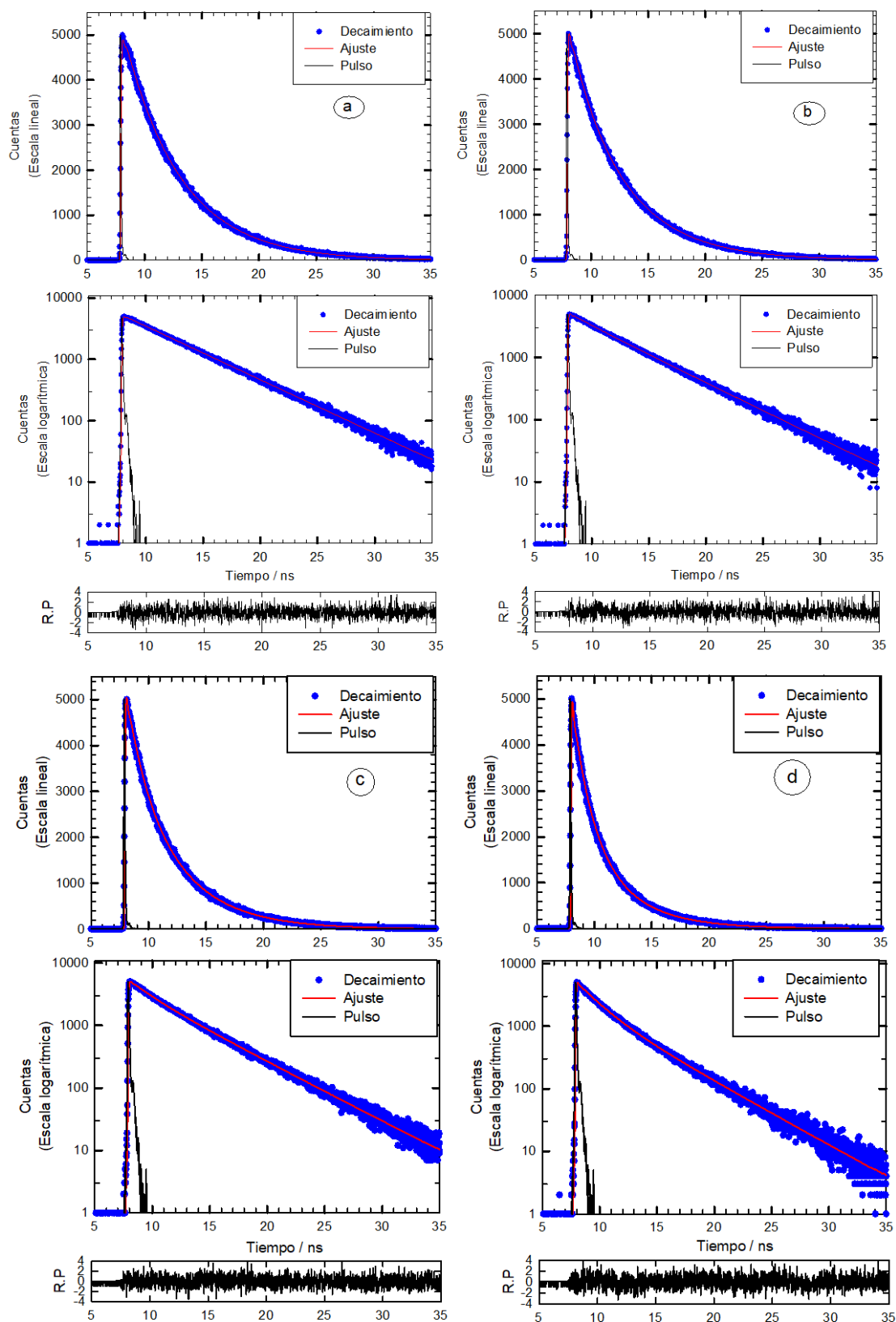


Figura 8.12. Decaimiento de la fluorescencia en escala lineal y logarítmica de la PF a 510 nm en agua con las concentraciones de SCX6: (a) 0 mol dm^{-3} , (b) $5.33 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, (c) $2.44 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ y (d) $6.66 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ junto con el perfil temporal del pulso de excitación, la función tetraexponencial ajustada globalmente a los datos y los residuos ponderados. $[PF] = 4.10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$.

La distribución de los residuos pone de manifiesto que la función tetraexponencial reproduce adecuadamente el decaimiento de la fluorescencia.

Los tiempos de vida de fluorescencia τ_1 , τ_2 , τ_3 y τ_4 obtenidos del análisis global, así como los valores de sus amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 a las distintas concentraciones de SCX6 se recogen en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Resultados del ajuste global de una función con cuatro términos exponenciales a los decaimientos de fluorescencia a 510 nm de la PF en presencia de SCX6. Se muestran los valores obtenidos para los tiempos de vida τ_1 , τ_2 , τ_3 y τ_4 , sus amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 .

[SCX6] / mol dm ⁻³	a_1	a_2	a_3	a_4
0	5164.42	2.06	69.42	921.35
2.43×10 ⁻⁶	5086.36	0	102.26	1077.90
6.47×10 ⁻⁶	5026.17	71.11	137.31	1049.69
1.21×10 ⁻⁵	4684.09	357.64	129.42	1261.38
2.26×10 ⁻⁵	4363.97	575.28	260.85	1247.61
3.29×10 ⁻⁵	4093.53	748.48	344.61	1249.21
4.87×10 ⁻⁵	3820.79	965.94	389.73	1351.02
4.99×10 ⁻⁵	3397.56	1316.50	483.72	1315.48
5.33×10 ⁻⁵	3521.26	1293.02	398.25	1381.17
9.98×10 ⁻⁵	2288.99	2100.49	865.85	1354.85
1.50×10 ⁻⁴	1611.90	2374.14	1183.12	1301.39
1.99×10 ⁻⁴	1205.17	2605.19	1463.01	1450.53
2.44×10 ⁻⁴	947.80	2694.02	1571.87	1532.56
2.94×10 ⁻⁴	658.55	2723.87	1833.97	1473.05
3.44×10 ⁻⁴	444.16	2741.48	2055.86	1549.52
3.89×10 ⁻⁴	342.43	2628.16	2158.11	1588.17
4.39×10 ⁻⁴	253.43	2588.60	2350.93	1672.86
4.89×10 ⁻⁴	153.37	2532.57	2426.42	1664.09
5.39×10 ⁻⁴	77.611	2464.13	2552.12	1801.82
5.89×10 ⁻⁴	68.81	2246.43	2598.96	1810.15
6.66×10 ⁻⁴	0.0042	2196.99	2832.40	1884.22

Tiempo	Valor / ns
τ_1	4.989(2)
τ_2	4.26(7)
τ_3	1.75(2)
τ_4	0.117(4)

La Figura 8.13 muestra el perfil temporal de los cuatro componentes obtenidos en el análisis global que permiten reproducir todos los decaimientos de emisión experimentales. En la Figura 8.14 se recogen los decaimientos de fluorescencia experimentales de la Figura 8.12 junto con las contribuciones de los cuatro componentes y la suma de las contribuciones.

8. Comportamiento de la proflavina con macrociclos

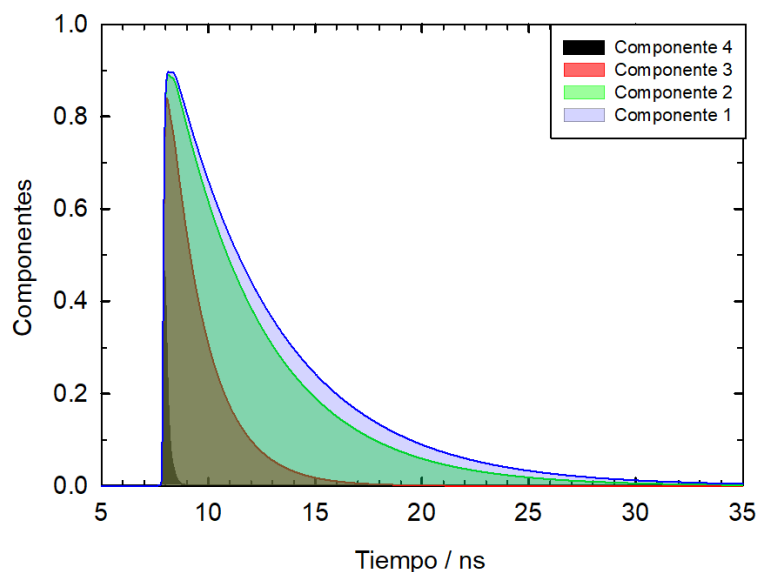


Figura 8.13. Perfil temporal de los componentes 1, 2, 3 y 4 obtenidos mediante análisis global de la serie de decaimientos de fluorescencia experimentales de la PF a 510 nm en presencia de SCX6.

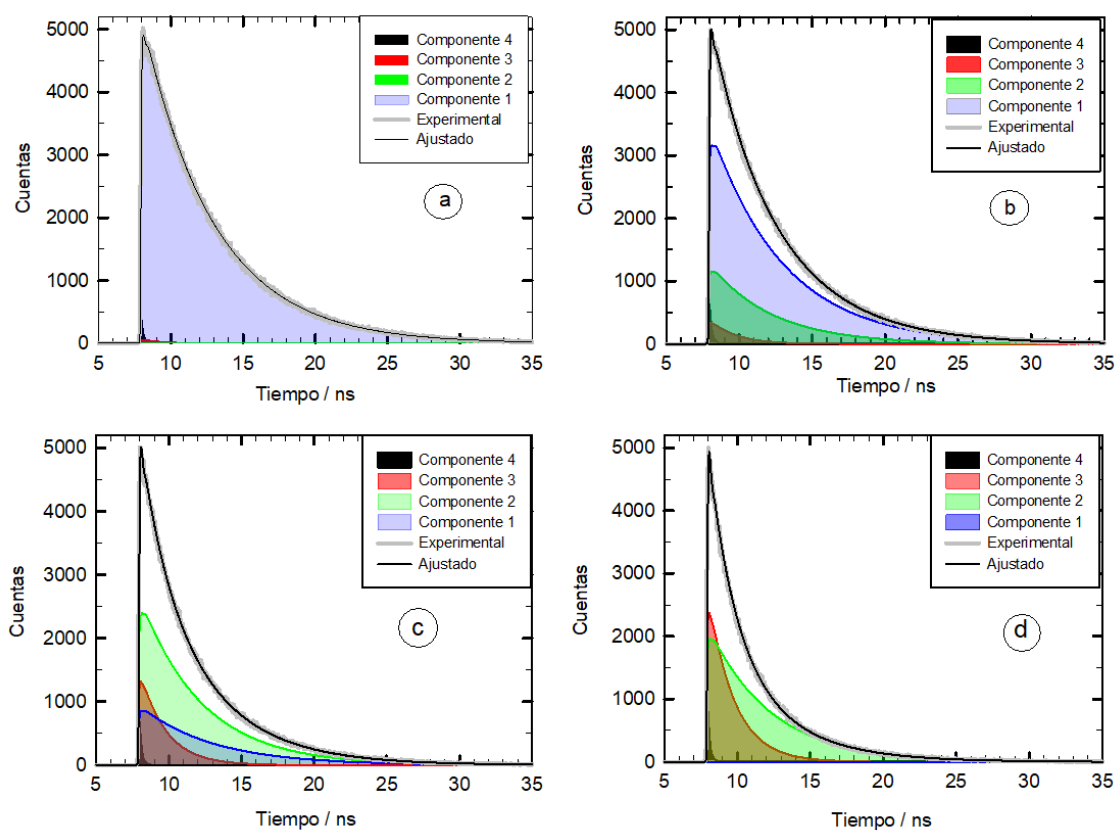


Figura 8.14. Decaimiento de la fluorescencia a 510 nm de la PF en agua con las concentraciones de SCX6: (a) 0 mol dm^{-3} , (b) $5.33 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, (c) $2.44 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ y (d) $6.66 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ junto con las participaciones de los componentes 1, 2, 3 y 4 de la Figura 8.12 y la suma de las contribuciones.

Se aprecia en la Figura 8.14 que en ausencia de SCX6 el decaimiento de emisión se debe prácticamente al componente τ_1 , con un tiempo de 4.990 ns, que es concordante con el valor publicado para esta sonda en agua^{51,58,114} y corresponde al catión de la PF libre P^* . Al aumentar la concentración del calixareno la participación de P^* va disminuyendo (es prácticamente cero a la concentración más alta de SCX6) mientras que aumenta la de los componentes 2 y 3, que deben corresponder a los complejos COM1 y COM2. La asignación de los componentes a cada especie es más clara si se analiza la dependencia de las amplitudes de los cuatro tiempos de vida con la concentración de SCX6 en todo el intervalo estudiado. Se han representado en la Figura 8.15 los valores de las amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 , obtenidas en el análisis global, así como los correspondientes a las amplitudes corregidas (divididas por el tiempo de medida de cada decaimiento) a_1^c , a_2^c , a_3^c y a_4^c en función de la concentración de SCX6. Los valores de las amplitudes a_1^c , a_2^c , a_3^c y a_4^c a cada concentración de SCX6 son un reflejo de las proporciones en el estado fundamental de las especies emisoras.

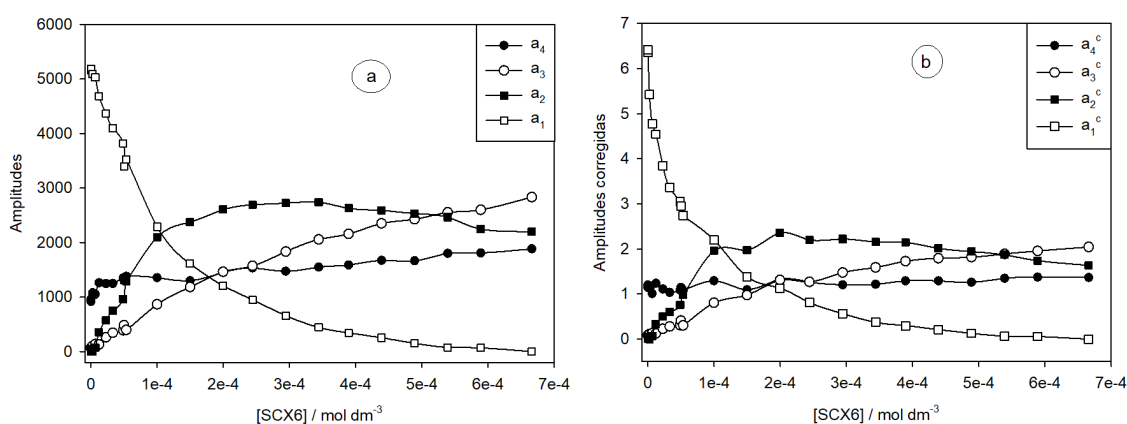


Figura 8.15. a) Representación de las amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 obtenidas mediante el ajuste global de la ecuación (8.26) a los decaimientos de fluorescencia de la PF a 510 nm y b) las amplitudes corregidas por el tiempo de medida de cada decaimiento a_1^c , a_2^c , a_3^c y a_4^c , en función de la concentración de SCX6.

Se ve claramente en la Figura 8.15 que el tiempo τ_1 (4.990(2) ns), que hemos asignado a P^* muestra una amplitud (a_1^c) cuyo valor desciende a medida que aumenta la concentración de SCX6, como era de esperar debido a que la concentración de PF libre disminuye a medida que se produce la complejación de P con el SCX6 en el estado fundamental. La amplitud a_2^c , del tiempo τ_2 (4.26(7) ns), es nula en ausencia de SCX6 y aumenta con la concentración de SCX6 hasta una $[SCX6] \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ en que a_2^c alcanza un valor casi constante y a concentraciones más altas de SCX6 empieza a disminuir lentamente. Este es el comportamiento esperado para $COM1^*$ ya que su fracción molar en el estado fundamental (ver ecuación (8.22)) aumenta inicialmente con la concentración de SCX6, pero a medida que se incrementa la concentración de SCX6 se favorece la formación del complejo 1:2, COM2, por lo que la fracción molar de $COM1^*$ pasa por un máximo y empieza a disminuir. Podemos asegurar entonces que $COM1^*$ es la especie responsable del tiempo de vida de 4.26 ns. Por otra parte, la amplitud a_3^c , asociada a τ_3 (1.75(2) ns), es también cero cuando no hay SCX6 presente en el medio, pero su valor aumenta progresivamente al añadir calixareno a la disolución, mostrando el valor máximo a la concentración de SCX6 más alta de la serie. Esta dependencia de la amplitud a_3^c con la concentración de SCX6 es análoga a la que muestra la fracción molar de $COM2$ con la concentración del calixareno (ver ecuación (8.23)) y permite asignar esta amplitud y su tiempo de vida de 1.75 ns al complejo $COM2^*$.

Falta por explicar la presencia del tiempo de vida τ_4 (117(4) ps). Este tiempo, mucho más corto que el correspondiente al de la PF (libre o complejada), muestra una contribución pequeña y prácticamente independiente de la concentración de SCX6, como se observa en las Figura 8.14 y Figura 8.15, y no guarda relación con el modelo propuesto. Kumar y col.⁵¹ realizaron medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo de la PF en agua (y otros disolventes) en escala de fs y obtuvieron decaimientos triexponenciales que atribuyeron a la existencia de dos estados emisores de energías próximas para la PF: 1B_2 (estado de Franck-Condon) y 1A_1 . Además del tiempo de vida de la proflavina, 4.6(2) ns, que corresponde a la emisión desde el estado 1A_1 , detectaron dos tiempos ultrarrápidos de 1.26 ps, que atribuyen al decaimiento del estado 1B_2 junto con la dinámica de solvatación y la población del estado 1A_1 , y de 71.6 ps, que asignan a la emisión desde el estado 1B_2 relajado. En la escala temporal de nuestras medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo (ps) el componente de 1.26 ps no es detectable, pero el tiempo τ_4 , de 117 ps, debe ser el resultado de la emisión desde el estado 1B_2 relajado de la PF. Este tiempo no se ve afectado por la asociación de la PF con SCX6.

Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo han permitido ratificar el modelo de dos complejaciones propuesto para la PF en el apartado 8.1.2. Así, aunque P^* y $COM1^*$ tienen el mismo espectro de emisión los tiempos de vida de fluorescencia de las tres especies emisoras son diferentes, por lo que se pudo obtener la dependencia de la emisión de cada una de ellas con el tiempo y las amplitudes asociadas a sus tiempos de vida, que permitieron comprobar que éstas siguen la dependencia de las concentraciones de estas tres especies marcadas por los dos equilibrios de complejación.

8.2 4-SULFOCALIX[4]ARENO (SCX4)

8.2.1 Serie absorción

La Figura 8.16 recoge los espectros de absorción de la proflavina en agua en presencia de 4-sulfocalix[4]areno (SCX4) $2.22 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ en el intervalo de concentración de la PF $0-4.2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

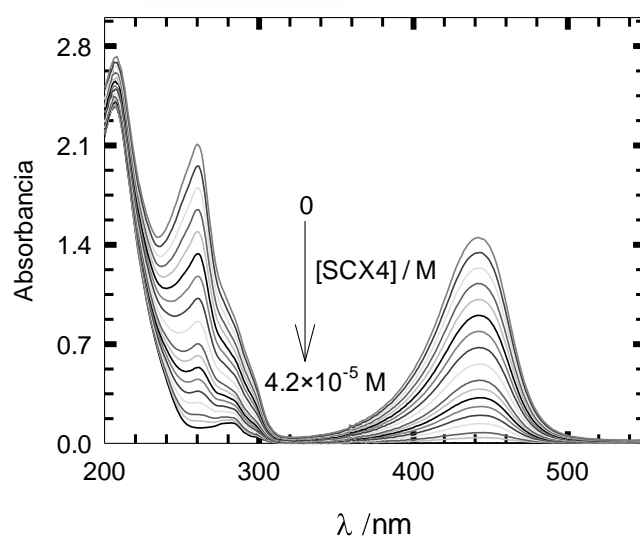


Figura 8.16. Espectros de absorción de la proflavina en agua en presencia de SCX4, para un intervalo de concentración de PF $0-4.2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $[SCX4] = 2.22 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Se observa en la Figura 8.16 que el SCX4 muestra una banda de absorción con máximo en torno a 205 nm y al incrementar la concentración de PF el espectro de absorción de la sonda va aumentando su absorbancia. La Figura 8.17 muestra los datos experimentales de absorbancia-[PF] a varias longitudes de onda. Se observa que a concentraciones bajas de PF la absorbancia presenta una dependencia lineal con la concentración de sonda, pero al aumentar la concentración de la PF se aprecia una ligera curvatura hacia abajo, por lo que debe producirse también la asociación de P con el SCX4. Sin embargo, esta curvatura es claramente menos acusada que para el SCX6, lo que sugiere que la constante de complejación de la sonda con SCX4 es menos efectiva que con el macrociclo de mayor tamaño.

El equilibrio de asociación de P con el SCX4 vendrá dado por:



A partir de la expresión para K y siguiendo el mismo desarrollo que para el SCX6 (ecuaciones (8.1) a (8.7)) se llega a la expresión para la absorbancia total A^λ :

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda a_0 + \varepsilon_{SCX4}^\lambda b_0 - x(\varepsilon_P^\lambda + \varepsilon_{SCX4}^\lambda - \varepsilon_{COM}^\lambda) \quad (8.27)$$

donde ε_P^λ , $\varepsilon_{SCX4}^\lambda$ y $\varepsilon_{COM}^\lambda$ son los coeficientes de absorción molar de P, el SCX4 y el complejo (COM) respectivamente a la longitud de onda λ , a_0 y b_0 las concentraciones totales de PF y SCX4 respectivamente y x la concentración de complejo, que viene dada por la ecuación (8.28).

$$x = \frac{\left(a_0 + b_0 + \frac{1}{K}\right) - \sqrt{\left(-a_0 - b_0 - \frac{1}{K}\right)^2 - 4a_0b_0}}{2} \quad (8.28)$$

Se ajustaron globalmente las ecuaciones (8.27) y (8.28) a los datos de absorbancia correspondientes a la primera banda de absorción de la PF (leídos en el intervalo 350 - 550 nm cada 10 nm). La buena concordancia entre los valores experimentales y los calculados se aprecia en la Figura 8.17, que recoge la absorbancia experimental y la función ajustada en función de la concentración de SCX4 a algunas de las longitudes de onda analizadas.

8. Comportamiento de la proflavina con macrociclos

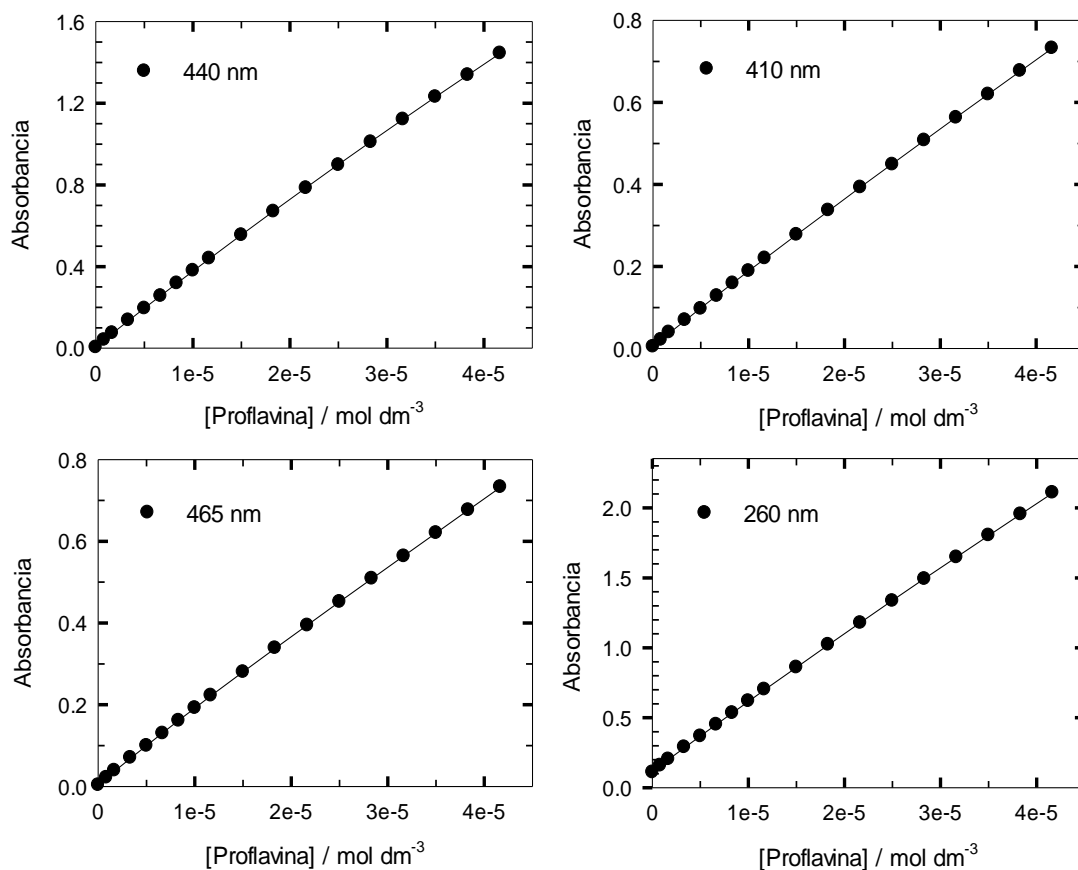


Figura 8.17. Absorbancia de la PF en presencia de SCX4 en función de la concentración de PF a diferentes longitudes de onda y ajuste de las ecuaciones (8.27) y (8.28) a los datos experimentales.

Los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX4}^λ y ϵ_{COM}^λ obtenidos mediante el análisis global están representados en la Figura 8.18. Además, la optimización proporcionó el valor de la constante de asociación K , que fue: $K = 4.3(4) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^{-3}$.

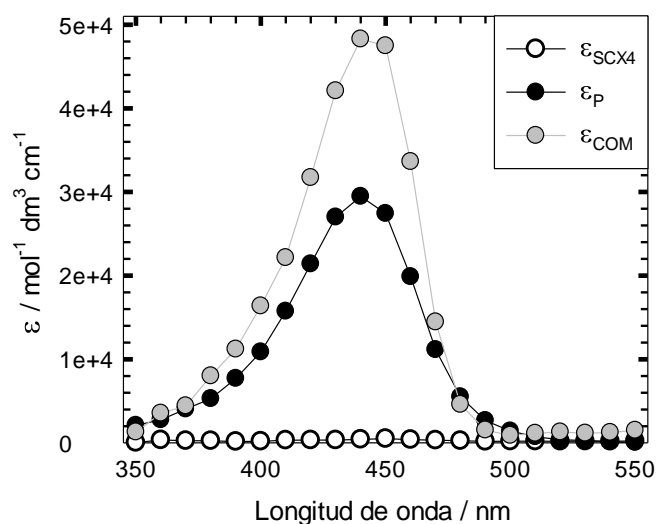


Figura 8.18. Representación de los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX4}^λ y ϵ_{COM}^λ obtenidos del ajuste global de las ecuaciones (8.27) y (8.28) a los datos experimentales de absorbancia-[PF] a distintas longitudes de onda de la primera banda de absorción de la PF.

Se realizó a continuación el análisis realizando un ajuste global de las ecuaciones (8.27) y (8.28) a los datos de absorbancia correspondientes a la segunda banda de absorción (Figura 8.16, valores leídos de los espectros cada 5 nm en el intervalo 205 - 315 nm). Los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX4}^λ y ϵ_{COM}^λ obtenidos se muestran en la Figura 8.19, en la que se observa que el espectro del complejo muestra las bandas características de P y el SCX4.

Se obtuvo un valor para la constante de asociación K de: $3.4(6) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, semejante al resultante del ajuste a los datos de la primera banda de absorción ($4.3(4) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$). A pesar de la concordancia entre ambos resultados, se puede apreciar en la Figura 8.18 que, como ocurría en el caso del SCX6, el espectro de absorción de P resultante del modelo de complejación 1:1 muestra un coeficiente de absorción molar en el máximo ($2.95 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) inferior al valor que le corresponde a P ($4.07 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, ver Figura 5.9), sugiriendo que el modelo de asociación 1:1 no es correcto. A pesar de ello, dado que la posición y forma del espectro de absorción de la PF apenas se modifican en presencia de SCX4, no se puede obtener de los espectros de absorción más información sobre la complejación. Los resultados de las medidas de fluorescencia, que se discuten a continuación, permitirán refinar el modelo.

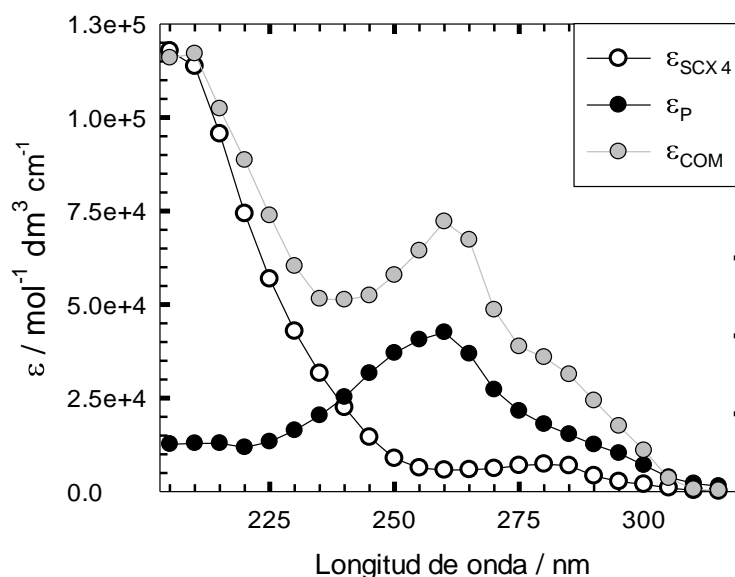


Figura 8.19. Representación de los valores de ϵ_P^λ , ϵ_{SCX4}^λ y ϵ_{COM}^λ obtenidos del ajuste global de las ecuaciones (8.27) y (8.28) a los datos experimentales de absorbancia-[PF] a distintas longitudes de onda de la segunda banda de absorción de la PF.

8.2.2 Serie de fluorescencia

La Figura 8.20 muestra los espectros de fluorescencia de la proflavina, a $\lambda_{exc} = 445 \text{ nm}$, en agua en presencia de SCX4 en el intervalo de concentración $0 - 1.47 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ y con una concentración de proflavina constante de $4.76 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

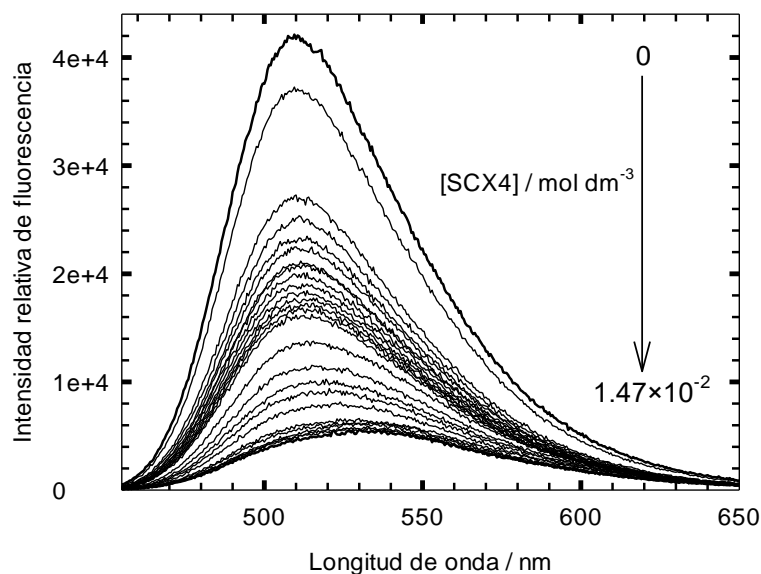


Figura 8.20. Espectros de emisión de fluorescencia de proflavina en agua, en presencia de SCX4 en el intervalo de concentración 0 – 1.47×10^{-2} mol dm^{-3} . $[\text{PF}] = 4.76 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} . $\lambda_{\text{exc}} = 445$ nm.

Por otra parte, en la Figura 8.21 se han representado los espectros de excitación de la PF en ausencia de SCX4 y cuando la concentración del mismo es de 0.0147 mol dm^{-3} , así como el espectro de absorción de la PF en agua. Observamos que ambos espectros de excitación son distintos, lo que nuevamente nos indica que es posible que existan dos especies distintas en el estado fundamental. El espectro de excitación cuando la concentración de SCX4 es cero se superpone con el espectro de absorción de P, esto está en concordancia con el hecho de que a pH neutro la forma estable de la PF es P. Sin embargo (al igual que sucedía con el SCX6), el espectro de excitación obtenido para una concentración de SCX4 de 0.0147 mol dm^{-3} se encuentra ligeramente desplazado al rojo respecto al registrado en ausencia de SCX4. En base a la estructura de las especies P y SCX4, es probable que se produzca una interacción electrostática entre las cargas negativas de los cuatro grupos sulfonato del SCX4 y positiva de P que daría lugar a la formación de un complejo entre ambas especies.

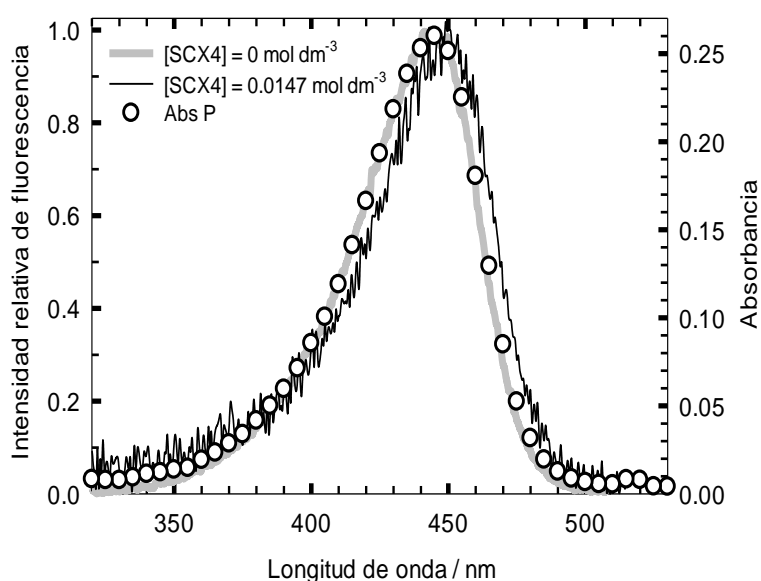


Figura 8.21. Espectros de excitación de fluorescencia de la PF en agua normalizados en el máximo, $\lambda_{\text{emis}} = 510$ nm, en ausencia de SCX4 y para una $[\text{SCX4}] = 0.0147$ mol dm^{-3} junto con el espectro de absorción del catión P de la PF en agua.

El comportamiento fluorescente de la PF en presencia de SCX4 es semejante al observado con el SCX6: al ir aumentando la concentración de SCX4 la intensidad de fluorescencia de la sonda va disminuyendo progresivamente. Además, la banda de emisión se desplaza al rojo, como se aprecia en la Figura 8.22, en la que se han representado los espectros de emisión de la PF sin SCX4 y en presencia de la concentración de SCX4 más alta de la serie ($1.47 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) normalizados en el máximo. Por tanto, la proflavina asociada al SCX4 emite a mayor longitud de onda que la PF libre.

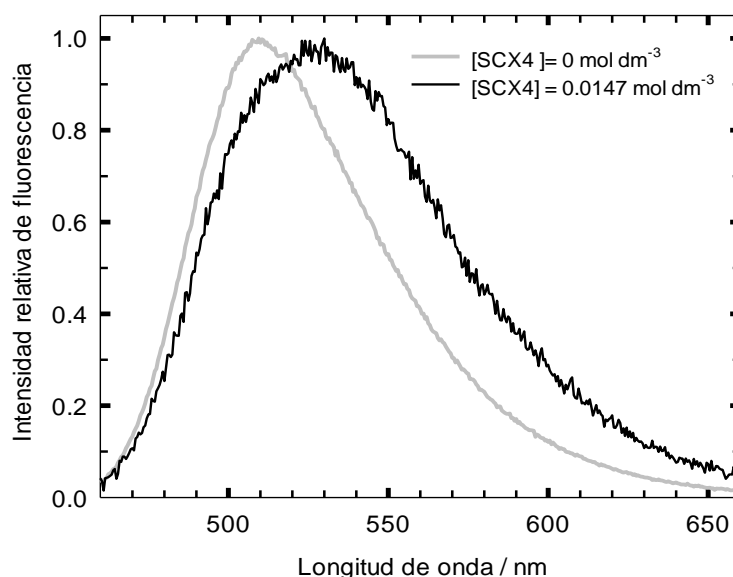
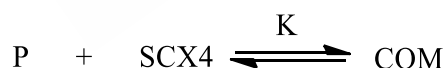


Figura 8.22. Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en agua, normalizados en el máximo, en ausencia de SCX4 y para $[\text{SCX4}] = 0.0147 \text{ mol dm}^{-3}$. $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$.

Los resultados anteriores indican que, como en el caso del SCX6, tiene lugar la formación de un complejo, que supondremos 1:1, entre P y el SCX4. Planteamos así para el SCX4 el mismo equilibrio de asociación que para el SCX6:



Siguiendo los mismos pasos que para el SCX6 (ecuaciones (8.8) a (8.14)), se obtiene la siguiente expresión para la intensidad de fluorescencia total del catión de la proflavina, F_T^λ , a una longitud de onda λ en función de la concentración de SCX4:

$$F_T^\lambda = F_P^\lambda x_P + F_{\text{COM}}^\lambda x_{\text{COM}} \quad (8.29)$$

donde F_P^λ y F_{COM}^λ tienen el mismo significado que para la asociación con SCX6 y las fracciones molares de P y COM, x_P y x_{COM} , vienen dadas por:

$$x_P = \frac{1}{1 + K[\text{SCX4}]} \quad (8.30)$$

$$x_{\text{COM}} = \frac{K[\text{SCX4}]}{1 + K[\text{SCX4}]} \quad (8.31)$$

En una primera etapa se realizó el análisis de componentes principales de los espectros de emisión de la Figura 8.20. Al igual que para el SCX6 el método indica que dos componentes, de autovectores V_1 y V_2 y coeficientes Z_1 y Z_2 (ver Figura 8.23), generan todos los espectros experimentales, como se aprecia en la Figura 8.24, que recoge los espectros experimentales y calculados a algunas de las concentraciones de SCX4 analizadas.

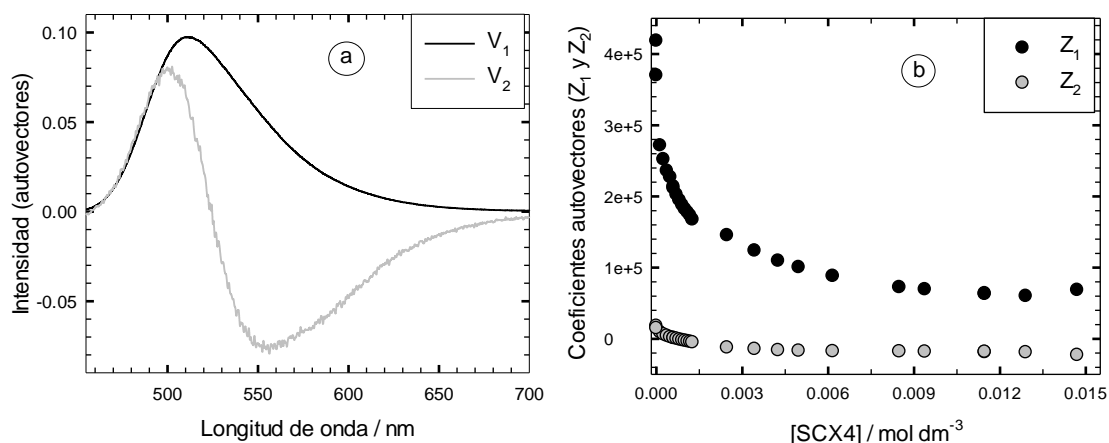


Figura 8.23. (a) Representación de los autovectores V_1 y V_2 asociados a los dos autovalores. (b) Variación de los coeficientes Z_1 y Z_2 de la matriz Z con la concentración de SCX4.

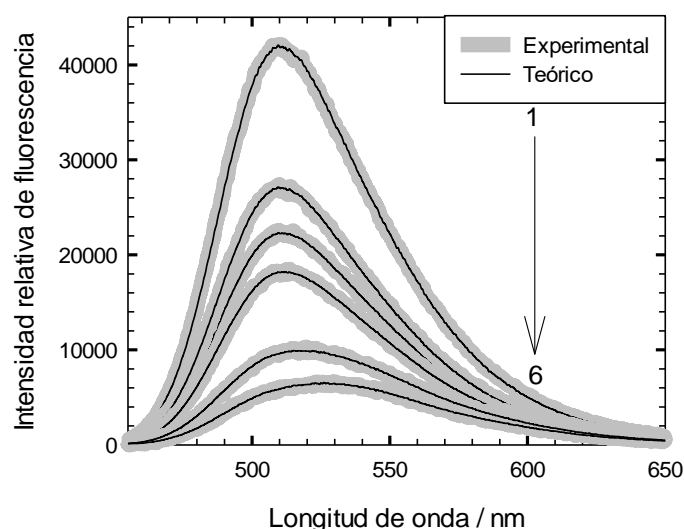


Figura 8.24. Espectros de fluorescencia experimentales de la PF en agua en presencia de SCX4 en el intervalo de concentración $0-1.47 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³ junto con los calculados a partir de los autovectores y coeficientes de la Figura 8.23.

Se realizó a continuación el análisis global de las ecuaciones (8.29)–(8.31) combinado con el método PCA, lo que permitió obtener los espectros puros de P^* y COM^* (Figura 8.25 (a)), los coeficientes experimentales y teóricos en función de la concentración de SCX4 (Figura 8.25 (b)) y el valor de la constante de asociación K : $K = 1.41(2) \times 10^3$ mol⁻¹ dm³.

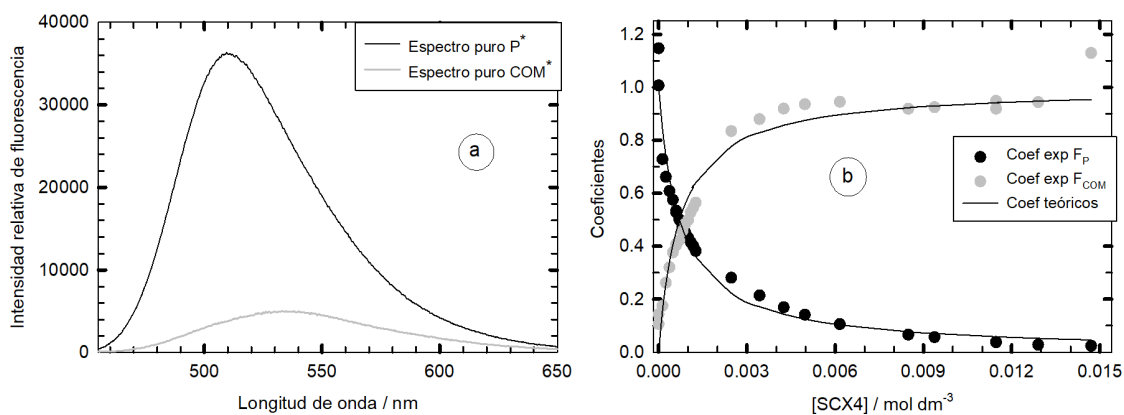
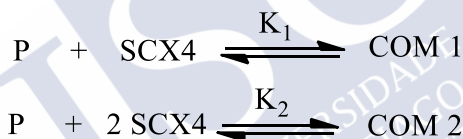


Figura 8.25. a) Espectros puros de P* y COM2* y (b) coeficientes experimentales y calculados resultantes del ajuste PCGA de las ecuaciones (8.29)-(8.31) (modelo de una complejación) a los espectros de la Figura 8.20.

Como se observa en la Figura 8.25(b), el modelo propuesto no reproduce el comportamiento experimental observado a concentraciones bajas de SCX4. Es posible que, como para el SCX6, además de producirse la asociación 1:1 entre P y el SCX4 dando el complejo COM1, al aumentar la proporción de calixareno respecto a la sonda se forme un segundo complejo COM2 entre P y dos moléculas de SCX4. La formación de los complejos COM1 y COM2, con constantes de asociación K_1 y K_2 respectivamente, vendrá determinada por los equilibrios:



Las expresiones de K_1 y K_2 son:

$$K_1 = \frac{[\text{COM1}]}{[\text{P}][\text{SCX4}]} \quad (8.32)$$

$$K_2 = \frac{[\text{COM2}]}{[\text{P}][\text{SCX4}]^2} \quad (8.33)$$

De acuerdo con los resultados del análisis PCA solo hay dos componentes espectrales, a pesar de que el modelo predice que hay tres especies emisoras: P*, COM1* y COM2*. Sin embargo, al igual que ocurría para la asociación de la PF con SCX6, el espectro de emisión de COM1* debe tener igual forma espectral que el de P*, pero con menor rendimiento cuántico de fluorescencia que el de la PF libre, porque a concentraciones bajas de SCX4, cuando se forma solo el complejo COM1, el espectro de emisión baja de intensidad, pero no cambia su forma (ver Figura 8.20). De acuerdo con esto se debe poder reproducir la serie de espectros experimentales con los espectros puros de P* y COM2*.

A partir de las definiciones de K_1 y K_2 se llega a la expresión (8.34) para la intensidad de fluorescencia total de la proflavina F_T^λ a cualquier longitud de onda λ (ver ecuaciones (8.18) a (8.25) para el SCX6):

$$F_T^\lambda = F_P^\lambda x_P + F_{\text{COM1}}^\lambda x_{\text{COM1}} + F_{\text{COM2}}^\lambda x_{\text{COM2}} = F_P^\lambda (x_P + \alpha x_{\text{COM1}}) + F_{\text{COM2}}^\lambda x_{\text{COM2}} \quad (8.34)$$

donde F_P^λ , F_{COM1}^λ , F_{COM2}^λ y α ya se han definido anteriormente para la asociación de la PF con el SCX6 y las fracciones molares de P, COM1 y COM2 (x_P , x_{COM1} y x_{COM2}) son:

$$x_P = \frac{1}{1 + K_1[SCX4] + K_2[SCX4]^2} \quad (8.35)$$

$$x_{COM1} = \frac{K_1[SCX4]}{1 + K_1[SCX4] + K_2[SCX4]^2} \quad (8.36)$$

$$x_{COM2} = \frac{K_2[SCX4]^2}{1 + K_1[SCX4] + K_2[SCX4]^2} \quad (8.37)$$

Se ajustaron globalmente mediante el método PCGA las ecuaciones (8.34)–(8.37) a la serie de espectros experimentales. La Figura 8.26(a) muestra los espectros puros obtenidos para P^* y $COM2^*$. La validez del modelo se justifica por la buena concordancia observada entre los coeficientes experimentales y teóricos en función de la concentración de SCX4 (Figura 8.26 (b)). Los valores obtenidos para las constantes de asociación K_1 y K_2 y la relación de rendimientos cuánticos de P^* y $COM1^*$, α , se presentan en la Tabla 8.3.

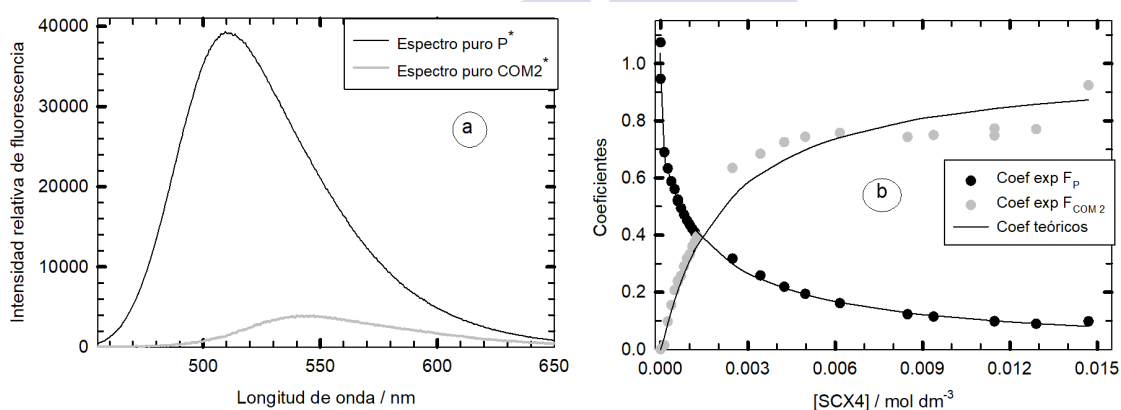


Figura 8.26. (a) Espectros puros de P^* y $COM2^*$ y (b) coeficientes experimentales y calculados resultantes del ajuste PCGA de las ecuaciones (8.34)–(8.37) (modelo de dos complejaciones) a los espectros de la Figura 8.20.

Tabla 8.3. Valores de K_1 y K_2 y α obtenidos mediante el ajuste global PCGA de las ecuaciones (8.34)–(8.37) a los espectros de emisión de la PF en presencia de SCX4.

$K_1 / 10^4\ mol^{-1}\ dm^3$	$K_2 / 10^7\ mol^{-2}\ dm^6$	α
2.2(2)	1.04(9)	0.633(5)

El valor obtenido para K_1 ($2.2(2) \times 10^4\ mol^{-1}\ dm^3$) es un poco inferior al determinado para la asociación 1:1 del catión de la acridina ($4.45 \times 10^4\ mol^{-1}\ dm^3$; $1.3 \times 10^5\ mol^{-1}\ dm^3$)¹¹⁷ y de la 9-aminoacridina ($1.84 \times 10^5\ mol^{-1}\ dm^3$)¹¹⁸ con SCX4. Además, los valores de K_1 y K_2 para la asociación del catión de la PF con SCX4 son inferiores (unas 4 veces para K_1 y unas 15 veces K_2) a los correspondientes a la asociación de la sonda con SCX6 (Tabla 8.1), por lo que tanto para COM1 como para COM2 el equilibrio para el SCX4 está menos desplazado hacia los complejos que en el caso del SCX6. Esto debe ser consecuencia de que la interacción electrostática entre P y el SCX4

es menos fuerte que entre P y el SCX6 ya que el SCX4 tiene menor carga negativa (4 grupos sulfonato) que el SCX6 (6 grupos sulfonato).

Por último, el hecho de que los espectros de emisión de P* y COM1* sean prácticamente iguales sugiere, como para el SCX6, que es poco probable que en el complejo 1:1 la sonda esté dentro del macrociclo. Por otra parte, como para el SCX6, el espectro de emisión del complejo COM2* está ligeramente desplazado hacia el rojo respecto al de P* y COM1* y su rendimiento cuántico de fluorescencia es considerablemente menor. Los mismos argumentos utilizados para el SCX6 nos llevan a proponer que en el complejo COM2 existe enlace de H entre un grupo amino de P y un hidroxilo del SCX4, pero parece más probable que en COM2 la proflavina esté fuera del SCX4 que formando un complejo de inclusión.

8.2.3 Tiempos de vida de fluorescencia

Se registró el decaimiento de fluorescencia de la PF en agua a 510 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm en ángulo mágico) en el intervalo de concentraciones de SCX4 $0-1.84 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³.

Los resultados obtenidos son análogos a los encontrados para la asociación de la PF con SCX6. Al igual que se había observado para el SCX6, se comprobó que es necesaria una función $F(\lambda, t)$ con cuatro términos exponenciales ($a_i(\lambda)e^{(-t/\tau_i)}$) para poder reproducir todos los decaimientos de emisión experimentales de la serie:

$$F(\lambda, t) = a_1(\lambda)e^{(-t/\tau_1)} + a_2(\lambda)e^{(-t/\tau_2)} + a_3(\lambda)e^{(-t/\tau_3)} + a_4(\lambda)e^{(-t/\tau_4)} \quad (8.38)$$

donde $a_i(\lambda)$ representa la amplitud correspondiente al tiempo de vida de fluorescencia τ_i . En la Figura 8.27 se muestran los decaimientos experimentales, el perfil temporal del pulso de excitación, las funciones tetraexponenciales ajustadas y los residuos ponderados para las concentraciones de SCX4: 0 mol dm⁻³, 2.19×10^{-4} mol dm⁻³, 6.20×10^{-4} mol dm⁻³ y 1.84×10^{-3} mol dm⁻³. Los residuos ponderados reflejan el buen acuerdo entre los datos experimentales y los calculados. El análisis global proporcionó los valores de los tiempos de vida de fluorescencia τ_1 , τ_2 , τ_3 y τ_4 , de sus amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 a las distintas concentraciones de SCX4 compilados en la Tabla 8.4.

8. Comportamiento de la proflavina con macrociclos

Tabla 8.4. Resultados del ajuste global de una función con cuatro términos exponenciales a los decaimientos de fluorescencia a 510 nm de la PF en agua en presencia de SCX4. Se muestran los valores obtenidos para los tiempos de vida τ_1 , τ_2 , τ_3 y τ_4 , de sus amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 .

[SCX4] / mol dm ⁻³	a_4	a_3	a_2	a_1
0	213590	31.33	0	5205.72
4.51×10^{-5}	2563.82	13.67	514.42	4580.37
9.02×10^{-5}	2638.72	72.18	953.72	4080.15
1.35×10^{-4}	2707.60	59.88	1520.28	3532.69
1.80×10^{-4}	2780.01	99.30	1906.05	3093.30
2.19×10^{-4}	2920.74	87.97	2242.74	2583.20
2.66×10^{-4}	2937.44	134.69	2662.85	2246.01
3.36×10^{-4}	2898.50	298.74	2907.58	1799.75
4.06×10^{-4}	3029.82	371.06	3229.95	1355.035
4.78×10^{-4}	2859.79	515.12	3400.28	1082.95
5.50×10^{-4}	3014.92	648.07	3573.54	781.07
6.20×10^{-4}	2994.42	922.67	3476.01	631.35
6.93×10^{-4}	3154.40	959.29	3542.12	476.33
7.58×10^{-4}	2927.15	1244.92	3360.62	426.77
8.28×10^{-4}	2912.06	1400.78	3329.71	301.61
8.98×10^{-4}	3019.17	1571.49	3216.56	240.93
9.68×10^{-4}	2962.76	1619.42	3111.21	137.35
1.04×10^{-3}	3056.08	1785.06	3136.40	59.78
1.27×10^{-3}	3053.41	2342.40	2759.48	0.02
1.84×10^{-3}	3325.23	3232.55	1628.71	87.42

Tiempo	Valor / ns
τ_1	4.992(3)
τ_2	4.04(5)
τ_3	2.58(4)
τ_4	0.088(2)

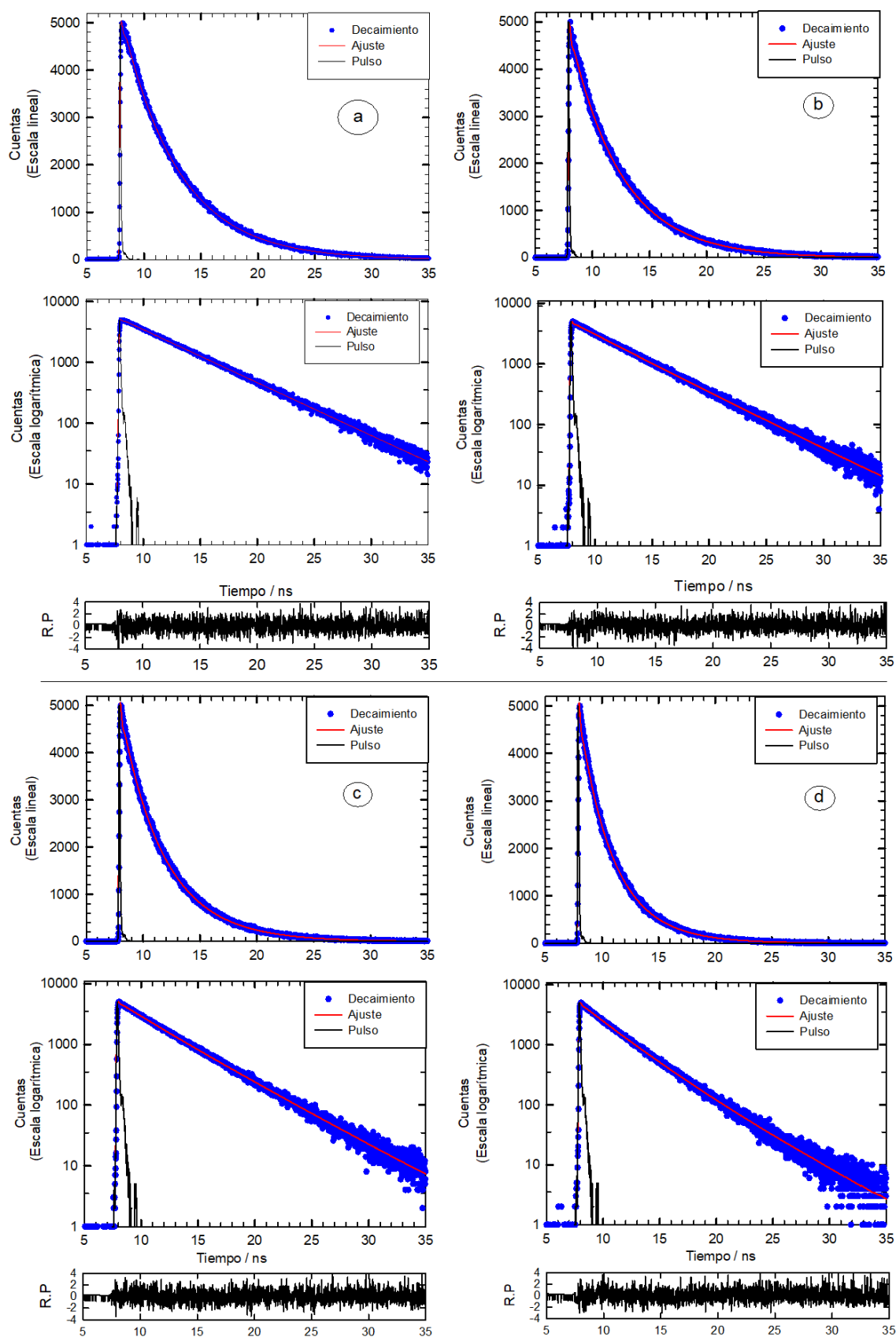


Figura 8.27. Decaimiento de la fluorescencia en escala lineal y logarítmica de la PF a 510 nm en agua con las concentraciones de SCX4: (a) 0 mol dm^{-3} , (b) $2.19 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, (c) $6.20 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ y (d) $1.84 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ junto con el perfil temporal del pulso de excitación, la función tetraexponencial ajustada globalmente a los datos y los residuos ponderados. $[PF] = 4.2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ en ángulo mágico.

Se ha representado en la Figura 8.28 el perfil temporal de los cuatro componentes que reproducen los decaimientos de fluorescencia experimentales resultantes del análisis global. Para poder asignar los componentes a las distintas especies excitadas de la proflavina es necesario analizar cómo varían las contribuciones de cada componente con la concentración de SCX4. En la Figura 8.29 se muestran los decaimientos experimentales de la Figura 8.27 junto con la contribución de los cuatro componentes y la suma de las mismas. Las amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 , resultantes del análisis global (Tabla 8.4) y sus valores corregidos (divididos por el tiempo de adquisición de cada decaimiento de fluorescencia) a_1^c , a_2^c , a_3^c y a_4^c se han representado frente a la concentración de SCX4 en la Figura 8.30.

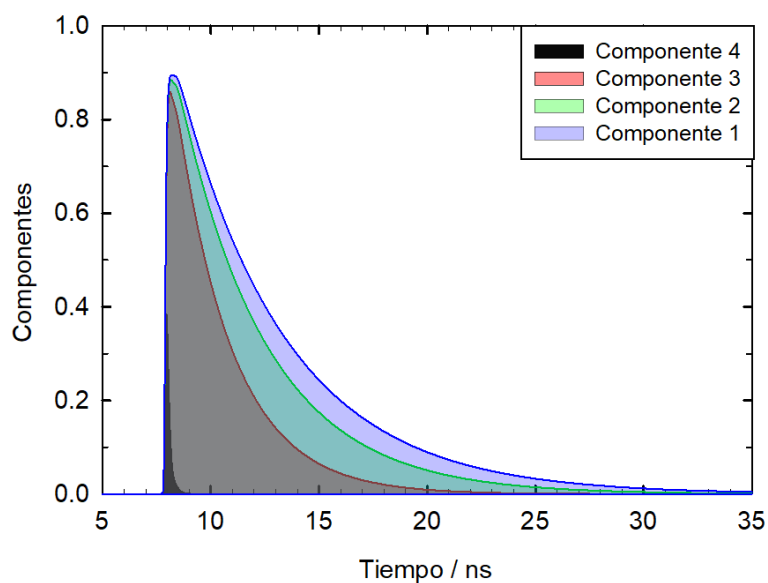


Figura 8.28. Perfil temporal de los componentes 1, 2, 3 y 4 obtenidos mediante análisis global de la serie de decaimientos de fluorescencia experimentales a 510 nm de la PF en agua en presencia de SCX4.

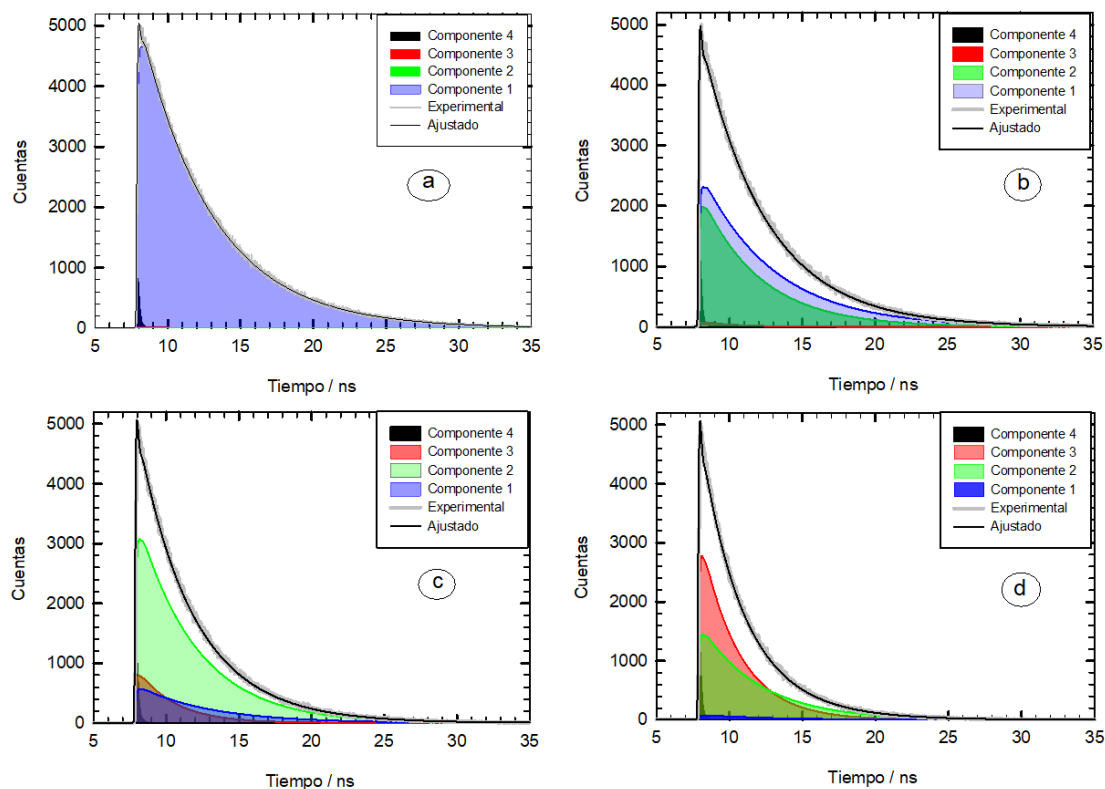


Figura 8.29. Decaimiento de la fluorescencia a 510 nm de la PF en agua con las concentraciones de SCX4: (a) 0 mol dm³, (b) 2.19×10^{-4} mol dm³, (c) 6.20×10^{-4} mol dm³ y (d) 1.84×10^{-3} mol dm³ junto con las participaciones de los componentes 1, 2, 3 y 4 de la Figura 8.27 y la suma de las contribuciones.

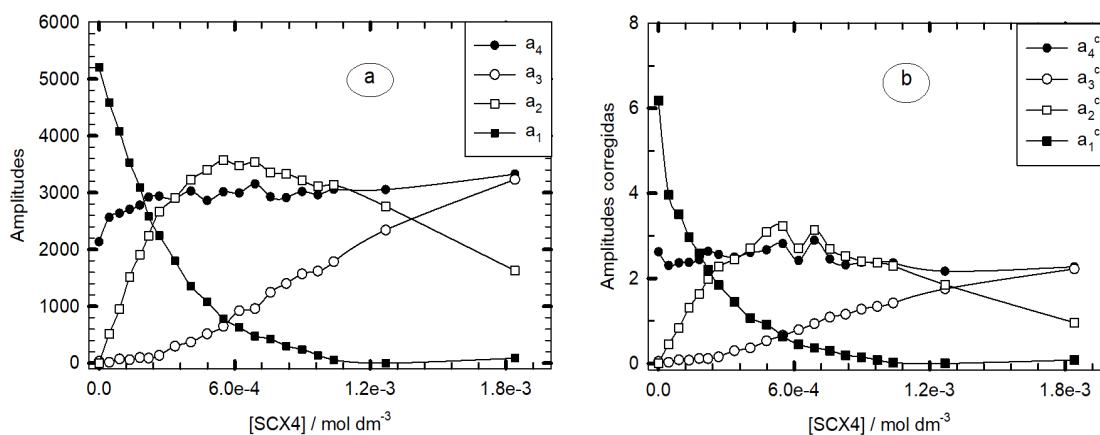
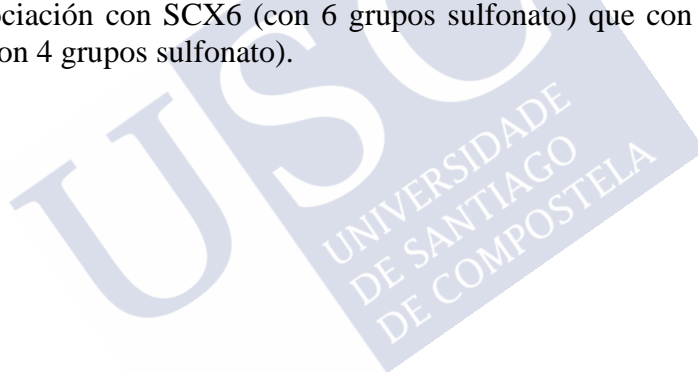


Figura 8.30. Representación de las amplitudes a_1 , a_2 , a_3 y a_4 obtenidas mediante el ajuste global de la ecuación (8.38) a los decaimientos de fluorescencia a 510 nm de la PF en agua en presencia de SCX4, así como las amplitudes corregidas por el tiempo de medida de cada decaimiento a_1^c , a_2^c , a_3^c y a_4^c , en función de la concentración de SCX4.

El modelo propuesto predice que el decaimiento de fluorescencia de la PF en presencia de SCX4 debe ser triexponencial con tres tiempos de vida, debidos a P*, COM1* y COM2*, independientes de la concentración de SCX4, y amplitudes que vendrán determinadas por la proporción de estas especies en el estado fundamental, dependiente a su vez de la concentración de SCX4 presente en el medio. En la Figura 8.29 se observa que el componente 4, con un tiempo de vida muy corto, de 88.5(8) ps (Tabla 8.4), tiene una contribución muy pequeña que no varía apenas con la concentración de SCX4 y no

corresponde a ninguna especie del modelo planteado. Como ya se explicó en el caso del SCX6 (apartado 8.1.3), este tiempo debe corresponder con el tiempo de vida de fluorescencia (71.6 ps) asignado por Kumar y col.⁵¹ a la emisión de la PF desde el estado 1B_2 relajado.

El tiempo de vida τ_1 (4.992(3) ns) se debe a la especie P^* , como se discutió en el apartado 8.1.3. En concordancia con el modelo propuesto, la contribución del tiempo de vida de la proteína libre es máxima en ausencia de SCX4 y disminuye progresivamente al aumentar la concentración del calixareno, como se observa en la Figura 8.29, y lo mismo puede decirse de su amplitud corregida a_1^c (Figura 8.30). El tiempo τ_2 (4.04(5) ns) pertenece al complejo $COM1^*$ ya que presenta una participación al decaimiento experimental (Figura 8.29) y una amplitud corregida a_2^c (Figura 8.30) que aumentan inicialmente con la concentración de SCX4, pero a concentraciones altas del calixareno empiezan a disminuir. Por último, el valor de tiempo τ_3 (2.58(4) ns), con una contribución (Figura 8.29) y un valor de a_3^c (Figura 8.30) crecientes con la concentración de SCX4, debe corresponder a $COM2^*$. Si se comparan los tiempos obtenidos para la asociación de la PF con los dos calixarenos se observa que el valor correspondiente a $COM1^*$ es prácticamente el mismo con los dos macrociclos (4.26(7) ns con SCX6 y 4.04(5) ns con SCX4). En el caso de $COM2^*$, el tiempo de vida de fluorescencia es ligeramente más corto en el complejo con SCX6 (1.75(2) ns) que en el complejo con SCX4 (2.58(4) ns), por lo que el proceso de desactivación no radiante de la PF en $COM2^*$ es más efectivo en el caso de la asociación con SCX6 (con 6 grupos sulfonato) que con el calixareno de menor tamaño (con 4 grupos sulfonato).





9. COMPORTAMIENTO DE LA PROFLAVINA EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA BSA

9.1 MEDIDAS DE ABSORCIÓN

Se han registrado los espectros de absorción de la proflavina en disolución acuosa en presencia de la proteína seroalbúmina bovina, BSA, en el intervalo de concentración de proteína $0-6.67 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ con una concentración de PF $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Tal y como se muestra en la Figura 9.1 observamos que al aumentar la concentración de BSA la primera banda de absorción del catión de la PF se desplaza ligeramente hacia longitudes de onda mayores (desde 445 a 447 nm) y su absorbancia disminuye y se observan dos puntos isobésticos, lo que sugiere que la proflavina forma un complejo con la BSA. Además, aparece una banda en torno a 280 nm que se corresponde con la absorción de la proteína y que va aumentando a medida que aumenta la concentración de BSA a lo largo de toda la serie experimental.

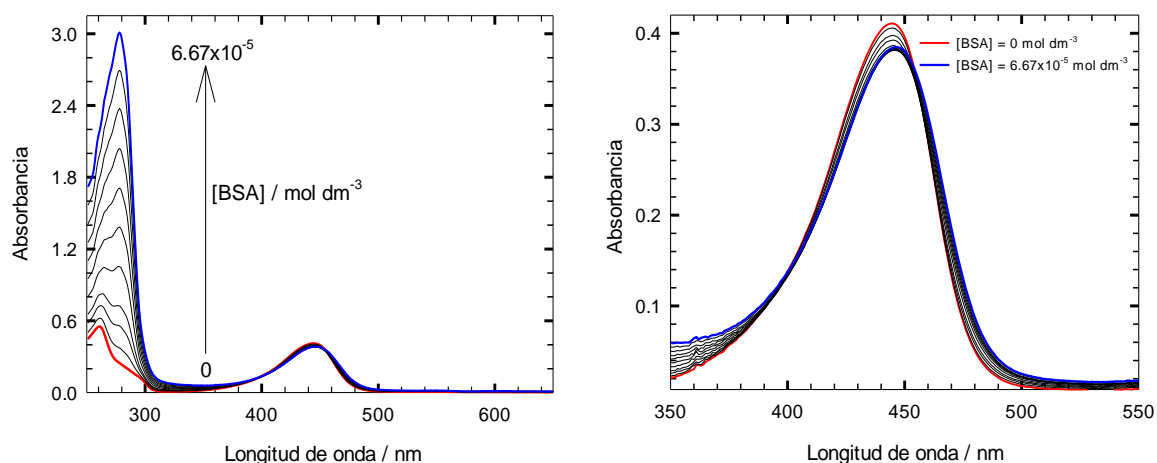
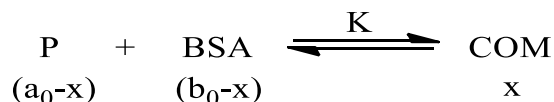


Figura 9.1. Espectros de absorción de la proflavina en agua en presencia de BSA en el intervalo de concentración de la misma de 0 a $6.67 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $[PF] = 1.31 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

El equilibrio de asociación entre el catión de la PF y la proteína BSA para dar un complejo, COM, es el siguiente:



La constante de complejación K vendría dada por la ecuación siguiente:

$$K = \frac{[\text{COM}]}{[\text{P}][\text{BSA}]} = \frac{x}{(a_0 - x)(b_0 - x)} \quad (9.1)$$

donde x es la concentración de complejo, a_0 la concentración total de proflavina, que se mantiene constante, y b_0 la concentración de BSA.

Las concentraciones a_0 y b_0 empleadas en el experimento son del mismo orden de magnitud, por lo que el denominador de la ecuación (9.1) no se puede simplificar.

Desarrollando esta expresión y simplificando llegamos a la siguiente ecuación de segundo grado:

$$x^2 + x \left(-a_0 - b_0 - \frac{1}{K} \right) + a_0 b_0 = 0 \quad (9.2)$$

Despejando x y resolviendo la ecuación (9.2) se comprobó que la solución correcta era la siguiente:

$$x = \frac{\left(a_0 + b_0 + \frac{1}{K} \right) - \sqrt{\left(-a_0 - b_0 - \frac{1}{K} \right)^2 - 4a_0 b_0}}{2} \quad (9.3)$$

La absorbancia a cualquier longitud de onda vendrá dada por:

$$A^\lambda = A_P^\lambda + A_{BSA}^\lambda + A_{COM}^\lambda \quad (9.4)$$

donde A_P^λ , A_{BSA}^λ y A_{COM}^λ son las absorbancias de P, la BSA y el complejo respectivamente.

Admitiendo que las tres especies que absorben radiación cumplen la ley de Lambert-Beer, la ecuación (9.4) queda:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda (a_0 - x) + \varepsilon_{BSA}^\lambda (b_0 - x) + \varepsilon_{COM}^\lambda x \quad (9.5)$$

donde ε_P^λ , $\varepsilon_{BSA}^\lambda$ y $\varepsilon_{COM}^\lambda$ son los coeficientes de absorción molar de P, la BSA y el complejo respectivamente.

Reagrupando términos en la expresión anterior obtenemos la ecuación:

$$A^\lambda = \varepsilon_P^\lambda a_0 + \varepsilon_{BSA}^\lambda b_0 + x \left(\varepsilon_{COM}^\lambda - \varepsilon_P^\lambda - \varepsilon_{BSA}^\lambda \right) \quad (9.6)$$

En la Figura 9.2 se ha representado la absorbancia experimental a varias longitudes de onda frente a la concentración de BSA junto con el ajuste de la ecuación (9.6) a los datos experimentales, apreciándose que hay una buena concordancia entre los datos experimentales y calculados. A continuación, se aplicó el método PCA a los espectros de la Figura 9.1. El análisis confirmó que son necesarios tres componentes para reproducir los espectros experimentales. La Figura 9.3 muestra la buena concordancia entre los espectros calculados a partir de los tres autovectores y los experimentales.

9. Comportamiento de la proflavina en presencia de la proteína BSA

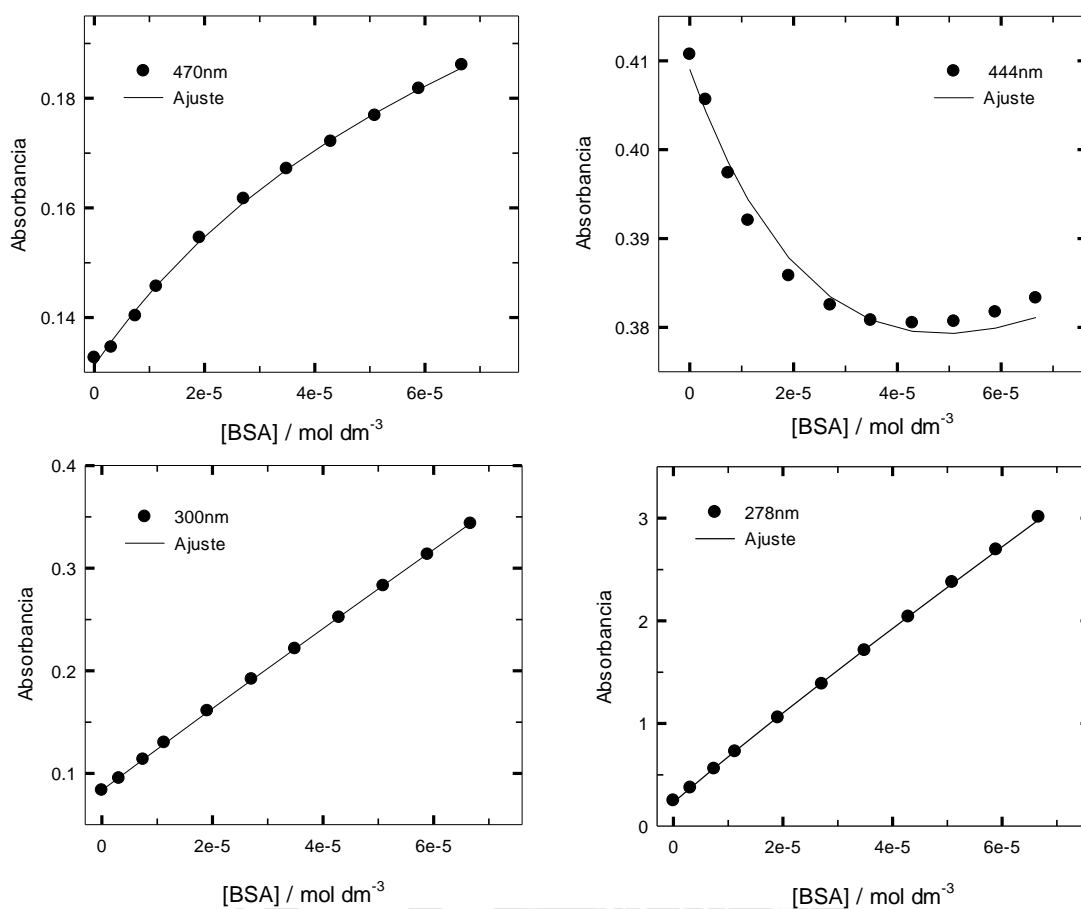


Figura 9.2. Absorbancia experimental de la PF en función de la concentración de BSA a distintas longitudes de onda y ajuste de la ecuación (9.11) a los datos experimentales.

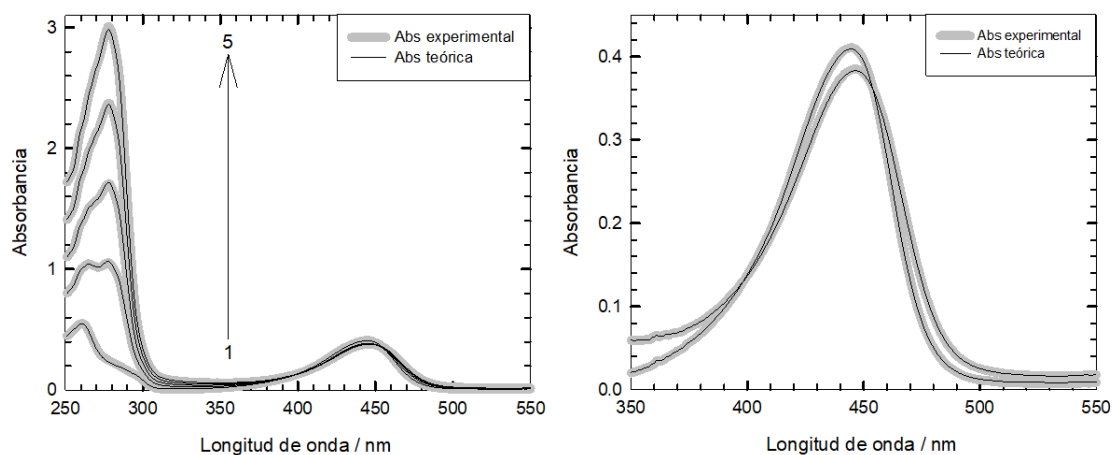


Figura 9.3. Espectros de absorción experimentales (gris) y teóricos (negro) calculados mediante PCA a partir de los tres primeros autovectores y sus coeficientes. Las concentraciones de BSA: 0 mol dm⁻³ (1), 1.9 × 10⁻⁵ mol dm⁻³ (2), 3.49 × 10⁻⁵ mol dm⁻³ (3), 5.09 × 10⁻⁵ mol dm⁻³ (4) y 6.67 × 10⁻⁵ mol dm⁻³ (5).

La incorporación del modelo (ecuación (9.5)) al análisis PCA condujo a los espectros de la proflavina libre P, la BSA y el complejo se muestran en la Figura 9.4. En el espectro del complejo se observa la banda de absorción característica de la proteína a ~ 280 nm mientras que la banda correspondiente a la proflavina muestra un pequeño desplazamiento al rojo respecto a la de la PF libre. La Figura 9.5 permite constatar que hay una buena concordancia entre las concentraciones experimentales y teóricas (calculadas para el modelo) de P, la BSA y el complejo a las distintas concentraciones de BSA estudiadas. El análisis proporcionó un valor para la constante de asociación de $K = 3.6(2) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. El valor de la constante de equilibrio es análogo al publicado por Chakraborti y col.¹¹⁹. ($5.6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ a 298 K) para la asociación de la PF con la BSA. En el caso de la seroalbúmina humana¹²⁰ se encontró que la constante de asociación tenía un valor de $6.5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ a 293 K.

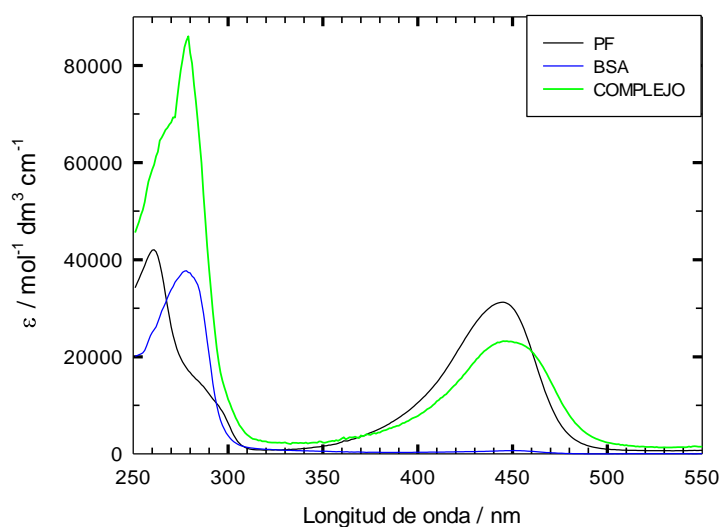


Figura 9.4. Espectros de absorción puros de la PF, la BSA y el complejo obtenidos mediante el análisis PCGA de la serie de espectros de absorción de la PF de la Figura 9.1.

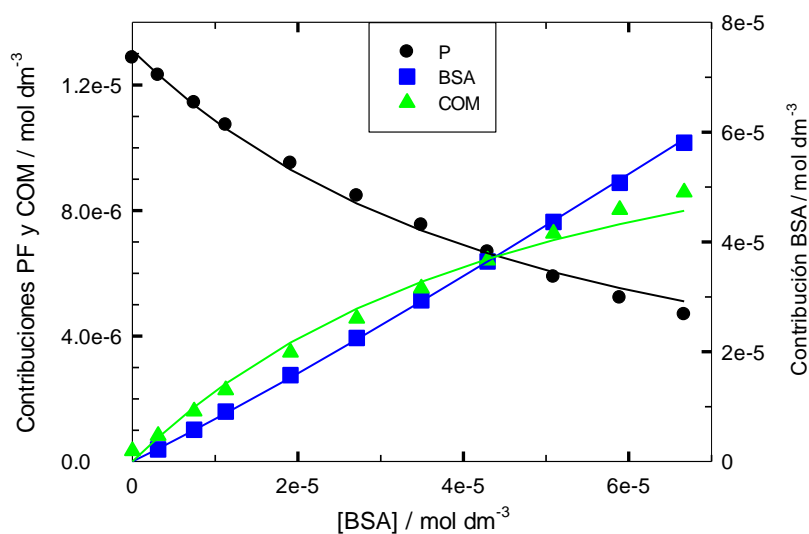


Figura 9.5. Concentraciones experimentales (símbolos) y teóricas (calculadas para el modelo) de P, BSA y complejo en función de la concentración de BSA obtenidos mediante PCGA.

9.2 MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DE ESTADO ESTACIONARIO

Se han registrado los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de la proflavina en disolución acuosa en presencia de la proteína BSA en el intervalo $0-4.84 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ y para una concentración de PF $3.13 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ a $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$, longitud de onda a la que únicamente se excita la proflavina. La Figura 9.6 muestra los espectros de emisión obtenidos, apreciándose que en presencia de BSA la banda de emisión de P disminuye su intensidad levemente, probablemente debido a que el coeficiente de absorción molar de P disminuye ligeramente al complejarse con la proteína.

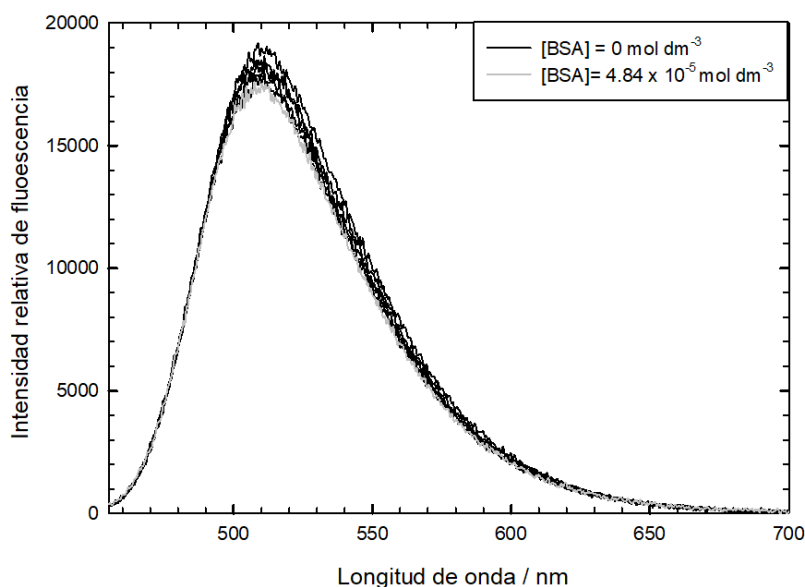


Figura 9.6. Espectros de emisión de fluorescencia de la proflavina en disolución acuosa en presencia de la proteína BSA en el intervalo de concentración de la misma de $0-4.84 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{PF}] = 3.13 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$.

La Figura 9.7 recoge los espectros de emisión y excitación de fluorescencia, normalizados en el máximo, de la proflavina sin BSA y a la concentración de BSA $4.84 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Se observa que en presencia de BSA la banda de excitación se desplaza ligeramente al rojo, al igual que ocurría con la banda de absorción. Cuando se comparan los espectros de emisión, normalizados en el máximo, de la PF en ausencia de BSA y en presencia de la concentración de BSA más alta ($4.84 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) de la serie se comprueba que prácticamente coinciden. Esto parece indicar que a pesar de que la proflavina se compleja con la BSA la fluorescencia de la sonda no se ve muy afectada por el entorno de la proteína.

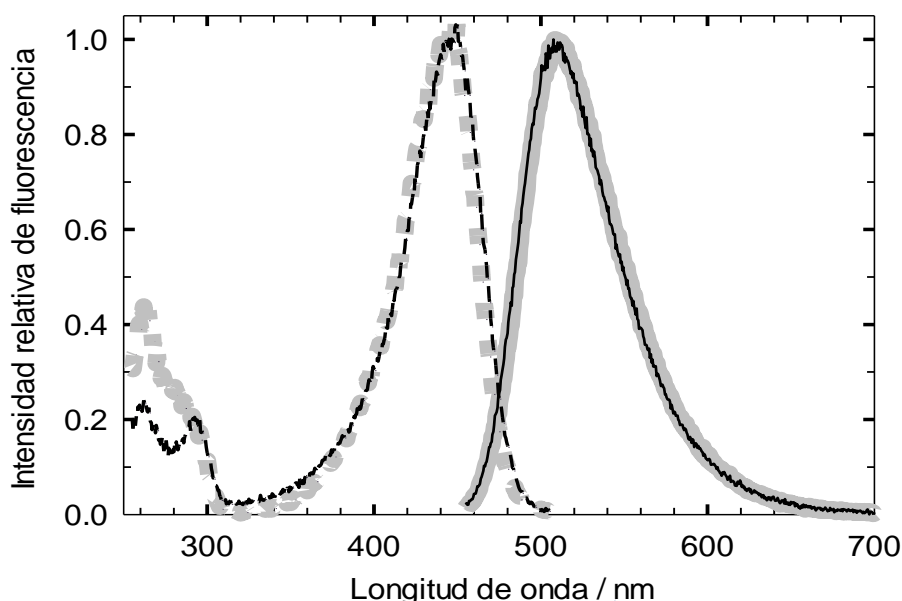


Figura 9.7. Espectros de emisión y excitación de fluorescencia normalizados en el máximo, de la proflavina en ausencia de BSA (gris) y para una $[BSA] = 4.84 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (negro), $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emis}} = 510 \text{ nm}$.

De acuerdo con el modelo de complejación 1:1 entre el catión P de la PF y la BSA propuesto en el apartado 9.1, cabe esperar que la emisión a una longitud de onda dada sea la suma de las contribuciones correspondientes a P y al complejo de P con la BSA. Siguiendo los mismos pasos que para la complejación 1:1 entre P y los calixarenos (apartado 8.1.2) se obtiene la expresión para la intensidad de emisión a cualquier longitud de onda, F_T^λ , en función de la concentración de BSA (ecuación (9.7)).

$$F_T^\lambda = \frac{F_P^\lambda + F_{\text{COM}}^\lambda K [BSA]}{1 + K [BSA]} \quad (9.7)$$

En la expresión anterior F_P^λ y F_{COM}^λ representan las intensidades de emisión que se obtendrían a esa longitud de onda si toda la PF estuviese sin complejar o asociada a la proteína respectivamente.

La aplicación del método PCA a la serie de espectros de la Figura 9.1, permitió confirmar que son necesarias dos componentes para reproducir la serie espectral. Para obtener los espectros de la PF libre y el complejo y la constante de complejación se realizó el análisis global PCGA incluyendo la (ecuación (9.7)). Los espectros componentes obtenidos para P y COM se muestran en la Figura 9.8(a). Se aprecia que las bandas de emisión apenas difieren y el espectro del complejo muestra una intensidad ligeramente más baja que el de P libre. Eso debe ser debido, al menos en parte, a que el coeficiente de absorción molar del complejo es algo inferior que el de P sin complejar (ver Figura 9.4). El análisis proporcionó también los coeficientes experimentales y calculados de esos espectros (las fracciones molares de P y COM) que se muestran en la Figura 9.8(b), apreciándose una buena concordancia entre ambos. El valor optimizado de la constante de equilibrio de asociación K fue: $3.5(6) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, que concuerda con el obtenido para esta constante a partir de las medidas de absorción ($3.6(2) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$).

9. Comportamiento de la proflavina en presencia de la proteína BSA

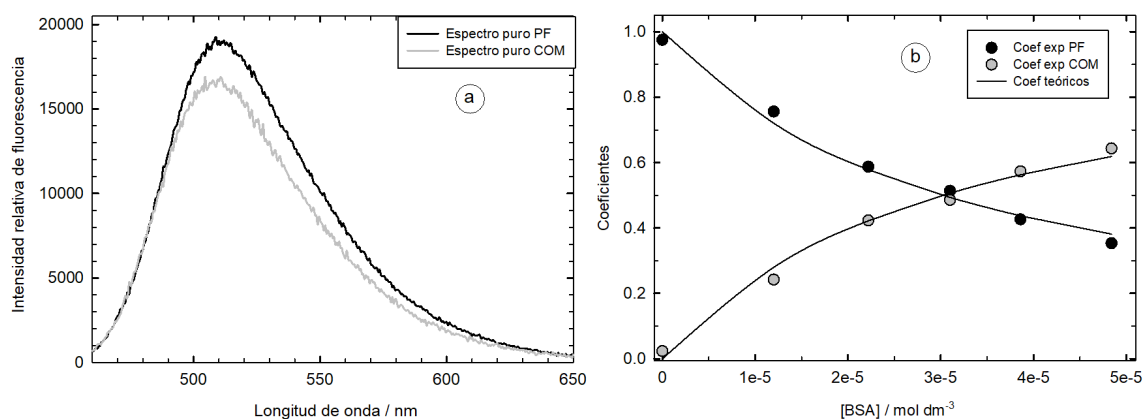


Figura 9.8. a) Espectros puros de la PF y el complejo obtenidos del ajuste global por PCA. b) Coeficientes experimentales y teóricos de la PF y del complejo.

9.3 ANÁLISIS MULTIEXPONENCIAL DE LOS DECAIMIENTOS DE FLUORESCENCIA DE LA PROFLAVINA EN PRESENCIA DE BSA

Para obtener más información sobre el complejo entre la PF y la BSA se registró el decaimiento de la fluorescencia de la PF en agua en presencia de una concentración de BSA $3.84 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (concentración a la que la PF está totalmente complejada) a una longitud de onda de excitación de 370 nm (a ángulo mágico) a una serie de longitudes de onda de emisión en el intervalo 460-570 nm (cada 10 nm). La Figura 9.9 muestra los decaimientos experimentales obtenidos a varias longitudes de onda del intervalo estudiado, en escala lineal (izquierda) y logarítmica (derecha), junto con el pulso del láser.

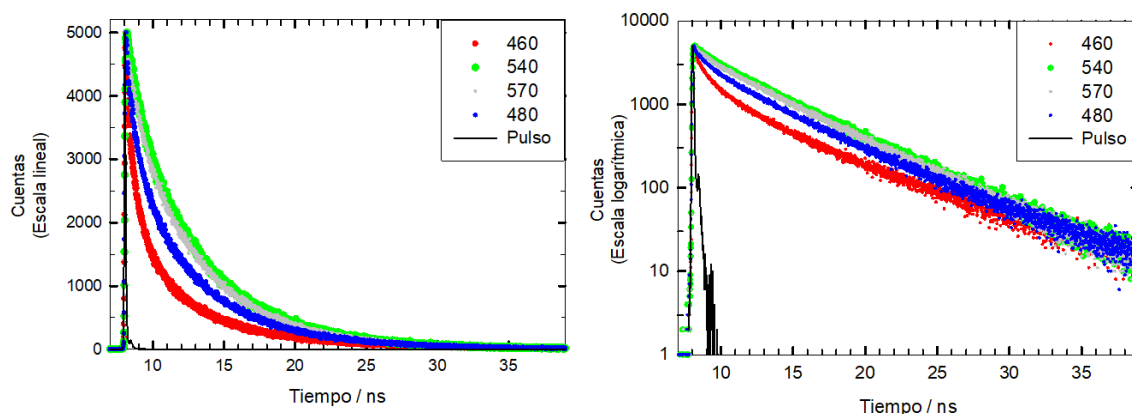
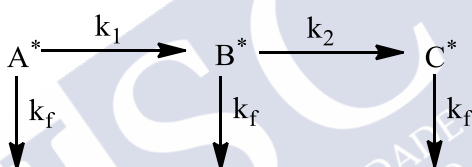


Figura 9.9. Decaimientos de la PF en presencia de BSA a 460, 480, 540 y 570 nm, tanto en escala lineal como escala logarítmica. $[PF] = 7.61 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y $[BSA] = 3.84 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. $\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ en ángulo mágico.

Vimos en el apartado 9.2 que el espectro de emisión de la PF permanece casi constante tras su asociación con la BSA. De acuerdo con esto, esperaríamos que el decaimiento de fluorescencia de la PF fuese independiente de la longitud de onda de emisión. Sin embargo, en la Figura 9.9 se aprecia claramente que los decaimientos de emisión experimentales son distintos a las distintas longitudes de onda de emisión, observándose que a 460 nm la intensidad de emisión disminuye más rápidamente que a mayores longitudes de onda. Además, los decaimientos de fluorescencia no son monoexponenciales, siendo necesarias al menos tres funciones exponenciales para ajustar los datos experimentales. Este comportamiento se observa cuando la relajación del

disolvente en torno a la molécula excitada tiene lugar con una constante de velocidad comparable a la constante de desactivación de la especie emisora, de modo que la emisión y la relajación ocurren simultáneamente. El tiempo de relajación espectral suele ser inferior al tiempo de relajación dieléctrica del disolvente τ_D , que para el agua a temperatura ambiente es 8.3 ps^{121} , mientras que el tiempo de vida de fluorescencia de P es $\sim 5 \text{ ns}$. De acuerdo con esto, en ausencia de la proteína BSA la emisión de la PF tiene lugar desde el estado relajado ya que la reorientación de las moléculas de agua es mucho más rápida que la desactivación de la PF. Sin embargo, la situación cambia cuando la PF se compleja con la BSA ya que las moléculas de agua que rodean a la PF excitada tienen menor movilidad que cuando están en el seno del disolvente y de igual forma la complejación de la PF con la macromolécula debe restringir también el movimiento de la sonda de modo que ésta puede emitir desde diferentes estados de relajación.

Los decaimientos experimentales registrados (Figura 9.9) muestran que la mayor parte de los fotones de 460 nm alcanzan el detector a tiempos más cortos que los fotones de mayor longitud de onda, por ejemplo 570 nm , reflejando de la evolución temporal del espectro de fluorescencia de la proflavina debido a la dinámica de solvatación. De acuerdo con esto se propone el modelo del esquema en el que intervienen tres especies emisoras: A^* , B^* y C^* (Esquema 9.1), que representan tres estados de relajación diferentes de la proflavina asociada al BSA:



Esquema 9.1. Modelo del esquema en el que intervienen tres especies emisoras: A^* , B^* y C^* .

donde k_1 y k_2 son las constantes de velocidad para los procesos $A^* \rightarrow B^*$ y $B^* \rightarrow C^*$ respectivamente y k_f es la constante de desactivación de la proflavina, que debe ser la misma para los tres estados.

Las concentraciones de A, B y C en función del tiempo vendrán dadas por:

$$-\frac{d[A^*]_t}{dt} = (k_1 + k_f)[A^*]_t \quad (9.8)$$

$$-\frac{d[B^*]_t}{dt} = (k_2 + k_f)[B^*]_t - k_1[A^*]_t \quad (9.9)$$

$$-\frac{d[C^*]_t}{dt} = k_f[C^*]_t - k_2[B^*]_t \quad (9.10)$$

La integración de la ecuación (9.8) conduce a:

$$[A^*]_t = [A^*]_0 \exp [-(k_1 + k_f)t] \quad (9.11)$$

donde $[A^*]_0$ es la concentración de A^* cuando $t = 0$. La sustitución de la ecuación (9.11) en la 9.9 da lugar a una ecuación diferencial ordinaria lineal de primer orden cuya solución, teniendo en cuenta que a $t = 0$ $[B^*]_0$ es cero, es:

$$[B^*]_t = \frac{k_1[A^*]_0}{k_2 - k_1} \{ \exp [-(k_1 + k_f)t] - \exp [-(k_2 + k_f)t] \} \quad (9.12)$$

Introduciendo la ecuación (9.12) en la (9.10) y resolviendo la ecuación diferencial como en el caso anterior, considerando que a $t = 0$ $[C^*]_0$ es cero, se obtiene:

$$[C^*]_t = [A^*]_0 \left\{ \exp[-k_f t] + \frac{k_1 \exp[-(k_2 + k_f)t]}{k_2 - k_1} - \frac{k_2 \exp[-(k_1 + k_f)t]}{k_2 - k_1} \right\} \quad (9.13)$$

Las expresiones anteriores se pueden escribir como:

$$[A^*]_t = [A^*]_0 \exp[-t/\tau_1] \quad (9.14)$$

$$[B^*]_t = \frac{k_1 [A^*]_0}{k_1 - k_2} \{ \exp[-t/\tau_2] - \exp[-t/\tau_1] \} \quad (9.15)$$

$$[C^*]_t = \frac{[A^*]_0}{k_1 - k_2} \{ k_2 \exp[-t/\tau_1] - k_1 \exp[-t/\tau_2] + (k_1 - k_2) \exp[-t/\tau_3] \} \quad (9.16)$$

donde:

$$\tau_1 = \frac{1}{k_1 + k_f} \quad (9.17)$$

$$\tau_2 = \frac{1}{k_2 + k_f} \quad (9.18)$$

$$\tau_3 = \frac{1}{k_f} \quad (9.19)$$

De acuerdo con las ecuaciones (9.14)–(9.16) los decaimientos de fluorescencia registrados entre 460–570 nm deberían ser triexponenciales. Sin embargo, cuando se aplicó el método PCA a la matriz de decaimientos experimentales se comprobó que son necesarias 4 componentes para reproducir la serie de datos. El motivo es que aún en ausencia de BSA el decaimiento de fluorescencia de la PF es biexponencial, esto es, hay un componente, que llamaremos X, con $\tau_4 = 1/k_X$ que es característico de la propia proflavina y que sigue estando presente aun cuando esta sonda está asociada a la BSA. Teniendo en cuenta esto, la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda dada λ a tiempo t vendrá dada por la suma de las contribuciones de las especies A^* , B^* , C^* y X^* de acuerdo con:

$$F(\lambda, t) = F_A(\lambda)[A^*]_t + F_B(\lambda)[B^*]_t + F_C(\lambda)[C^*]_t + F_X(\lambda)[X^*]_t \quad (9.20)$$

donde $F_A(\lambda)$, $F_B(\lambda)$, $F_C(\lambda)$ y $F_X(\lambda)$ representan las contribuciones que tienen los espectros de A^* , B^* , C^* y X^* a la intensidad de fluorescencia $F(\lambda, t)$ a la longitud de onda λ .

Se realizó el análisis global de componentes principales (PCGA) de los decaimientos de fluorescencia experimentales optimizando el conjunto de ecuaciones (9.11)–(9.20) del modelo propuesto a los datos experimentales. La Figura 9.10 muestra el decaimiento experimental, el perfil del pulso de excitación y la función ajustada a 460 nm, 480 nm, 540 nm y 570 nm en escala lineal y logarítmica. La buena calidad del ajuste se aprecia en la buena distribución en torno a cero de los residuos ponderados y la proximidad a 1 del valor de χ^2 . La Tabla 9.1 muestra los valores obtenidos para $F_A(\lambda)$, $F_B(\lambda)$, $F_C(\lambda)$ y $F_X(\lambda)$

a cada longitud de onda analizada así como de las constantes de velocidad k_1 , k_2 , k_f y k_x .



9. Comportamiento de la proflavina en presencia de la proteína BSA

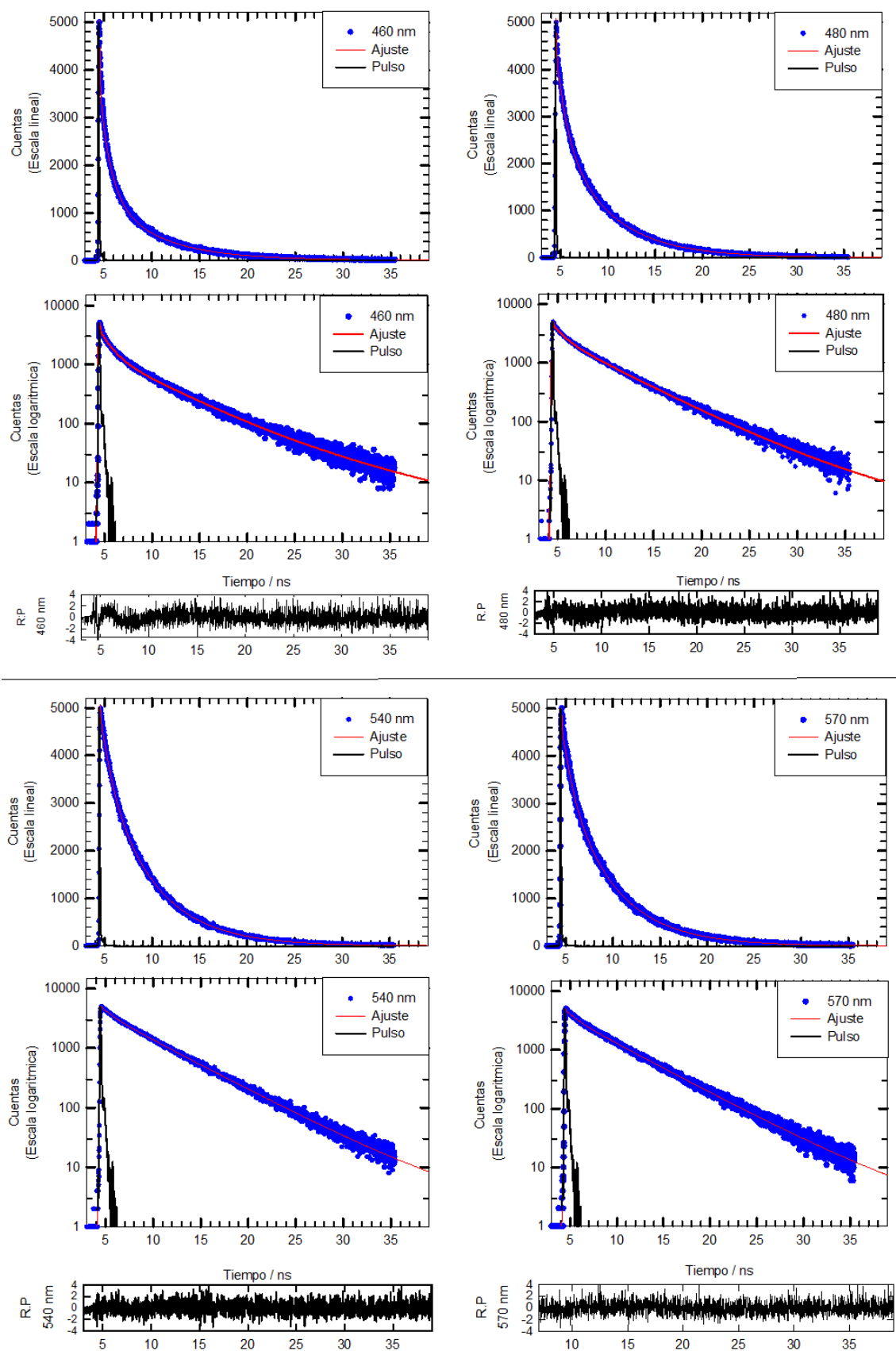


Figura 9.10. Decaimientos de fluorescencia a varias longitudes de onda de emisión de la PF en presencia de BSA en escala lineal y logarítmica, perfil del pulso de excitación y funciones tetraexponenciales ajustadas globalmente a los datos. Se muestran también los residuos ponderados de los ajustes a cada longitud de onda.

Tabla 9.1. Resultados del ajuste global de las ecuaciones (9.14)-(9.20) a los decaimientos de fluorescencia de la PF en presencia de BSA, medidos hasta 5000 cuentas en el máximo a varias longitudes de onda de emisión. Se muestran los valores obtenidos para $F_A(\lambda)$, $F_B(\lambda)$, $F_C(\lambda)$ y $F_X(\lambda)$, el parámetro χ^2 y las constantes de velocidad k_1 , k_2 , k_f , y k_x .

λ / nm	F_A/λ	F_B/λ	F_C/λ	F_X/λ	χ^2
460	9333.24	3612.76	1446.54	123.01	1.07
470	8889.29	4015.84	2050.15	104.83	1.03
480	8486.44	4418.36	2747.83	83.97	1.00
490	7914.47	4654.44	3259.21	69.64	0.98
500	7627.26	4803.87	3577.65	61.43	0.95
510	7352.19	4893.24	3767.92	57.31	0.99
520	7408.51	4999.75	3936.35	53.73	0.99
530	7421.72	4947.09	3933.09	47.52	0.97
540	7485.56	5057.79	3993.03	48.09	0.90
550	7503.36	5048.25	3985.20	44.48	0.95
560	7596.90	4875.02	3832.11	40.01	1.00
570	7645.13	4877.69	3755.09	38.51	0.98

Constantes de velocidad	Valor
k_1 / ns ⁻¹	11.3(3)
k_2 / ns ⁻¹	0.73(1)
k_f / ns ⁻¹	0.1958(3)
k_x / ns ⁻¹	0.07(2)

La Figura 9.11 recoge la evolución con el tiempo de los cuatro componentes A*, B*, C* y X* convolucionadas con el perfil del pulso de excitación. Se aprecia en la figura que el componente A* desaparece mucho más rápido que el B* y el C* muestra la desactivación más lenta de los tres. Se puede analizar la contribución que tiene cada uno de estos componentes al decaimiento experimental a las distintas longitudes de onda de emisión. En la Figura 9.12 se representan los decaimientos experimentales de la Figura 9.10 junto con las contribuciones de A*, B*, C* y X* y su suma. En ella se puede observar que a 460 nm, longitud de onda a la que el decaimiento experimental es más rápido, la contribución de la especie A* muestra el valor más alto de la serie mientras que la de la especie C* es la mínima observada. Al ir aumentando la longitud de onda, la participación de A* disminuye significativamente mientras que las de B* y C* van aumentando. La participación de X* es muy pequeña a todas las longitudes de onda.

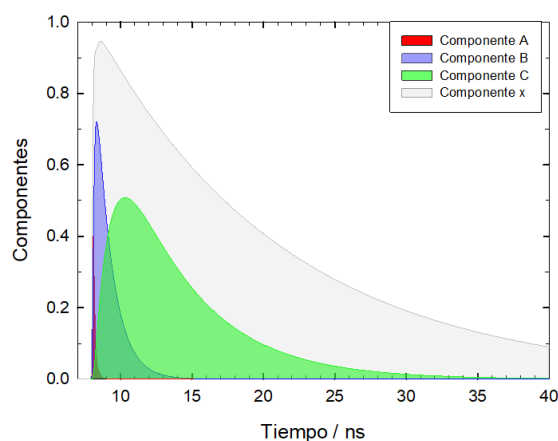


Figura 9.11. Evolución temporal de las especies A*, B*, C* y X* del modelo propuesto de ajuste.

9. Comportamiento de la proflavina en presencia de la proteína BSA

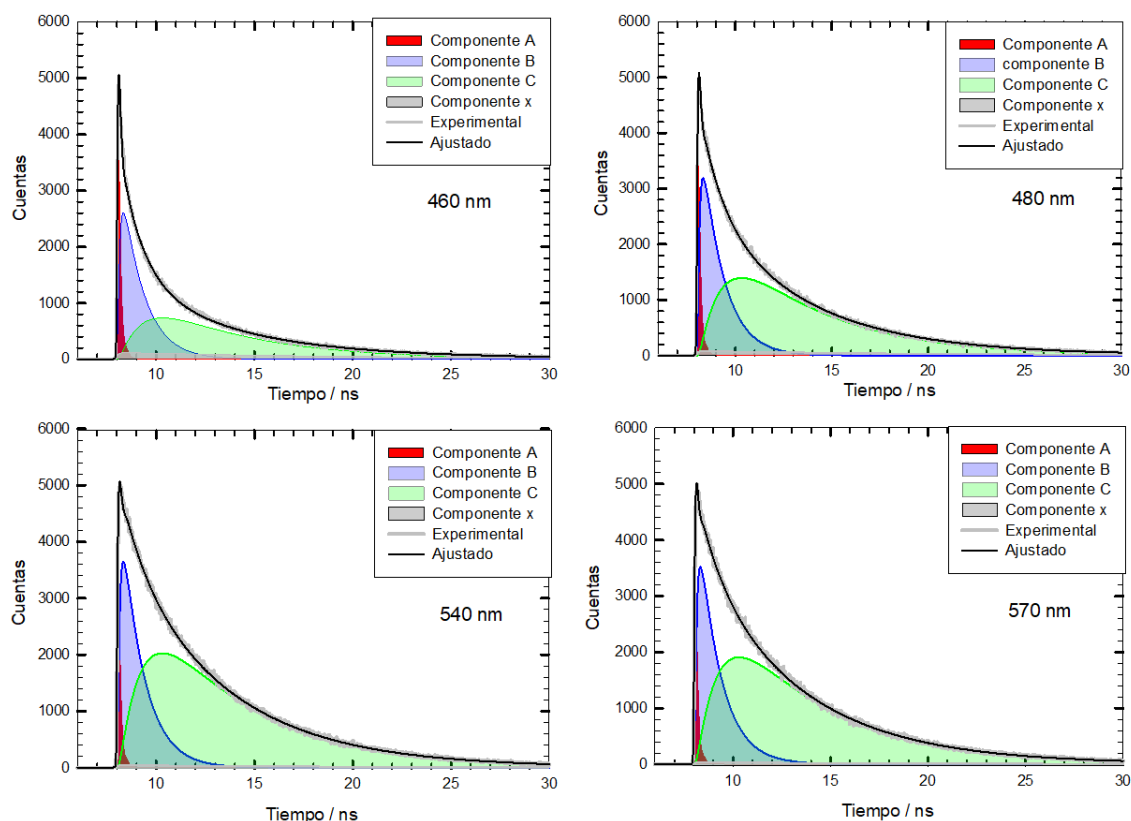


Figura 9.12. Decaimientos de fluorescencia experimentales y calculados de la PF en presencia de BSA a 460 nm, 480 nm, 540 nm y 570 nm. Los decaimientos calculados se han obtenido por combinación lineal de los perfiles temporales de las poblaciones relativas de las cuatro especies excitadas mostradas en la Figura 9.10. Se muestran también las contribuciones individuales de cada especie al decaimiento a cada longitud de onda.

Los datos de la Tabla 9.1 muestran que el valor de la constante de velocidad k_1 ($11.3(3) \text{ ns}^{-1}$), correspondiente a la primera etapa de la relajación $A^* \rightarrow B^*$, es 15 veces superior al de la constante k_2 ($0.73(1) \text{ ns}^{-1}$) para la segunda etapa $B^* \rightarrow C^*$. El primer paso $A^* \rightarrow B^*$ debe corresponder a la reorganización de las moléculas de agua que se encuentran solvatando a la proflavina excitada y que tiene lugar como consecuencia de la modificación de la distribución electrónica que tiene lugar en la sonda tras su excitación electrónica. Como ya se indicó anteriormente, en ausencia de BSA este proceso no se observa porque es más rápido que cuando la sonda está asociada a la proteína y por tanto las moléculas de agua de su esfera de solvatación ven reducida su movilidad al estar interaccionando también con la BSA. Una vez que se ha producido la relajación de las moléculas de agua se obtiene la especie B^* que a su vez evoluciona mediante la reorientación de la propia proflavina, cuya movilidad es menor que la de las moléculas de agua, en el entorno de la proteína para generar el estado relajado C^* de la PF. La inversa de la constante k_f ($0.1958(3) \text{ ns}^{-1}$) es el tiempo de vida de la proflavina asociada a la proteína: 5.11 ns. Este valor es semejante al obtenido para la sonda en ausencia de BSA (4.99 ns).

La Figura 9.13 recoge las contribuciones proporcionadas por el análisis PCGA a cada longitud de onda analizada (Tabla 9.1). En ella se ve claramente que la participación del espectro de X^* es casi nula y nos centraremos en las especies A^* , B^* y C^* . Las amplitudes mostradas no se corresponden con los espectros de emisión de A^* , B^* , C^* (y X^*). El motivo es que en las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo por el método de recuento de fotones individuales se registran los fotones que llegan al detector a la

longitud de onda analizada hasta que en el máximo del decaimiento se alcanza un número fijo de fotones, en nuestro caso 5000, por lo que el tiempo de adquisición de los datos es distinto a cada longitud de onda mientras que en las medidas de estado estacionario el tiempo de integración es el mismo a todas las longitudes de onda del espectro. Para obtener el espectro de cada una de las especies involucradas solo hay que dividir cada amplitud a una longitud de onda dada por el tiempo de medida correspondiente a esa longitud de onda. Se ha realizado esa corrección para obtener los espectros $F_A^c(\lambda)$, $F_B^c(\lambda)$, $F_C^c(\lambda)$ de las especies involucradas en el proceso de relajación: A^* , B^* y C^* (ver Figura 9.14), observándose que la longitud de onda correspondiente al máximo de estos espectros varía en el orden: $A^* < B^* < C^*$ como era de esperar ya que a medida que tiene lugar la relajación de la proflavina excitada disminuye la energía de la transición electrónica $S_1 \rightarrow S_0$.

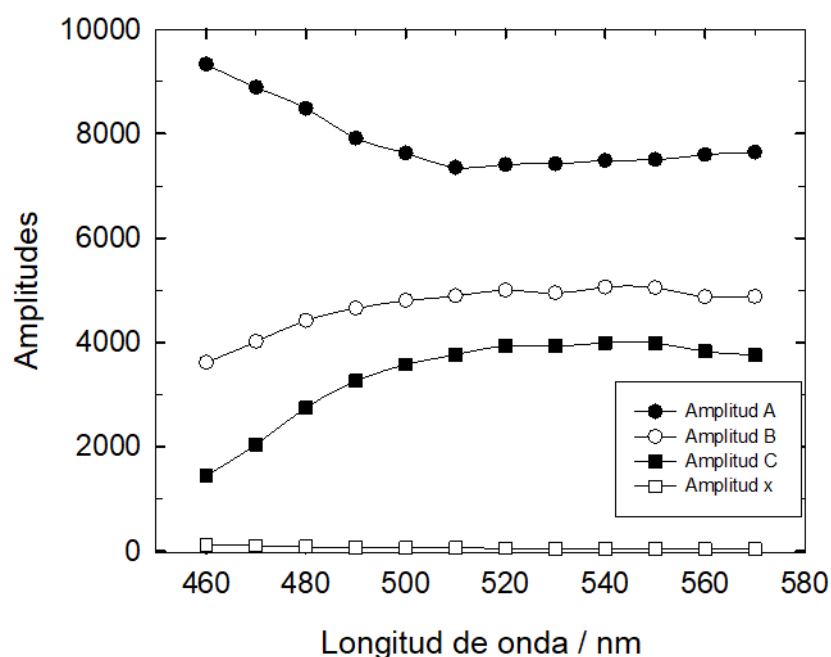


Figura 9.13. Espectros sin corregir $F_A(\lambda)$, $F_B(\lambda)$, $F_C(\lambda)$ y $F_X(\lambda)$ de A^* , B^* , C^* y X^* obtenidos mediante el ajuste global de las ecuaciones (9.14)-(9.20) a los decaimientos de fluorescencia de la PF en presencia de BSA a varias longitudes de onda en el intervalo 460-570 nm. $[PF]=7.61 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} , $[BSA]=3.84 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} . $\lambda_{exc} = 370$ nm en ángulo mágico.

9. Comportamiento de la proflavina en presencia de la proteína BSA

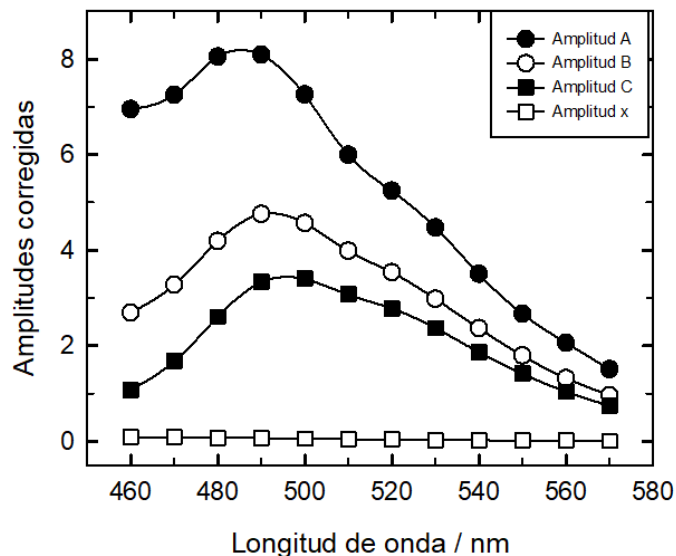


Figura 9.14. Espectros $F_A^c(\lambda)$, $F_B^c(\lambda)$ y $F_C^c(\lambda)$ correspondientes a las especies A*, B* y C* obtenidos dividiendo las intensidades de emisión de los espectros sin corregir de estas especies de la Figura 9.13 por el tiempo de adquisición a cada longitud de onda.

Una vez conocidos los espectros de emisión de A*, B* y C* se puede determinar cuál es la participación de estas tres especies en el espectro de emisión de estado estacionario puro del complejo (éste se obtuvo en el apartado anterior). En la Figura 9.15 se ha representado el espectro de emisión puro del complejo obtenido mediante PCGA (ver Figura 9.8) junto con las contribuciones de los espectros $F_A^c(\lambda)$, $F_B^c(\lambda)$ y $F_C^c(\lambda)$ y el espectro suma. Se observa que la suma de las contribuciones coincide con el espectro de estado estacionario de la PF complejada. Además, se aprecia que la especie relajada C* es la que muestra una mayor contribución seguida de la especie parcialmente relajada B* mientras que la participación de la proflavina inicialmente excitada A* es muy pequeña. Estos resultados ponen de manifiesto que el espectro de emisión de estado estacionario de la proflavina complejada no corresponde a la emisión desde el estado relajado.

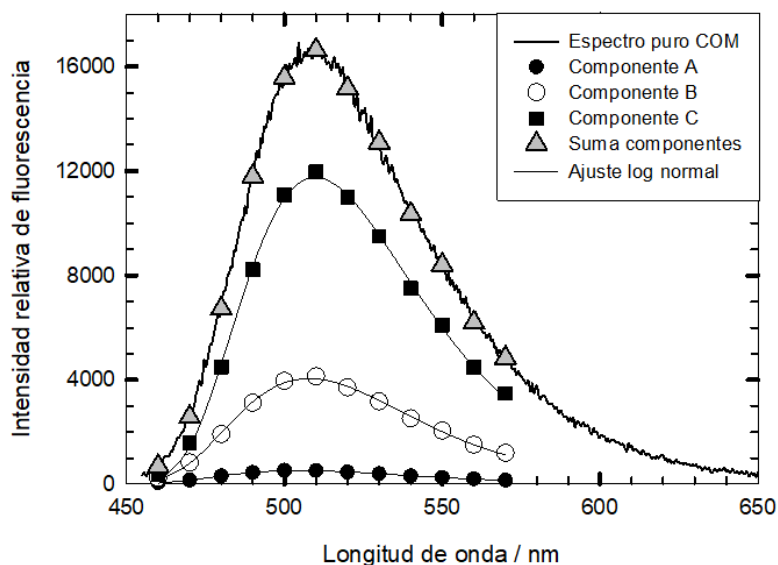


Figura 9.15. Espectro de emisión de estado estacionario puro del complejo junto con las contribuciones de los espectros de emisión de A*, B* y C* (se muestra también una función logaritmo normal ajustada a los datos) y la suma de las contribuciones.



10. CONCLUSIONES

En la investigación llevada a cabo en esta tesis doctoral se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. El estudio de la influencia de la acidez sobre los espectros de absorción de la proflavina en disolución acuosa ha permitido observar que, en función del pH del medio, la sonda puede existir como forma neutra, catión, protonado en el nitrógeno del anillo aromático, o bien dicatión, resultante de la protonación del catión en el grupo amino, y obtener las constantes de acidez de sus equilibrios ácido-base. Se ha comprobado que tanto la forma neutra como la protonada forman agregados diméricos en etanol y agua a concentraciones relativamente bajas de proflavina, y se han determinado sus constantes de dimerización. Los resultados obtenidos muestran que la interacción entre las dos unidades de proflavina de estos agregados es débil e independiente de la carga de la sonda.

2. La excitación de la forma protonada de la proflavina conduce a la fluorescencia del catión en todos los disolventes estudiados. Al aumentar la polaridad del disolvente el espectro de emisión de la forma protonada se desplaza al rojo y su rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye. En disolventes próticos, como el agua y los alcoholes, la excitación de la forma neutra da lugar a la fluorescencia de la forma protonada como consecuencia de que el nitrógeno del anillo incrementa notablemente su basicidad tras la excitación electrónica. En disolventes apróticos, como el DMSO, este proceso no puede ocurrir y se observa emisión de la forma neutra.

3. La intensidad de fluorescencia de la proflavina en disolución acuosa disminuye por la presencia de aniones en el medio, siendo los desactivadores más efectivos los iones yoduro, azida y tiocianato, seguidos por el bromuro y nitrito, mientras que el ion cloruro muestra un efecto de quenching muy pequeño. La desactivación puede explicarse a través de un mecanismo que incluye la formación de un excíplejo entre la proflavina excitada y el anión, habiéndose determinado sus constantes de velocidad de formación, disociación y desactivación. La constante de equilibrio de formación del excíplejo se incrementa a medida que aumenta su carácter de transferencia de carga, observándose un incremento de dos órdenes de magnitud entre el desactivador más ineficiente (ion cloruro) y el más eficiente (ion yoduro). Este hecho es el factor principal que explica la efectividad de los diferentes aniones como desactivadores de la fluorescencia de la proflavina, ya que el excíplejo presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia mucho menor que el de la proflavina. Los resultados obtenidos indican que la transferencia electrónica debe jugar un papel importante en la desactivación de los excíplejos de los desactivadores aniónicos.

4. La tiourea, metiltiourea, *N,N'*-dimetiltiourea y tetrametiltiourea son desactivadores muy efectivos de la fluorescencia de la proflavina. Estas especies reaccionan a velocidad próxima al control por difusión con la proflavina excitada, provocando la extinción de su fluorescencia probablemente por transferencia electrónica. Además, se propone que las tioureas forman un complejo con la proflavina en estado fundamental, que no es emisivo. La constante de equilibrio de formación de ese complejo se incrementa al aumentar su carácter de transferencia de carga. Por esta razón, la efectividad de estos desactivadores aumenta con el número de metilos sustituyentes en la tiourea.

5. La intensidad de fluorescencia de la proflavina en disolución acuosa disminuye significativamente y el espectro de emisión se desplaza a mayor longitud de onda al aumentar la concentración de los calixarenos SCX4 y SCX6. Este comportamiento se

atribuye a la asociación de la proflavina con el calixareno en el estado fundamental debido a la interacción electrostática entre la carga positiva de la sonda y la negativa del macrociclo. Se puede afirmar que a concentraciones bajas de calixareno se forma un complejo 1:1, y que al aumentar la concentración del macrociclo se favorece la aparición del complejo 1:2 entre una molécula de proflavina y dos de calixareno. El análisis de datos ha proporcionado los espectros de emisión de los dos complejos, que permiten concluir que es poco probable que el complejo 1:1 sea un complejo de inclusión y que en el complejo 1:2 debe existir una interacción específica entre la proflavina y el macrociclo, probablemente enlace de H entre un $-NH_2$ de la sonda y un $-OH$ del calixareno, interacción que puede producirse tanto si la proflavina se encuentra dentro como fuera del calixareno. Se ha encontrado que los valores de las constantes de equilibrio de asociación proflavina-SCX6 son algo superiores que los de la sonda con el SCX4, probablemente como consecuencia de la mayor carga negativa del SCX6. Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo han permitido identificar los tiempos de vida de fluorescencia de las tres especies emisoras y ratificar el modelo propuesto.

6. El espectro de absorción de la proflavina en disolución acuosa se modifica en presencia de la proteína BSA, debido a la asociación de la sonda con la proteína. La intensidad de fluorescencia de la proflavina disminuye ligeramente como consecuencia de su asociación con la proteína, aunque su espectro apenas se modifica. El análisis de las series de datos ha proporcionado los espectros puros de absorción y emisión del complejo proflavina-BSA y la constante de equilibrio de asociación. El decaimiento de la fluorescencia de la proflavina asociada a la BSA es multiexponencial y más rápido a longitudes de onda de emisión cortas que a longitudes de onda largas, poniendo de manifiesto que la proflavina complejada emite desde distintos estados de relajación. El análisis de los datos permite concluir que la proflavina inicialmente excitada experimenta un rápido proceso de relajación consistente en la reorganización de las moléculas de agua que se encuentran solvatando la sonda, originando una especie intermedia que evoluciona más lentamente mediante la reorientación de la proflavina en el entorno de la proteína, dando lugar al estado relajado de la sonda. El análisis de datos ha conducido a los espectros de los tres intermedios y ha permitido comprobar que el espectro de estado estacionario de la sonda asociada a la proteína corresponde a un estado que no está completamente relajado.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ The Noble Prize in Chemistry 2008. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/> (acceso septiembre 2020).
- ² Nobel Prize in Chemistry 2014. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/summary/> (acceso septiembre 2020).
- ³ Bacic, L.; Sabantsev, A.; Deindl, S. Recent Advances in Single-Molecule Fluorescence Microscopy Render Structural Biology Dynamic. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, 65(), 61-68, doi:10.1016/j.sbi.2020.05.006.
- ⁴ Zhou, J.; Chizhik, A.I.; Chu, S.; Jin, D. Single-Particle Spectroscopy for Functional Nanomaterials. *Nature* **2020**, 579(7797), 41-50, doi:10.1038/s41586-020-2048-8.
- ⁵ Illumina. Introduction to DNA Sequencing. <https://emea.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing.html> (acceso septiembre 2020).
- ⁶ Dsouza, R.N.; Pischel, U.; Nau, W.M. Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution. *Chem. Rev.* **2011**, 111(12), 7941-7980, doi:10.1021/cr200213s.
- ⁷ Fam, T.K.; Klymchenko, A.S.; Collot, M. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials* **2018**, 11(9), 1768, doi:10.3390/ma11091768.
- ⁸ Klymchenko, A.S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50(2), 366-375, doi:10.1021/acs.accounts.6b00517.
- ⁹ Peacocke, A.R.; Skerrett, J.N. The Interaction of Aminoacridines with Nucleic Acids. *Trans. Faraday Soc.* **1956**, 52, 261-279, doi:10.1039/TF9565200261.
- ¹⁰ Weill, G. Rendement Quantique, Temps de Vie de Fluorescence et Heterogeneité des Sites de Fixation de la Proflavine sur le DNA. *Biopolymers* **1965**, 3(5), 567-572, doi:10.1002/bip.1965.360030507.
- ¹¹ Horobin, R.W.; Stockert, J.C.; Rashid-Doubell, F. Fluorescent Cationic Probes for Nuclei of Living Cells: Why Are They Selective? A Quantitative Structure-Activity Relations Analysis. *Histochem. Cell Biol.* **2006**, 126(2), 165-75, doi:10.1007/s00418-006-0156-7.
- ¹² Georghiou, S. Interaction of Acridine Drugs with DNA and Nucleotides. *Photochem. Photobiol.* **1977**, 26(1), 59-68, doi:10.1111/j.1751-1097.1977.tb07450.x.
- ¹³ Jain, S.S.; Anet, F.A.L.; Sthale, C.J.; Hud, N.V. Enzymatic Behavior by Intercalating Molecules in a Template-Directed Ligation Reaction. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43(15), 2004-2008, doi:10.1002/anie.200353155.

- ¹⁴ Denny, W.A. Chemotherapeutic Effects of Acridine Derivatives. *Medicinal Chemistry Reviews - Online* **2004**, *1*(3), 257-266, doi:10.2174/1567203043401923.
- ¹⁵ Kalyanasundaram, K.; Grätzel, M. Proflavine-Sensitized Photoproduction of H₂, from Water with Electron-Donors and a Colloidal Redox Catalyst. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, (24), 1137-1138, doi:10.1039/C39790001137.
- ¹⁶ Nam, D.H.; Park, C.B. Visible Light-Driven NADH Regeneration Sensitized by Proflavine for Biocatalysis. *ChemBioChem* **2012**, *13*(9), 1278-1282, doi:10.1002/cbic.201200115.
- ¹⁷ Vorst, A.V.; Lion, Y. Electron Transfer in Photosensitization of Biomolecules by Acridine Dyes. *Photochem. Photobiol.* **1975**, *21*(2), 85-89, doi:10.1111/j.1751-1097.1975.tb06633.x.
- ¹⁸ Pileni, M.P.; Graetzel, M. Light-Induced Redox Reactions of Proflavin in Aqueous and Micellar Solution. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*(19), 2402-2406, doi:10.1021/j100456a013.
- ¹⁹ Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2006; pp. 1-7, ISBN: 978-0387-31278-1.
- ²⁰ Albani, JR. *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2007; pp. 88-89, ISBN: 978-1-4051-3891-8.
- ²¹ Valeur, B.; Berberan-Santos, M.N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012; pp. 53-61, ISBN: 978-3-527-32837-6.
- ²² Wardle, B.; *Principles and Applications of Photochemistry*; Wiley: Manchester, UK, 2009; pp. 49-50, ISBN: 978-0-470-01493-6.
- ²³ Valeur, B.; Berberan-Santos, M.N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012; pp. 141-154, ISBN: 978-3-527-32837-6.
- ²⁴ Wardle, B. *Principles and Applications of Photochemistry*; Wiley: Manchester, UK, 2009; pp. 110-111, ISBN: 978-0-470-01493-6.
- ²⁵ Klan, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*; Wiley: Chichester, UK, 2009; pp. 184-190, ISBN: 978-1-405-19088-6.
- ²⁶ De Silva, A.P. Luminescent Photoinduced Electron Transfer (PET) Molecules for Sensing and Logic Operations. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*(22), 2865-2871, doi:10.1021/jz201311p.
- ²⁷ Wu, Y.; Zhu, W. Organic Sensitizers from D- π -A to D-A- π -A: Effect of the Internal Electron-Withdrawing Units on Molecular Absorption, Energy Levels and Photovoltaic Performances. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*(5), 2039-2058, doi:10.1039/c2cs35346f.

- ²⁸ Valeur, B.; Berberan-Santos, M.N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012; pp. 159-162, ISBN: 978-3-527-32837-6.
- ²⁹ Doose, S.; Neuweiler, H.; Sauer, M. Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules. *ChemPhysChem* **2009**, *10*(9-10), 1389-1398, doi:10.1002/cphc.200900238.
- ³⁰ Birks, J.B.; Excimers and Exciplexes. *Nature* **1967**, *214*(5094), 1187-1190, doi:10.1038/2141187a0.
- ³¹ Gordon, M.; Ware, W.R. *The Exciplex*; Academic Press: New York, NY, USA, 1975; pp. 11-13, ISBN: 978-0323-15286-0.
- ³² Kavarnos, G.J. *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*; VCH: New York, 1993; pp. 19-20, ISBN: 978-0471-18730-1.
- ³³ Kumpulainen, T.; Lang, B.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E. Ultrafast Elementary Photochemical Processes of Organic Molecules in Liquid Solution. *Chem. Rev.* **2017**, *117*(16), 10826-10839, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00491.
- ³⁴ Acheson, R.M. *Acridines*, 2nd ed.; Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1973; p. 109, ISBN: 987-0-471-37753-8.
- ³⁵ Ngadi, L.; Galy, A.M.; Galy, J.P.; Barbe, J.; Crémieux, A.; Chevalier, J.; Sharples, D. Some New 1-Nitro Acridine Derivates as Antimicrobial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, *25*(1), 67-70, doi:10.1016/0223-5234(90)90166-Z.
- ³⁶ Martínez, R.; Chacón-García, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. *Curr. Med. Chem.* **2005**; *12*(2), 127-51. doi:10.2174/0929867053363414.
- ³⁷ Acheson, R.M. *Acridines*, 2nd ed.; Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1973; p. 726, ISBN: 987-0-471-37753-8.
- ³⁸ Prieto, S.P.; Powless, A.J.; Boice, J.W.; Sharma, S.G.; Muldoon, T.J. Proflavine Hemisulfate as a Fluorescent Contrast Agent for Point-of-Care Cytology. *PLoS One* **2015**, *10*(5), e0125598, doi:10.1371/journal.pone.0125598.
- ³⁹ Lerman, L.S. Structural Considerations in the Interactions of DNA and Acridines. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*(1), 18-30, doi:10.1016/S0022-2836(61)80004-1.
- ⁴⁰ Li, H.J.; Crothers, D.M. Relaxation Studies of the Proflavine-DNA Complex: The Kinetics of an Intercalation Reaction. *J. Mol. Biol.* **1969**, *39*(3), 461-477, doi:10.1016/0022-2836(69)90138-7.
- ⁴¹ Horowitz, E.D.; Hud, N.V. Ethidium and Proflavine Binding to a 2',5'-Linked RNA Duplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(48), 15380-15381. doi:10.1021/ja065339l.
- ⁴² Sasikala, W.D.; Mukherjee, A. Structure and Dynamics of Proflavine Association around DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*(15), 10383-10391, doi:10.1039/C5CP07789C.

- ⁴³ Nakamoto, K.; Tsuboi, M.; Strahan, G.D. Intercalating drugs. En *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*; Nakamoto, K.; Tsuboi, M.; Strahan, G.D. Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp. 119-208, ISBN: 978-0-471-78626-9.
- ⁴⁴ Obendorf, S.K.; Carrell, H.L.; Glusker, J.P. Proflavine Dichloride Dihydrate (3,6-Diaminoacridine Dihydrochloride Dihydrate). *Acta Cryst.* **1974**, *B30*(6), 1408-1411, doi:10.1107/S0567740874004985.
- ⁴⁵ Qin, Z.; Li, X.; Zhou, M. A Theoretical Study on Hydrogen-Bonded Complex of Proflavine Cation and Water: The Site-dependent Feature of Hydrogen Bond Strengthening and Weakening. *J. Chin. Chem. Soc.* **2014**, *61*(11), 1199-1204, doi:10.1002/JCCS.201400089.
- ⁴⁶ Kim, K.S.; Corongiu, G.; Clementi, E. Networks of Water Molecules in a Proflavine Deoxydinucleoside Phosphate Complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1983**, *1*(1), 263-285, doi:10.1080/07391102.1983.10507439.
- ⁴⁷ Haugen, G.R.; Melhuish, W.H. Association and Self-quenching of Proflavine in Water. *Trans. Faraday Soc.* **1964**, *60*, 386-394, doi:10.1039/TF9646000386.
- ⁴⁸ Melhuish, W.H. Measurement of Quantum Efficiencies of Fluorescence and Phosphorescence and Some Suggested Luminescence Standards. *J. Opt. Soc. Am.* **1964**, *54*(2), 183-186, doi:10.1364/JOSA.54.000183.
- ⁴⁹ Aaron, J.J.; Maafi, N.; Párkányi, C.; Boniface, C. Quantitative Treatment of the Solvent Effects on the Electronic Absorption and Fluorescence Spectra of Acridines and Phenazines. The Ground and First Excited Singlet-State Dipole Moments. *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*(4), 603-615. doi:10.1016/0584-8539(94)00164-7.
- ⁵⁰ Bonaca, A.; Bilalbegovic, G. Optical Spectrum of Proflavine and its Ions. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *493*(1-3), 33-36. doi:10.1016/j.cplett.2010.05.003.
- ⁵¹ Kumar, K.S.; Selvaraju, C.; Malar, E.P.; Natarajan, P. Existence of a New Emitting Singlet State of Proflavine: Femtosecond Dynamics of the Excited State Processes and Quantum Chemical Studies in Different Solvents. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*(1), 37-45. doi:10.1021/jp207495r.
- ⁵² Turner, D.H.; Flynn, G.W.; Lundberg, S.K.; Faller, L.D.; Sutin, N. Dimerization of Proflavin by the Laser Raman Temperature-Jump Method. *Nature* **1972**, *239*(5369), 215-217, doi:10.1038/239215b0.
- ⁵³ Glazer, A.N. Spectral Studies of the Interaction of Alpha-Chymotrypsin and Trypsin with Proflavine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1965**, *54*(1), 171-176, doi:10.1073/pnas.54.1.171.
- ⁵⁴ Mitsuhiro, H.; Teruko, S. Studies of the Aggregation of Dyes. The Scope of Application of the Maximum-Slope Method. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*(8), 2291-2296, doi:10.1246/bcsj.43.2291.

- ⁵⁵ Chambers, R.W.; Kajiwara, T.; Kearns, D.R. Effect of Dimer Formation of the Electronic Absorption and Emission Spectra of Ionic Dyes. Rhodamines and Other Common Dyes. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*(4), 380-387, doi:10.1021/j100597a012.
- ⁵⁶ Ferguson, J.; Mau, A.W.H. Absorption studies of Acid-Base Equilibria of Dye Solutions. *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *17*(4), 543-546, doi:10.1016/0009-2614(72)85101-7.
- ⁵⁷ Albert, A. Acridine Syntheses and Reactions. Part VI.1 A New Dehalogenation of 9-Chloroacridine and its Derivatives. Further Acridine Ionisation Constants and Ultraviolet Spectra. *J. Chem. Soc.* **1965**, (0), 4653-4657, doi:10.1039/JR9650004653.
- ⁵⁸ De Silvestri, S.; S Laporta, S. Time-Resolved and Steady-State Fluorescence Studies of Excited-State Proton-Transfer Reactions of Proflavine. *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *103*(4), 275-280, doi:10.1016/0009-2614(84)80006-8.
- ⁵⁹ Gutsche, C.D.; Levine, J.A. Calixarenes. 6. Synthesis of a Functionalizable Calix[4]arene in a Conformationally Rigid Cone Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*(9), 2652-2653, doi:10.1021/ja00373a060.
- ⁶⁰ Cornforth, J.W.; Hart, P.D.; Nicholls, G.A.; Rees, R.J.; Stock, J.A. Antituberculous Effects of Certain Surface-Active Polyoxyethylene Ethers. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1955**, *10*(1), 73-88, doi:10.1111/j.1476-5381.1955.tb00063.x.
- ⁶¹ McMahon, G.; O'Malley, S.; Nolan, K.; Diamond, D. Important Calixarene Derivates – Their Synthesis and Applications. *Arkivoc* **2003**, *2003*(7), 23-31, doi:10.3998/ARK.5550190.0004.704.
- ⁶² Kim, J.S.; Quang, D.T. Calixarene-Derived Fluorescent Probes. *Chem. Rev.* **2007**, *107*(9), 3780-3799, doi:10.1021/cr068046j.
- ⁶³ Shinkai, S.; Mori, S.; Tsubaki, T.; Sone, T.; Manabe, O.. New Water-Soluble Host Molecules Derived from Calix[6]arene. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*(46), 5315-5318, doi:10.1016/S0040-4039(01)81592-6.
- ⁶⁴ Shinkai, S.; Mori, S.; Tsubaki, T.; Manabe, O. Hexasulfonated Calix[6]arene Derivates: A New Class of Catalysts, Surfactants, and Host Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*(9), 2409-2416, doi:10.1021/ja00269a045.
- ⁶⁵ Shmygleva, L.; Slesarenko, N.; Chernyak, A.; Sanginov, E.; Karelin, A.; Pisareva, A.; Pisarev, R.; Dobrovolsky, Y. Effect of Calixarene Sulfonic Acids Hydration on Their Proton Transport Properties. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2017**, *12*(5), 4056-4076, doi:10.20964/2017.05.47.
- ⁶⁶ Shi, Y.; Schneider, H.J. Interactions between Aminocalixarenes and Nucleotides or Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, *2*(8), 1797-1804, doi:10.1039/A900204I.
- ⁶⁷ Nikura, K.; Anslyn, E.V. Azacalixarene: Synthesis, Conformational Analysis, and Recognition Behavior toward Anions. *J. Chem. Soc.* **1999**, *2*(12), 2769-2775, doi:10.1039/A904607K.

- ⁶⁸ Lynam, C.; Diamond, D. Varying Solvent Polarity to Tune the Enantioselective Quenching of a Calixarene Host. *J. Mater. Chem.* **2004**, *15*(2), 307-314, doi:10.1039/B404553J.
- ⁶⁹ Carter, D.C.; Ho, J.X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153-203, doi:10.1016/S0065-3233(08)60640-3.
- ⁷⁰ Gelamo, E.L.; Tabak, M. Spectroscopic Studies on the Interaction of Bovine (BSA) and Human (HSA) Serum Albumins with Ionic Surfactants. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol Spectrosc.* **2000**, *56*(11), 2255-2271, doi:10.1016/s1386-1425(00)00313-9.
- ⁷¹ Naveenraj, S.; Anadan, S. Binding of Serum Albumins with Bioactive Substances–Nanoparticles to Drugs. *J. Photochem. Photobiol., C* **2013**, *14*(1), 53-71, doi:10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001.
- ⁷² Carter, D.C.; Chang, B.; Ho, J.X.; Keeling, K.; Krishnasami, K. Preliminary Crystallographic Studies of Four Crystal forms of Serum Albumin. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*(3), 1049-1052, doi:10.1111/j.1432-1033.1994.01049.x.
- ⁷³ Brown, J.R.; Shockley, P. En *Lipid-Protein Interactions, vol 1*; Jost, P.C.; Griffith, O.H. Eds.; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 1982; pp. 26-68, ISBN: 978-0471-06457-2.
- ⁷⁴ Belatik, A.; Hotchandani, S.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H.A. Locating the Binding Sites of Pb(II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins. *PLoS One* **2012**, *7*(5), e36723, doi:10.1371/journal.pone.0036723.
- ⁷⁵ Chuang, V.T.; Otagiri, M. Stereoselective Binding of Human Serum Albumin. *Chirality* **2006**, *18*(3), 159-166, doi:10.1002/chir.20237.
- ⁷⁶ Dufour, C.; Dangles, O. Flavonoid-Serum Albumin Complexation: Determination of Binding Constants and Binding Sites by Fluorescence Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1721*(1-3), 164-173, doi:10.1016/j.bbagen.2004.10.013.
- ⁷⁷ Melhuish, W.H. A Standard Fluorescence Spectrum for Calibrating Spectrofluorophotometers. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*(6), 762-764, doi:10.1021/j100835a014.
- ⁷⁸ 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*(5), 630-636, doi:10.1366/0003702011952253.
- ⁷⁹ Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Plenum Press: New York, NY, USA, 1983; ISBN: 978-0306-41285-1.
- ⁸⁰ Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002; pp. 306-307, ISBN: 978-3-3527-29919-5.
- ⁸¹ Pileni, M.P.; Graetzel, M. Zinc Porphyrin Sensitized Reduction of Simple and Functional Quinones in Micellar Systems. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*(14), 1822-1825, doi:10.1021/j100451a016.

- ⁸² Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. On the Base Strength of Some Nitrogen Heterocycles in the Excited State. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, 29(3), 373-379, doi:10.1246/bcsj.29.373.
- ⁸³ Montes-Navajas, P.; García, H. Complexes of Basic Tricyclic Dyes in Their Acid and Basic Forms with Cucurbit[7]uril: Determination of pKa and Association Constants in the Ground and Singlet Excited State. *J. Photochem. Photobiol. A* **2009**, 204(2-3), 97-101, doi:10.1016/j.jphotochem.2009.02.019.
- ⁸⁴ Valeur, B.; Berberan-Santos, M.N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012; pp. 172-173, ISBN: 978-3-527-32837-6.
- ⁸⁵ Shenderovich, I.G. The Partner Does Matter: The Structure of Heteroaggregates of Acridine Orange in Water. *Molecules* **2019**, 24(15), 2816, doi:10.3390/molecules24152816.
- ⁸⁶ Blears, D.J.; Danyluk, S.S. The Aggregation of Acridine Orange in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88(5), 1084-1085, doi:10.1021/ja00957a058.
- ⁸⁷ Antonov, L.; Gergov, G.; Petrov, V.; Kubista, M.; Nygren, J. UV-Vis Spectroscopic and Chemometric Study on the Aggregation of Ionic Dyes in Water. *Talanta* **1999**, 49(1), 99-106, doi:10.1016/S0039-9140(98)00348-8.
- ⁸⁸ Costantino, L.; Guarino, G.; Ortona, O. Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *J. Chem. Eng. Data* **1984**, 29(1), 62-66, doi:10.1021/je00035a021.
- ⁸⁹ Amado, A.M.; Ramos, A.P.; Silva, E.R.; Borissevitch, I.E. Quenching of Acridine Orange Fluorescence by Salts in Aqueous Solutions: Effects of Aggregation and Charge Transfer. *J. Lumin.* **2016**, 178, 288-294, doi:10.1016/j.jlumin.2016.06.006.
- ⁹⁰ Schwarz, G.; Klose, S.; Balthasar, W. Cooperative Binding to Linear Biopolymers. *Eur. J. Biochem.* **1970**, 12(3), 454-460, doi:10.1111/j.1432-1033.1970.tb00872.x.
- ⁹¹ Brignoli, C.A.; DeVoe, H. Least-Squares Computer Analysis of Dye Absorption Spectra. Acridine Orange Dimerization Equilibrium. *J. Phys. Chem.* **1978**, 82(24), 2570-2575, doi:10.1021/j100513a007.
- ⁹² Lamm, M.E.; Neville, D.M.Jr. The Dimer Spectrum of Acridine Orange Hydrochloride. *J. Phys. Chem.* **1965**, 69(11), 3872-3877, doi:10.1021/j100895a039.
- ⁹³ Marcus, Y. *The properties of solvents. Wiley Series in Solution Chemistry: Volume 4*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1998; ISBN: 978-0-471-98369-9.
- ⁹⁴ Valeur, B.; Berberan-Santos, M.N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012; pp. 146-147, ISBN: 978-3-527-32837-6.
- ⁹⁵ Valeur, B.; Berberan-Santos, M.N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012; pp. 68-70, ISBN: 978-3-527-32837-6.

- ⁹⁶ Koch, M.; Letrun, R.; Vauthey, E. Exciplex Formation in Bimolecular Photoinduced Electron-transfer Investigated by Ultrafast Time-Resolved Infrared Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*(10), 4066-4074, doi:10.1021/ja500812u.
- ⁹⁷ Youmans, H.L. Measurement of pH of Distilled Water. *J. Chem. Educ.* **1972**, *49*(6), 429, doi:10.1021/ed049p429.
- ⁹⁸ Armstrong, D.A.; Huie, R.E.; Koppenol, W.H.; Lyman, S.V.; Merényi, G.; Neta, P.; Ruscic, B.; Stanbury, D.M.; Steenken, S.; Wardman, P. Standard Electrode Potentials Involving Radicals in Aqueous Solution: Inorganic Radicals (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*(11-12), 1139-1150, doi:10.1515/pac-2014-0502.
- ⁹⁹ Ghosh, T.; Slanina, T.; König, B. Visible Light Photocatalytic Reduction of Aldehydes by Rh(iii)-H: A Detailed Mechanistic Study. *Chem. Sci.* **2015**, *6*(3), 2027-2034, doi:10.1039/C4SC03709J.
- ¹⁰⁰ Romero, N.A.; Nicewicz, D.A. Organic Photoredox Catalysis. *Chem. Rev.* **2016**, *116*(17), 10075-10166, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00057.
- ¹⁰¹ Rehm, D.; Weller, A. Kinetik und Mechanismus der Elektronübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1969**, *73*(8-9), 834-839, doi:10.1002/bbpc.19690730818.
- ¹⁰² Rosspeintner, A.; Vauthey, E. Bimolecular Photoinduced Electron Transfer Reactions in Liquids Under the Gaze of Ultrafast Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*(47), 25741-25754, doi:10.1039/C4CP03862B.
- ¹⁰³ Kavarnos, G.J.; Turro, N.J. Photosensitization by Reversible Electron Transfer: Theories, Experimental Evidence, and Examples. *Chem. Rev.* **1986**, *86*(2), 401-449, doi:10.1021/cr00072a005.
- ¹⁰⁴ Wardman, P. Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*(4), 1637-1755, doi:10.1063/1.555843.
- ¹⁰⁵ Jha, K.N.; Bolton, G.L.; Freeman, G.R. Solvent Structure Effects and Diffusion Control in the Reaction Between Solvated Electrons and Solvated Protons in Alcohols and Water. *Can. J. Chem.* **1972**, *50*(18), 3073-3075, doi:10.1139/v72-487.
- ¹⁰⁶ Jayaraman, S.; Verkman, A.S. Quenching Mechanism of Quinolinium-Type Chloride-Sensitive Fluorescent Indicators. *Biophys. Chem.* **2000**, *85*(1), 49-57, doi:10.1016/s0301-4622(00)00146-0.
- ¹⁰⁷ Farid, S.; Dinnocenzo, J.P.; Merkel, P.B.; Young, R.H.; Shukla, D.; Guirado, G. Reexamination of the Rehm-Weller Data Set Reveals Electron Transfer Quenching That Follows a Sandros-Boltzmann Dependence on Free Energy. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*(30), 11580-11587, doi:10.1021/ja2024367.
- ¹⁰⁸ Lias, S.G.; Bartmess, J.E.; Liebman, J.F.; Holmes, J.L.; Levin, R.D.; Mallard, W.G. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69* [Online]; Linstrom, P.J.; Mallard, M.G. Ed.; National Institute of Standards and Technology:

- Gaithersburg, MD, USA, 2018; p.20899. <https://webbook.nist.gov/chemistry/> (acceso agosto, 2020).
- ¹⁰⁹ Elliot, A.J.; McCracken, D.R.; Buxton, G.V.; Wood, N.D. Estimation of Rate Constants for Near-Diffusion-Controlled Reactions in Water at High Temperatures. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1990**, *86*(9), 1539-1547, doi:10.1039/FT9908601539.
- ¹¹⁰ Millich, F.; Oster, G. Photoreduction of Acridine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*(6), 1357-1363, doi:10.1021/ja01515a023.
- ¹¹¹ Pedzinski, T.; Marciniak, B.; Hug, G.L. Quenching of the Excited Singlet State of Acridine and 10-Methylacridinium Cation by Thio-Organic Compounds in Aqueous Solution. *J. Photochem. Photobiol. A* **2002**, *150*(1-3), 21-30, doi:10.1016/S1010-6030(02)00028-X.
- ¹¹² Chuang, T.J.; Eisenthal, K.B. Studies of Excited State Charge-Transfer Interactions with Picosecond Laser Pulses. *J. Chem. Phys.* **1975**, *62*(6), 2213, doi:10.1063/1.430743.
- ¹¹³ Bordwell, F.G.; Algrim, D.J.; Harrelson, J.A. The Relative Ease of Removing a Proton, a Hydrogen Atom, or an Electron from Carboxamides versus Thiocarboxamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*(17), 5903-5904, doi:10.1021/ja00225a054.
- ¹¹⁴ Pereira, R.V.; Gehlen, M.H. Fluorescence of Acridinic Dyes in Anionic Surfactant Solution. *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, *61*(13-14), 2926-2936, doi:10.1016/j.saa.2004.11.009.
- ¹¹⁵ Jadhav, A.; Kalyani, V.S.; Barooah, N.; Malkhede, D.D.; Mohanty, J. Molecular-Recognition-Assisted pKa Shifts and Metal-Ion-Induced Fluorescence Regeneration in p-Sulfonatocalix[6]arene-encapsulated Acridine. *ChemPhysChem* **2015**, *16*(2), 420-427, doi:10.1002/cphc.201402591.
- ¹¹⁶ Guo, D.S.; Uzunova, V.D.; Su, X.; Liu, Y.; Nau, W.M. Operational Calixarene-Based Fluorescent Sensing Systems for Choline and Acetylcholine and Their Application to Enzymatic Reactions. *Chem. Sci.* **2011**, *2*(9), 1722-1734, doi:10.1039/c1sc00231g.
- ¹¹⁷ Sayed, M.; Shinde, K.; Shah, R.; Pal, H. pH-Responsive Indicator Displacement Assay of Acetylcholine Based on Acridine-p-Sulfonatocalix[4]arene Supramolecular System: Fluorescence Off/On Switching and Reversible pKa Shift. *ChemistrySelect* **2016**, *1*(5), 989-999, doi:10.1002/slct.201600226.
- ¹¹⁸ Zhou, Y.; Lu, Q.; Liu, C.; She, S.; Wang, L. Study on the Inclusion Behavior of p-Sulphonatocalix[4]arene with 9-Amino-acridine by Spectrofluorometric Titrations. *Spectrochim. Acta, Part A* **2006**, *63*(2), 423-426, doi:10.1016/j.saa.2005.04.056.
- ¹¹⁹ Chakraborty, B.; Basu, S. Interaction of BSA with Proflavin: A Spectroscopic Approach. *J. Lumin.* **2009**, *129*(1), 34-39, doi:10.1016/j.jlumin.2008.07.012.
- ¹²⁰ Gökoğlu, E.; Kıpçak, F.; Seferoğlu, Z. Studies on the Interactions of 3,6-Diaminoacridine Derivatives with Human Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy. *J. Lumin.* **2014**, *29*(7), 872-877, doi:10.1002/bio.2635.

¹²¹ Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2006; p. 250, ISBN: 978-0387-31278-1.







En esta tesis se caracteriza la sonda fluorescente proflavina (PF) mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y fluorescencia. La PF excitada es desactivada por aniones inorgánicos a través de un excíplejo de menor rendimiento cuántico, con carácter de transferencia de carga. Las tioureas también actúan como desactivadores por transferencia electrónica, tras el encuentro de la tiourea con la PF excitada, y por la formación de un complejo no emisor en estado fundamental. Se ha analizado asimismo la interacción de la PF con los macrociclos 4-sulfocalix[6]areno y 4-sulfocalix[4]areno, así como con la proteína seroalbúmina bovina, determinándose los espectros y constantes de equilibrio de los complejos formados en estado fundamental.