



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Facultad de Farmacia  
Departamento de Química Física**

***Desarrollo de Modelos Cinéticos en dos y tres  
Estados Excitados, Aplicables al Intercambio  
Protónico en Disolución Acuosa de 2',7'-  
difluorofluoresceína y su Resolución Mediante  
Análisis Global Compartmental***

**TESIS DOCTORAL**

**Ángel Orte Gutiérrez**

**Granada, 2004**



***Desarrollo de Modelos Cinéticos en dos y tres  
Estados Excitados, Aplicables al Intercambio  
Protónico en disolución Acuosa de 2',7'-  
difluorofluoresceína y su Resolución Mediante  
Análisis Global Compartimental***

*Los Directores,*

*Fdo. Dr. J.M. Álvarez Pez  
(Catedrático Univ. Granada)*

*Fdo. Dr. E. M. Talavera Rodríguez  
(Profesora Titular Univ. Granada)*

*Tesis Doctoral presentada para aspirar al grado de  
Doctor por la Universidad de Granada*

*Fdo. Ángel Orte Gutiérrez  
Granada, 2004*



El Director del Departamento certifica que el Departamento de Química Física de la Universidad de Granada ha dado su conformidad para la presentación de la presente Tesis Doctoral.

Director Dpto. Química Física  
Universidad de Granada

Fdo. Dr. D. Pedro Luis Mateo Alarcón



*La gratitud es ese sentimiento que nos obliga a estimar el favor recibido y a corresponder a él de alguna manera. La única forma de expresarla, en estos momentos finales de una etapa, es por escrito, dejando constancia en este trabajo de mi más sincero agradecimiento a todos los que me han ayudado y acompañado a lo largo de estos años.*

*En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, José María Álvarez y Eva María Talavera, por haberme introducido en el apasionante y duro campo de la fotoquímica, enseñándome y ayudándome cada día, y sobre todo, por haberme inculcado sus ganas de avanzar (“cuanto más sabes, más te das cuenta de todo lo que no sabes”).*

*A todos los miembros del Departamento, que de algún modo, han colaborado en este trabajo, al menos haciéndolo cordial, amigable y en ocasiones divertido. A Luis, Mónica, Raquel, Ilu, Carmen y María del Señor. En especial, a Carlos por apoyarme en todo momento, y aguantar (aunque sea bajita) la música en el despacho. A Serafín e Indalecio, por ayudar con el papeleo y en el laboratorio.*

*También me gustaría agradecer la cordialidad y hospitalidad de los Profesores António L. Maçanita y Noël Boens, haciendo posible las estancias en Oeiras y Leuven, poniendo a mi disposición todo su tiempo y su atención. Gracias también a todos los que allí encontré.*

*Por supuesto, a Paco, Puri, Jesús, Chus, Mar y Ros, por soportarme después del laboratorio. A Luis Camacho, María Teresa Martín y Marta Pérez, porque ellos me empezaron a descubrir la investigación. A Marta, Fran, Rafa y Marisa, por todos los momentos de ciencia.*

*Mi agradecimiento también para mis padres y hermanos, por haberme hecho como soy, formándome como persona, y suponer para mí, un constante ejemplo.*

*Finalmente, sería imposible expresar con palabras todo lo que le tendría que agradecer a María José, así que, por todo.*



A mis padres y hermanos.

A Maria José, porque no  
habría sido posible sin ella



---

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I.1.- JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b> .....	3
<b>I.2.- DERIVADOS DE LA FLUORESCÉINA. OREGON GREEN 488 Y OTROS DERIVADOS FLUORADOS</b> .....	7
I.2.1.- <u>Usos de la fluoresceína</u> .....	7
I.2.2.- <u>Limitaciones de la fluoresceína</u> .....	9
I.2.3.- <u>Derivados de la fluoresceína</u> .....	15
I.2.3.1.- <i>Derivados fluorados de la fluoresceína</i> .....	21
I.2.4.- <u>2',7'-difluorofluoresceína (Oregon Green 488)</u> .....	31
I.2.4.1.- <i>Características fundamentales</i> .....	31
I.2.4.2.- <i>Aplicaciones</i> .....	35
<b>I.3.- ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL: CONTAJE DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN EL TIEMPO</b> .....	44
I.3.1.- <u>Fundamentos de la técnica TCSPC</u> .....	44
I.3.2.- <u>Fuentes de luz para la técnica TCSPC</u> .....	47
I.3.2.1.- <i>Lámparas de flash</i> .....	48
I.3.2.2.- <i>Radiación de sincrotrón</i> .....	50
I.3.2.3.- <i>Láseres de colorantes de picosegundos</i> .....	50
I.3.2.4.- <i>Láseres de Titanio:Zafiro (Ti:Sa) de femtosegundos</i> .....	51
I.3.3.- <u>Detectores para instrumentos de TCSPC</u> .....	53
I.3.3.1.- <i>Fototubos de díodos en cadena</i> .....	54
I.3.3.2.- <i>Fototubos multiplicadores de platos de microcanales</i> .....	54
I.3.3.3.- <i>Fotodiodos</i> .....	55
I.3.4.- <u>Integral de convolución. Análisis de los decaimientos</u> .....	55

<b>I.4.- REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN EL ESTADO EXCITADO (ESPT)</b> .....	59
I.4.1.- <u>Antecedentes históricos sobre ESPT</u> .....	59
I.4.2.- <u>Reacciones ESPT en presencia de un aceptor/dador protónico</u> .....	73
I.4.3.- <u>Reacciones ESPT de la fluoresceína</u> .....	81
<b>I.5.- MÉTODOS DE ANÁLISIS</b> .....	87
I.5.1.- <u>Análisis no lineal por mínimos cuadrados (NLLS)</u> .....	87
I.5.1.1.- <i>Requerimientos para un análisis NLLS</i> .....	88
I.5.1.2.- <i>Mínimos cuadrados</i> .....	88
I.5.1.3.- <i>Estimación de la bondad del ajuste</i> .....	89
I.5.1.4.- <i>Análisis global</i> .....	91
I.5.2.- <u>Análisis global compartimental</u> .....	93
I.5.2.1.- <i>Definición de compartimento. Análisis compartimental</i> .....	93
I.5.2.2.- <i>Análisis compartimental en fotofísica</i> .....	97
I.5.2.3.- <i>Teoría de análisis global compartimental para procesos en el estado excitado</i> .....	102
I.5.3.- <u>Comparación entre el análisis global y el análisis global compartimental</u> .....	108
I.5.4.- <u>Análisis de componentes principales (PCA)</u> .....	115
<b>II.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	119
<b>II.1.- INSTRUMENTACIÓN</b> .....	121
II.1.1.- <u>pH-metro</u> .....	121
II.1.2.- <u>Sonicador</u> .....	121
II.1.3.- <u>Balanza</u> .....	121
II.1.4.- <u>Espectrofotómetro</u> .....	121
II.1.5.- <u>Espectrofluorímetro de estado estacionario</u> .....	122

II.1.6.- <u>Fluorímetro con resolución temporal y excitación láser</u>	123
II.1.6.1.- <i>Fuente de excitación láser</i> .....	123
II.1.6.2.- <i>Sistema TCSPC</i> .....	125
II.1.7.- <u>Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear</u> .....	127
II.2.- <b>REACTIVOS</b> .....	128
II.3.- <b>METODOLOGÍA</b> .....	129
II.3.1.- <u>Preparación de las disoluciones</u> .....	129
II.3.2.- <u>Procedimientos experimentales</u> .....	130
II.3.2.1.- <i>Medidas de absorción</i> .....	130
II.3.2.2.- <i>Medidas de fluorescencia en estado estacionario</i> .....	131
II.3.2.3.- <i>Fluorescencia resuelta en el tiempo</i> .....	131
II.3.2.4.- <i>Espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN</i> .....	132
II.3.3.- <u>Tratamiento de datos y métodos de análisis</u> .....	133
II.3.4.- <u>Modelos compartimentales</u> .....	133
II.3.4.1.- <i>Sistema bicompartimental de la reacción ESPT favorecida por las especies de un aceptor/dador protónico</i> .....	134
II.3.4.2.- <i>Sistema tricompartmental aplicado a reacciones ESPT consecutivas</i> .....	140
<b>III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	149
III.1.- <b>CARACTERÍSTICAS DE ABSORCIÓN Y EQUILIBRIOS ÁCIDO–BASE DEL OREGON GREEN 488</b> .....	151
III.1.1.- <u>Obtención de constantes ácido–base y de espectros de absorción de las especies prototrópicas en disolución acuosa</u> .....	151
III.1.1.1.- <i>Procedimiento 1: Ajustes por mínimos cuadrados</i> .....	153
III.1.1.1.1.- <i>Determinación de <math>\epsilon_D</math></i> .....	153

III.1.1.1.2.- Determinación de $\varepsilon_C$ .....	156
III.1.1.1.3.- Ajuste global de la superficie $A$ vs $\lambda$ vs pH. Obtención de los primeros valores de $pK_a$ .....	159
III.1.1.1.4.- Obtención de los perfiles espectrales y estimación definitiva de los $pK_a$ ...	163
III.1.1.2.- <i>Procedimiento 2: Análisis de componentes principales</i> .....	168
III.1.2.- <u>Consideraciones adicionales</u> .....	170
III.1.2.1.- <i>Comparación de procedimientos</i> .....	170
III.1.2.2.- <i>Especie neutra</i> .....	173
III.1.2.2.1.- Espectros de $^1\text{H}$ -RMN .....	178
III.1.2.3.- <i>Equilibrios ácido–base del OG488</i> .....	184
III.1.2.4.- <i>Influencia de la fuerza iónica</i> .....	185
III.1.2.5.- <i>Ausencia de complejación con las especies del tampón <math>\text{HAc}/\text{Ac}^-</math></i> .....	186
<b>III.2.- ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN ESTADO EXCITADO DEL OG488 MEDIANTE FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO</b> .....	188
III.2.1.- <u>Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario</u> .....	188
III.2.2.- <u>Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia frente al pH</u> .....	194
III.2.3.- <u>Influencia de un dador/aceptor protónico en la intensidad de fluorescencia del sistema monoanión/dianión</u> .....	206
III.2.3.1.- <i>Cálculo del <math>pK_a^*</math> de la reacción monoanión / dianión, mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico</i> .....	210

---

<b>III.3.- SISTEMA BICOMPARTIMENTAL <math>M^* \rightleftharpoons D^*</math> EN PRESENCIA DE <math>HAc/Ac^-</math> COMO ACEPTOR/DADOR PROTÓNICO. FLUORIMETRÍA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL</b> .....	218
III.3.1.- <u>Identificabilidad del sistema compartimental</u> .....	219
III.3.2.- <u>Análisis global biexponencial del sistema en ausencia de <math>HAc/Ac^-</math></u> .....	227
III.3.3.- <u>Análisis global compartimental del sistema <math>M^* \rightleftharpoons D^*</math> en presencia de <math>HAc/Ac^-</math> de concentración 1 M</u> .....	233
III.3.3.1.- <i>Superficie de decaimientos de fluorescencia</i> .....	233
III.3.3.2.- <i>Análisis global multiexponencial</i> .....	234
III.3.3.3.- <i>Análisis global bicompartmental</i> .....	240
III.3.4.- <u>Análisis global compartimental del sistema <math>M^* \rightleftharpoons D^*</math>. Superficie de decaimientos de fluorescencia en presencia y ausencia de tampón</u> .....	250
<b>III.4.- SISTEMA TRICOMPARTIMENTAL <math>C^* \rightleftharpoons N^* \rightleftharpoons M^*</math></b> .....	265
III.4.1.- <u>Consideraciones previas</u> .....	265
III.4.2.- <u>Análisis globales</u> .....	266
III.4.3.- <u>Análisis global tricompartmental</u> .....	273
III.4.3.1.- <i>Estudio de la identificabilidad del sistema tricompartmental</i> .....	283
<b>IV.- CONCLUSIONES</b> .....	291
<b>V.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	297



# ***I. INTRODUCCIÓN***

---

---





## I.1.- JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

En el campo de la fotofísica, el análisis de los procesos que suceden durante el estado excitado de moléculas, tras la absorción de radiación, supone un área de amplio interés. Aunque los primeros estudios se realizaron en los años 50 y 60, fue en la década de los 70, mediante la aplicación de la técnica de resolución temporal de la fluorescencia, cuando se resolvieron los parámetros cinéticos involucrados en las reacciones. Posteriormente, la introducción de nuevas técnicas con resolución temporal cada vez más potentes, que emplean excitación por láseres con pulsos en el orden del picosegundo y femtosegundo, junto a los avances realizados sobre los métodos matemáticos de ajuste, ha permitido la resolución de determinados procesos en el estado excitado, entre los que se incluyen cinéticas extremadamente rápidas, o aquellas en las que intervienen reactantes con espectros de excitación o de emisión solapados.

Nuestro grupo de investigación, ha venido desarrollando durante años diversas metodologías aplicables al análisis biológico, empleando uno de los fluoróforos más comunes, la fluoresceína (*Yguerabide et al., 1996; Álvarez-Pez et al., 1997; Talavera et al., 1997, 2000, 2003*). A lo largo de estas investigaciones y en determinadas circunstancias, en la emisión de la fluoresceína se observaron cinéticas complejas que indicaban la formación en el estado excitado de la especie dianiónica, que es la que más fluoresce, a partir de otras formas iónicas con menor eficiencia de emisión.

Dado que, 1) la fluoresceína es uno de los fluoróforos más utilizados; 2) que presentaba evidencia de una transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) entre las especies monoaniónica y dianiónica cuando está presente un aceptor/dador protónico adecuado; 3) que en la mayoría de los sistemas en donde se ha generalizado su uso existen potenciales aceptores/dadores protónicos (medios con presencia de un tampón, residuos de aminoácidos, etc.) y 4) que la bibliografía consultada era muy ambigua sobre tal posibilidad y la

mayoría de autores suponían, de forma gratuita, que no se producían estas reacciones de transferencia protónica en el estado excitado; hace algunos años nos planteamos el estudio de las mencionadas reacciones entre las diversas formas protonadas de la fluoresceína en disolución acuosa. Así, nuestro grupo de investigación se introducía en esta rama de la fotofísica que trata los procesos primarios en el estado excitado.

En las investigaciones efectuadas, se encontró que la ESPT entre el monoanión y el dianión de la fluoresceína era promovida por la presencia de tampón de fosfatos, que no perturba el estado fundamental, pero provoca la reacción de transferencia durante el tiempo de vida del estado excitado. La presencia de tal reacción se demostró usando metodologías de fluorescencia en estado estacionario (*Yguerabide et al., 1994*) y con resolución temporal (*Álvarez-Pez et al., 2001*), planteando y resolviendo un modelo cinético en dos estados excitados. Con objeto de comprobar si estos procesos pueden también tener lugar cuando la fluoresceína es utilizada como etiqueta fluorescente de proteínas, se utilizaron como aceptores/dadores protónicos sustancias que mimetizasen ciertos residuos de aminoácidos. En este sentido, se ha comprobado la existencia de la ESPT en presencia de ácido N-acetilaspártico (*Crovetto et al., 2004*).

De otra parte, la extensa utilización de las técnicas fluorescentes en el análisis químico y biológico, hace que, prácticamente cada año, aparezcan nuevos y mejorados fluoróforos, usualmente basados en los colorantes tradicionales. En este sentido, la 2',7'-difluorofluoresceína (Oregon Green 488) se ha destacado como uno de los más utilizados. Sus principales características espectrales son prácticamente coincidentes con las de la fluoresceína (*Sun et al., 1997*), mientras que, entre sus ventajas, destaca una mayor resistencia al fotoblanqueamiento (*Sun et al., 1997; Haugland, 2002*). Sin embargo, la información básica sobre el fluoróforo es hasta ahora escasa, y no existen en la

bibliografía datos concretos sobre la mayoría de sus características fundamentales.

Sobre la base de los motivos expuestos, la presente Memoria se plantea con los siguientes objetivos concretos. Por una parte, se pretende aportar información cuantitativa fundamental que resulte de utilidad en el empleo del Oregon Green 488 (OG488) como etiqueta fluorescente de biomoléculas. En efecto, hasta ahora no se conoce si entre las distintas especies iónicas del OG488 en disolución acuosa y bajo determinadas condiciones experimentales, se establece alguna reacción de intercambio protónico en el estado excitado, ni los valores de los  $pK_a^*$  de los diferentes equilibrios posibles. Adicionalmente, aunque una de las destacadas ventajas de este nuevo colorante es que el  $pK_a$  en el estado fundamental del equilibrio monoanión – dianión está relativamente alejado de la neutralidad ( $pK_a = 4.8$  en *Sun et al., 1997*), es conocido que en muchas biomoléculas, el pH del microambiente que rodea a un fluoróforo puede diferir considerablemente del de la disolución en donde se encuentra la biomolécula etiquetada, lo que implica la necesidad de conocer si entre estas dos especies, que son las más relevantes en la medida analítica de su fluorescencia, se establece alguna reacción de intercambio protónico en el estado excitado, bajo determinadas condiciones experimentales.

Por otra parte, el OG488 es un colorante muy adecuado para extender el modelo cinético en dos estados excitados, hasta ahora resuelto con fluoresceína, a un modelo en tres estados excitados, debido a que los valores conocidos de las constantes de los equilibrios en el estado fundamental entre las diferentes especies prototrópicas, son bastante cercanos entre sí. Por este motivo, a determinados valores de pH, se pueden encontrar en el estado fundamental, tres diferentes especies protonadas en equilibrio que pueden excitarse simultáneamente para analizar sus posibles equilibrios en el estado excitado. Dado que los estudios previos que hemos realizado, revelan la posibilidad de que existan dos equilibrios bien diferenciados, uno que se alcanza de forma

espontánea sin mediación de ningún aceptor/dador protónico y otro que necesita un mediador adecuado y que, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no hay ningún estudio hasta la fecha sobre sistemas en tres estados excitados con esta peculiaridad, hemos planteado la resolución teórico-práctica de tal sistema empleando el OG488.

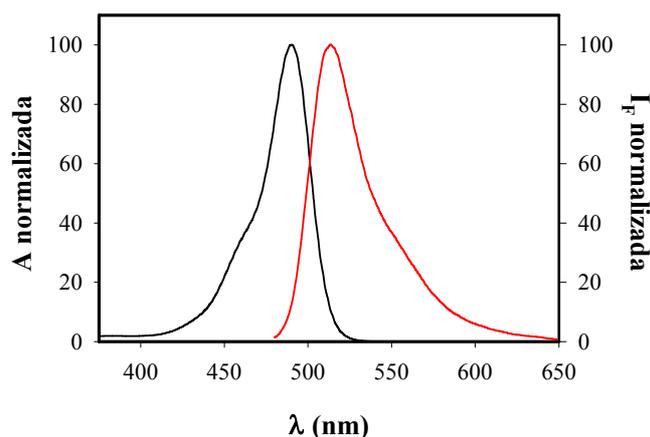
Finalmente, y como objetivo derivado del anterior, se pretende aplicar la poderosa herramienta del análisis global compartimental al sistema previamente citado, planteando las ecuaciones derivadas del modelo teórico y resolviendo los parámetros cinéticos y espectrales correspondientes, mediante la adaptación de esta novedosa metodología y su aplicación, en una forma y a un tipo de sistema, que nunca hasta ahora había sido estudiado.

Así, el objetivo final de esta Memoria es servir como base para una interpretación más correcta de la señal fluorescente en muchas de las aplicaciones en las que la 2',7'-difluorofluoresceína se presenta como una importante alternativa al uso de otros colorantes, así como establecer el mejor método teórico-práctico para resolver sistemas en tres estados excitados con dos equilibrios diferenciados, que se caracterizan por establecerse en diferentes condiciones experimentales.

## I.2.- DERIVADOS DE LA FLUORESCÉINA. OREGON GREEN 488 Y OTROS DERIVADOS FLUORADOS.

### I.2.1.- Usos de la fluoresceína.

Los oxixantenos (fluoresceína y sus derivados) son ampliamente utilizados como fluoróforos, en láseres de colorantes y como reactivos analíticos (*Ebato et al., 1994; Zeng et al., 1994*). La fluoresceína es probablemente la sonda fluorescente más usada hoy día. Posee una gran absortividad molar, excelente rendimiento cuántico y buena solubilidad en agua; su máximo de absorción (494 nm) (figura I-1) está cercano a la línea del láser de argón (488 nm), haciendo que sea un fluoróforo muy importante en microscopía confocal con barrido láser (*Miller et al., 1994; Wells y Johnson, 1994*) y que tenga aplicaciones en citometría de flujo. Es además muy empleada en el etiquetado de macromoléculas y aminoácidos, a través de ciertos derivados como isotiocianato o éster succinimídico. Las macromoléculas así etiquetadas se pueden detectar con una gran sensibilidad utilizando técnicas como la electroforesis (*Smith et al., 1986; Abler et al., 1997; Chen y Chrambach, 1997; Cheng y Dovivhi, 1998*). El solapamiento espectral con otros fluoróforos, como el bromuro de etidio o la tetrametil-rodamina, permite utilizarla en procesos que implican transferencia resonante de energía, por ejemplo para medir distancias entre macromoléculas marcadas o en el interior de éstas (*Murchie et al., 1989*), o en la detección de interacciones entre macromoléculas, como puede ser en estudios sobre hibridación de ADN (*Talavera et al., 1997, 2000, 2003*). Adicionalmente, la posibilidad de prepararla con un alto grado de pureza, hace que se emplee como fluoróforo de referencia, caracterizándose por un máximo de absorción aproximado en 490 nm, máximo de emisión en 514 nm y un rendimiento cuántico a 22°C de 0.94, en disolución acuosa 0.1 M en NaOH (*Haugland, 2002*).



**Figura I-1:** Espectros normalizados de absorción (—) y emisión (—) de la fluoresceína a pH 9 (Haugland, 2002).

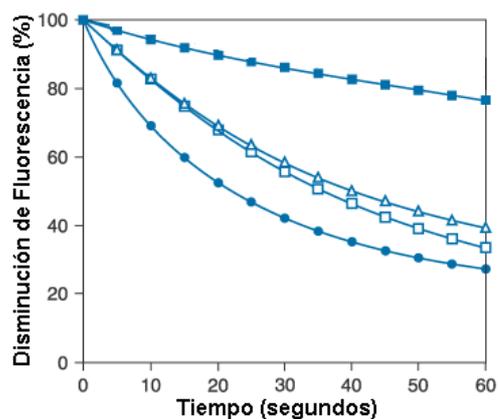
Es, por tanto, en las áreas de bioquímica (Azadnia *et al.*, 1994; Pavelavrancic *et al.*, 1994; Nag *et al.*, 1997; Fixler *et al.*, 2003) y genética (Lorite *et al.*, 1997; Dreider *et al.*, 2002) donde mayor uso se hace de este fluoróforo, aunque también es destacable su utilización en química analítica (Miralles *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002). A continuación, y simplemente por ejemplos de su extendido uso, se citarán algunos muy diferentes campos de la ciencia donde la fluoresceína está siendo empleada: conversión de energía solar (Chan y Bolton, 1980), biología (Yu *et al.*, 2002), reacciones de fotosensibilización (Gollnick y Schenck, 1964; Grossweiner, 1970; Usui y Enokido, 1973), veterinaria (Somanath y Gandhi, 2002), contador cuántico (Demas y Crosby, 1971), microscópica confocal (Miller *et al.*, 1994), citometría de flujo (Cover *et al.*, 1994; Kasaian *et al.*, 1994; Gratama *et al.*, 1997), determinación de aminoácidos (Nouadje *et al.*, 1997; Basañez *et al.*, 2002), estudios en proteínas (Slentz *et al.*, 2003), cuantificación de DNA (Singer *et al.*, 1997; Wittwer *et al.*, 1997), hibridación de DNA (Talavera *et al.*, 1997, 2000, 2003), DNA triple hélice (Ellouze *et al.*, 1997), detección de radicales (Makrigiorgos *et al.*, 1997; Bulteau *et al.*, 2002), microbiología (Jacobs *et al.*, 1997), parasitología (Reyes-López *et al.*, 2001; Seabra *et al.*, 2002), diversas

áreas relacionadas con la farmacia (*Lang et al., 1997; Chiu et al., 2003; Eaimtrakan et al., 2003; Squires et al., 2003*), radioterapia (*Berson et al., 1996*), oftalmología (*Shaikh et al., 2003*), ingeniería (*George y Ponta, 2002; Sharma et al., 2003*), estudios marinos y relacionados con el agua (*Houghtan, 2002; Huang et al., 2002*), neurología (*Li et al., 2002; Sriram et al., 2002*) e investigación médica (*Daxecker et al., 2002; Inoue et al., 2002*). También destaca el uso de la fluoresceína en investigación sobre temas de actualidad como la diabetes (*Torchinsky et al., 1997*), alcoholismo (*Ohki et al., 1996*), cáncer (*Washbrook y Riley, 1997; Goudier et al., 2002*), medio ambiente (*Regel et al., 2002; Tutundjian et al., 2002*), toxicología (*Schmitt et al., 2002; Turton et al., 2002*), agricultura (*Fontaniella et al., 2002*), pesticidas (*Prater et al., 2002*), etc.

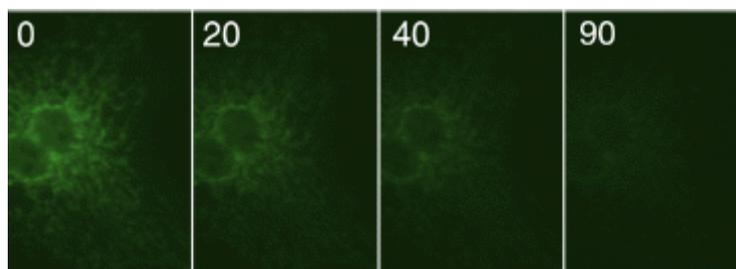
#### I.2.2.- Limitaciones de la fluoresceína.

Desafortunadamente, la fluoresceína y sus conjugados en macromoléculas tienen una serie de serios inconvenientes, como son:

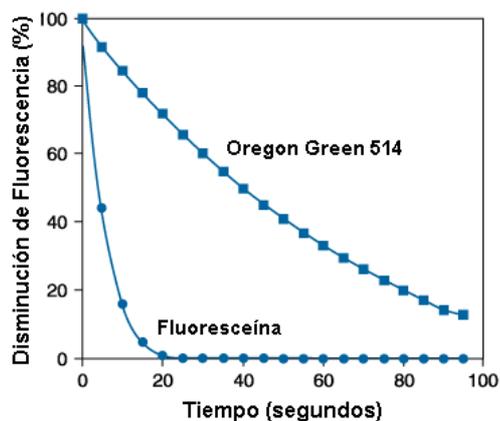
↳ Una velocidad de fotoblanqueamiento relativamente alta (*Song et al., 1995, 1996*). En las figuras I-2 – I-7 se muestran algunos ejemplos de este efecto sobre la fluoresceína y derivados.



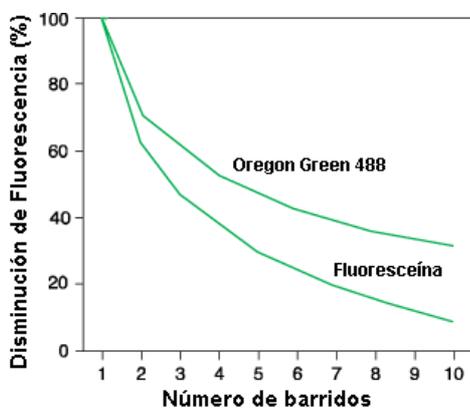
**Figura I-2:** Comparación de la fotoestabilidad de diferentes fluoróforos conjugados con anticuerpos. Oregon Green 514 (■), BODIPY FL (▲), Oregon Green 488 (□) y fluoresceína (●) (Haugland, 2002).



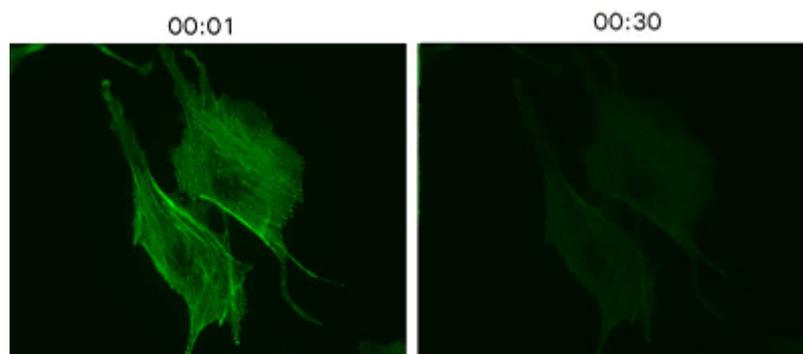
**Figura I-3:** Anticuerpos etiquetados con fluoresceína, observados mediante microscopía confocal. Las sucesivas imágenes se tomaron a los 0, 20, 40 y 90 segundos desde el comienzo de la iluminación de la muestra. Se observa la rápida pérdida de intensidad de fluorescencia (Haugland, 2002).



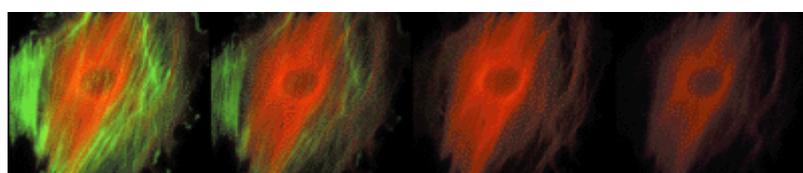
**Figura I-4:** Intensidad de fluorescencia en faloidinas etiquetadas con fluoresceína (●) y Oregon Green 514 (■) (Haugland, 2002).



**Figura I-5:** Resistencia al fotoblanqueamiento de fluoresceína y su derivado bifluorado, Oregon Green 488, determinada mediante citometría de flujo con barrido láser (Haugland, 2002).



**Figura I-6:** Células del endotelio de arteria pulmonar bovina etiquetadas con fluoresceína-faloidina. Las imágenes están recogidas en el primer segundo y a los treinta segundos desde el comienzo de la iluminación de la muestra (Haugland, 2002).



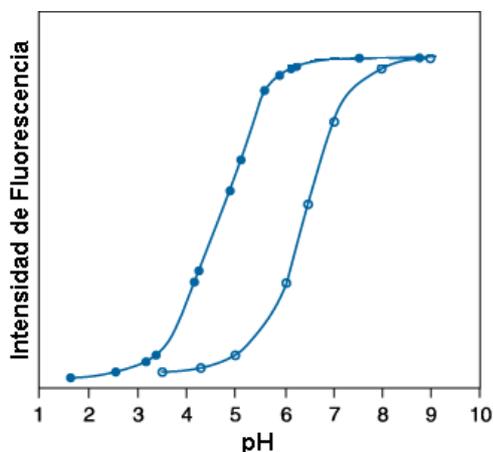
**Figura I-7:** Citoesqueleto de células endoteliales de arteria pulmonar bovina etiquetado con fluoresceína-faloidina (fluorescencia verde) y el fluoróforo comercial Cy3 (fluorescencia roja). Las imágenes se recogieron en intervalos de 30 segundos tras el inicio de la exposición (Haugland, 2002).

↳ Otro de los problemas que puede presentar la fluoresceína es que posee una dependencia con el pH de la fluorescencia bastante notable (Yguerabide, 1994; Sjöback *et al.*, 1995). La intensidad de fluorescencia se reduce significativamente por debajo de pH 7 (figura I-8), debido al  $pK_a$  y a los diferentes rendimientos cuánticos de las especies prototrópicas.

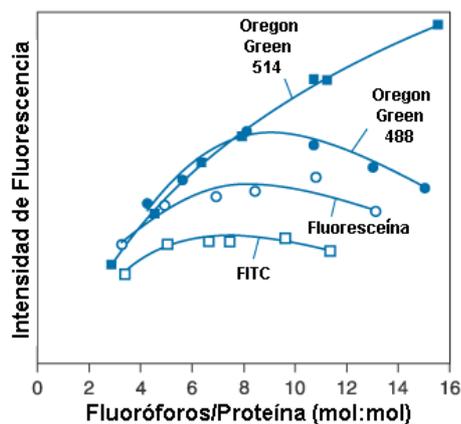
↳ Un espectro de emisión de fluorescencia relativamente ancho, limitando su aplicación en microscopía confocal multicolor.

↳ La fluorescencia de la fluoresceína (y otros muchos fluoróforos) se ve reducida alrededor de un 50% con la conjugación a biopolímeros. Además, mayores grados de sustitución en la macromolécula no mejoran la

fluorescencia, sino que produce un mayor *quenching* (Zuk *et al.*, 1979; Chen y Knutson, 1988; Chapple *et al.*, 1990; Talavera *et al.*, 1997) (figura I-9).



**Figura I-8:** Comparación de la dependencia de la fluorescencia con el pH de los fluoróforos Oregon Green 488 (●) y carboxifluoresceína (○). Las intensidades de fluorescencia se midieron a las mismas concentraciones de las dos moléculas con excitación a 490 nm y emisión a 520 nm (Haugland, 2002).

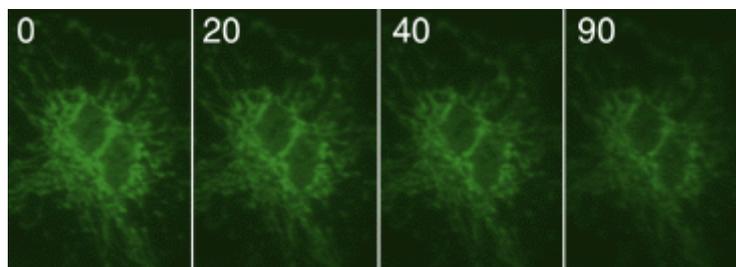


**Figura I-9:** Fluorescencia relativa en función del número de fluoróforos unidos por proteína, empleando ésteres succinimídicos de los ácidos carboxílicos del Oregon Green 514 (■), Oregon Green 488 (●), fluoresceína (○) e isotiocianato de fluoresceína (FITC, □) (Haugland, 2002).

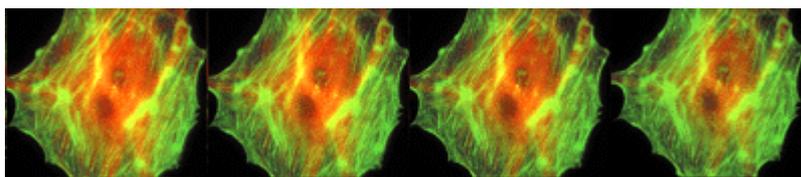
El fotoblanqueamiento y la dependencia de la fluorescencia con el pH hacen que las medidas cuantitativas sean problemáticas. Además, la alta

velocidad de fotoblanqueamiento limita la sensibilidad de los análisis, por ejemplo en secuenciación de ADN e hibridación *in situ* de ADN en medios homogéneos (Talavera *et al.*, 2000), etc. Estas limitaciones han sido un factor importante que motiva el actual desarrollo de fluoróforos alternativos. Sin embargo, la disponibilidad de múltiples dispositivos optimizados para la detección de la fluorescencia de la fluoresceína, como filtros ópticos y la proximidad entre el máximo de absorción de la fluoresceína con la línea espectral de 488 nm del láser de ión de argón, hacen que los sustitutos de ésta se busquen con características espectrales similares a ella.

No existen actualmente fluoróforos que resuelvan completamente el problema de fotoblanqueamiento de la fluoresceína, aunque se han realizado progresos importantes. En moléculas comerciales como la 2',7'-difluorofluoresceína (Oregon Green 488), carboxirodamina 110 o Alexa Fluor 488, las características espectrales y rendimientos cuánticos se asemejan en gran medida a los de la fluoresceína, mejorándose su fotoestabilidad (figuras I-10 y I-11) y la dependencia de la fluorescencia con el pH en la zona fisiológica (figura I-8).



**Figura I-10:** Anticuerpos etiquetados con Oregon Green 514, observados mediante microscopía confocal. Las sucesivas imágenes se tomaron a los 0, 20, 40 y 90 segundos desde el comienzo de la iluminación de la muestra. Comparándola con la figura I-3, se observa la mayor estabilidad de este fluoróforo con respecto a la fluoresceína (Haugland, 2002).



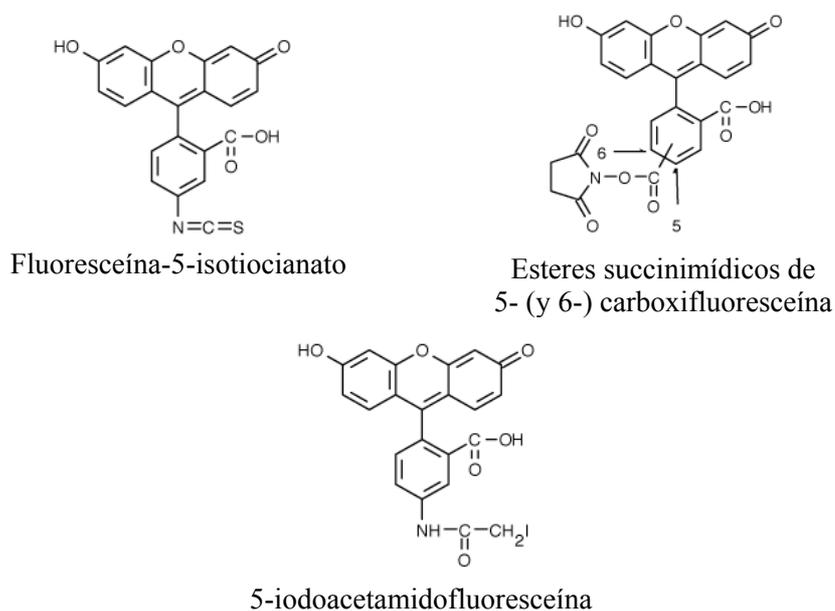
**Figura I-11:** Citoesqueleto de células endoteliales de arteria pulmonar bovina etiquetado con Alexa Fluor 488-faloidina (fluorescencia verde) y Alexa Fluor 546 (fluorescencia roja). Las imágenes se recogieron en intervalos de 30 segundos tras el inicio de la exposición. Es notable la mayor estabilidad de estos fluoróforos comparando esta figura con la I-7 (Haugland, 2002).

### I.2.3.- Derivados de la fluoresceína.

A lo largo de los años, se han sintetizado un amplio número de derivados de la fluoresceína, empleándose en diferentes aplicaciones.

Ejemplos de los más utilizados en el etiquetado de macromoléculas, citología e inmunohistoquímica son la 5-carboxifluoresceína y sus ésteres 3-succinimídicos (y sus isómeros en posición 6), 5-iodoacetamidofluoresceína, e isotiocianato de fluoresceína (esquema I-1), aunque estos compuestos y los conjugados con macromoléculas, como se mencionó anteriormente, presentan los mismos problemas que la fluoresceína. Estos derivados son los denominados *reactivos*, ya que son los que se utilizan directamente para el etiquetado de moléculas con el fluoróforo, mediante una reacción de derivatización a través de este grupo reactivo, con lo que la fluoresceína queda unida a la otra molécula. Por otro lado, estos derivados que muestran diferentes isómeros (sustituciones en las posiciones 5 o 6) tras su síntesis pueden presentar ciertas complicaciones, ya que los espectros de ambos isómeros son prácticamente indistinguibles, tanto en longitud de onda como en intensidades. Sin embargo, la geometría de unión a las macromoléculas, cuando se utilicen como etiquetas fluorescentes, puede variar según el isómero, pudiendo alterar resultados en técnicas tan empleadas como la cromatografía o la electroforesis en gel.

Algunas de las aplicaciones más comunes del isotiocianato de fluoresceína son su uso en estudios de hibridación de ácidos nucleicos (*Dirks et al., 1990; Talavera et al., 1997, 2000, 2003*); péptidos y aminoácidos etiquetados con este fluoróforo se han separado mediante electroforesis capilar, alcanzando unos límites de detección de unas 1000 moléculas (*Wu y Dovichi, 1989*); se ha empleado para detectar proteínas en gel (*Vera et al., 1988*) y en membranas de nitrocelulosa (*Houston y Peddie, 1989*); la transferencia de energía entre moléculas de fluoresceína también ha sido aprovechada para seguir el ensamblaje de distintas subunidades de una proteína (*Sims, 1984*).



**Esquema I-1:** Estructuras químicas de algunos derivados de fluoresceína.

Los ésteres succinimídicos de fluoresceína permiten la introducción de brazos espaciadores hidrofóbicos, lo que separa el fluoróforo de la macromolécula etiquetada. Esta separación reduce en gran medida el *quenching* normalmente observado con la conjugación biomolécula – fluoróforo. Además, los espaciadores permiten una mejor detección secundaria del fluoróforo

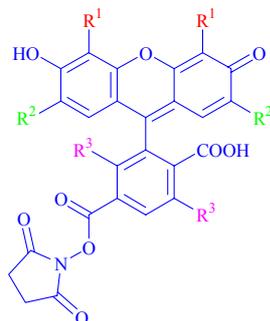
conjugado (Kimura *et al.*, 1992), por ejemplo a través de anticuerpos específicos.

Otro derivado reactivo de fluoresceína es la 5-(4,6-diclorotriazinil)-aminofluoresceína, el cual reacciona bastante bien con proteínas (Blakeslee y Baines, 1976) y polisacáridos. Suele emplearse para etiquetar tubulina (Wadsworth y Salmon, 1986).

Una familia interesante de derivados de la fluoresceína son los halogenados. La halogenación confiere a las moléculas unas características especiales, presentando algunas diferencias con la fluoresceína. Unos ejemplos interesantes son la eosina (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína), eritrosina (2',4',5',7'-tetraiodofluoresceína) y la 2',4',5',7'-tetrabromo-4,5,6,7-tetraclorofluoresceína. Estos derivados, tras la absorción de luz, sufren un cruzamiento entre sistemas considerable desde el estado excitado singlete hacia el estado triplete. Así, sus rendimientos cuánticos de fluorescencia serán bastante más pequeños, pero se pueden emplear eficazmente como sensibilizadores de oxígeno singlete (Neckers, 1989; Linden y Neckers, 1988), y aprovechar sus características fosforescentes, midiendo por ejemplo las propiedades rotacionales de proteínas, membranas y otras biomoléculas en disolución utilizando medidas de anisotropía de fosforescencia (Ludescher, 1990; Stein *et al.*, 1990; Matayoshi *et al.*, 1991).

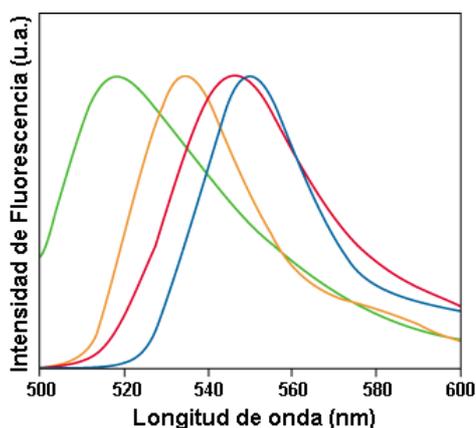
Unos derivados halogenados de fluoresceína muy importantes en el campo de la genética son la 6-carboxi-4',5'-dicloro-2'7'-dimetoxifluoresceína, la 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína, y la 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (esquema I-2). Estos fluoróforos muestran un amplio desplazamiento batocrómico en sus espectros de absorción y emisión conforme aumenta la sustitución (figura I-12). Se han utilizado en secuenciación de ADN (Lindqvist *et al.*, 1996; Poltl *et al.*, 1997), en patología y medicina forense (Lindqvist *et al.*, 1996) o como sondas de hibridación por transferencia de

energía, actuando como donadores, mientras que los aceptores fueron derivados de la rodamina (Sevall, 2000).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína	Cl	OCH <sub>3</sub>	H
6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína	Cl	Cl	Cl
6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína	H	Cl	Cl

**Esquema I-2:** Estructuras químicas de ésteres succinimídicos de algunos derivados clorados de fluoresceína (Haugland, 2002).



**Figura I-12:** Espectros de emisión normalizados de los ésteres succinimídicos de 5-carboxifluoresceína (—), 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (—), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (—) y 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (—) (Haugland, 2002).

Dentro de este grupo se encuentra la 2',7'-diclorofluoresceína. Este fluoróforo es también bastante conocido y en sus características fundamentales se combinan los efectos de los átomos de cloro, por ser sustituyentes

electronegativos y átomos pesados. La cloración de la fluoresceína va acompañada por un desplazamiento batocrómico de unos 10 nm, tanto en los espectros de absorción como en emisión (Haugland, 2002). A principios de los años 70, Leonhardt et al. (1971) estudiaron las características fundamentales de este fluoróforo, comparándolo con la fluoresceína. Mediante un método gráfico, encontraron tres constantes en estado fundamental para los equilibrios ácido-base. Ya que los grupos con carácter ácido-base son los mismos que en la fluoresceína, las especies son, por tanto, equivalentes: catión, neutra, monoanión y dianión. Los valores de las constantes encontradas fueron  $pK_1=0.47$ ,  $pK_2=3.50$  y  $pK_3=4.95$ . Se observa como el efecto de la electronegatividad de los sustituyentes, le aporta más polaridad a la molécula, disminuyendo los valores de  $pK_a$ , con respecto a los de fluoresceína. Determinaron, además gráficamente, los valores de  $pK_2^*$  y  $pK_3^*$ , asumiendo que se llega al equilibrio durante el tiempo de vida de los estados excitados; y del  $pK_1^*$  mediante el ciclo de Förster, reconociendo las limitaciones del método y la posible falta de sentido físico.

La 2',7'-diclorofluoresceína puede utilizarse igualmente como marcador fluorescente de macromoléculas, a través de sus derivados reactivos, teniendo en cuenta sus menores  $pK_a$ . Pero su campo de aplicación es bastante más amplio. Por ejemplo, se ha utilizado en la detección de cambios en el  $H_2O_2$  intracelular (Royall e Ischiropoulos, 1993), al tratarse de una medida de varias alteraciones patológicas detectadas por la generación endotelial de oxígeno activo (Freeman et al., 1986; Brigham et al., 1987; Kviety et al., 1989). Esta línea ha sido ampliamente desarrollada y, en la actualidad, la 2',7'-diclorofluoresceína es un indicador esencial en el estudio de oxígeno reactivo *in vivo*, estrés oxidativo, etc., habiendo aparecido centenares de trabajos publicados en este sentido en los últimos años. A modo de ejemplo, y sin pretender profundizar más en el tema, se citará el trabajo de Chignell y Sik (2003) por ser uno de los más recientes al respecto.

La medida del pH de ciertos orgánulos celulares, cuyo pH es ácido, también es un empleo muy común de la 2',7'-diclorofluoresceína. Debido a sus valores de  $pK_a$ , la zona de mayor dependencia de la absorción y emisión del fluoróforo con el pH es precisamente el intervalo de acidez moderada. Estos orgánulos celulares de pH ácido tienen diversas funciones dentro de la célula. Por ejemplo, pueden activar enzimas y funciones proteicas, que serían demasiado lentas a pH neutro, favoreciendo así el metabolismo celular. Además, el pH anormalmente bajo en lisosomas se ha relacionado con determinadas patologías, por ejemplo esto ocurre en algunas células tumorales (Montcourrier *et al.*, 1994). El derivado dicarboxílico también fue utilizado como sonda de pH en diversos orgánulos celulares ácidos por Nedergaard *et al.* (1990). Estos autores emplearon el derivado diacetilado, el cual se hace permeable a las membranas, pudiendo entrar en el citosol del orgánulo. Asimismo, se ha medido el pH del citosol y vacuolas de plantas y levaduras (Roberts *et al.*, 1991).

En química analítica se ha empleado recientemente. Así, Safavi utiliza 2',7'-diclorofluoresceína para realzar la quimioluminiscencia en sistemas de determinación por inyección en flujo, por ejemplo para hidrazina (Safavi y Baezzat, 1998) y sulfuros (Safavi y Karimi, 2002).

Otra aplicación analítica, no relacionada con el etiquetado de biomoléculas, es el trabajo de Gong y Gong (1999), quienes desarrollaron un método fluorimétrico para la determinación de tiocianato. El método se basa en la formación de una especie poco fluorescente entre el  $I_2$  y la 2',7'-diclorofluoresceína; cuando se añade el ion tiocianato ocurre la siguiente reacción:



Al reaccionar el  $I_2$ , se libera la 2',7'-diclorofluoresceína del complejo formado, con el consecuente aumento de la intensidad de fluorescencia de la mezcla. Al estar bien definida la estequiometría de la reacción anterior, puede

relacionarse fácilmente la cantidad de  $\text{SCN}^-$  presente en la mezcla con la fluorescencia de la disolución. Estos autores aplicaron este método a la determinación de  $\text{SCN}^-$  en suero y en saliva, siendo esto un marcador para la identificación de fumadores y no fumadores (Cai y Zhao, 1988).

Existe una gran cantidad de derivados de la fluoresceína y sus aplicaciones son muy diversas. Hasta ahora se ha dado una visión más o menos global de varios de estos derivados y se han puesto ejemplos de distintas aplicaciones descritas en diferentes ramas de la ciencia, pero no es motivo de esta Memoria desarrollar con mayor profundidad este campo. Sin embargo, el compuesto principal sobre el que versa esta Memoria es la 2',7'-difluorofluoresceína, por lo tanto, la próxima sección se ocupará de la familia de las fluoresceínas fluoradas. Es importante destacar esta serie de compuestos debido a que muestran unas características correlacionadas entre sí, y se diferencian apreciablemente de otras fluoresceínas halogenadas.

#### I.2.3.1.- *Derivados fluorados de fluoresceína.*

Como se ha mencionado previamente, una serie de derivados de la fluoresceína, que presentan ventajas frente a ella, son los derivados fluorados. La sustitución de átomos de hidrógeno por flúor en compuestos orgánicos normalmente produce cambios importantes en las propiedades de la molécula (Lentz, 1994), debido principalmente a la alta electronegatividad de los átomos de flúor, unido a sus pequeños radios de Van der Waals. En contraste con otros compuestos halogenados, en los cuales la alteración de las propiedades con la halogenación puede extrapolarse con determinados patrones, los derivados fluorados poseen muy asiduamente propiedades inesperadas.

La aparición de las fluoresceínas fluoradas es bastante reciente. De hecho, hasta 1997 no aparecen recogidas en la bibliografía. En este año, Sun *et al.* (1997) describieron la síntesis y propiedades fotofísicas de varias

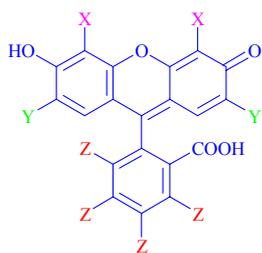
fluoresceínas fluoradas, en búsqueda de nuevos derivados que mantuvieran las buenas características de la fluoresceína, y presentaran ciertas ventajas frente a ella.

La síntesis que proponen *Sun et al. (1997)* se basa en la conocida condensación de resorcinol con anhídrido ftálico, con la que se obtiene fluoresceína, y que fue propuesta ya a finales del siglo XIX por *Von Bayer (1871)*. La síntesis propuesta por *Sun et al.* permite la obtención, con rendimientos muy considerables, de: 2',7'-difluorofluoresceína (**1**), 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína (**2**), 2',4,5,6,7,7'-hexafluorofluoresceína (**3**), 2',4,4',5,5',6,7,7'-octafluorofluoresceína (**4**), mezcla de 5-carboxi-2',7'-difluorofluoresceína (**5a**) y 6-carboxi-2',7'-difluorofluoresceína (**5b**), mezcla de 5-carboxi-4',5'-difluorofluoresceína (**6a**) y 6-carboxi-4',5'-difluorofluoresceína (**6b**), y la mezcla de 5-carboxi-2',4',5',7'-tetrafluorofluoresceína (**7a**) y 6-carboxi-2',4',5',7'-tetrafluorofluoresceína (**7b**). En el esquema I-3 aparecen las estructuras de los derivados obtenidos. En esta síntesis, por un lado, se obtienen resorcinolos fluorados en las posiciones requeridas partiendo de nitrobenenos fluorados disponibles comercialmente, a través de cuatro etapas con un alto rendimiento y selectividad. Por otro lado, en un segundo paso, la condensación<sup>∇</sup> del resorcinol fluorado concreto con anhídrido ftálico, anhídrido tetrafluorofáltico o anhídrido trimelítico, según el producto final buscado, proporciona con buenos rendimientos los derivados fluorados de fluoresceína. Hay seguidamente una etapa final de purificación por medio de la transformación de las fluoresceínas obtenidas en los correspondientes diacetatos para una mejor recristalización o purificación en columna cromatográfica, hidrolizando finalmente el producto purificado hacia los fluoróforos iniciales.

---

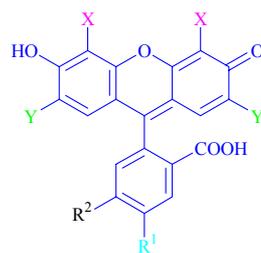
<sup>∇</sup> La condensación catalizada por Cloruro de Zinc a alta temperatura propuesta por *Von Bayer* no es efectiva en este caso, por la gran pérdida de material de partida en la etapa de sublimación. En cambio, la condensación en ácido metanosulfónico en condiciones más suaves (80-85 °C), donde este ácido funciona a la vez como disolvente y catalizador ácido, proporciona mejores rendimientos (*Confalone, 1990*).

a)



Compuesto	X	Y	Z
1	H	F	H
2	H	H	F
3	H	F	F
4	F	F	F

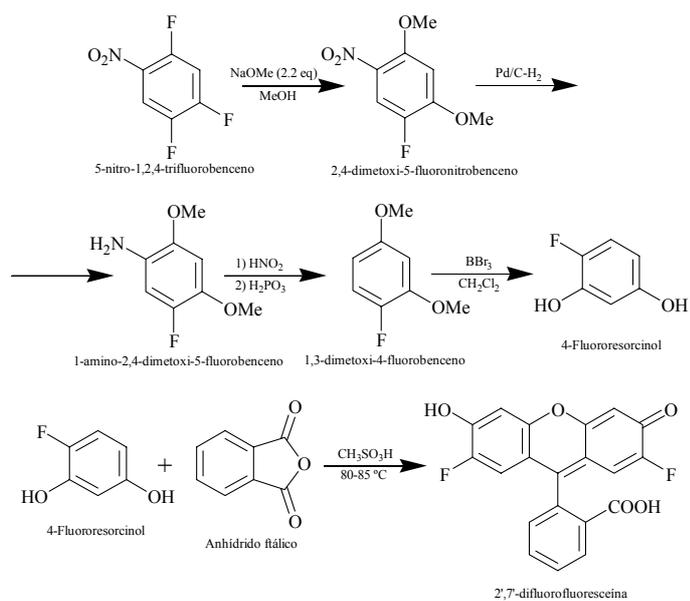
b)



Compuesto		R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X	Y
5	a	COOH	H	H	F
	b	H	COOH	H	F
6	a	COOH	H	F	H
	b	H	COOH	F	H
7	a	COOH	H	F	F
	b	H	COOH	F	F

**Esquema I-3:** Estructuras de los derivados fluorados de la a) fluoresceína y b) carboxyfluoresceína sintetizados por *Sun et al. (1997)*.

En el esquema I-4 se muestra la síntesis, según esta metodología, de la 2',7'-difluorofluoresceína, por ser el fluoróforo sobre el que trata esta Memoria. Las síntesis de los demás derivados son equivalentes a la anterior. Para una profundización sobre las condiciones concretas de trabajo, etapas intermedias, valores de rendimientos de las reacciones, etc. se recomienda la lectura del artículo de *Sun et al. (1997)*.



**Esquema I-4:** Síntesis de la 2',7'-difluorofluoresceína según la metodología propuesta por *Sun et al. (1997)*.

En la Tabla I aparecen las características principales de los derivados fluorados de la fluoresceína (en su especie prototrópica existente a pH 9), comparados con la fluoresceína y la carboxifluoresceína. Se incluyen los máximos de absorción y de emisión, rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi_f$ ), fotoestabilidad,  $pK_a$  y los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ).

Tabla I: Propiedades fisicoquímicas de fluoresceínas fluoradas<sup>o</sup>

Compuesto	Máx. Abs. <sup>o</sup>	Máx. Em. <sup>o</sup>	$\phi_f$	Blanqueamiento <sup>o</sup>	$pK_a$ <sup>o</sup>	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
Fluoresceína	490	514	0.92	17	6.5	90000
Carboxi-fluoresceína	492	516	0.92	17	6.4	84700
<b>1</b>	490	514	0.97	8	4.8	82400
<b>2</b>	508	527	0.85	7	6.1	85600
<b>3</b>	508	527	0.96	4	4.5	81200
<b>4</b>	535	553	0.47	8	3.3	83400
Mezcla <b>5a,b</b>	492	516	0.92	9	4.8	85900
<b>5a</b>	492	517	0.92	--	--	--
<b>5b</b>	492	514	0.92	--	--	--
Mezcla <b>6a,b</b>	510	534	0.43	11	5.2	84200
Mezcla <b>7a,b</b>	510	534	0.59	6	3.7	78100

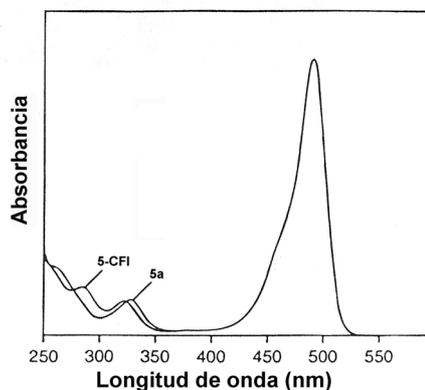
<sup>o</sup> Correspondientes a la especie prototrópica existente a pH 9 (*Sun et al., 1997*).  
<sup>o</sup> Determinados en disolución acuosa con tampón fosfato a pH 9.  
<sup>o</sup> Porcentaje de fluorescencia perdida después de 33 minutos de irradiación en un fluorímetro con una excitación centrada en el máximo y con 20 nm de paso de banda.  
<sup>o</sup> Constante de disociación del grupo fenólico. Datos obtenidos gráficamente a través de curvas de valoración pH vs intensidad de emisión.

Como ya se ha indicado, de forma general, la influencia de la fluoración se refleja en un desplazamiento batocrómico tanto de la absorción como de la emisión, aunque este desplazamiento es menor que en otras fluoresceínas halogenadas<sup>∇</sup>.

Un comportamiento inesperado se encuentra en las sustituciones en 2' y 7', que apenas modifican los máximos de absorción y emisión fluorescente. Pueden compararse los valores de los máximos en pares que se diferencien únicamente en la adición de dos átomos de F en las posiciones 2' y 7'. Se encuentra, por ejemplo, en los pares fluoresceína – **1**, carboxifluoresceína – **5a,b**, **6a,b** – **7a,b**, y **2** – **3**. De hecho, los espectros de absorción de la 5-

<sup>∇</sup> Por ejemplo, para la 2',7'-diclorocarboxifluoresceína:  $\lambda_{max}(abs) = 529$  nm,  $\lambda_{max}(em) = 540$  nm; para 2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína:  $\lambda_{max}(abs) = 520$  nm,  $\lambda_{max}(em) = 543$  nm; para 2',4',5',7'-tetraiodofluoresceína:  $\lambda_{max}(abs) = 528$  nm,  $\lambda_{max}(em) = 553$  nm.

carboxifluoresceína y la 5-carboxi-2',7'-difluorofluoresceína (**5a**) se superponen perfectamente por encima de 360 nm (Figura I-13).



**Figura I-13:** Espectros de absorción de la 5-carboxifluoresceína (**5-CFI**) y la 5-carboxi-2',7'-difluorofluoresceína (**5a**) (*Sun et al., 1997*).

Por otro lado, como ya se ha comentado, el fotoblanqueamiento es uno de los principales problemas de la fluoresceína y sus conjugados con macromoléculas, lo que limita y desfavorece en gran medida su utilización en diversas aplicaciones. Se trata de un proceso dinámico por el cual un fluoróforo sufre una destrucción química fotoinducida con la exposición prolongada a la luz, perdiendo así capacidad de fluorescer. Como se observa en la Tabla I, todas las fluoresceínas fluoradas poseen menores velocidades de fotoblanqueamiento que la fluoresceína. Existen algunos trabajos, como el de *Yagupol'skii et al. (1993)*, que describen que la introducción de sustituyentes con átomos de flúor puede producir fluoróforos con mayor resistencia a la oxidación, luz, calor y otros efectos físicos.

Otro parámetro característico de la Tabla I son los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\phi$ ). La mayoría de estas fluoresceínas fluoradas presentan rendimientos cuánticos similares a los de la fluoresceína. Una observación general es que los átomos de flúor en las posiciones 2' y 7' no tienen apenas efecto sobre el rendimiento cuántico; en contraste, la fluoración

de las posiciones 4' y 5' desciende el valor de éste. La fluoración en el anillo carboxifenilo tampoco produce variaciones apreciables en  $\phi_f$ .

Otro aspecto a tener en cuenta es la influencia sobre las constantes de disociación ácido–base. Está sobradamente documentado que la fluoración de fenoles produce un marcado descenso de las constantes de disociación, debido a la alta electronegatividad de los átomos de flúor (*Fujio et al., 1981; Dolbier et al., 1994*). De forma análoga, las fluoresceínas fluoradas poseen constantes de disociación entre 0.3 y 3.2 unidades de  $pK_a$  más bajas que las de fluoresceína. Este efecto es igualmente notable en otras fluoresceínas halogenadas; un ejemplo puede encontrarse en las constantes de disociación ácido–base de la 2',7'-diclorofluoresceína calculadas por *Leonhardt et al. (1971)*, que son 0.47, 3.50 y 4.95.

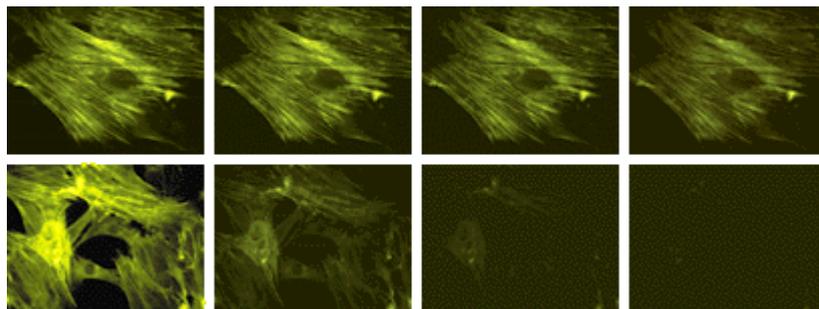
Se encuentran ciertas correlaciones entre los descensos en los valores de  $pK_a$  y la posición de fluoración. Por ejemplo, la fluoración de las posiciones 4, 5, 6 y 7 produce un descenso del  $pK_a$  de 0.4 unidades (compuesto **2** comparado con la fluoresceína); en las posiciones 4' y 5' la disminución de  $pK_a$  está alrededor de las 1.2 unidades (compuesto **6** frente a la carboxifluoresceína); si las posiciones con átomos de flúor son las 2' y 7', el descenso de  $pK_a$  es de 1.6 unidades (compuesto **5** frente a la carboxifluoresceína). La correlación puede extenderse, ya que estos efectos parecen tener un carácter aditivo; por ejemplo la 5(6)-carboxi-2',4',5',7'-tetrafluorofluoresceína (compuesto **7**) tiene un  $pK_a$  de 3.7, que representa un descenso con respecto a la carboxifluoresceína que combina aproximadamente, el efecto de las fluoraciones en las posiciones 2' y 7' (1.6 unidades de  $pK_a$  menos) y los átomos de flúor en las posiciones 4' y 5' (descenso de 1.2 unidades); así, el  $pK_a$  estimado para el compuesto **7** sería: 6.4 (carboxifluoresceína) – 1.6 (sustitución 2',7') – 1.2 (sustitución 4',5') = 3.6. De forma similar, se comprueba que el  $pK_a$  de la 2',4,5,6,7,7'-hexafluorofluoresceína (compuesto **3**) combina el descenso correspondiente a la 2',7'-difluoración y la 4,5,6,7-tetrafluoración (6.5 – 1.6 – 0.4 = 4.5); el descenso de  $pK_a$  en la

2',4,4',5,5',6,7,7'-octafluorofluoresceína (compuesto **4**) es el resultado de las disminuciones debidas a las fluoraciones en 2',7', en 4,5,6,7 y 4',5' ( $6.5 - 1.6 - 0.4 - 1.2 = 3.3$ ).

En cuanto a las posibles aplicaciones de estos derivados, es importante destacar que la 2',7'-difluorofluoresceína, y la 2',4,5,6,7,7'-hexafluorofluoresceína han sido comercializadas con los nombres Oregon Green 488 (OG488) y Oregon Green 514 (OG514) respectivamente. Asimismo, mencionar que se han sintetizado también sus derivados reactivos (ácidos carboxílicos, ésteres succinimídicos, isotiocianatos, etc.). Estos derivados fluorados presentan las siguientes ventajas frente a la fluoresceína:

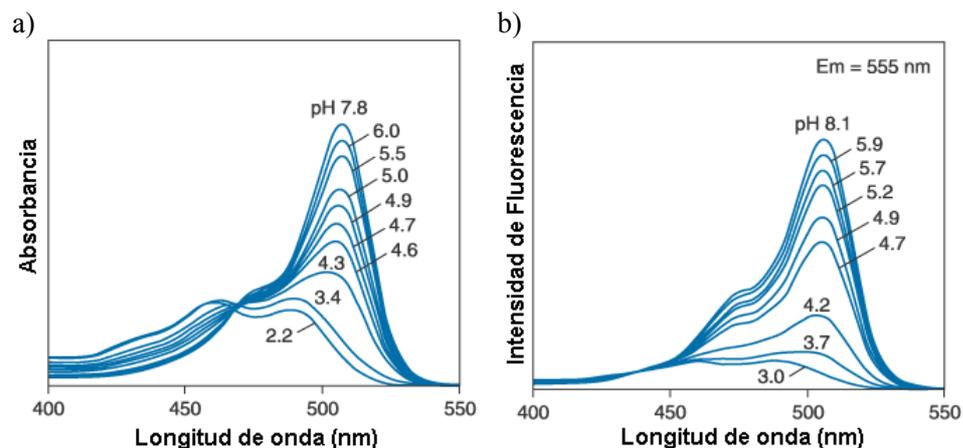
◆ Los conjugados de Oregon Green 488 y 514 con proteínas presentan mayores intensidades de fluorescencia que los equivalentes con fluoresceína. El *quenching* es menos notable, incluso a altos grados de etiquetado (figura I-9). No obstante, *Delmotte y Delmas (1999)* encontraron un *quenching* de unas 15 veces en el OG514 con la conjugación a péptidos mediante un enlace tioéter, aunque éste no se producía en un medio micelar, en presencia de Triton X 100, ni en medios más hidrofóbicos, como en mezclas dioxano:agua.

◆ Los conjugados de OG488 y OG514 son más fotoestables (figuras I-2, I-4, I-10 y I-14). Esta mayor fotoestabilidad hace estos fluoróforos especialmente útiles para aplicaciones en microscopía, al poder recogerse un mayor número de fotones antes de la fotodestrucción del fluoróforo.



**Figura I-14:** Comparación de la fotoestabilidad de Oregon Green 514 – faloidinas (serie superior) y fluoresceína – faloidinas (serie inferior). Las muestras se iluminaron continuamente, recogiendo las imágenes a 1, 10, 20 y 30 segundos después del comienzo de la iluminación (de izquierda a derecha). El Oregon Green 514 muestra mayor estabilidad que la fluoresceína (*Haugland, 2002*).

◊ El menor  $pK_a$  de estos fluoróforos, hace que en el pH fisiológico la fluorescencia sea constante (figura I-8). Adicionalmente, la sensibilidad de la intensidad de fluorescencia en la zona de pH entre 4 y 6 hace que se puedan emplear como sondas de pH para orgánulos ácidos en células vivas. Al igual que la 2',7'-diclorofluoresceína, esta dependencia con el pH moderadamente ácido, tanto de la absorción como de la emisión (figura I-15), hace útiles a estos fluoróforos para la medida del pH de orgánulos celulares ácidos. Además, los derivados diacetilados son permeables a las membranas de los orgánulos, pudiendo introducirse en el citosol. *Wilson et al. (1998)* han estudiado con estos fluoróforos el mecanismo de rectificación del pH vacuolar tras la exposición a amoníaco, en células de raíces de arroz y maíz.



**Figura I-15:** Espectros de: **a)** absorción y **b)** excitación, del ácido carboxílico del Oregon Green 514 a diferentes valores de pH (Haugland, 2002).

◊ Además, los anticuerpos para los cuales la fluoresceína es antígeno, también afectan al Oregon Green 488 y 514. Por tanto, pueden diseñarse multitud de inmunoensayos, aprovechando las ventajas de los derivados fluorados (Haugland, 2002).

Ya se han citado algunas de las aplicaciones de estos fluoróforos en investigación, sobre todo, bioquímica. De forma general, las aplicaciones pueden ser análogas a las realizadas con fluoresceína, aunque teniendo en cuenta sus características propias. Es conocido su uso etiquetando macromoléculas, en microscopía confocal, estudios sobre hibridación de ADN, etc.; igualmente, se ha citado su empleo como indicadores de pH intracelular y la posibilidad de diseñar inmunoensayos. Otra aplicación bastante importante, por lo extendido de su uso, es la utilización del Oregon Green 488 como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque esto será tratado con mayor profundidad en el apartado siguiente.

#### I.2.4.- 2',7'-difluorofluoresceína (Oregon Green 488).

##### I.2.4.1.- *Características fundamentales.*

No es mucha la información básica existente sobre la 2',7'-difluorofluoresceína. La mayoría de esta información se encuentra ya mencionada en el apartado anterior, y fundamentalmente proviene de *Sun et al. (1997)* y el *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9<sup>th</sup> ed. (Haugland, 2002)*.

Se trata de un polvo amarillo, soluble en agua por encima de pH 6 y en dimetilformamida. *Grams et al. (2003)* han descrito una solubilidad del OG488 en tampón citrato a pH 5 de 0.05 mg/ml. En la Tabla I se recogen las principales características del OG488: máximos de absorción y emisión a 490 y 514 nm respectivamente (medidos a pH 9), un rendimiento cuántico de 0.97 para la especie dianiónica, la cual también presenta un coeficiente de extinción molar en el máximo que, según bibliografía, varía entre 82400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (*Sun et al., 1997*) y 87000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (*Haugland, 2002*). El *pK<sub>a</sub>* determinado por *Sun* es de 4.8. También se ha referido la mayor fotoestabilidad con respecto a la fluoresceína, lo que permite cortas exposiciones a la luz sin provocar alteraciones significativas, aunque ha de seguir protegiéndose de exposiciones de mayor duración.

En cuanto a las características ácido-base en disolución acuosa del OG488 se puede observar que la fluoración no afecta a los grupos responsables de las protonaciones/desprotonaciones, por lo que pueden considerarse los mismos equilibrios ácido-base que en la fluoresceína. Para la fluoresceína están implicadas cuatro especies prototrópicas, catión, neutra, monoaniónica y dianiónica. Además, han sido consideradas en bibliografía diferentes formas tautoméricas para las especies neutra y monoaniónica. Una estructura quinoide, otra zwitteriónica y un tautómero lactónico, cuyas características de absorción y fluorescencia son muy diferentes al romperse la conjugación del sistema

aromático oxixanténico. En bibliografía no existe prácticamente información sobre las especies prototrópicas y estructuras presentes en el OG488. No obstante, las consideraciones que se describirán a continuación para la fluoresceína se tendrán en cuenta posteriormente, en el estudio de los equilibrios ácido–base del OG488 (sección III.1).

Para el dianión de OG488, la estructura del anillo xanténico es equiparable al de la fluoresceína y, como ya se mencionó anteriormente, la fluoración en las posiciones 2' y 7' no modifica las características espectroscópicas de esta especie (*Sun et al., 1997*).

En cuanto a la especie monoaniónica, para la fluoresceína algunos autores describían una única especie (*Dielh et al., 1986; Dielh y Horchack-Morris, 1987; Diehl y Markuszewski, 1985, 1989; Martin y Lindqvist, 1975; Rozwadowski, 1961*), posteriormente *Sjöback et al. (1995)* y *Klonis y Sawyer (1996)* proponen la existencia de dos especies monoaniónicas en equilibrio tautomérico. Por su parte, *Fabian et al. (1996)* y *Jang et al. (2001)* mediante cálculos semi-empíricos (los primeros) y *ab initio* (los segundos), describen también diferentes tautómeros del monoanión de fluoresceína. Así, según *Sjöback et al. (1995)* la carga característica del monoanión puede situarse sobre el grupo carboxilato o sobre el grupo hidroxilo del anillo. De estas dos especies, la que tiene la carga en el grupo carboxilato debe ser la dominante al tener un carácter más ácido que la que la tiene en el grupo hidroxilo. Estos autores han encontrado diferencias en la forma de los espectros de absorción y de excitación, en la región de pH de predominio del monoanión y a unas determinadas longitudes de onda de excitación. El espectro electrónico de absorción calculado por *Kubista et al. (1995 a,b)* y por *Sjöback et al. (1995)* presenta dos máximos para el monoanión a 453 y 472 nm, con igual coeficiente de absorción molar. Sin embargo la emisión excitando a 472 nm es más intensa que la de 453 nm, lo que parece indicar que el rendimiento cuántico de fluorescencia decrece conforme lo hace la longitud de onda de excitación. Las

especies fluorescentes puras, en general, presentan un rendimiento cuántico independiente de la longitud de onda, si la emisión proviene del primer estado singlete excitado. De esta manera la no constancia del rendimiento cuántico con la longitud de onda de excitación puede ser indicativa de la existencia de dos especies monoaniónicas de fluoresceína en equilibrio tautomérico (*Klonis y Sawyer, 1996, Sjöback et al., 1995*). *Jang et al. (2001)* parten de tres formas tautoméricas para el monoanión de fluoresceína, la usual con la carga en el grupo carboxilato, otra lactónica y una tercera con carácter zwitteriónico (dos cargas negativas y una positiva). Sus cálculos *ab initio* de energías libres relativas para disolución acuosa proporcionan una sorprendente contribución de un 37% para esta especie de carácter zwitteriónico, siendo mayoritaria la forma quinoide (con el grupo hidroxixanténico protonado) y despreciable la lactónica. Evidentemente, las extrapolaciones hacia la 2',7'-difluorofluoresceína no son aconsejables, ya que los átomos de flúor aportarán una polaridad extra a la molécula, alterando sus características. Sin embargo, todos estos antecedentes han de tenerse en consideración, ya que, como se comentó, los grupos implicados en los equilibrios ácido-base son los mismos en la fluoresceína y el OG488.

Para la especie neutra, es usual encontrar en la bibliografía las tres formas de la fluoresceína: quinoide, zwitteriónica y lactónica. Según esto, serán posibles las mismas modificaciones en la 2',7'-difluorofluoresceína. *Martín y Lindqvist (1975)*, mediante la comparación de la fluoresceína con un compuesto modelo, en el que se impide una de las desprotonaciones (el 6-hidroxi-9-fenilfluoron), establecieron que el espectro de absorción de la especie neutra en disolución acuosa es menos intenso que el resto debido a la contribución de la modificación lactónica. Establecieron además que los espectros de absorción de la forma neutra quinoide y monoaniónica debían coincidir, así como los de la forma catiónica y la neutra zwitteriónica. Descomponiendo el espectro de absorción de la forma neutra, asignaron una contribución de 62.5% para la

forma lactónica, 25% para la zwitteriónica, y un 12.5% para la modificación quinoide. Más tarde, *Mchedlov-Petrosyan y Mayorga (1992)* establecieron una contribución de un 22% para la especie zwitteriónica de la fluoresceína en disolución acuosa, aunque posteriormente asumieron que no podían detectar ninguna evidencia de esta especie (*Mchedlov-Petrosyan y Kleshchevnikova, 1994*). Por su parte, *Jang et al. (2001)* en su estudio *ab initio*, encuentran que la forma zwitteriónica evoluciona en los cálculos hacia la lactónica, encontrando en disolución acuosa un 67% para la modificación lactónica y un 33% para la quinoide. Se puede seguir comprobando en más referencias la dificultad que conlleva el determinar el carácter de la especie neutra. De nuevo, se tendrán en cuenta estas consideraciones, aunque hay que seguir notando que por las características propias del OG488, la información sobre la fluoresceína únicamente sirve como mera comparación.

En contraste con las especies anteriores, en la fluoresceína, la especie catiónica parece estar bien definida estructuralmente. Así, esta información es más fácilmente extrapolable hacia el derivado bifluorado.

Por último, en *Sun et al. (1997)* también pueden encontrarse descritos para el OG488, los espectros de RMN de protón y  $^{19}\text{F}$ . Las señales que estos autores encontraron se recogen en las tablas II y III.

**Tabla II:** Señales del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN<sup>Ⓢ</sup> del OG488 en DMSO deuterado.<sup>Ⓢ</sup>

<b>Desplazamiento (<math>\delta</math>)<sup>Ⓢ</sup></b>	<b>Multiplicidad</b>	<b>Constantes de acoplamiento (J)</b>	<b>Intensidad (número de H)</b>
7.99	Doblete	7.5 Hz	1 H
7.80	Triplete	7.4 Hz	1 H
7.73	Triplete	7.3 Hz	1 H
7.29	Doblete	7.5 Hz	1 H
6.88	Doblete	7.4 Hz	2 H
6.48	Doblete	11.2 Hz	2 H

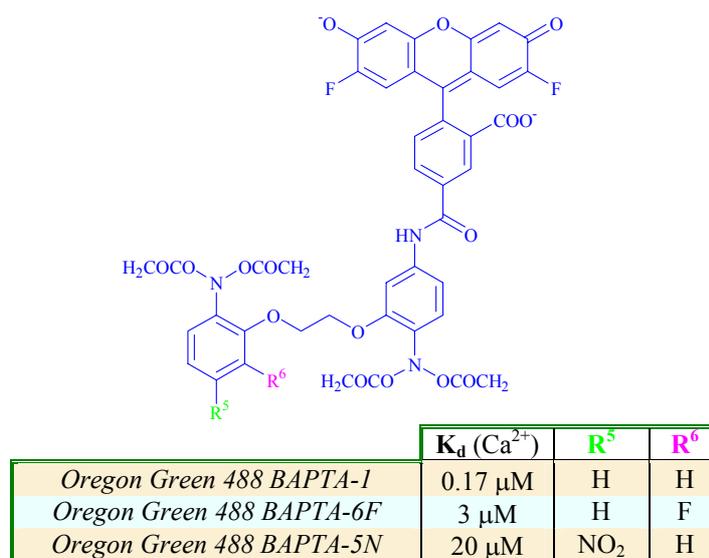
<sup>Ⓢ</sup> Frecuencia del campo electromagnético: 400 MHz.  
<sup>Ⓢ</sup> *Sun et al. (1997)*.  
<sup>Ⓢ</sup> Desplazamiento químico,  $\delta$ , expresado en ppm de la frecuencia del instrumento, hacia campos más bajos, con respecto al trimetilsulfóxido (TMS).

**Tabla III:** Señales del espectro de  $^{19}\text{F}$ -RMN<sup>Ⓢ</sup> del OG488 en DMSO deuterado.<sup>Ⓢ</sup>

<i>Desplazamiento (<math>\phi</math>)<sup>Ⓢ</sup></i>	<i>Multiplicidad</i>	<i>Constantes de acoplamiento (J)</i>	<i>Intensidad (número de F)</i>
134.35	Doble doblete	7.3 Hz 11.3 Hz	Señal única
<sup>Ⓢ</sup> Frecuencia del campo electromagnético: 282 MHz. <sup>Ⓢ</sup> Sun et al. (1997). <sup>Ⓢ</sup> Desplazamiento químico, $\phi$ , expresado en ppm de la frecuencia del instrumento, hacia campos más altos, con respecto al $\text{CFCl}_3$ .			

#### I.2.4.2.- Aplicaciones.

La comercialización de la 2',7'-difluorofluoresceína, como Oregon Green 488, es relativamente reciente. Sin embargo, el número de aplicaciones en las que este fluoróforo ha sido empleado es bastante considerable. Como anteriormente se comentó, la mayoría de estas aplicaciones se encuentran en el campo de la bioquímica, al ser empleado como etiqueta fluorescente; no obstante, el Oregon Green 488 viene siendo ampliamente utilizado como sonda de  $\text{Ca}^{2+}$ , y por consiguiente, es muy útil en neurociencia. El Oregon Green 488 se excita con la línea 488 del láser de ion de argón más que otros indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que le confiere una mayor sensibilidad frente a los demás indicadores, siendo ésta su principal ventaja. En realidad, los compuestos utilizados como indicadores de calcio son derivados del fluoróforo, al que se le une el grupo quelante BAPTA. Las estructuras se muestran en el esquema I-5.



Esquema I-5: Indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  basados en la 2',7'-difluorofluoresceína.

El Oregon Green 488 BAPTA-1 es moderadamente fluorescente en disolución en ausencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, su emisión se ve incrementada unas 14 veces con la saturación en  $\text{Ca}^{2+}$  (Haugland, 2002), tal y como se muestra en la figura I-16.

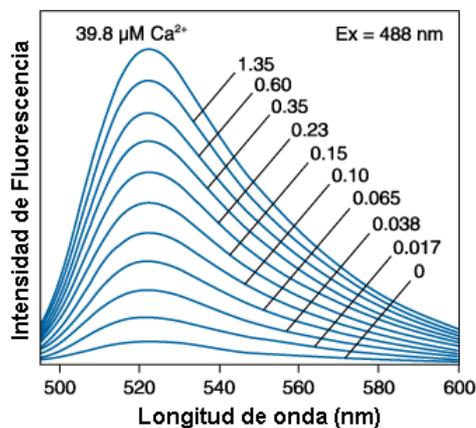


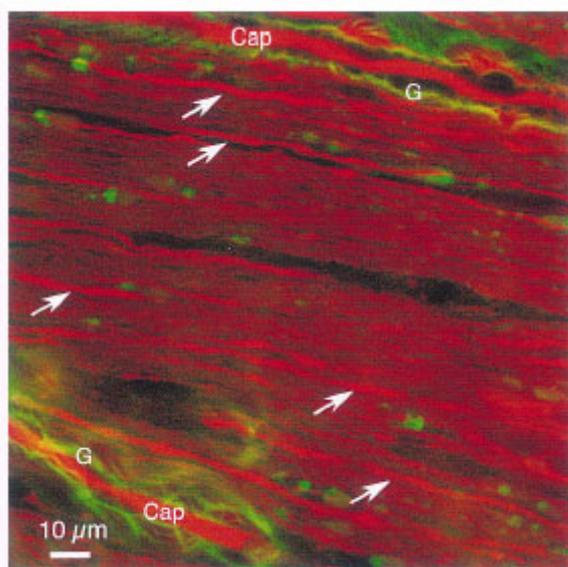
Figura I-16: Dependencia con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de los espectros de emisión de fluorescencia del Oregon Green 488 BAPTA-1 (Haugland, 2002).

Por su parte, los derivados Oregon Green 488 BAPTA-5N y Oregon Green 488 BAPTA-6F son indicadores de baja afinidad, empleados para la medida de concentraciones relativamente altas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, *Franco-Obregón et al. (2000)* y *Cessna y Low (2001)* utilizaron estos indicadores de baja afinidad en linfocitos B y T y en células del tabaco respectivamente.

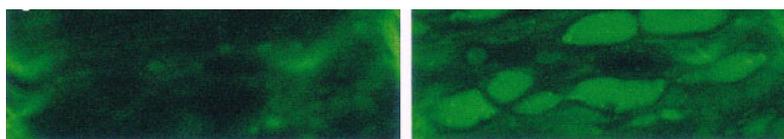
La importancia de los derivados de OG488 como indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  es bastante notable. De hecho, *Thomas et al. (2000)* realizaron un estudio comparativo de diferentes indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la elección de un buen indicador depende de multitud de factores, como la afinidad de enlace, el rango dinámico y la facilidad de carga en la célula. Además, su comportamiento se ve afectado por cada medio concreto (fuerza iónica, osmolaridad, pH, etc.). Los parámetros por los que destacó en este estudio el OG488 frente a los demás (Fluo-3, Fluo-4, Calcium Green-1, Calcium Orange y Fura-Red) fueron su buena fotoestabilidad y la independencia de la fluorescencia con el pH fisiológico.

Es un conocimiento reciente la relación entre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en las terminales pre-sinápticas de las células nerviosas y la eficacia de la sinapsis (*Kamiya y Zucker, 1994*). Además, la excesiva acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es un factor determinante en lesiones celulares y la muerte. Esta relación es la que ha impulsado la utilización del OG488 en neurociencia. *Lin et al. (1998)* describieron la evolución temporal del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en las terminales nerviosas tras diferentes trenes de impulsos, y la influencia de algunos factores como la cafeína o la adenosina, para ello emplearon un método de detección fluorescente, empleando el OG488 como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las modificaciones en la concentración de este ión en nervios ópticos de rata fueron motivo del trabajo de *Ren et al. (2000)*. Estos autores consiguieron obtener por primera vez señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en axones con mielina de mamíferos adultos a la temperatura fisiológica (hasta la fecha solo se había conseguido en células sin mielina), por medio de microscopía confocal de fluorescencia con un par de fluoróforos, uno

sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  (OG488), y otro no sensible de referencia (Sulforrodamina 101). La demostración de que su sistema era adecuado para medir cambios en las concentraciones de calcio la realizaron a través de la exposición de los nervios ópticos a caféina. Este método es usualmente utilizado para relajar los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , y aumentar la concentración de este ión. En las figuras I-17 y I-18 se muestran algunas de las imágenes conseguidas por *Ren et al.* (2000).

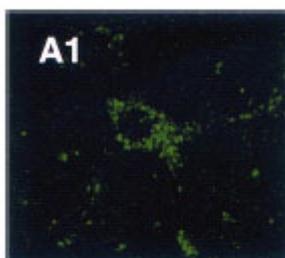


**Figura I-17:** Imagen confocal de axones de nervios ópticos de rata adulta, empleando dos fluoróforos, OG488 (fluorescencia verde) y sulforrodamina 101 (fluorescencia roja). Los capilares sanguíneos (*Cap*) se diferencian por su tamaño grande y por estar rodeados de fluorescencia verde en proceso de intercambio de iones (*G*). Los cilindros de los axones (flechas) aparecen con fuerte fluorescencia roja, debido a los bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones fisiológicas (*Ren et al.*, 2000).



**Figura I-18:** Aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por cafeína en axones de nervios ópticos de rata adulta. La fluorescencia del OG488, presenta un claro aumento (imagen de la derecha) tras la exposición del nervio óptico a una disolución 20 mM de cafeína durante 30 minutos (Ren *et al.*, 2000).

Beck *et al.* (2001) también emplearon OG488 en su estudio sobre la inducción de actividad rítmica en neuronas de sanguijuela. Esta actividad rítmica se puede inducir por una concentración externa baja de  $\text{Ca}^{2+}$ , u otros agentes como iones inorgánicos bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como pueden ser  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , etc. Estos autores producen, mediante la disminución de la concentración externa de  $\text{Cl}^-$ , la actividad rítmica de las neuronas. Esta actividad viene siempre acompañada por modificaciones en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intraneuronal, que los autores midieron mediante técnicas fluorimétricas convencionales, utilizando el indicador fura-2, y mediante microscopía confocal láser de fluorescencia, para la que emplearon OG488 como indicador. Otras investigaciones han relacionado la actividad de los neurotransmisores que se activan en presencia de nicotina, con picos cortos en la concentración de calcio, usando también OG488 (Brain *et al.*, 2001). Se ha empleado este fluoróforo recientemente en el desarrollo de antagonistas para neurotoxinas y proteínas neurotóxicas por el instituto de defensa químico de la armada estadounidense (Goodnough *et al.*, 2002). Estos autores desarrollaron un agente transportador de los antagonistas de ciertas neurotoxinas hacia el interior del citosol de las células nerviosas. Este agente de transporte consiste en una glicoproteína unida al inhibidor de la neurotoxina mediante un brazo de amino dextrano. El OG488 se empleó para visualizar este transporte mediante microscopía confocal (figura I-19).

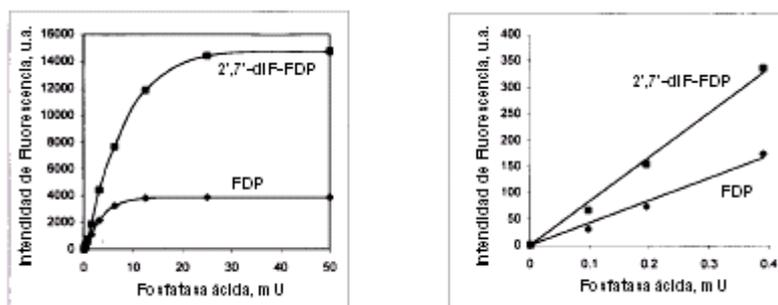


**Figura I-19:** Imagen de células corticales de ratón incubadas durante 24 horas con una disolución 200 nM del agente de transporte marcado con OG488 (Goodnough *et al.*, 2002).

Aparte de las investigaciones en neurología, otras aplicaciones medicobioquímicas recientes las encontramos en los trabajos de *Lominadze y Dean (2002)*, quienes utilizando fibrinógeno marcado con OG488 estudiaron la agregación de eritrocitos inducida por fibrinógeno. Esta agregación y altos niveles de fibrinógeno suelen estar asociados a enfermedades cardiovasculares y alteraciones cerebrovasculares. Probaron además un pequeño oligopéptido como inhibidor de la agregación inducida de eritrocitos. Una reciente investigación médica, relacionada con la posibilidad de la acumulación de sustancias en los folículos pilosos y glándulas sebáceas, también ha usado Oregon Green 488. La acumulación de sustancias en los folículos puede ser de gran ayuda en diversos tratamientos tópicos contra el acné, células tumorales, etc. (*Agarwal et al.*, 2000). En este sentido, *Grams et al. (2003)* han medido la acumulación en los folículos pilosos del OG488, detectándole mediante microscopía confocal de fluorescencia. Estos autores han encontrado que la acumulación en los folículos es función de la lipofiliidad de la sonda, y que ciertos tensoactivos pueden ayudar a la acumulación.

También se ha empleado el OG488 en la detección y cuantificación de la acción enzimática mediante sustratos fluorogénicos. Para determinar la acción de la fosfatasa alcalina se ha venido utilizando durante años la difosfato-fluoresceína como sustrato fluorogénico. Al actuar la fosfatasa, se libera

fluoresceína y aparece la emisión fluorescente (Huang *et al.*, 1992). Sin embargo, la fluoresceína adolece de falta de sensibilidad cuando se aplica a la fosfatasa ácida. El menor  $pK_a$  del OG488 produce señales cuatro veces mayores que la correspondiente reacción de la fosfatasa ácida con el derivado difosfatado (Gee, 1999) (figura I-20).



**Figura I-20:** Acción de la fosfatasa ácida sobre difosfato-fluoresceína (FDP) y difosfato-2',7'-difluorfluoresceína (2',7'-diF-FDP). Intensidad de fluorescencia generada después de la incubación de sustrato 100  $\mu$ M durante 60 minutos con concentraciones crecientes de enzima a pH 5 (Gee, 1999).

El OG488 ha sido también utilizado como sonda de anisotropía de fluorescencia para medir interacciones proteína – proteína y proteína – ácido nucleico comparándolo con otros fluoróforos como el OG514 y el Alexa Fluor 488 (Rusinova *et al.*, 2002). Las medidas de anisotropía de fluorescencia están alcanzando gran popularidad en las investigaciones sobre equilibrios entre interacciones intermacromoleculares (Hill y Royer, 1997). Los fluoróforos utilizados por Rusinova *et al.* (2002), OG488, OG514 y Alexa Fluor 488, demostraron tener ventajas adicionales para estas medidas de anisotropía de fluorescencia, como pueden ser: el alto valor de anisotropía límite ( $r_0$  cercano a 0.4), maximizando la posibilidad de observar cambios debidos a modificaciones de la movilidad global de la macromolécula con las interacciones; la anisotropía límite es constante a lo largo de toda la banda de absorción, con lo que pueden emplearse rendijas de excitación anchas, aumentando la intensidad de

fluorescencia, e incrementando así la sensibilidad; los tiempos de vida de fluorescencia de estos fluoróforos son independientes de la temperatura (en el intervalo importante para la investigación bioquímica), haciéndolos ideales para la determinación de parámetros termodinámicos (*Eftink, 1997*).

Otras aplicaciones interesantes del OG488 son las que utilizan este fluoróforo como sonda de pH. *Vergne et al. (1998)*, por ejemplo, emplearon la citometría de flujo, con detección fluorescente para determinar el pH en el interior de fagosomas. El método se basa en la medida de dos sondas fluorescentes, una sensible al pH (OG488) y otra de fluorescencia invariable con el pH (carboxitrametil-rodamina). Ambas sondas etiquetarán las partículas fagocitadas. Mediante el cociente de las intensidades de fluorescencia de las dos etiquetas evitan varios de los problemas de los métodos propuestos con anterioridad, con medida de una única sonda. La citometría de flujo permite además discriminar partículas marcadas libres (no fagocitadas), por lo que pudieron realizar una calibración intracelular del pH, eliminando la contribución de las partículas fluorescentes externas, sin la necesidad de añadir *quencher*s o forzar la degradación de estas partículas libres. Otra ventaja de la citometría de flujo es que las medidas son rápidas, evitándose así el fotoblanqueamiento de las sondas fluorescentes. *Vergne et al. (1998)* hallaron un pH de  $4.5 \pm 0.1$  para el interior de los fagosomas. Este valor de pH hace necesaria la utilización de OG488 como etiqueta fluorescente sensible al pH, ya que es un valor demasiado bajo como para determinarlo con fluoresceína (la sonda más usada para la medida del pH intracelular). *Beaven y Paynter (1999)* también midieron el pH del interior de fagosomas de ciertas ostras, empleando OG488 y rodamina etiquetando la partícula fagocitada. Encontraron diferencias entre fagocitos granulares, con pH alrededor de 4.9, y los no granulares, con un pH más ácido, de 3.1. En estas medidas, también se pone de manifiesto la ventaja del OG488 sobre otras sondas de pH, debido a su menor  $pK_a$ .

En microscopía confocal de fluorescencia se ha usado en el marcaje de vacuolas. *Cole et al. (1998)* en su estudio de vacuolas de hongos con una serie de diferentes fluoróforos, señalan que el Oregon Green 488 es el preferido de todos los que probaron para esta cuestión. La formación de vacuolas en fibras musculares también ha sido analizada mediante microscopía confocal con OG488 (*Launikonis y Stephenson, 2002*). También ha sido utilizado OG488 para chequear la construcción y funcionamiento de un nuevo microscopio de fluorescencia con excitación multifotónica (*Tan et al., 1999*).

En resumen, el OG488 es, por tanto, un fluoróforo cuya utilización es relativamente reciente, pero que su campo de aplicación se encuentra en clara expansión debido a las ventajas que presenta sobre la fluoresceína y otros fluoróforos. Además presenta una función como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  la cual hace que el OG488 sea muy empleado en una rama en constante evolución, como es la neurología.

### **I.3.- ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL: CONTAJE DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN EL TIEMPO.**

Existen dos técnicas generales en fluorimetría con resolución temporal, la de pulsos y la de fase-modulación. En las primeras se mide la evolución temporal de la luz emitida por una muestra cuando se excita con un pulso de luz más o menos corto. En las técnicas de fase-modulación se excita la muestra con luz modulada sinusoidalmente, y se estiman los tiempos de decaimiento a partir de la diferencia de fase y desmodulación de la radiación emitida con respecto a la excitatriz. Estas técnicas se comenzaron a desarrollar entre los años 60 y 70 (*Bollinger y Thomas, 1961; Yguerabide, 1972; Badea y Brand, 1979; Yguerabide e Yguerabide, 1984*), y están muy extendidas en la actualidad.

Dentro de este marco, prácticamente todas las medidas que se realizan en la actualidad en cuanto a fluorimetría resuelta en el tiempo emplean la técnica del contaje de fotones individuales correlacionados en el tiempo (time-correlated single photon counting: TCSPC), aunque se encuentran algunas aplicaciones recientes en la bibliografía que emplean la técnica de fase modulación (*Shah et al., 1984; Lakowicz y Balter, 1982; Bardez et al., 1992; Jankowski et al., 1998; Mironczyk y Jankowski, 2002*), pero son poco importantes en volumen de publicaciones. Al emplearse en esta Memoria exclusivamente la técnica TCSPC, sólo se desarrollará ésta brevemente a continuación.

#### **I.3.1.- Fundamentos de la técnica TCSPC.**

La técnica del contaje de fotones individuales correlacionados en el tiempo es un método experimental que proporciona información sobre los procesos que ocurren durante el estado excitado de muy diferentes tipos de muestras. La técnica se basa en la excitación óptica de la muestra por una fuente

de luz de intensidad pulsada con una determinada frecuencia. La emisión de las especies de la muestra se recoge en el detector y proporciona, así, información sobre los procesos que han tenido lugar durante la excitación. La técnica fue desarrollada entre los años 60 y 70 por *Bollinger y Thomas (1961)*, y ha sido ampliamente analizada en diversas monografías y libros generales (*O'Connor y Phillips, 1984; Lakowicz, 1999*).

El dispositivo fundamental en un instrumento de TCSPC es el convertidor tiempo–amplitud (TAC), que se puede considerar como un rapidísimo “cronómetro”. A grandes rasgos, la técnica consiste en determinar el tiempo que tardan los fotones emitidos por la muestra en llegar al detector tras la excitación por el pulso de luz.

A continuación, se describe pormenorizadamente el procedimiento de la técnica TCSPC. Inicialmente, la muestra fluorescente se excita repetidamente por pulsos rápidos de luz con una determinada frecuencia, procedentes de las diversas fuentes adecuadas descritas posteriormente. Cada pulso de luz es monitorizado por un fotodiodo o fototubo de alta velocidad de respuesta, produciendo una señal denominada START. Esta señal produce una subida de voltaje en el TAC, que aumenta de forma lineal con el tiempo, de modo que esta subida será lo que servirá de “cronómetro”. El voltaje se detiene cuando se detecta el primer fotón emitido por la muestra (señal STOP), y así, su valor final es directamente proporcional al tiempo entre las señales START y STOP. En el caso en el que no se detecte fotón, el voltaje alcanza un nivel máximo y vuelve a cero (se “resetea”), a espera de la siguiente señal START.

Otro elemento esencial es el analizador multicanal (MCA). El MCA, según sea el valor del voltaje detectado entre las señales START y STOP, añade una cuenta a un canal de tiempo correspondiente al tiempo de llegada del fotón STOP, a través de un convertidor analógico–digital (ADC). Repitiendo este proceso durante varios miles de pulsos, el MCA construye un histograma de

probabilidad de cuentas frente a canales de tiempo. El experimento continúa hasta que se han recogido un número suficiente de cuentas<sup>✓</sup>.

Lo expuesto hasta ahora se corresponde con el funcionamiento estándar de un instrumento TCSPC. Sin embargo, la velocidad de la subida de voltaje en el TAC, así como la velocidad de “reseteado” de ese voltaje son factores limitantes en la respuesta temporal del instrumento. El modo estándar de funcionamiento es suficiente cuando las frecuencias de repetición de los pulsos son bajas, como las que proporcionan fuentes de excitación como las lámparas de flash. Cuando las frecuencias de repetición son mayores, como las que producen los láseres pulsados, el TAC se satura por una llegada masiva de señales START al fotodiodo “disparador” antes de la vuelta a un voltaje nulo. La solución a este problema es que el TAC opere en **modo reverso** (*Bowman et al., 1993; Maus et al., 2001*). Ya que en esta Memoria se ha empleado un instrumento de TCSPC con esta modalidad del TAC, como se expone en la sección *Materiales y Métodos*, es importante explicar brevemente su fundamento. En la modalidad reversa, el primer fotón emitido detectado da la señal START, y la señal del pulso siguiente detectado funcionará como señal STOP. De esta forma la subida de voltaje en el TAC solo se activa si el fotón emitido es detectado; en el resto de pulsos, cuando el fotón emitido no se detecta, el TAC permanece inactivo, y por tanto no se satura. En esta modalidad, el inicio de los decaimientos aparecería en los canales finales del MCA, pero esto es fácilmente corregido mediante el software.

Es necesario remarcar que para trabajar en el modo de contaje de fotones individuales la emisión fluorescente debe ser atenuada, de forma que únicamente un 3% de la radiación excitatriz produzca una señal sensible en el detector. Bajo estas condiciones, se puede asegurar que la señal recogida en el

---

<sup>✓</sup> Suele ser usual recoger histogramas de unas 10000 cuentas en el canal del máximo, aunque según las necesidades puede ser necesario un mayor número de cuentas.

detector corresponde a un fotón individual (más o menos un único fotón detectado cada 100 pulsos de la fuente). Asimismo, en estas condiciones, el histograma producido en el MCA se corresponde con el decaimiento de intensidad de fluorescencia de la muestra, aunque, y como se describirá posteriormente, convolucionado con el perfil del pulso excitatriz.

El desarrollo de dispositivos específicos para esta técnica, tales como láseres de pico- y femtosegundos, detectores de platos multicanales, amplificadores de fracción constante, discriminadores, materiales ópticos no lineales, etc., hacen posible la determinación de tiempos de vida de unos pocos picosegundos. *Boens et al. (1990)* refinan en este trabajo la técnica TCSPC para obtener con bastante fiabilidad tiempos de decaimiento de fluorescencia en la escala del picosegundo. Aun así, siguen existiendo problemas en la determinación de tiempos cortos, como por ejemplo el alto error asociado que suele encontrarse. La mejora de los dispositivos instrumentales, y algunas nuevas aportaciones metodológicas proporcionan cada vez mayor resolución temporal. Por ejemplo, *Karolczak et al. (2001)*, a través del método de convolución de la función delta (*Zuker et al., 1985; Van den Zegel et al., 1986; Boens et al., 1988*) y el empleo de referencias, obtienen tiempos de vida muy precisos para la xantona en tolueno ( $5.1 \pm 0.3$ ps) y en benceno ( $8.1 \pm 0.3$ ps).

### I.3.2.- Fuentes de luz para la técnica TCSPC.

Con objeto de excitar una gran variedad de muestras y para describir las posibles dependencias con la longitud de onda de excitación, la fuente excitatriz debería abarcar un amplio intervalo espectral. Un tipo de fuentes de excitación ampliamente utilizadas son las lámparas de flash (*Birch e Imhof, 1981; Álvarez-Pez et al., 2001*), o la radiación procedente de un sincrotrón (*Laws y Sutherland, 1986*). Sin embargo, ambos tipos de fuentes poseen el problema de anchuras de pulso relativamente grandes, alrededor de algunos cientos de picosegundos.

Esto limita extremadamente la resolución temporal de los experimentos de TCSPC llevados a cabo. Por otro lado, el desarrollo de los láseres “*mode-locked*”, tales como los láseres de estado sólido sintonizables o los láseres de colorantes con bombeo sincrónico, proporcionan una buena resolución temporal, frecuencias de pulso ajustables y alta estabilidad con el tiempo. Sin embargo, éstos presentan problemas como una región limitada de longitudes de onda, o el requerimiento de cambiar el colorante del láser, con el consumo de tiempo que conlleva. La aparición durante la pasada década de materiales no lineales mucho más resistentes al deterioro (*Tang et al., 1990; Fix et al., 1991*) abrió el camino al desarrollo de los amplificadores paramétricos ópticos (*Petrov et al., 1994; Schweitzer, 1997*) y de los osciladores paramétricos ópticos (*Laenen y Laubereau, 1994; Robertson et al., 2000*). Estos dispositivos han demostrado ser herramientas muy fiables e importantes para conseguir mayores intervalos de longitudes de onda en láseres ultra-rápidos de alta calidad.

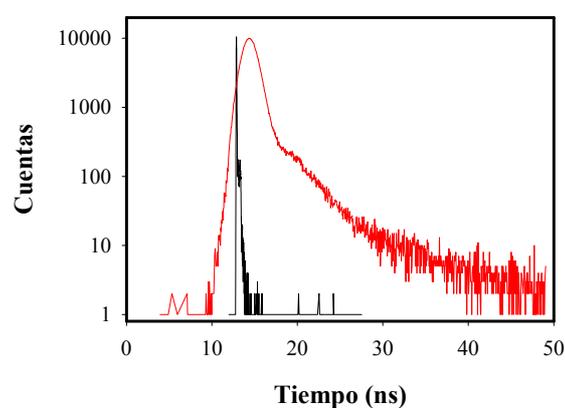
#### *I.3.2.1.- Lámparas de flash.*

Las lámparas de flash proporcionan pulsos de una anchura alrededor de 2 ns, con amplia variabilidad de longitudes de onda para excitar la muestra, según el gas encerrado en su interior. Comenzaron a emplearse en TCSPC a mediados de los años 70 (*Birch e Imhof, 1977*).

Este tipo de lámparas consiste en dos electrodos ligeramente separados y situados en un bulbo de cuarzo. Existen dos modalidades diferentes: compartimentadas y de recorrido libre. En las lámparas compartimentadas uno de los electrodos se conecta a una fuente de alto voltaje a través de una resistencia, y el otro se conecta a tierra a través de un tiratrón o tubo de gas de cátodo caliente. Los pulsos de luz son generados conforme la capacitancia de la lámpara se va cargando y el tiratrón pasa a un estado conductor, produciendo una rápida descarga entre los electrodos. Las frecuencias alcanzadas son de unos  $4.0 \times 10^4$  pulsos por segundo. El perfil espectral de la lámpara depende del

gas contenido en el bulbo (Hidrógeno, Deuterio, Nitrógeno, etc.), y la intensidad depende del voltaje aplicado y la capacitancia. Las lámparas de recorrido libre, en lugar del tiratrón, poseen una resistencia de  $50 \Omega$  para conectar el segundo electrodo a tierra.

En el desarrollo de estas lámparas se han llegado a conseguir anchuras a mitad de altura (FWHM) de 730 ps (Birch *et al.*, 1991). Aunque un inconveniente claro de la respuesta instrumental es la larga cola persistente después del pulso inicial (figura I-21).



**Figura I-21:** Perfiles instrumentales de instrumentos de TCSPC con lámpara de flash (Edinburgh RF-900, —) y láser pulsado de picosegundos (instrumento descrito en *Materiales y Métodos*, —).

La mayor desventaja de las lámparas de flash es su relativa baja frecuencia de repetición, como se ha comentado, unos 40 kHz. Por tanto, y debido a la limitación de detección de un fotón cada 100 pulsos, la adquisición de un único decaimiento conlleva un tiempo bastante importante.

#### I.3.2.2.- Radiación de sincrotrón.

Los electrones circulando a velocidades relativistas emiten radiación en un amplio intervalo de longitudes de onda. Estos pulsos son bastante intensos y tienen perfiles gaussianos, pudiendo ser empleados en instrumentos TCSPC (Laws y Sutherland, 1986; Van der Oord et al., 1995). El principal inconveniente es que el instrumento debe situarse en los lugares donde exista el sincrotrón.

#### I.3.2.3.- Láseres de colorantes de picosegundos.

Un láser de colorante necesita una fuente óptica de “bombeo”, que excite el material láser. Normalmente, esta fuente suele ser un láser “mode-locked” de ión de argón, aunque también pueden usarse láseres “mode-locked” de Neodimio:YAG, y en este caso hay que doblar o triplicar su frecuencia para excitar el láser de colorantes.

A finales de los años 70 y principios de los 80 se empezó a utilizar el láser “mode-locked” de ión de argón en TCSPC (Lytle y Kelsey, 1974; Spears et al., 1978; Turko et al., 1983). Este láser proporciona pulsos de unos 70 ps de anchura en 514 nm,<sup>∇</sup> y una frecuencia de 80 MHz, que se consiguen mediante un cristal en el interior de la cavidad. Este cristal es un dispositivo opto-acústico que dirige la luz fuera de la cavidad láser, basado en la difracción de la luz por ondas de sonido en el cristal (Berg y Lee, 1983). Este fenómeno opto-acústico es muy dependiente de la temperatura, por lo que normalmente el cristal está bien termostatzado a la temperatura ambiente.

Sin embargo, al ser la longitud de onda de excitación fija no es muy versatil. La introducción en TCSPC de los láseres de colorantes bombeados por el láser pulsado de argón (Kinoshita et al., 1981; Small et al., 1984) solucionó

---

<sup>∇</sup> La longitud de onda de máxima intensidad del láser de argón, 488 nm, no puede emplearse en este tipo de láseres, ya que no se consigue el efecto de “mode-locking” con esta línea.

esto, usualmente el láser de rodamina 6G, que proporciona pulsos de 5 ps de anchura (más estrecho que los límites de detección de los detectores actuales) pudiendo considerarse un pulso  $\delta$ . El principal problema de este láser es su longitud de onda de emisión, entre 570 y 610 nm, con lo que no pueden excitarse muchos fluoróforos. Se han desarrollado otros colorantes de menor longitud de onda de emisión, pero también requieren un láser de bombeo. Aunque se ha conseguido en alguna ocasión el efecto “*mode-locking*” en un láser de ión de argón a menores longitudes de onda (*Visser y Van Hoek, 1981*), en general es bastante complicado.

Así, para solucionar el problema de la longitud de onda de emisión del láser, se emplea el doblado de las energías, a través del segundo armónico del láser, disminuyendo la longitud de onda del haz. Estos procesos son bastante ineficaces, por lo que sólo una pequeña fracción del haz inicial consigue doblarse. Usando el segundo armónico del láser de rodamina 6G, se consiguen longitudes de onda entre 285 y 305 nm.

Por todo esto, la principal ventaja de los láseres de colorantes es la capacidad de sintonización entre diferentes longitudes de onda, utilizando diferentes colorantes, y los segundo armónicos.

#### I.3.2.4.- Láseres de Titanio:Zafiro (Ti:Sa) de femtosegundos.

Son los láseres introducidos recientemente en TCSPC. Los pulsos que proporcionan tienen una anchura de unos 100 fs, y se necesitan dispositivos ópticos especiales para ensancharlo hasta los ps.

También constan de una fuente láser de bombeo, que en este caso es un láser continuo de ión de argón, siendo éste entre 10 y 15 veces más potente que el láser “*mode-locked*” de ión de argón utilizado en láseres de colorantes. Más recientemente, también se han empleado láseres de estado sólido (similares a los de Nd:YAG) para bombear el Ti:Sa.

Una característica importante del láser de Ti:Sa es que él mismo consigue el efecto “*mode-locking*”. Esto se debe a que las altas intensidades alcanzadas crean gradientes de índice de refracción transitorios en el cristal de Ti:Sa, actuando igual que un dispositivo opto-acústico y consiguiendo el efecto comentado. Adicionalmente, puede añadirse un dispositivo activo en la cavidad láser para estabilizar la frecuencia y sincronizarla cuando sea necesario, produciendo el “*mode-locking*”.

Otra ventaja frente a los láseres de colorantes, es que se trata de un dispositivo en estado sólido, con una vida útil muy larga. En cambio los colorantes de la cavidad láser pueden sufrir fotodegradación y han de ser reemplazados.

Una desventaja es su elevada longitud de onda de emisión, entre 720 y 1000 nm. Con el doblado de frecuencias se consigue un intervalo de longitudes de onda entre 360 y 500 nm, que también puede resultar excesivo para ciertos fluoróforos. Por tanto, a través de la generación del tercer armónico pueden conseguirse haces de mayor frecuencia. Sin embargo, esto es bastante complicado ya que consiste en el solapamiento en un cristal adicional del haz fundamental con el segundo armónico. La excitación en el ultravioleta, por ejemplo, necesaria en proteínas y ciertos fluoróforos, requiere del triplicado de la frecuencia fundamental del haz láser.

La frecuencia de repetición del tren de pulsos de salida, de 80 MHz, es demasiado rápido para los experimentos de TCSPC. Esta frecuencia se controla usualmente por medio de un selector de pulsos, esto es un deflector opto-acústico que elimina ciertos pulsos y deja pasar otros alterando así la frecuencia de repetición.

Una aplicación en alza de los láseres de Ti:Sa es la *excitación multifotónica*. La absorción de dos o más fotones de longitud de onda larga para producir la excitación es un proceso ya predicho en los años 30, pero que fue demostrado empíricamente con la aparición de los láseres; esto se debe a la

necesidad de que los fotones se encuentren en el mismo instante para la absorción, lo que requiere de altas intensidades locales de luz (*Lakowicz, 1999*). Recientemente se han estudiado mediante excitación multifotónica varios compuestos aromáticos (*Lakowicz et al., 1992*), sondas de ADN (*Lakowicz y Gryczynski, 1992*), residuos de triptófano y tirosina en proteínas (*Gryczynski et al., 1996*), también ha encontrado aplicaciones en microscopía de fluorescencia (*Denk et al., 1990*), análisis de trazas (*Lyle et al., 1993*) y detección de moléculas individuales (*Mertz et al., 1995*). La excitación multifotónica presenta algunas ventajas sobre la excitación monofotónica tradicional, al obedecer a diferentes reglas de selección (*Lakowicz, 1999*), la excitación multifotónica puede emplearse para estudiar estados excitados “prohibidos” por excitación monofotónica.

### I.3.3.- Detectores para instrumentos de TCSPC.

Uno de los factores más críticos en estos instrumentos son los sistemas de detección, tanto en la línea de señal START como en la línea STOP. Las características de respuesta de los detectores definen el perfil instrumental, modificando la anchura de los pulsos, y por tanto la resolución temporal de los experimentos. Los tres tipos de detectores más empleados son fototubos de dinodos en cadena, fototubos de platos microcanales, y fotodiodos. Existen revisiones más o menos completas sobre las características de los detectores utilizados en TCSPC (*Candy, 1985; Hungerford y Birch, 1996*).

Además, la utilización de detectores multicanal (varias líneas de detección simultánea) aumenta la velocidad de adquisición de decaimientos, al poder aumentar el número de fotones detectados (cuentas por segundo), evitando el “apilamiento de pulsos”, es decir, la llegada al detector de más de un fotón, lo que distorsiona los decaimientos adquiridos. Se han llegado a describir en la bibliografía dispositivos con hasta 96 ánodos (*Howorth et al., 1995*), aunque de forma usual, están disponibles platos de microcanales funcionando

como 10 – 16 detectores. Para estas detecciones multicanales, cada canal de detección está asociado a un discriminador de fracción constante y a un segmento de memoria independiente del MCA (*Birch et al., 1994; McLoskey et al., 1996*).

#### *I.3.3.1.- Fototubos de dínodos en cadena.*

Los fototubos de dínodos son adecuados para la mayoría de los experimentos de TCSPC, especialmente si la fuente es una lámpara de flash. Valores típicos de anchura de pulsos son 1 – 2 ns, aunque se han llegado a alcanzar anchuras entre 112 – 700 ps en tubos de dínodos con ventana lateral. La característica principal de estos detectores, y la que limita su resolución temporal es el tiempo que tardan los electrones en pasar de unos dínodos a los siguientes.

#### *I.3.3.2.- Fototubos multiplicadores de platos de microcanales.*

Se trata de los detectores más empleados actualmente, ya que proporcionan pulsos unas diez veces más cortos que los anteriores. Los fototubos de platos de microcanales (MCP) empezaron a desarrollarse a finales de los años 70 (*Boutot et al., 1977*); pero los primeros dispositivos útiles aparecieron a mediados de los 80 (*Yamazaki et al., 1985*) y comenzaron a utilizarse en instrumentos de TCSPC (*Murao et al., 1982*).

El diseño de un MCP es completamente diferente a los detectores anteriores, ya que no poseen dínodos. En lugar de los dínodos, los fotoelectrones se van amplificando a lo largo de canales alineados, muy estrechos, del material de los dínodos. Debido a la estrechez de estos canales (4 – 12  $\mu\text{m}$  de diámetro) todos los fotoelectrones siguen el mismo camino, y no hay dispersión en los tiempos de respuesta del detector, que es el principal problema de los detectores de dínodos.

Los fototubos MCP proporcionan anchuras de pulso muy pequeñas, habiéndose conseguido hasta de 25 ps.

Algunas desventajas de estos fototubos MCP es su elevado precio, de forma que el gasto extra sólo se justifica en el caso de utilizar láser de picosegundos como fuente de luz. Otra desventaja es la pérdida de ganancia con el tiempo, y su vida útil relativamente limitada.

#### I.3.3.3.- *Fotodiodos.*

Los fotodiodos (PD) no son caros, y pueden responder incluso más rápido que los fototubos MCP. El problema de los PD es su baja ganancia. Sin embargo, se han desarrollado fotodiodos en avalancha (APD) que tienen una ganancia adecuada, y también pueden responder más rápido que los MCP. Pero los APD tienen serias desventajas: el área activa es de una superficie muy pequeña, y es muy difícil focalizar la emisión fluorescente en esta área, disminuyendo esto su sensibilidad. Otra desventaja es la aparición de largas colas en el perfil instrumental, que dependen de la longitud de onda, creando problemas en el análisis de datos, ya que la función respuesta instrumental dependerá de la longitud de onda.

Sin embargo, los fotodiodos son muy utilizados como detector “disparador”, dando la señal START en el TAC, cuando la fuente de excitación es un láser. Esto es posible debido a que los láseres sí pueden enfocarse en un área muy pequeña, y tienen una alta intensidad que contrarresta la baja ganancia del PD.

#### I.3.4.- Integral de convolución. Análisis de los decaimientos.

Los histogramas que proporciona el instrumento son una convolución de la función de respuesta al impulso, también denominada ley de decaimiento, con la función de lámpara o función de respuesta instrumental. La función de respuesta al impulso,  $I(t)$ , es la que se observaría si la muestra fuese excitada

con un pulso  $\delta$ , es decir un pulso infinitamente corto. Sin embargo, los pulsos de las fuentes existentes tienen una determinada anchura. Así, puede considerarse el pulso excitatriz como una serie de pulsos  $\delta$  con diferentes amplitudes, que van a producir diferentes respuestas, de intensidades proporcionales a cada función  $\delta$ . El histograma medido sería la suma de todas estas funciones respuesta. Esta suma viene expresada por la llamada *integral de convolución*:

$$F(t) = \int_0^t I(t-t')D(t')dt' \quad (\text{I-1})$$

El decaimiento medido experimentalmente es  $F(t)$ ,  $D(t')$  es la función de respuesta instrumental, mientras que  $I(t)$  es la ley de decaimiento.

El perfil instrumental se obtiene usualmente con una disolución dispersora de luz, recogiendo la emisión a la misma longitud de onda que la excitación. Pueden ser utilizados dispersores como sílica coloidal, sulfato de bario, partículas de oro, glucógeno o leche. En los experimentos de TCSPC con excitación multifotónica, *Habenicht et al. (2002)* remarcan la importancia de realizar el ajuste por reconvolución con una función instrumental adecuada. Para ello, estos autores constatan la mejoría en los análisis al utilizar el perfil instrumental obtenido por dispersión hiper-Rayleigh (una generación de un haz disperso del segundo armónico de la radiación incidente), en lugar de la dispersión Rayleigh usual.

En lo referente a las leyes de decaimientos posibles,  $I(t)$ , las más empleadas para describir los comportamientos usuales de las muestras fluorescentes son las siguientes:

✦ *Decaimientos multiexponenciales* (ecuación I-2) se presentan en mezclas de fluoróforos independientes, en el caso de un único fluoróforo con decaimiento complejo, y en algunos procesos en el estado excitado.

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (\text{I-2})$$

↗ *Distribuciones de tiempos de vida* (ecuación I-3) que pueden describir comportamientos de fluoróforos en mezclas de disolventes con distintos ambientes.

$$I(t) = \int_{\tau=0}^{\infty} \alpha(\tau) e^{-t/\tau} d\tau \quad (\text{I-3})$$

↗ *Exponenciales extendidos* (ecuación I-4) similares a las distribuciones de tiempos de vida, pero en este caso,  $\beta$  se relaciona con la distribución de tiempos. Esta ley se encuentra en ocasiones en estudios sobre polímeros.

$$I(t) = I_0 \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right] \quad (\text{I-4})$$

↗ *Efectos transitorios* (ecuación I-5) se trata de decaimientos no exponenciales debido a fenómenos que suceden justo tras la excitación. Ejemplos son el *quenching* colisional, la transferencia resonante de energía o la recombinación de los protones con la base excitada tras la desprotonación de un fotoácido.

$$I(t) = I_0 \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right) - 2bt^{1/2}\right] \quad (\text{I-5})$$

El análisis de los decaimientos consiste en obtener la función de respuesta al impulso que, a través de la convolución con el perfil instrumental, proporcione una función calculada de decaimiento  $F_{calc}(t)$  que mejor se ajuste a los datos experimentales  $F(t_k)$ . Este tipo de métodos en los que se compara la función experimental  $F(t_k)$  con la función calculada a través de la función impulso respuesta  $I(t)$  y el perfil instrumental  $L(t)$ , por medio de la integral de convolución (ecuación I-1), se denominan métodos de **reconvolución iterativa**.

Los métodos más empleados en el análisis de resultados son el análisis no lineal por mínimos cuadrados (*Ware et al., 1973; Grinvald y Steinberg, 1974; Johnson y Frasier, 1985*), método de los momentos (*Yguerabide, 1972; Small, 1992*), transformaciones de Laplace (*Ameloot y Hendrickx, 1983; Ameloot, 1992*), método de máxima entropía (*Brochon, 1994*), método de convolución de la función delta (*Zuker et al., 1985; Van den Zegel et al., 1986; Boens et al., 1988; Karolczak et al., 2001*), método de Prony (*Zhang et al., 1996*), método de máxima probabilidad (*Bajzer y Prendergast, 1992*), transformación sinusoidal (*López et al., 1992*), y otros métodos analíticos. Los métodos de los momentos y de Laplace no son muy empleados actualmente, mientras que el método, más reciente, de la máxima entropía está siendo muy utilizado en algunos laboratorios. Sin embargo, el método de análisis no lineal por mínimos cuadrados sigue empleándose como el más general y fiable para el análisis de los datos de tiempo resuelto (*Lakowicz, 1999*).

#### I.4.- REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN EL ESTADO EXCITADO (ESPT).

##### I.4.1.- Antecedentes históricos sobre ESPT.

Las reacciones de transferencia protónica en el estado fundamental, es decir, los equilibrios ácido–base, son procesos muy conocidos y de gran importancia en Química. Sin embargo, las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) ocupan un apartado más restringido, sobre todo en el ámbito de la Fotoquímica, aunque tienen gran interés tanto en Química fundamental como aplicada.

Las primeras investigaciones sobre el comportamiento ácido–base en el estado excitado se deben a *Weber (1931)*, quien observó que la zona de inflexión en la curva de valoración ácido–base de algunas moléculas orgánicas, se producía en zonas de pH distintas dependiendo de si los datos experimentales correspondían a emisión o absorción. *Förster (1950)* investigó este fenómeno proponiendo un método, el ciclo de Förster, para estimar el  $pK_a$  de una molécula en el estado excitado ( $pK_a^*$ ) basado en el  $pK_a$  del estado fundamental y los espectros de absorción y/o emisión de la molécula. El ciclo de Förster, aunque sólo da valores de  $pK_a^*$  exactos en determinadas condiciones, suele emplearse en la actualidad para obtener una estimación aproximada de estas constantes en el estado excitado (por ejemplo *Balón et al., 1987, 1993; Draxler y Lippitsch, 1993; Wenska et al., 1997*). En esta ecuación,  $\bar{\nu}_B$  y  $\bar{\nu}_{BH}$  son los números de onda de la transición  $0 \rightarrow 0$  de la base y el ácido respectivamente, y  $T$  la temperatura en grados Kelvin.

$$pK_a^* = pK_a + \frac{0.625}{T}(\bar{\nu}_B - \bar{\nu}_{BH}) \quad (I-6)$$

Años más tarde, *Weller (1955)* encontró en el metil-salicilato un desplazamiento de Stokes inusualmente grande en el espectro de emisión. La protonación del grupo fenólico provocaba que el espectro de emisión se

convirtiera en imagen especular del espectro de absorción. Propuso que el desplazamiento hacia el rojo en el espectro de fluorescencia se debía a un isómero formado en el estado excitado por transferencia protónica. Desde este trabajo de Weller, las reacciones ESPT intramoleculares han sido ampliamente estudiadas.

El propio *Weller (1961)* realizó en estas fechas una extensa revisión sobre las reacciones ESPT intramoleculares. En la siguiente década, hubo un amplio desarrollo en los estudios sobre estas reacciones. Existen revisiones como la de *Vander Donckt (1970)* sobre ESPT intermoleculares, en base a las teorías de transferencia de carga y resonancia. Por su parte, *Schulman y Winefordner (1970)* trataron las aplicaciones analíticas de estas reacciones.

Ya por estas fechas, se comenzaron a proporcionar diferentes utilidades de estas reacciones, por ejemplo, *Loken et al. (1972)* emplearon las reacciones ESPT como sonda biológica, ya que la adsorción a albúmina sérica del 2-naftol y del 2-naftol-6-sulfonato impedía o disminuía drásticamente las velocidades de las ESPT. También, se estudiaban cómo diferentes entornos podían afectar a la velocidad de estas reacciones, por ejemplo, *Stryer (1966)* revisó el efecto del isótopo de deuterio en la cinética de las ESPT de diversos fluoróforos, o la aceleración en dos órdenes de magnitud en las constantes cinéticas que *Escabi-Pérez y Fendler (1978)* encontraron llevando a cabo los procesos en micelas reversas.

Otras revisiones que fueron surgiendo en estos años fueron las de *Ireland y Wyat (1976)* y *Klöppfer (1977)*, quien revisó las reacciones ESPT intramoleculares. Por su parte, *Martynov et al. (1977)* trataron con mayor profundidad la cinética de estas reacciones, recopilaron valores de  $pK_a^*$  de varios fluoróforos, sobre todo naftoles y derivados, y trataron las ESPT intermoleculares, tanto en disolventes próticos como apróticos, ESPT intramoleculares y las ESPT en fase sólida.

En la década de los 70 la cinética de estos procesos se evaluaba casi exclusivamente a través del método inicialmente propuesto por *Weller (1952)*, basado en el estudio del estado estacionario, y que se sigue utilizando actualmente (*Kelly y Schulman, 1988; Mirończyk y Jankowski, 2002*). Sin embargo, no siempre la utilización de las ecuaciones de Weller lleva a valores verdaderos de  $pK_a^*$ , sino a aparentes (*Capomacchia y Schulman, 1972; Lasser y Feitelson, 1973*). El principal problema del método de Weller es que, por un lado, supone que el equilibrio ha de alcanzarse en el estado excitado, y por otro, que los tiempos de vida del par ácido–base excitados deben de ser idénticos (*Samanta et al., 1985*). De ahí, que las ecuaciones de Weller necesiten ser modificadas en ciertas situaciones, y así se ha realizado en diferentes trabajos (*Schulman y Vogt, 1981; Chattopadhyay, 1995; Yang y Schulman, 2003*). No obstante, las técnicas de fluorimetría con resolución temporal, y la obtención de decaimientos de fluorescencia ya empezaba a ser de utilidad en los estudios al respecto (*Loken et al., 1972; Gafni et al., 1976*). Estas técnicas han supuesto un extraordinario avance en el estudio de cinéticas muy rápidas, como son las de este tipo.

A finales de los años 70 se empieza a desarrollar una técnica que plantea un gran interés, relacionada con las reacciones ESPT: los saltos de pH inducidos por láser. Consiste en la creación, mediante pulsos láser muy intensos, de una población alta de moléculas en estados excitados, que sufren rápidas protonaciones o desprotonaciones mediante ESPT, proporcionando una variación muy rápida, en el orden de los ps, del pH de un medio. Estos saltos de pH pueden emplearse como iniciadores de ciertas reacciones en estado fundamental. La técnica de los saltos de pH inducidos por láser fue desarrollada en los trabajos de *Campillo et al. (1978)* y *Clark et al. (1979)*. La acidificación local mediante ESPT también es un procedimiento que sigue empleándose en la actualidad. Por ejemplo, *Jankowski y Stefanowicz (1994)* y *Jankowski et al.*

(1995) emplearon los saltos de pH para comprobar su efecto en proteínas, a través de derivados del 2-naftol unidos a éstas.

Durante los años 80, se han estudiado multitud de fluoróforos con propiedades ácido-base, y sus posibles reacciones ESPT. Por ejemplo, las  $\beta$ -carbolinas (*Sakurovs y Ghiggino, 1982; Vert et al., 1983; Ghiggino et al., 1985; Balón et al., 1987*), equileninas (*Davenport et al., 1986*), 1-isoquinolinas (*Vogt y Schulman, 1983*), hidroxiflavonas (*Choi et al., 1984*), fluoresceína (*Shah et al., 1984; Diehl y Markuszewski, 1985; Diehl et al., 1986*), carbazol (*Samanta et al., 1985; Chattopadhyay y Chowdhury, 1987*). En muchos de estos trabajos ya se incluyeron láseres pulsados, en el orden de los picosegundos, en los instrumentos de TCSPC, lo que permitió estudiar cinéticas aún más rápidas. *Webb et al. (1984, 1986)* analizaron la ESPT del 1-naftol, resultando ser bastante más rápida que la del 2-naftol, estudiada ampliamente años antes (*Laws y Brand, 1979; Lakowicz y Balter, 1982*). Así, *Webb et al. (1984)* encontraron un tiempo de vida de 33 ps para el 1-naftol. Numerosas revisiones continuaban apareciendo, debido al rápido desarrollo de las técnicas fluorescentes con resolución temporal, tanto por TCSPC como por fase-modulación. Las revisiones de *Brand y Laws (1983)* o *Shizuka (1985)* son buenos ejemplos al respecto. Aunque la técnica TCSPC prácticamente se ha impuesto, en los años 80 la técnica de fase-modulación se utilizaba con asiduidad. Por ejemplo, *Lakowicz y Balter (1982)* analizaron la ya conocida reacción ESPT del 2-naftol, empleando medidas de fase-modulación. El desarrollo de instrumentos de fase-modulación multifrecuenciales, como el descrito por *Pouget et al. (1989)*, amplió y mejoró el desarrollo de la técnica.

Los procesos de ESPT están asociados a grandes desplazamientos de Stokes, fotoestabilidad, altos rendimientos cuánticos y efectividad en inversiones de población (*Kasha, 1986*), lo que los hace útiles en el diseño de láseres de colorantes. La existencia de reacciones de transferencia protónica en el estado excitado produce esquemas de cuatro niveles para diseñar inversiones

de población láser. *Chou et al. (1984)* diseñaron un láser de cuatro niveles, basándose en la tautomerización en estado excitado de la 3-hidroxi-flavona. Igualmente, *Acuña et al. (1986, 1986b, 1991)* diseñaron láseres de colorantes en estado sólido de cuatro niveles en matriz sólida. Otro láser de colorantes basado en ESPT fue el diseñado por *Parthenopoulos et al. (1991)*. *Uzhinov y Druzhinin (1998)* recopilaron los fundamentos y los distintos tipos de láseres de ESPT aparecidos.

Otro aspecto interesante de las reacciones ESPT se encuentra en moléculas cuya desprotonación en el estado excitado es muy rápida. En estas moléculas, el control por difusión de la desprotonación puede hacer que se produzca una reprotonación inmediata y procesos transitorios, que afectan notablemente las constantes cinéticas de la ESPT. En estos casos se obtienen decaimientos que siguen leyes no exponenciales. La reprotonación, la dependencia de las constantes cinéticas de la ESPT con el tiempo y los decaimientos no exponenciales de fotoácidos, como el 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato, fueron estudiados por *Pines y Huppert (1986a, 1986b)*, *Agmon (1988)*, *Pines et al. (1988)*, o en el caso del 1-naftol-3,6-disulfonato por *Massad y Huppert, 1991*, etc. Este tratamiento supone la utilización del tratamiento de Debye – Smoluchowski para explicar la dependencia temporal de las constantes cinéticas. Estos efectos son sobre todo notables en fotoácidos muy fuertes, y en disolventes de viscosidades apreciables. En este sentido *Tolbert y Haubrich (1990)* estudiaron derivados del 1- y 2-naftol, de forma que los sustituyentes muy electronegativos convierten la molécula en un fotoácido más fuerte, como muestran *Carmeli et al. (1996)* y *Solntsev et al. (1999)* en el diciano-naftol y 5-ciano-2-naftol respectivamente.

*Arnaut y Formosinho (1988)* propusieron un modelo teórico para explicar las reacciones ESPT, a través de un estado de transición. *Chattopadhyay et al. (1989b)* estudiaron la dependencia con la temperatura de las ESPT del carbazol, indol y difenilamina en disolventes próticos (agua) y

aproticos (acetonitrilo), utilizando TCSPC con resolución de picosegundos, al objeto de demostrar que las reacciones ESPT son procesos dependientes de una barrera de energía de activación, y que ésta corresponde a un control por difusión. El efecto de diferentes medios microheterogéneos sobre las ESPT también proporciona aspectos interesantes al respecto; por ejemplo, ESPT en medios micelares y vesículas (*Davenport et al., 1986; Il'ichev et al., 1991; Solntsev et al., 1994; Varela et al., 1995b; Sarkar et al., 1996*), o en presencia de ciclodextrinas (*Chattopadhyay et al., 1990; Hansen et al., 1992*). En este sentido, *Yorozu et al. (1982)*, *Shizuka et al. (1985)* y *Eaton (1987)* encontraron que la reacción ESPT de naftoles y naftilaminas disminuye en presencia de ciclodextrinas con respecto a los fluoróforos en disolución.

Las ESPT han sido bastante empleadas como sondas estructurales de medios microheterogéneos, sondas para estudiar cambios conformacionales y estructurales de macromoléculas cuando el fluoróforo se emplea como etiqueta fluorescente (*Jankowski et al., 1992, 1995, 1998*), o en la detección de cambios de fase en liposomas (*Sujatha y Mishra, 1997*). *Davenport et al. (1986)* describieron medidas de la velocidad de las ESPT del fluoróforo dihidroequilenina como sonda para detectar las perturbaciones en la membrana de vesículas. Otros trabajos de ESPT en medios micelares, proponen éstas como sondas para estudiar el microambiente micelar como son los de *Politi et al. (1985)*, *Chattopadhyay et al. (1989)* o *Sarkar y Sengupta (1991)*. Un estudio reciente de *Jankowski et al. (1998)* comparó las ESPT del 2-hidroxinaftaldehído-1 con 1-hidroxinaftaldehído-4 y otros derivados del 2-naftol cuando se encuentran etiquetando proteínas a través de enlaces sulfonamida y dialquilamino, empleando la técnica de fase-modulación para la medida de los tiempos de vida. Describieron que el enlace y el tipo de grupo unido a la proteína influyen en gran medida en la cinética y el mecanismo de las reacciones ESPT. Así, por ejemplo, cuando el enlace es dialquilamino, al tratarse de un enlace corto, el ambiente de la proteína influye mucho. En

cambio, cuando el enlace a la proteína es de tipo sulfonamida, se producen mayores velocidades en la ESPT, en parte por la atracción de electrones del brazo del enlace.

Otra característica de estas reacciones bastante estudiada a lo largo de los últimos años es el efecto de los electrolitos sobre su cinética. De forma más o menos general, se ha observado que las velocidades de ESPT, cuando el agua es el aceptor de protones, descienden en presencia de electrolitos. La mayoría de las interpretaciones de estos estudios, presentan la necesidad de un aceptor protónico, que en general consiste en un *cluster* de moléculas de agua. *Huppert et al. (1982)* sugirieron que el descenso de la velocidad en la ESPT en presencia de electrolitos se debe principalmente a una disminución de las moléculas de agua libres necesarias para hidratar los iones  $H_3O^+$  creados con la disociación en el estado excitado, ya que estarían hidratando a los iones del electrolito. Para fotoácidos no excesivamente fuertes, *Lee et al. (1985)* propusieron un *cluster* de cuatro moléculas de agua funcionando como aceptor del protón; y posteriormente, Lee explicó la influencia de los electrolitos de forma similar a Huppert. *Lee (1989)* propuso igualmente que el decrecimiento en la velocidad de la ESPT debida a la presencia de electrolitos era consecuencia de una disminución de las moléculas de agua libres para la producción de las especies  $H_9O_4^+$  tras la desprotonación. Mientras que, sobre el mismo modelo de *clusters* de cuatro moléculas de agua como especie aceptora de protones, *Shizuka et al. (1986)* establecieron que la hidratación de los iones del electrolito producía la ruptura de *clusters*  $H_8O_4$ , disminuyendo así la velocidad de las ESPT. Por el contrario, *Suwaiyan et al. (1990)* encontraron un incremento en la velocidad de la reacción ESPT en presencia de pequeñas cantidades de electrolito. Para ácidos muy fuertes en el estado excitado ( $pK_a^* < 0$ ), se han propuesto especies dimeras de agua como los aceptores protónicos efectivos (*Tolbert y Haubrich, 1994; Htun et al., 1995*). En este tipo de fotoácidos, la desprotonación y reorientación del disolvente suceden a velocidades comparables, y todo lo que

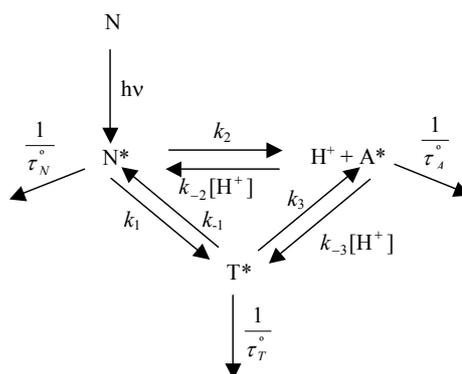
afecte a la estructura local del disolvente, como pueden ser los electrolitos, alterarán la cinética de la ESPT. *Htun et al. (1997)*, basándose en el modelo de dímeros de agua como aceptores, encontraron que la presencia de  $\text{CaCl}_2$  en mezclas metanol:agua produce un incremento en la velocidad de la reacción ESPT del 4-hidroxi-1-naftalensulfonato hasta una concentración 0.1 M, mientras que disminuye la velocidad por encima de esa concentración de electrolito. No obstante, la influencia de electrolitos en las cinéticas de las ESPT sigue presentando en la actualidad bastantes ambigüedades y contradicciones.

A principios de los años 90, surgen nuevas tendencias en los estudios sobre ESPT, abriéndose líneas de investigación aún vigentes. Los estudios teóricos y cálculos tanto semi-empíricos como *ab initio* dan paso a un interesante campo. Por ejemplo, se han realizado cálculos sobre las ESPT de cianonaftoles (*Tolbert y Haubrich., 1990*), las características fotofísicas de algunas  $\beta$ -carbolinas (*Dias et al., 1992*), o el estudio de la influencia de la fluoración en las ESPT de la salicilaldimina (*Forés y Scheiner, 1999*). Otro aspecto muy interesante, y que sigue muy en boga, es la aplicación de láseres pulsados con resolución de femtosegundos a las reacciones ESPT (*Wiechmann et al., 1990; Schwartz et al., 1992; Kim et al., 1995; Genosar et al., 2000*). Se han llegado a estudiar las ESPT del 2-naftol en agua supercrítica (*Ryan et al., 1996*).

Las  $\beta$ -carbolinas suponen un ejemplo claro de la diversificación de los trabajos sobre ESPT, en cuanto a derivados y diferentes condiciones estudiadas, junto con los relacionados con el 1- y 2-naftol. La extensa fotoquímica de las  $\beta$ -carbolinas ha dado lugar a una gran cantidad de trabajos durante los años 80 (*Sakurovs y Ghiggino, 1982; Vert et al., 1983; Ghiggino et al., 1985*) y 90 (*Dias et al., 1992; Pardo et al., 1992; Balón et al., 1993; Draxler y Lippitsch, 1993; Dias et al., 1996; Reyman et al., 1997, 1999*).

También, durante los años 90, se comenzaron a considerar sistemas más complejos con esquemas cinéticos más complicados. Hasta estas fechas, la

mayoría de los sistemas estudiados se componían de dos especies, ácido y base excitados. Sin embargo, el avance en los instrumentos de medida con resolución temporal y las herramientas informáticas, ha permitido por ejemplo detectar decaimientos triexponenciales o discriminar entre tiempos de decaimiento similares. Así, comenzaron a plantearse esquemas cinéticos de tres y cuatro especies excitadas, cuando previamente tan sólo se habían desarrollado algunos sistemas simulados de tres especies (*Buchberger et al., 1988; Sugar et al., 1991*). *Seixas de Melo y Maçanita (1993)* plantearon un método general de resolución del “triángulo fotocinético” (esquema I-6), un esquema en tres estados excitados donde no se descarta ninguna de las constantes de transformación entre las especies. Inicialmente lo aplicaron a la 7-hidroxi-4-metilcumarina, a su especie neutra, a su tautómero, sólo formado en estado excitado, y a la especie aniónica (esquema I-6). Los decaimientos de fluorescencia se caracterizan por ser triexponenciales. El método de solución general del sistema suponía el empleo como dato adicional del tiempo de decaimiento de un compuesto modelo y el ajuste de los tres tiempos de decaimiento y las razones de sus pre-exponenciales. *Seixas de Melo y Maçanita (1993)* remarcan la necesidad de obtener decaimientos con una excepcional exactitud, por ejemplo, los decaimientos que recogieron contenían 20000 cuentas en el canal del máximo, frente al valor típico de 10000.



**Esquema I-6:** Esquema del triángulo fotocinético general, aplicado a las especies aniónica, neutra y tautomérica de la 7-hidroxi-4-metilcumarina (Seixas de Melo y Maçanita, 1993).

Otros sistemas de reacciones ESPT de tres y cuatro especies excitadas se intentaron resolver en estos años. *Dias et al. (1996)* plantearon un esquema cinético de tres estados para la harmina, otra  $\beta$ -carbolina, basando su resolución en el triángulo cinético de *Seixas de Melo y Maçanita (1993)*. Otros sistemas de tres estados excitados son por ejemplo el trabajo de *Reyman et al. (1997)* sobre el norharmano, o el de *Wenska et al. (1997)* con el cloruro de 1-(purin-6-il)-3-metilimidazol. Se han intentado resolver algunas reacciones de transferencia protónica en el estado excitado con cuatro especies excitadas implicadas, pero la complejidad de los sistemas, la dificultad de discriminar tiempos de decaimiento similares, etc. resultan factores muy limitantes. *Bardez et al. (1992)* plantearon una fototautomerización biprotónica con cuatro especies para la 4-metilumbeliferona mediante medidas de fase-modulación multifrecuencial. El esquema se basó en uno propuesto varios años antes por *Schulman y Rosenberg (1979)* para este compuesto. Por otro lado, *Draxler y Lippitsch (1993)* intentaron resolver un sistema de cuatro especies para el norharmano, sin embargo el gran número de constantes cinéticas que pretendieron obtener, alrededor de veinte, hace que los valores a los que llegaron fueran tan solo estimativos. El ajuste de tal cantidad de parámetros da lugar a correlaciones

excesivamente grandes entre ellos, de forma que estos autores reconocen que de algunas de las constantes tan solo podían calcular sus límites superiores. *Varela et al. (1995a)* y *Dias et al. (1996)*, en trabajos también sobre el norharmano y otras  $\beta$ -carbolinas, demostraron igualmente las carencias del tratamiento de *Draxler y Lippitsch (1993)*.

Nuevas y completas revisiones sobre cinéticas de ESPT siguen realizándose durante los años 90, destacando la importancia creciente de este tipo de procesos en el estado excitado, y el amplio desarrollo que siguen adquiriendo. Entre ellos, destacan los de *Arnaut y Formosinho (1993)* sobre reacciones ESPT intermoleculares, y *Formosinho y Arnaut (1993)* sobre ESPT intramoleculares. Más tarde, *Bardez (1999)* realizó otra revisión de estos procesos en fluoróforos bifuncionales.

*Lima et al. (1998)* midieron a finales de esta década la mayor, hasta esa fecha, constante de desprotonación en el estado excitado hacia moléculas de agua comoceptoras, alcanzando un valor de  $1.4 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$  para el catión 7-hidroxi-4-metilflavilio. Los trabajos respecto a sales del ión flavilio (2-fenilbenzopirilio) tienen interés por su relación con productos naturales como las antocianinas. El ión estudiado por *Lima et al. (1998)* presenta únicamente dos formas prototrópicas, lo que simplifica su comportamiento frente a otras antocianinas. *Lima et al.* emplean para resolver la cinética de este proceso en estado excitado el hecho de que la emisión de la base en estado excitado, cuando sólo se excita la forma ácida, es la convolución de la emisión de la forma ácida con los procesos de desactivación de la base, que serán la cinética de emisión de fluorescencia y la cinética de protonación en estado excitado, según la ecuación I-7.

$$I_A(t) = k_d \left[ I_{AH}(t) \otimes e^{-\gamma t} \right] \quad (\text{I-7})$$

En esta ecuación,  $k_d$  es la constante cinética de desprotonación en el estado excitado,  $I_A(t)$  e  $I_{AH}(t)$  son las emisiones de las formas básica y ácida

respectivamente, mientras que  $Y$  engloba la cinética de emisión de A y la protonación de la forma básica ( $Y = k_A + k_p[\text{H}^+]$ ). El símbolo  $\otimes$  expresa convolución. El análisis de deconvolución de la emisión de la base con la de la forma ácida, proporcionará ajustes monoexponenciales, cuyo tiempo de decaimiento corresponderá a  $1/Y$ . La representación de diferentes valores de  $Y$ , así obtenidos, frente a  $[\text{H}^+]$  proporciona los valores de  $k_A$  y  $k_p$ . El empleo de este método (Conte y Martinho, 1987; Lakowicz, 1999) ayuda en ocasiones a resolver ciertas cinéticas en el estado excitado muy difíciles de solucionar por otros métodos, como por ejemplo, la de formación de excímeros (Vigil et al., 1998).

Usualmente, la forma de obtener los valores de las constantes cinéticas a través de los decaimientos de fluorescencia se basa en análisis globales por reconvolución iterativa. En ellos, se relacionan los tiempos de decaimiento y pre-exponenciales asociados con un determinado modelo cinético. Estos análisis en dos pasos han sido los más empleados en la determinación de cinéticas de ESPT, sin embargo, se han desarrollado otras estrategias, como son la introducción en fotofísica del análisis global compartimental (Ameloot et al., 1992). Como se tratará en un apartado posterior (sección I.5.2.2), el análisis global compartimental de una superficie de decaimientos de fluorescencia permite resolver cinéticas en estado excitado y obtener parámetros espectroscópicos en un solo paso. Este tipo de análisis ha sido aplicado a reacciones de transferencia protónica en el estado excitado en escasas ocasiones. Por ejemplo, una de las primeras aplicaciones, y que sirvió de “validación” de este tipo de análisis fue el estudio de la ESPT del 2-naftol/naftolato (Beechem et al., 1985; Van den Bergh et al., 1992), donde se obtuvieron resultados análogos a los descritos previamente en la bibliografía. Otra aplicación reciente del análisis global compartimental en una ESPT lo encontramos en la reacción entre las especies monoaniónica y dianiónica de la fluoresceína cuando el ácido N-

acetilaspártico funciona como aceptor/dador protónico en el estado excitado (Crovetto *et al.*, 2004).

En los últimos años continúan ampliándose las investigaciones sobre las reacciones ESPT en multitud de fluoróforos, así como el efecto de grupos sustituyentes y en distintas condiciones experimentales. Por ejemplo, Mirończyk y Jankowski (2002) han tratado la influencia sobre la ESPT del 2-naftol con sustituyentes atractores de electrones, con un brazo espaciador y un grupo carboxilo, en diferentes medios alcohólicos y en mezclas alcohol:agua. Para ello, utilizan un método basado en las ecuaciones de Weller y la medida de los tiempos de vida mediante las técnicas de fase-modulación y TCSPC.

La proliferación de métodos numéricos para cálculos semi-empíricos y *ab initio* se ha traducido en un gran número de publicaciones y trabajos en torno a reacciones ESPT. Por ejemplo, se citarán las simulaciones de superficies de potencial en ESPT de Cukier y Zhu (1999), los trabajos sobre oxacinas de Grofcsik *et al.* (2000), o sobre los derivados de la salicilaldimina (Forés y Scheiner, 1999; Forés *et al.*, 2000). Purkayastha *et al.* (2000) correlacionaron, mediante métodos semi-empíricos, los valores de  $pK_a^*$  del carbazol y algunos derivados, con la densidad de carga del centro ácido.

Los “súper-fotoácidos”, las reacciones ESPT ultrarrápidas con fenómenos transitorios, y la adecuación a la ecuación de Debye–Smoluchowski, siguen estudiándose (Solntsev *et al.*, 2000; Cohen y Huppert, 2001; Clower *et al.*, 2002). Una revisión de Tolbert y Solntsev (2002) incluye estas reacciones ultrarrápidas y los diversos fenómenos que se producen durante las ESPT (ruptura y formación de los enlaces de H, reorganización del disolvente, disociación del protón y finalmente difusión y/o recombinación del protón). La instrumentación, cada vez más potente, con resolución de femtosegundos ha obligado en muchas ocasiones a replantear los mecanismos y características de las ESPT. La posibilidad de detectar etapas cada vez más rápidas ha revelado diferentes fenómenos de crucial importancia para estas reacciones y que,

mediante técnicas anteriores no se tenían en cuenta. En las desprotonaciones en el estado excitado ultrarrápidas se han atribuido tiempos de unos cientos de femtosegundos a efectos de hidratación del disolvente tras la desprotonación. Estos fenómenos pasan desapercibidos cuando la resolución temporal es menor (*Elaesser, 1995*). Un ejemplo de esto lo muestran *Tran-Thi et al. (2000)* y *Hynes et al. (2002)* con sus experimentos con ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico (piranina). Estos autores encontraron tres tiempos diferentes en la desprotonación de la piranina. El más corto, alrededor de 300 fs, puede atribuirse típicamente a la reorganización del disolvente alrededor del fluoróforo excitado en la transición Franck-Condon inicial  $S_0 \rightarrow S_1$ ; un segundo tiempo de unos 2.2 ps, que presenta cierta incertidumbre en su interpretación, y el tercer tiempo, de 87 ps, que está relacionado con la desprotonación en sí misma, siendo consistente con los resultados previos de *Pines y Huppert (1986a)*, apareciendo el efecto de la recombinación difusiva de los  $H_3O^+$  con el fluoróforo. También, mediante fluorimetría con resolución temporal, a través de la técnica TCSPC con un láser de femtosegundos, *Shiobara et al. (2002)* han estudiado recientemente las reacciones ESPT de derivados de anilina en disoluciones acuosas, y el efecto de sustituyentes alquilo sobre la cinética de la reacción. Encontraron un tiempo de desprotonación de estas anilinas protonadas de 70 ps, la cinética más rápida encontrada hasta la fecha para aminas protonadas.

También continúan los estudios sobre ESPT de fluoróforos en medios micelares (*Pina et al., 2001; Cohen et al., 2002; Giestas et al., 2003*), liposomas, bicapas lipídicas (*Pappayee y Mishra, 2000*), ciclodextrinas (*Abdel-Shafi 2001*), medios fuertemente ácidos (*Yang y Schulman, 2001, 2003*), agregados de polímeros con tensoactivos (*Dutta et al., 2002*), etc. A este respecto, *Mishra (2001)* publicó una revisión de ESPT de diversos fluoróforos en medios organizados, y su empleo como sondas del comportamiento de estos medios. A este respecto, es un buen ejemplo el reciente y completo trabajo de

*Chattopadhyay (2003)* sobre la ESPT del carbazol como medio para estudiar medios microheterogéneos. En este trabajo, basándose en sus estudios precedentes en micelas catiónicas, neutras y aniónicas (*Chattopadhyay et al., 1989*), exponen la posibilidad de emplear la ESPT del carbazol para calcular la concentración micelar crítica de varios sistemas micelares, y estudiar el efecto de la diferente carga superficial de las micelas sobre la ESPT y la consecuencia de la adición de urea al sistema micelar. Igualmente, tratan el comportamiento del carbazol en presencia de ciclodextrinas, encontrando que la reacción ESPT se acelera con respecto al fluoróforo libre. Esto contrasta con el comportamiento de otros fluoróforos los cuales, en presencia de ciclodextrinas, ven reducida la velocidad de la ESPT.

Las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado se han aprovechado recientemente para idear un sistema de fotólisis de destello con el que calcular las constantes de protonación y desprotonación en el estado fundamental, habiéndose obtenido también las constantes cinéticas en el estado excitado. Se ha aplicado a antocianinas sintéticas (*Maçanita et al., 2002*) y naturales (*Moreira et al., 2003*).

Otra aportación muy reciente es el descubrimiento de algunos “superfotóacidicos”, como el 5,8-diciano-2-naftol, que presentan cinéticas de ESPT diferentes en disolventes quirales, como el 2-butanol, según se trate de un enantiómero puro o de la mezcla racémica (*Solntsev et al., 2002*).

#### I.4.2.- Reacciones ESPT en presencia de un aceptor/dador protónico.

En el apartado anterior se ha realizado un recorrido a lo largo de los años sobre las investigaciones en reacciones ESPT. Se han incluido a grandes rasgos los diferentes aspectos que se han tratado en cuanto a fluoróforos, aplicaciones y factores que afectan a estas reacciones. En el apartado que a continuación se desarrolla, y por su relación con el tema tratado en esta Memoria, se recogen diferentes aportaciones respecto a la influencia de

aceptores/dadores protónicos en las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado.

Las ESPT necesitan de un aceptor/dador protónico adecuado para mediar la reacción. Las desprotonaciones en estado excitado hacia el agua, en general, pueden considerarse de primer orden con respecto al fluoróforo, al funcionar el exceso de moléculas de agua como aceptores. Sin embargo, se ha citado en el apartado anterior, que en otras situaciones, *clusters* de agua como  $H_8O_4$  o  $H_4O_2$  funcionan como aceptores protónicos. Esto puede ser de relevante importancia en medios fuertemente ácidos y en presencia de electrolitos.

La presencia de otros aceptores/dadores protónicos en la disolución, tales como las especies de un tampón, puede afectar a la cinética y al mecanismo de la ESPT. Esta situación es bastante común, ya que los sistemas amortiguadores del pH se suelen emplear en cualquier aplicación fluorimétrica, incluso a altas concentraciones. Siendo en este caso la probabilidad de reacción del fluoróforo excitado con las especies de la disolución reguladora mayor que la probabilidad de reacción con los iones  $OH^-$  o  $H^+$ . Por tanto, el estudio del efecto de estos aceptores/dadores protónicos en las ESPT es un campo de bastante relevancia, en cuanto a que pueden suponer graves interferencias en aplicaciones fluorimétricas y promover o alterar transferencias protónicas en el estado excitado.

Weller ya trató la influencia de las especies de un tampón en las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado (*Weller, 1954, 1958*). En una revisión posterior de *Martynov et al. (1977)* recogieron también el efecto de las especies de un tampón en las ESPT.

*Laws y Brand (1979)* estudiaron el efecto de aceptores protónicos, como acetato, fosfato o carbonato, en la ESPT del 2-naftol/naftolato. El modelo cinético seguido por Laws y Brand constaba de dos especies excitadas ( $1^*$  y  $2^*$ ), considerando la existencia de la desprotonación en el estado excitado unimolecular de  $1^*$ , cuya constante de velocidad fue denominada  $k_{21}$ , así como

la existencia de desprotonación bimolecular promovida por la especie R del aceptor protónico, y cuya cinética tenía una constante de velocidad llamada  $k_{21}^b$ . Asimismo, las constantes cinéticas de las protonaciones bimoleculares en estado excitado de la especie  $2^*$  a través de los protones y la especie RH del aceptor/dador protónico fueron denominadas respectivamente  $k_{12}$  y  $k_{12}^b$ . Por tanto, las ecuaciones del modelo cinético seguido por *Laws y Brand (1979)* vienen dadas por:

$$\frac{-d[1^*]}{dt} = (k_{01} + k_{21} + k_{21}^b[R])[1^*] - (k_{12}[H^+] + k_{12}^b[RH])[2^*] \quad (I-8)$$

$$\frac{-d[2^*]}{dt} = (k_{02} + k_{12}[H^+] + k_{12}^b[RH])[2^*] - (k_{21} + k_{21}^b[R])[1^*] \quad (I-9)$$

Estas ecuaciones tienen la misma forma que el modelo cinético que se tratará en el apartado siguiente. De la misma forma, este modelo supone una ley de decaimiento biexponencial, pero en esta ocasión, tanto los tiempos de decaimiento como los pre-exponenciales dependerán de  $[H^+]$  y de las concentraciones de R y RH. Por tanto, al estar relacionadas estas especies a través de las ecuaciones I-10 y I-11, dependerán del pH, del  $pK_a$  del tampón RH/R y de la concentración total del aceptor/dador protónico ( $C^{buff}$ ).

$$[R] = C^{buff} \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad (I-10)$$

$$[RH] = C^{buff} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (I-11)$$

Así, los tiempos de vida de los decaimientos biexponenciales vendrán dados por la ecuación siguiente:

$$-\frac{1}{\tau_{1,2}} = \frac{X + Y \pm \sqrt{(Y - X)^2 + 4(k_{21} + k_{21}^b[R])(k_{12}[H^+] + k_{12}^b[RH])}}{2} \quad (I-12)$$

siendo:

$$X = k_{01} + k_{21} + k_{21}^b [R] \quad (I-13)$$

$$Y = k_{02} + k_{12} [H^+] + k_{12}^b [RH] \quad (I-14)$$

Laws y Brand (1979) proponían para obtener las constantes cinéticas de las reacciones ESPT del sistema 2-naftol/naftolato, en presencia de aceptores/dadores protónicos, la representación de la suma  $\gamma_1 + \gamma_2$ , con  $\gamma_i = -1/\tau_i$ , frente a  $[H^+]$ ,  $[R]$  y  $[RH]$ . Esta suma ( $\gamma_1 + \gamma_2$ ) viene dada por la ecuación I-15:

$$\gamma_1 + \gamma_2 = k_{01} + k_{02} + k_{21} + k_{12} [H^+] + k_{21}^b [R] + k_{12}^b [RH] \quad (I-15)$$

Sin embargo, esta propuesta es errónea. En realidad las concentraciones de  $H^+$ , R y RH están siempre relacionadas, a través de las ecuaciones I-10 y I-11, y debido a esto, no se podrá realizar, por ejemplo, una representación de  $\gamma_1 + \gamma_2$  frente a  $[H^+]$ , dejando constantes  $[R]$  y  $[RH]$ , ya que estas concentraciones se verán modificadas al alterarse la de protones. En efecto, sustituyendo las ecuaciones I-10 y I-11 en la ecuación I-15 se obtiene:

$$\begin{aligned} \gamma_1 + \gamma_2 = & k_{01} + k_{02} + k_{21} + k_{12} [H^+] + \\ & + k_{21}^b C^{buff} \frac{K_a}{K_a + [H^+]} + k_{12}^b C^{buff} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \end{aligned} \quad (I-16)$$

En esta ecuación I-16, se puede observar la no-linealidad de la suma  $\gamma_1 + \gamma_2$  frente a la concentración protónica. Únicamente, si a cada pH estudiado se hace  $C^{buff} = K_a + [H^+]$ , la representación de  $\gamma_1 + \gamma_2$  frente a  $[H^+]$  sería lineal, obteniéndose en cualquier caso a través de la pendiente  $k_{12} + k_{12}^b$ , en lugar de  $k_{12}$  como afirmaban Laws y Brand.

De la misma forma se puede concluir que las representaciones de  $\gamma_1 + \gamma_2$  frente a  $[R]$  o  $[RH]$ , manteniendo el resto de los parámetros constantes son imposibles. Sin embargo, aunque la propuesta de obtención de las constantes cinéticas no fue la correcta, el modelo cinético sí que se ajusta a las características del comportamiento de estos sistemas, y es el que sigue

utilizándose para estas ESPT en presencia de un aceptor/dador protónico (Álvarez-Pez *et al.*, 2001; Crovetto *et al.*, 2004; Boens *et al.*, 2004).

Posteriormente, continuó investigándose otros sistemas de fluoróforos que presentan ESPT y el efecto de aceptores/dadores protónicos sobre éstas. Por ejemplo, Davenport *et al.* (1986) estudiaron las reacciones de transferencia protónica en estado excitado de *d*-equilenina y dihidroequilenina, tanto en disolución como en vesículas. Estos autores también analizaron el efecto de la adición de acetato, actuando como aceptor/dador protónico. El estudio en vesículas resulta bastante interesante ya que, a los resultados obtenidos por las técnicas de fluorimetría en estado estacionario y fluorimetría con resolución temporal mediante TCSPC, adicionan medidas de anisotropía de fluorescencia, y estas medidas de anisotropía ayudan a discernir la localización y comportamiento del fluoróforo en medios organizados. Davenport *et al.* (1986) encuentran que, al igual que en otros sistemas, la adición de un aceptor/dador protónico a la concentración adecuada acelera la reacción ESPT. Sin embargo, en vesículas, esta aceleración no es tan notable, ya que hay una serie de fluoróforos libres y, por tanto, accesibles al aceptor/dador protónico, mientras que hay otros que están adsorbidos a las vesículas, y no resultan accesibles al acetato. Encontraron además, que el contenido en colesterol de las membranas de las vesículas afectaba a esta accesibilidad, y este efecto plantea una posible aplicación, al poder emplearse la ESPT como indicador del contenido en colesterol de las membranas.

Una visión diferente del efecto de aceptores protónicos en las ESPT la dieron Goldberg *et al.* (1992). En el tratamiento de desprotonaciones ultrarrápidas de fotoácidos, en las cuales la recombinación del protón saliente con la base en estado excitado es un fenómeno de relevancia, la adición de sustancias aceptoras de protones consigue reducir la reprotonación, favoreciendo la desprotonación del fotoácido.

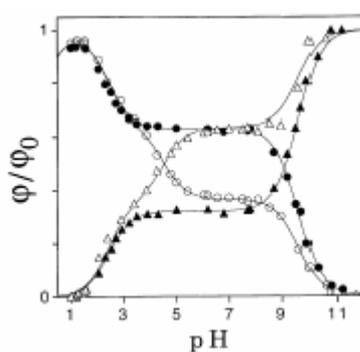
*Melo et al. (1996)* desarrollaron unas expresiones teóricas, derivadas de las ecuaciones de Weller, para cuantificar las constantes cinéticas de las reacciones ESPT en presencia de tampones a través de las curvas de valoración de fluorescencia. En ellas consideraban tanto las ESPT adiabáticas por su rapidez, como los efectos no adiabáticos de las especies del tampón. Las aplicaron a las ESPT del fenol, 1- y 2-naftol y a la acridina.

El efecto de las especies de un aceptor/dador protónico sobre las reacciones de transferencia protónica de un fluoróforo tan común y empleado en diversas aplicaciones, como es la fluoresceína, ha sido objeto de estudio de nuestro grupo de investigación (*Yguerabide et al., 1994; Álvarez-Pez et al., 2001; Crovetto et al., 2002, 2004; Boens et al., 2004*), aunque esto se tratará en el epígrafe siguiente. Además, en una serie de resultados preliminares de esta Memoria, ya se comprobó que el tampón HAc/Ac<sup>-</sup> promueve la reacción ESPT entre las especies monoaniónica y dianiónica de la 2',7'-difluorofluoresceína (*Orte et al., 2002*).

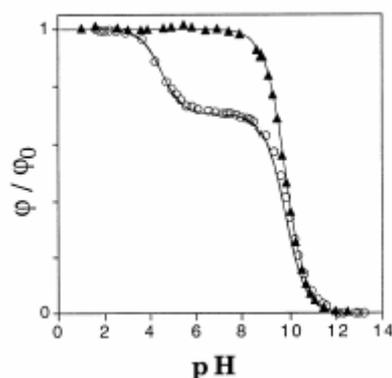
En determinadas condiciones, la alta concentración de aceptor protónico, en transferencias protónicas bimoleculares en el estado excitado, hace notable el control por difusión de las velocidades de la reacción. *Pines et al. (1997)* estudiaron este efecto en transferencias protónicas hacia el ión acetato, de varios fotoácidos (1-naftol, 2-naftol y derivados, 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato, 1-hidroxipireno, etc.), empleando dos diferentes concentraciones de tampón acetato, 8 y 1 M. En este trabajo, publican uno de los valores más altos de constantes cinéticas bimoleculares en transferencias protónicas en el estado excitado:  $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para el 5-ciano-1-naftol, el cual deriva en un tiempo de decaimiento de alrededor de 5 ps.

Los aceptores/dadores protónicos también pueden influir en otro tipo de transferencias protónicas en el estado excitado como son las intramoleculares o las fototautomerizaciones formando complejos de transición (*Koziolowa et al., 1996; Sikorska y Koziolowa, 1996*).

Una aplicación más reciente de las ESPT mediadas por las especies de un aceptor/dador protónico la encontramos en el diseño de quimiosensores (Pina *et al.*, 1999). Estos autores proponen el uso de un aceptor/dador protónico para controlar la eficiencia de la señal fluorescente, de tal manera que a través de diferentes concentraciones del aceptor/dador protónico se puede seleccionar la eficiencia requerida, crear esquemas de quimiosensores de tres niveles (figuras I-22 y I-23) y en definitiva, emplear estos fluoróforos como sondas de pH o indicadores de la concentración de un aceptor/dador protónico.

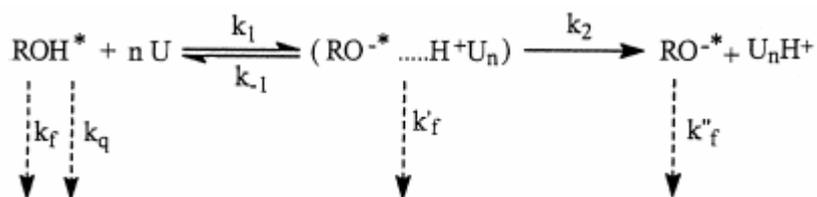


**Figura I-22:** Curvas de valoración normalizadas de emisión de fluorescencia del 2-naftol: (●) forma ácida en ausencia de tampón, (▲) forma básica en ausencia de tampón, (○) forma ácida en presencia de tampón acetato 0.1 M, (△) especie básica con tampón acetato 0.1 M (Pina *et al.*, 1999).



**Figura I-23:** Curva de valoración de emisión de fluorescencia del fenol en ausencia (▲) y presencia (○) de tampón acetato 0.1 M (Pina et al., 1999).

Además de las especies de un tampón, se han empleado otros aceptores protónicos, como por ejemplo la urea que es uno de los más utilizados. Htun ha estudiado la desprotonación en el estado excitado del 4-hidroxi-1-naftalensulfonato (Htun et al., 1998), del 1-naftol (Htun, 2000) y la piranina (Htun, 2003), en metanol como disolvente, actuando la urea como aceptor protónico. El mecanismo planteado por Htun es el que se muestra en el esquema I-7. Htun encontró reversibilidad de la reacción ESPT debida a la recombinación del par iónico fluoróforo excitado...urea tras la desprotonación.



**Esquema I-7:** Esquema de ESPT del 1-naftol, con urea como aceptor protónico, en metanol (Htun, 2000).

En resumen, la presencia de un aceptor/dador protónico adecuado favorece las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado. Tanto

el modelo inicial con el que *Laws y Brand (1979)* estudiaron el 2-naftol, como la visión más moderna de *Goldberg et al. (1992)*, describen el efecto “acelerador” que produce el aceptor/dador protónico sobre las reacciones ESPT.

#### I.4.3.- Reacciones ESPT de la fluoresceína.

Por analogía con el compuesto sobre el que trata esta Memoria, la 2',7'-difluorofluoresceína, las reacciones ESPT encontradas en bibliografía sobre la fluoresceína pueden resultar de bastante interés, ya que, tanto los equilibrios prototrópicos, como las características espectroscópicas de ambas moléculas son muy parecidos.

Ya por los años 60 *Rozwadowski (1961)* encontró diferencias en los cambios de los perfiles espectrales con el pH en disoluciones acuosas de fluoresceína, y se percibían modificaciones entre los valores de los sucesivos  $pK_a$  de los estados fundamental y excitado.

Una reacción ESPT muy evidente en la fluoresceína es la rápida desprotonación de la forma catiónica hacia las especies más básicas. Ya coincidieron en esta descripción *Rozwadowski (1961)*, *Leonhardt et al. (1971)*, y *Martin y Lindqvist (1975)*. *Guyot et al. (1975)* llegaron a cuantificar el  $pK_a^*$  de la reacción mediante el ciclo de Förster, obteniendo un valor de -2. Sin embargo, fueron los estudios de *Shah et al. (1983, 1984)* y *Shah y Pant (1985)* los primeros que analizaron con detalle esta ESPT. En la zona de pH más ácido, mientras que los espectros de absorción se mantenían invariables, encontraron dos bandas de emisión, que asignaron a las emisiones del catión, con máximo a 480 nm, y a la especie neutra, con máximo centrado en 515 nm (*Shah et al., 1983*). Posteriormente, *Shah et al. (1984)* plantearon, para el estudio cinético de la ESPT, un modelo simple en dos estados excitados. Las constantes cinéticas ( $k_p$  para la constante cinética de segundo orden de protonación en el estado excitado, y  $k_d$  para la constante de primer orden de desprotonación en dicho estado) fueron calculadas a través de una simplificación de las ecuaciones de

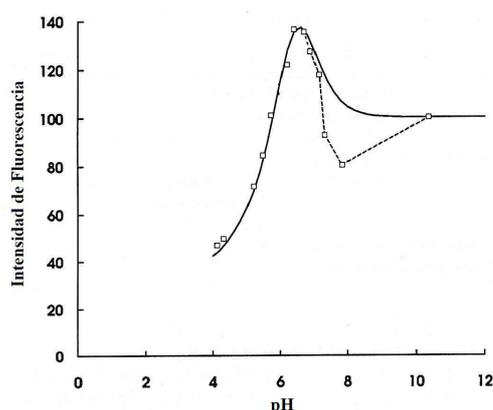
velocidad, ya que si el pH es mucho más bajo que el  $pK_a^*$  entonces no habrá reacción ESPT, y el  $\tau$  corresponderá al decaimiento del catión solo ( $\tau = 1/k_{0C}$ ). Conforme disminuye la concentración de ácido el término  $k_p[H_3O^+]$  se va haciendo despreciable, y el decaimiento viene definido por un tiempo de vida:  $\tau' = 1/(k_{0C} + k_d)$ . Así, calculan la constante de desprotonación  $k_d$  por simple diferencia entre  $\tau$  y  $\tau'$ , obteniendo un valor de  $2.6 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ . Adicionalmente, evalúan  $k_d$  por medio de las ecuaciones de *Weller (1952)*, y determinan un valor un orden de magnitud mayor que el encontrado por medidas de tiempos de vida. Esta discrepancia la atribuyen a un “*quenching* configuracional” en el catión, simultáneo a la reacción ESPT. Asimismo, los autores afirman que no es posible calcular el  $pK_a^*$  del catión basándose en la existencia de múltiples formas neutras, como la forma lactónica, y así, determinan el  $pK_a^*$  a través del ciclo de Förster (ecuación I-6), obteniendo un valor de -1.3.

El procedimiento seguido por estos autores no está libre de ambigüedades, tanto por las aproximaciones que realizan, como por la escasa cantidad de medidas de tiempos de decaimiento y la mayor dificultad experimental presente debida al empleo de la técnica de fase-modulación. Para su determinación, *Shah y Pant (1985)* posteriormente, continuaron sus investigaciones utilizando la técnica del conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) aplicada a la reacción ESPT de la forma catiónica de la fluoresceína. Plantearon un esquema cinético reversible en dos estados excitados. La solución teórica de las ecuaciones cinéticas supone la presencia de decaimientos biexponenciales. Sin embargo, en disolución acuosa de ácido sulfúrico y perclórico, los decaimientos que estos autores obtuvieron eran monoexponenciales, debido probablemente a que la resolución del instrumento no era la adecuada, ya que si la especie catiónica de la fluoresceína es un “super-fotoácido”, el tiempo de vida corto sería bastante pequeño, con lo que si el instrumento no era adecuado, este tiempo no se detectaría. Para reducir la cinética de la reacción *Shah y Pant (1985)* la estudiaron en mezclas

glicerol:agua, de forma que la mayor viscosidad de las disoluciones redujera las constantes difusionales. Efectivamente, en un 60% de glicerol, los autores obtuvieron un tiempo de decaimiento corto de 300 ps. Así, calcularon los valores de las constantes cinéticas para diferentes mezclas glicerol:agua, con distinta viscosidad total, de forma, que por extrapolación a la viscosidad de la disolución acuosa obtuvieron unos valores de  $3.5 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$  para la desprotonación y  $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para la reprotonación, lo que significaba un valor de  $pK_a^*$  de -0.6, en contraste con el de -1.3 obtenido por el ciclo de Förster.

Nuestro grupo de investigación, ha venido durante años estudiando las reacciones de transferencia protónica de la fluoresceína, especialmente entre las especies monoaniónica y dianiónica. Debido al amplio espectro de aplicación de la fluoresceína en bioquímica y su relevancia como fluoróforo, el conocimiento de estas reacciones supone una inestimable ayuda en la interpretación de los resultados de fluorescencia. Así, *Yguerabide et al. (1994)* describieron que la ESPT entre el monoanión y el dianión únicamente se produce en presencia de un aceptor/dador protónico adecuado, mientras que si no existe éste, ambas formas prototrópicas actúan como fluoróforos independientes. Plantearon una metodología general mediante fluorimetría en estado estacionario para cuantificar esta reacción, y fue aplicada a la ESPT entre el dianión y el monoanión promovida por las especies del tampón fosfato. Mediante ajuste no lineal por mínimos cuadrados a la ecuación I-17 de los datos de fluorescencia en estado estacionario, en presencia de fosfatos 1 M, se obtuvo un  $pK_a^*$  de 6.31 (figura I-24). En esta ecuación, los factores  $\phi_M$  y  $\phi_D$  están relacionados con los rendimientos cuánticos de cada especie, aunque su valor numérico es relativo a los de intensidad de fluorescencia.

$$I = \frac{A\phi_M}{1 + 10^{pH - pK_M^*}} + \frac{A\phi_D}{1 + 10^{pK_M^* - pH}} \quad (\text{I-17})$$



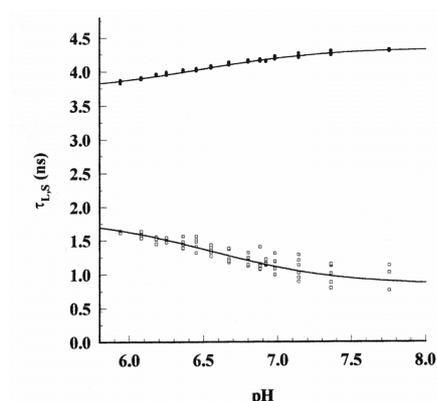
**Figura I-24:** Intensidad de fluorescencia ( $\square$ ) frente al pH de disoluciones de fluoresceína a alta concentración de tampón de fosfatos (1 M). La concentración de fluoresceína fue de  $10^{-6}$  M y las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 437 y 512 nm respectivamente. La línea sólida sobre los puntos experimentales fue calculada con la ecuación I-17, y los parámetros  $pK_M^* = 6.31$ ,  $\phi_M = 0.188$  y  $\phi_D = 1$ , y la absorbancia calculada con:  $pK_C = 2.19$ ,  $pK_N = 4.4$ ,  $pK_M = 6.48$ ,  $\epsilon_C = 49800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_N = 11600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_M = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_D = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Yguerabide et al., 1994).

Posteriormente, Ballesteros (1998) y Álvarez-Pez et al. (2001) proponen el modelo cinético de la reacción ESPT entre el monoanión y dianión incluyendo, tanto la reacción facilitada por las especies del aceptor/dador protónico, como la ESPT del monoanión hacia el disolvente, agua, así como la reacción de reprotonación bimolecular en el estado excitado del dianión. Mediante fluorimetría con resolución temporal de nanosegundos resuelven la cinética de la ESPT entre el monoanión y dianión promovida por las especies del tampón fosfato 1 M. La metodología se basa en ajustes globales no lineales por mínimos cuadrados de los tiempos de decaimiento, de acuerdo con las ecuaciones derivadas del modelo cinético. La tabla IV recoge los resultados de las constantes cinéticas obtenidas, mientras que la figura I-25 muestra estos ajustes.

**Tabla IV:** Constantes cinéticas para la ESPT entre el monoanión y dianión de la fluoresceína en presencia de tampón de fosfatos 1 M.<sup>ⓐ</sup>

$\tau_D$ (ns)	$\tau_M$ (ns)	$k_{DM}$ (ns <sup>-1</sup> )	$k_{MD}$ (M <sup>-1</sup> ns <sup>-1</sup> )	$k_{DM}^b$ (M <sup>-1</sup> ns <sup>-1</sup> )	$k_{MD}^b$ (M <sup>-1</sup> ns <sup>-1</sup> )
4.34±0.02	3.70±0.03	(2.6±1.3)×10 <sup>-3</sup>	0 <sup>ⓑ</sup>	0.92±0.04	0.304±0.009
$pK_a^* = 6.4^{\text{ⓐ}}$					

<sup>ⓐ</sup> *Álvarez-Pez et al., 2001.*  
<sup>ⓑ</sup> Tendió a cero en el proceso de ajuste.  
<sup>ⓐ</sup> Calculado en la zona de concentraciones constantes en equilibrio de [M\*] y [D\*].

**Figura I-25:** Tiempos de decaimiento largo ( $\tau_L$ , ●) y corto ( $\tau_S$ , □) para disoluciones de fluoresceína en presencia de tampón de fosfatos, obtenidos mediante análisis global. Las líneas representan los tiempos de decaimiento calculados con los valores de las constantes cinéticas determinadas por *Álvarez-Pez et al. (2001)*.

Hay otras sustancias que actúan como aceptores/dadores protónicos adecuados para mediar la ESPT entre las especies mono y dianiónica. Una de ellas es el ácido N-acetilaspártico (*Crovetto et al., 2002; Crovetto, 2003*). *Crovetto et al., (2004)* han determinado las constantes cinéticas de esta ESPT, en presencia de ácido N-acetilaspártico 1 M, empleando la metodología propuesta por *Yguerabide et al. (1994)* para la fluorescencia en estado estacionario, así como por la técnica de fluorimetría con resolución temporal. La cinética de este proceso se resuelve empleando el análisis global compartimental, siendo precisamente la resolución de este modelo una

importante novedad en el ámbito del análisis global compartimental. Los valores de las constantes cinéticas obtenidas por *Crovetto et al. (2004)* se muestran en la tabla V.

**Tabla V:** Constantes cinéticas para la ESPT entre el monoanión y dianión de la fluoresceína en presencia de ácido N-acetilaspártico 1 M.<sup>•</sup>

$k_{0M} + k_{DM}$ (ns <sup>-1</sup> )	$k_{0D}$ (ns <sup>-1</sup> )	$k_{MD}$ (M <sup>-1</sup> ns <sup>-1</sup> )	$k_{DM}^b$ (M <sup>-1</sup> ns <sup>-1</sup> )	$k_{MD}^b$ (M <sup>-1</sup> ns <sup>-1</sup> )
0.2765±0.004	0.231 <sup>•</sup>	0 <sup>•</sup>	0.0336±0.0015	0.012±0.0015

<sup>•</sup> *Crovetto et al., 2004.*  
<sup>•</sup> Mantenidas fijas durante el proceso de ajuste.

## I.5.- MÉTODOS DE ANÁLISIS.

### I.5.1.- Análisis no lineal por mínimos cuadrados (NLLS).

En la actualidad, el análisis no lineal por mínimos cuadrados (NLLS) es una herramienta de ajuste que se ha desarrollado ampliamente con el uso de los ordenadores, y se viene utilizando frecuentemente en todas las ramas de la ciencia, habiendo sustituido en gran medida a los métodos clásicos de evaluación de parámetros mediante linealizaciones o métodos gráficos. En la presente Memoria, el análisis NLLS es un método que se emplea en dos vertientes diferentes: una primera en el ajuste de datos espectroscópicos a las ecuaciones teóricas desprendidas de las teorías ácido–base, y leyes que rigen el comportamiento, absorciométrico y fluorescente, de fluoróforos (ley de Beer, ley de Kavanagh, etc.); un segundo aspecto donde se aplica el análisis NLLS es en los ajustes por reconvolución iterativa de decaimientos de fluorescencia a las leyes de decaimiento multi-exponenciales. Así, es interesante realizar una breve descripción de los fundamentos de estos métodos.

El análisis NLLS comprende un grupo de procedimientos numéricos de los que se obtienen valores óptimos de los parámetros  $\alpha_i$  de una ecuación  $G(\alpha, x)$  (siendo  $\alpha$  el vector de parámetros  $\alpha_i$ ), de forma que describan una colección de datos experimentales  $(x_k, y_k)$ . Estos métodos numéricos son simplemente algoritmos que partiendo de unos valores iniciales de los parámetros irán buscando los mejores de modo que la función calculada se ajuste bien a los datos experimentales; este proceso se repite iterativamente hasta alcanzar un valor en los parámetros con mayor probabilidad de ser el correcto, hecho que ocurre cuando las iteraciones convergen hacia una serie estable de valores de los parámetros. Existen varios tipos de algoritmos posibles a este efecto, los cuales recuperarán valores de los parámetros equivalentes, aunque pueden variar los límites de confianza, convergencia, etc. Algunos de los algoritmos más empleados son: Nelder–Mead, método de extrapolación

parabólica de  $\chi^2$ , método de Newton–Raphson, Gauss–Newton, método de descenso escarpado, y el algoritmo de Marquardt–Levenberg (*Marquardt, 1963; Bevington y Robinson, 1993*). Este último, que es una combinación de los métodos de Gauss–Newton y descenso escarpado, es el más utilizado en la actualidad, y el que se emplea exclusivamente en esta Memoria.

#### I.5.1.1.- *Requerimientos para un análisis NLLS.*

Para que la aplicación del método de ajuste no lineal por mínimos cuadrados sea correcta, ha de cumplirse una serie de requisitos:

1.- Toda la incertidumbre experimental se encuentra sobre la variable dependiente  $y$ . Además, esta incertidumbre ha de tener una distribución gaussiana centrada en el valor correcto. Si existe incertidumbre sobre la variable independiente  $x$ , ésta ha de ser significativamente menor que la que aparece en  $y$ , y no estar correlacionadas entre sí.

2.- Las incertidumbres no deben tener un carácter sistemático.

3.- El modelo teórico que define la función de ajuste es la ley correcta que describe al sistema. Si se asume una ley incorrecta, los parámetros recuperados serán también incorrectos, y sin sentido físico.

4.- Todos los datos provienen de observaciones independientes.

5.- Hay un número de datos experimentales suficientes como para que los parámetros queden sobredeterminados, y el ruido experimental quede totalmente determinado.

#### I.5.1.2.- *Mínimos cuadrados.*

Para los métodos de ajuste por *mínimos cuadrados* la definición de la “mejor” serie de parámetros es aquella que minimiza la suma de los cuadrados de los residuales incluyendo los factores de peso estadístico, es decir, según la siguiente ecuación (I-18) se minimiza el valor de  $\chi^2$ , siendo  $R_k$  estos residuales,  $y_k$  el valor de la variable dependiente en la observación  $k$ ,  $G(\alpha, x_k)$  es el valor de

la función de ajuste con los valores de parámetros del vector  $\alpha$  en el punto de variable independiente  $x_k$ , y  $\sigma_k$  es la incertidumbre asociada a  $y_k$ , donde  $w_k = 1/\sigma_k^2$  el factor de peso estadístico.<sup>∇</sup>

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n w_k [y_k - G(\alpha, x_k)]^2 = \sum_{k=1}^n R_k^2 \quad (\text{I-18})$$

Es evidente que conforme mejor sea el ajuste,  $G(\alpha, x_k)$  e  $y_k$  serán más parecidos, y el valor de  $\chi^2$  tenderá a un mínimo.

De forma general, tanto los datos espectroscópicos de absorción y fluorescencia en estado estacionario, como los de fluorescencia con resolución temporal, mediante la técnica del contaje de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC), cumplen todas las condiciones para implementar un ajuste NLLS.

El proceso de análisis de los datos de TCSPC difiere ligeramente de lo expuesto hasta ahora. De forma resumida, consiste en seleccionar una ley de decaimiento  $I(\alpha, t)$ , con su serie de parámetros  $\alpha$ , que describe el sistema. La función  $G(\alpha, t_k)$  se obtiene por convolución de la ley de decaimiento con el perfil instrumental, y es la que se compara con los valores experimentales del decaimiento  $y(t_k)$ , para obtener los valores de los parámetros de la ley de decaimiento, a través del análisis NLLS. Estos métodos se denominan de *reconvolución iterativa*.

#### I.5.1.3.- Estimación de la bondad del ajuste.

Una buena estimación de la bondad del ajuste es el valor del parámetro  $\chi^2$ , y que éste llegue a un mínimo. Sin embargo,  $\chi^2$  depende del número de puntos (*Bevington y Robinson, 1993*), así que suele utilizarse el valor de  $\chi^2$  reducido ( $\chi^2_\nu$ ):

---

<sup>∇</sup> Cuando el ruido es fundamentalmente aleatorio, suele definirse  $w_k = 1/y_k$  (*Gil y Rodríguez, 2003*).

$$\chi_v^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (\text{I-19})$$

Aquí,  $n$  es el número de puntos y  $p$  el número de parámetros ajustables, por lo que  $\nu = n - p$  representa el número de grados de libertad en el ajuste. El valor de  $\chi_v^2$  cuando existe ausencia de errores sistemáticos ha de estar próximo a la unidad, indicando un buen ajuste. Este  $\chi_v^2$ , o  $\chi^2$  por grado de libertad, también denominado *varianza del ajuste*, mide la dispersión residual de los datos alrededor del valor determinista.

Otro indicador de la bondad del ajuste NLLS es el *coeficiente de regresión*  $r^2$ , definido por la expresión siguiente (Gil y Rodríguez, 2003):

$$r^2 = \frac{S_t^2 - \chi_v^2}{S_t^2} \quad (\text{I-20})$$

En esta expresión,  $S_t^2$  es la *varianza total*, que mide la dispersión de los datos alrededor del valor medio de la variable dependiente ( $\bar{y}$ ), y viene definida como:

$$S_t^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n w_k (y_k - \bar{y})^2 \quad (\text{I-21})$$

Siendo  $n$  el número de puntos de cada curva ajustada,  $y_k$  el valor experimental medido de la variable dependiente, y  $w_k$  el factor de peso estadístico de cada medida.

Según la expresión de  $r^2$ , si el modelo  $G(\alpha, x_k)$  es una buena representación de los datos experimentales  $y_k$ , los residuales serán pequeños, por lo que el valor de  $\chi_v^2$  será también pequeño, de forma que  $\chi_v^2 \ll S_t^2$ , y por tanto  $r^2 \approx 1$ .

Existen, además, otros aspectos a tener en cuenta para definir la bondad del ajuste. El primero de éstos debe ser una exploración visual, tanto de los

datos experimentales con la función de ajuste, como de los residuales  $R_k$  frente a la variable independiente  $x_k$ . Estas visualizaciones permiten encontrar tendencias y correlaciones, juzgando de manera inequívoca la calidad del ajuste.

Otro criterio para comprobar la bondad del ajuste es la *función de autocorrelación*. La distribución de esta función, para un modelo correcto y en ausencia de errores sistemáticos, debe ser al azar en torno a cero. De forma simplificada, esta función es un índice de la correlación del residual a un cierto valor de la variable independiente con los residuales siguientes.

Existen métodos relativamente importantes para juzgar la bondad del ajuste, como el test de Durbin – Watson (*Draper y Smith, 1981*), test de tendencia (*Bard, 1974*), y otros. Estos métodos se encuentran descritos en detalle y estudiados comparativamente por *Straume y Johnson (1992)*.

Uno de los métodos más interesantes para estimar la fiabilidad de los parámetros recuperados es la obtención de los *coeficientes de correlación cruzada*. Si alguno de estos coeficientes de correlación cruzada  $CC_{ij}$  está próximo a +1 o -1 quiere decir que cualquier variación en el parámetro  $\alpha_i$  puede compensarse casi totalmente con una variación en  $\alpha_j$ . Así, no pueden asignarse valores únicos a los parámetros  $\alpha_i$  y  $\alpha_j$ , sin otros datos adicionales. Existe un valor crítico razonable de  $\pm 0.96$  por encima del cual, los parámetros obtenidos están claramente correlacionados (*Johnson et al., 1981; Johnson y Frasier, 1985*). Sin embargo, desafortunadamente, el grado en el que los coeficientes de correlación cruzada pueden acercarse a  $\pm 1$  sin suponer un claro inconveniente en la estimación de parámetros, no está bien definido, y depende en ocasiones de cada caso.

#### I.5.1.4.- *Análisis global.*

Uno de los mejores procedimientos para mejorar la precisión de una serie de parámetros determinados consiste en el análisis simultáneo de varios

experimentos, que pueden ser o repeticiones de uno solo<sup>∇</sup>, o bien, tratarse de diferentes experimentos con distintas condiciones (pH, temperatura, concentración,  $\lambda^{ex}$ ,  $\lambda^{em}$ , etc.). Denominaremos *análisis global* a la combinación, en un ajuste NLLS, de varios experimentos, en los que algunos parámetros son diferentes, y otros son idénticos en todas las medidas, vinculados en la totalidad de la superficie generada por todos los experimentos. El análisis global mejora claramente la resolución de los parámetros en ajustes NLLS (*Wahl y Auchet, 1972; Eisenfeld y Ford, 1979; Knutson et al., 1983; Beechem et al., 1983, 1985, 1991; Ameloot y Hendrickx, 1983; Beechem, 1992*), y además tiene en cuenta implícitamente la correlación existente entre los parámetros obtenidos, así como entre éstos y los datos experimentales (*Straume, 1994*).

En esta Memoria el análisis global se emplea en las dos vertientes citadas anteriormente. Así, se realizan ajustes globales NLLS de datos espectroscópicos de absorción y fluorescencia en estado estacionario de un fluoróforo con diferentes formas prototrópicas, en función del pH. En el caso de las medidas absorciométricas a diferentes longitudes de onda, los valores de  $pK_a$  en estado fundamental son un claro ejemplo de parámetros comunes a todas las curvas; mientras que los diferentes coeficientes de extinción molar de las especies prototrópicas al depender de la longitud de onda son parámetros no comunes. También se aplica el análisis global a los ajustes por reconvolución iterativa de los perfiles de decaimiento experimentales, obtenidos por fluorimetría con resolución temporal mediante la técnica TCSPC. En el caso de ajustes con funciones multiexponenciales, los tiempos de decaimiento  $\tau$  son independientes de las longitudes de onda de emisión y excitación. Así, decaimientos recogidos bajo las mismas condiciones, pero variando las longitudes de onda de emisión y/o excitación, pueden ajustarse simultáneamente ligando los tiempos de decaimiento; en cambio, los factores pre-exponenciales

---

<sup>∇</sup> Las repeticiones de experimentos individuales no deben promediarse, es conveniente emplear simultáneamente todos los datos (*Johnson y Frasier, 1985*).

no son parámetros ajustables globalmente, ya que dependen de la contribución relativa de cada tiempo de decaimiento a las longitudes de onda seleccionadas. Los valores de tiempos de vida recuperados por este tipo de análisis son bastante más fiables que los obtenidos por ajuste de un único decaimiento.

#### I.5.2.- Análisis global compartimental.

##### I.5.2.1.- *Definición de compartimento. Análisis compartimental.*

El término *compartimento* fue introducido probablemente por primera vez por *Sheppard (1948)*: “Existen numerosas instancias en investigación biológica y química donde se encuentran sistemas con múltiples compartimentos. Esto es indudablemente cierto en otros campos. En tales sistemas, los compartimentos reales pueden existir, cuyos contenidos son homogéneos y quedan separados unos de otros por límites reales. Sin embargo, el concepto puede generalizarse de forma que una sustancia, como cualquier elemento químico, puede considerarse que esta en un compartimento diferente cuando se encuentra en un estado diferente de combinación química”. Otras definiciones mas o menos equivalentes las dieron *Hearon (1963)*, *Brownell et al. (1968)*, *Jacquez (1972)* y más recientemente *Anderson (1983)*. Sin embargo, aun cuando el término compartimento no se estaba utilizando explícitamente, ya se trabajó anteriormente con modelos compartimentales. El primer modelo compartimental se utilizó para la descripción de los decaimientos radiactivos. Después de que *Becquerel* descubriera la radiactividad (*Becquerel, 1896*), *Rutherford* y *Soddy (1902)* encontraron experimentalmente que el torio decae con el tiempo, según una función exponencial. Posteriormente, *Rutherford (1904)* analizó los decaimientos en cadena de sucesivas transformaciones:

$$\begin{aligned}
\frac{dX_a}{dt} &= -K_a X_a \\
\frac{dX_b}{dt} &= K_a X_a - K_b X_b \\
\frac{dX_c}{dt} &= K_b X_b - K_c X_c
\end{aligned}
\tag{I-22}$$

Las soluciones de este sistema, es decir, la evolución temporal de las diferentes concentraciones de especies viene dada por:

$$\begin{aligned}
X_a(t) &= X_a(t_0)e^{-K_a(t-t_0)} \\
X_b(t) &= \frac{K_a}{K_b - K_a} X_a(t_0)e^{K_a(t-t_0)} + \\
&+ \left( X_b(t_0) + \frac{K_a}{K_a - K_b} X_a(t_0) \right) e^{-K_b(t-t_0)} \\
X_c(t) &= \frac{K_a K_b}{K_b - K_a} X_a(t_0)e^{-K_a(t-t_0)} + \\
&+ \left( \frac{K_b}{K_c - K_b} X_b(t_0) + \frac{K_a K_b}{(K_b - K_a)(K_b - K_c)} X_a(t_0) \right) e^{-K_b(t-t_0)} + \\
&+ \left( X_c(t_0) + \frac{K_b}{K_b - K_c} X_b(t_0) + \frac{K_a K_b}{(K_c - K_a)(K_c - K_b)} X_a(t_0) \right) e^{-K_c(t-t_0)}
\end{aligned}
\tag{I-23}$$

Como primera aplicación fisiológica, anterior incluso a la acuñación del término compartimento, se encuentran los estudios de *Benke et al. (1935)* que tratan de la absorción de nitrógeno en el organismo.

Igualmente importantes son las aportaciones de *Teorell (1937 a,b)* y *Artom et al. (1938)*. Son las primeras aplicaciones farmacocinéticas del análisis compartimental. En las referencias de Teorell aparece por primera vez la idea de la transformación química como una ruta entre compartimentos. La preocupación de Teorell era la desaparición del fármaco de la sangre o tejidos. La actividad del fármaco, dependiente de su forma química, podría disminuir, tanto por transporte a otra región espacial (eliminación) como por

transformación en otro compuesto químico (desactivación). Ambos procesos suponen un tratamiento cinético equivalente en cuanto a la desaparición del fármaco. Así, un compartimento se define como un estado caracterizado por una localización espacial y naturaleza química.

Con el desarrollo actual de la teoría del análisis compartimental, y sus múltiples aplicaciones, puede establecerse una definición más general de compartimento: “Un compartimento es una cantidad de material que actúa cinéticamente de forma homogénea y propia” (*Anderson, 1983*). *Rescigno* también aporta una definición simple, definiéndolo como “un conjunto de partículas caracterizadas por un límite físico y por tener idénticas propiedades cinéticas” (*Rescigno y Segre, 1966; Rescigno, 1999*). El compartimento al que pertenece una partícula caracteriza tanto sus propiedades físico-químicas como su ambiente. Un compartimento puede no ser un volumen físico concreto; en ciertos estudios clínicos, la cantidad de algún material en un espacio fisiológico usualmente se considera como un compartimento. Las partículas de cada compartimento están influenciadas por fuerzas que provocan que éstas pasen de uno a otro. Todas las partículas de un compartimento concreto tienen la misma probabilidad de transición, ya que para el sistema se consideran indistinguibles. La transición entre compartimentos ocurre traspasando ciertas barreras físicas, o bien, a través de transformaciones físicas o químicas.

Adicionalmente, otra definición importante es la de *sistema compartimental*, el cual consiste en dos o más compartimentos interconectados, de modo que existe entre algunos de ellos intercambio de material. El sistema compartimental se modela a través de una colección de ecuaciones diferenciales ordinarias, que describen la variación temporal de la cantidad de materia en cada compartimento particular. Estas cinéticas vendrán dictadas por las leyes físico-químicas que gobiernan el intercambio de material entre los compartimentos conectados, por ejemplo, difusión, temperatura, reacciones químicas, etc. Cabe mencionar la clasificación entre sistemas compartimentales

*cerrados y abiertos*. En los primeros no existirá intercambio de material con el exterior, en cambio, el sistema compartimental será abierto si existen entradas o salidas de material desde o hacia el exterior. Un ejemplo de salida hacia el exterior son las líneas de excreción en sistemas compartimentales metabólicos.

Se denomina *análisis compartimental* a la teoría matemática que describe el comportamiento de un sistema compartimental, y, como ya se ha comentado, viene siendo utilizado extensamente en diversas áreas de la ciencia, como biomedicina, farmacocinética, sistemas metabólicos, análisis de ecosistemas, ingeniería y cinética de reacciones químicas (*Anderson, 1983; Godfrey, 1983; Jacquez, 1972*). Un objetivo del análisis compartimental es desarrollar una representación matemática plausible de un fenómeno particular, físico, químico o biológico, para esto, es necesario un profundo conocimiento del sistema de modo que se disponga del fundamento adecuado que justifique el uso de un modelo compartimental. Igualmente, otro objetivo es resolver el problema inverso, que consiste en tres pasos: especificación del modelo (determinación del número de compartimentos y las interconexiones entre ellos), identificabilidad estructural (determinación de si los parámetros del sistema quedan definidos de forma única a través de las observaciones realizadas), y la estimación de los parámetros (el problema práctico de calcular, analítica o numéricamente, los “mejores” valores para los parámetros del modelo).

Un concepto importante en el entorno del análisis compartimental es el de identificabilidad. Como ya se ha citado, consiste en determinar si los parámetros recuperados del sistema compartimental tienen un valor único, o si por el contrario, existen diferentes combinaciones de valores que puedan describir de forma análoga al sistema. Así, se denomina *identificabilidad global* cuando solo existe un único conjunto de parámetros que describen al sistema e *identificabilidad local* cuando existen varios conjuntos de parámetros que describen al sistema compartimental de manera equivalente; en cambio, el

sistema será *no identificable* cuando exista un número infinito de conjuntos de parámetros para describirlo (Boens et al., 2000).

Hay que considerar que algunos autores, como Rescigno (2001), critican el excesivo uso de sistemas compartimentales. Rescigno atribuye la “decadencia de los compartimentos” al hecho de que en ocasiones se han empleado modelos compartimentales, considerando ecuaciones diferenciales erróneas, es decir, cuyos datos experimentales pueden más o menos ajustarse a dicha función, pero sin tratarse realmente de la función que define el sistema. Se trata, por tanto de una consideración *a priori* que puede no ser cierta. La modelización de sistemas, es decir, el ajuste de los datos experimentales a través de una función sin base física, elegida *a posteriori* tampoco es adecuado para este autor, ya que a través de este sistema no se trata de confirmar hipótesis expuestas *a priori* que aumenten el conocimiento sobre el sistema.

#### I.5.2.2.- *Análisis compartimental en fotofísica.*

La aplicación de los modelos compartimentales a los sistemas fotofísicos, cinéticas en el estado excitado, etc., es bastante reciente. De acuerdo a la definición de compartimentos y sistemas compartimentales, es importante remarcar las razones de por qué los procesos en el estado excitado y sus cinéticas asociadas pueden considerarse como procesos compartimentales:

↳ Los procesos implicados de intercambio de partículas de un estado a otro pueden describirse a través de sistemas de ecuaciones diferenciales de primer orden lineales.

↳ Se puede analizar el sistema en términos de un número finito de componentes que interactúan intercambiando material, y cada estado está compuesto por una serie de partículas que se comportan de un modo cinéticamente homogéneo.

↳ Puede considerarse la formación de las especies excitadas (excitación) como el “input” al sistema compartimental, mientras que los procesos de desactivación, como emisión de fluorescencia y procesos no radiativos, serán la salida del sistema. Por tanto se tratará de sistemas compartimentales abiertos.

Estos modelos, y el análisis global compartimental se han utilizado con éxito en bastantes sistemas fotofísicos reales. La primera aplicación del análisis global compartimental en fotofísica trata de una reacción ESPT sobradamente conocida, la del 2-naftol/naftolato. *Beechem et al. (1985)* introdujeron el concepto de los sistemas compartimentales en este sistema, llegando a resultados coherentes con los previos de *Laws y Brand (1979)*. Posteriormente, *Van den Bergh et al. (1992)* mediante análisis global compartimental en un solo paso llegaron también a resultados análogos a los ya obtenidos en la reacción ESPT del 2-naftol. Otro sistema fotofísico al que se aplicó inicialmente el análisis compartimental fue a la formación del excímero del pireno (*Andriessen et al., 1991*), mediante decaimientos simulados y reales.

Posteriormente se han estudiado otros sistemas fotofísicos mediante análisis global compartimental como es el caso de los sistemas de indicadores fluorescentes de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Estos sistemas bicompartimentales se componen del fluoróforo libre y el complejo formado por éste con el ión correspondiente, tanto en el estado fundamental como en el excitado. Mediante la aplicación del análisis global compartimental se han conseguido recuperar constantes cinéticas de formación y disociación de los complejos en el estado excitado, constantes de desactivación y tiempos de vida de los fluoróforos libres y los complejos, así como las constantes de disociación de los complejos fluoróforo-cación en estado fundamental. Los sistemas que se han estudiado han sido el indicador PBF1 para el  $K^+$  (*Meuwis et al., 1995b*), los indicadores fluorescentes de  $Ca^{2+}$  denominados Fura-2 (*Van den Bergh et al., 1995a*) y

Quin-2 (*Van den Bergh et al., 1995b*), y el indicador Mag-fura-2 selectivo para  $Mg^{2+}$  (*Meuwis et al., 1998*).

Se han realizado diversos estudios teóricos para determinar las condiciones necesarias para conseguir la identificabilidad estructural de sistemas fotofísicos compartimentales, lo que supone la determinación del mínimo número de decaimientos en **ausencia total de error**, que hacen falta para conseguir la identificabilidad del sistema. Aunque esto no es una situación real, su estudio puede ayudar al diseño de experimentos y construcción de superficies de decaimientos de fluorescencia reales, de forma que el análisis global compartimental por ajuste de esta superficie de decaimientos llegue a una solución identificable. Por ejemplo, se han determinado las condiciones para conseguir identificabilidad estructural en procesos intramoleculares entre dos estados excitados (*Boens et al., 1992*). En este estudio, mediante decaimientos simulados, se llega a la conclusión de que es necesario conocer *a priori* al menos tres parámetros del sistema (dos constantes cinéticas y un parámetro espectroscópico, dos parámetros espectroscópicos y una constante cinética, o bien, tres parámetros espectroscópicos). Este mismo sistema, pero con la adición de un amortiguador de fluorescencia fue estudiado por *Boens et al. (1993a)*. La identificabilidad de un proceso intermolecular irreversible en dos estados excitados (*Boens et al., 1996*), por ejemplo una especie 1 y otra especie 2 en estado fundamental ( $1 + M \rightarrow 2$ ), también presenta algunos aspectos de interés. En este trabajo se considera que la constante cinética de asociación en el estado excitado es nula, mientras que la disociación de  $2^*$  hacia  $1^*$  es apreciable. No obstante, esta información no ayuda a la identificabilidad del sistema. En esta situación, se pueden obtener los valores de la constante de desactivación de la especie  $1^*$ , la suma de las constantes de desactivación de  $2^*$  y la cinética de disociación de  $2^*$  hacia  $1^*$ , y la relación entre esta constante cinética de disociación y la constante del equilibrio de disociación de 2 en el estado

fundamental. Esto se puede conseguir con tan solo dos decaimientos con diferentes concentraciones del co-reactante M. El sistema puede ser globalmente identificable cuando por otra técnica externa se determine el valor de la constante de disociación del complejo 2 en estado fundamental. Cuando la constante cinética de asociación de  $1^*$  y M en el estado excitado no es despreciable, las condiciones de identificabilidad son diferentes (Boens *et al.*, 2000). Un sistema tricompartmental en el que una especie reacciona con dos co-reactantes diferentes, para dar otras dos diferentes especies excitadas también ha sido tratado por Boens y Kowalczyk (1996). Este sistema es identificable en cuanto a las constantes cinéticas con decaimientos a dos concentraciones diferentes de cada uno de los co-reactantes, mientras que no lo es en términos de parámetros espectroscópicos. Recientemente, y relacionado con esta Memoria, se ha desarrollado el estudio de identificabilidad de una reacción ESPT entre dos especies prototrópicas de un fluoróforo mediada por un aceptor/dador protónico (Boens *et al.*, 2004).

Cuando un sistema compartimental fotofísico no presenta identificabilidad global, existe un método para determinar los límites entre los que se encuentran los valores reales de las diferentes constantes cinéticas y de los parámetros espectroscópicos. Estos límites se pueden conocer llevando a cabo una serie de análisis globales de una superficie de decaimientos en los que una de las constantes permanece fija a diferentes valores preseleccionados. Este método fue aplicado por primera vez a un proceso intramolecular en dos estados excitados con adición de *quencher* (Van Dommelen *et al.*, 1993) y sin él (Boens *et al.*, 1993b).

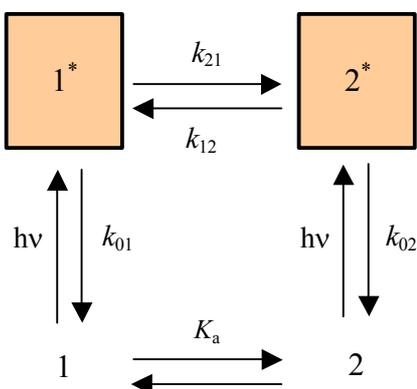
También se ha aplicado en fotofísica el análisis global tricompartmental (tres compartimentos implicados). El primer sistema fotofísico tricompartmental resuelto fue el estudiado por Khalil *et al.* (1993), quienes describieron la formación del excímero del 1-cianopireno, simultáneamente con el exciplexo del 1-cianopireno con el 1,2-dimetilindol

usando tolueno como disolvente. Las tres especies excitadas eran, por tanto, el 1-cianopireno, el excímero y el exciplejo. Inicialmente, mediante análisis global bicompartimental encontraron una constante de formación del exciplejo controlada por difusión, y una de disociación despreciable. Igualmente, por medio del análisis global bicompartimental, calcularon la constante de formación del excímero, siendo la disociación del mismo también despreciable. La aplicación del análisis global tricompartmental a la superficie de decaimientos de fluorescencia proporcionó unos valores de las constantes similares a los que estos autores habían obtenido en los análisis bicompartimentales. Otro sistema compartimental en tres estados excitados fue estudiado más tarde por *Hermans et al. (1995)*, este trabajo trata de un polímero con pireno enlazado en su estructura. Los tres estados excitados son el pireno en la estructura polimérica, pares de agregación entre las moléculas de polímero, y un excímero formado entre fluoróforos dentro de una misma cadena o entre diferentes cadenas de polímero.

El principal problema de los sistemas tricompartmentales, radica en la posible falta de identificabilidad (*Boens y Kowalczyk, 1996*). El elevado número de constantes puede hacer que queden muy correlacionadas entre sí, llegando a situaciones de identificabilidad local o de sistemas no identificables. En estos casos, la posibilidad de agregar información externa *a priori* o aplicar el método de los límites de las constantes que ya se ha comentado (*Van Dommelen et al., 1993; Boens et al., 1993b*) puede ayudar a resolver un sistema no identificable. Esto lo hizo *Van Stam et al. (1997)* con un polímero similar al empleado por *Hermans et al. (1995)*. Los resultados de *Hermans et al. (1995)*, como compuesto modelo, se utilizaron como información *a priori* por *Van Stam et al. (1997)*, quienes mediante el método de los límites de las constantes consiguieron obtener intervalos de valores para las constantes implicadas en el sistema tricompartmental.

I.5.2.3.- *Teoría del análisis global compartimental para procesos en el estado excitado.*

A continuación se desarrollará la teoría para un análisis global compartimental de un proceso en dos estados excitados, al ser un ejemplo sencillo y fácilmente comparable con los tratamientos “clásicos”. En este apartado se definirán los parámetros que determinan el sistema y su relación con otras variables fotofísicas y ecuaciones “clásicas”; y se explicará el proceso de ajuste para la obtención de los parámetros. La extrapolación a un sistema de más compartimentos es sencilla a partir del sistema bicompartimental.



**Esquema I-8:** Esquema cinético bicompartimental, con las especies 1 y 2 en equilibrio en el estado fundamental, y con una reacción reversible en el estado excitado entre  $1^*$  y  $2^*$ .

El sistema intermolecular considerado es el que se muestra en el esquema I-8. Este sistema es lineal e independiente del tiempo, y consta de dos especies distintas en el estado fundamental y sus dos correspondientes especies en el estado excitado. Estrictamente, el sistema compartimental únicamente consta de las especies excitadas, las entradas de material a los compartimentos son las excitaciones, mientras que la salida se produce a través de todos los mecanismos de desactivación.

Las especies 1 y 2 se pueden encontrar en equilibrio de cualquier tipo (ácido–base, complejación, etc.) en el estado fundamental, descrito por la constante  $K$ . La excitación por la luz genera en el estado excitado las especies  $1^*$  y  $2^*$ , que se desactivarán a través de emisión fluorescente (F) y/o por procesos no radiativos (NR). La composición de las constantes de velocidad para estos procesos de desactivación viene dada por  $k_{0i}$  ( $= k_{Fi} + k_{NRi}$ ) para las especies  $i$ . El proceso en el estado excitado viene descrito por las constantes cinéticas  $k_{21}$ , para la formación de  $2^*$  desde  $1^*$ , y  $k_{12}$ , para la reacción inversa  $2^* \rightarrow 1^*$ , estas constantes se han definido de forma general, incluyendo cualquier vía de transformación, por ejemplo formación de exciplejos o excímeros, reacciones de transferencia protónica en el estado excitado, cambios conformacionales en el estado excitado, etc. Así, si se tratara de una reacción de transferencia protónica en el estado excitado  $1^* \rightleftharpoons 2^* + H^+$ ,  $k_{21}$  correspondería a la constante de desprotonación de primer orden, y la protonación en el estado excitado vendría determinada por  $k_{12}[H^+]$ , siendo  $k_{12}$  la constante cinética de segundo orden.

Si las especies en el estado fundamental del esquema I-8 se excitan con un pulso  $\delta$ , un pulso de luz infinitamente corto, tal que no cambie significativamente las concentraciones de las especies en el estado fundamental, las concentraciones de las especies  $1^*$  y  $2^*$  en el estado excitado a lo largo del tiempo se pueden describir por la ecuación diferencial matricial de primer orden:

$$\mathbf{x}(t) = \mathbf{A} \cdot \mathbf{x}(t) \quad t \geq 0 \quad (\text{I-24})$$

$\mathbf{x}(t)$  es un vector  $2 \times 1$ , con las concentraciones de las especies del estado excitado  $1^*$  y  $2^*$  en función del tiempo:

$$\begin{pmatrix} x_1(t) \\ x_2(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} [1^*](t) \\ [2^*](t) \end{pmatrix} \quad (\text{I-25})$$

La derivada en el tiempo del vector de concentraciones viene expresada como  $\mathbf{x}(t)$ , mientras que  $\mathbf{A}$  es la matriz compartimental  $2 \times 2$ <sup>∇</sup>:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} -(k_{01} + k_{21}) & k_{12} \\ k_{21} & -(k_{02} + k_{12}) \end{pmatrix} \quad (\text{I-26})$$

La función impulso–respuesta,  $f(\lambda^{ex}, \lambda^{em}, t)$ , a la longitud de onda de emisión ( $\lambda^{em}$ ) y de excitación ( $\lambda^{ex}$ ) viene dada por (con  $t \geq 0$ ):

$$f(\lambda^{em}, \lambda^{ex}, t) = \kappa \tilde{\mathbf{c}}(\lambda^{em}) \mathbf{U} \exp(t\mathbf{\Gamma}) \mathbf{U}^{-1} \tilde{\mathbf{b}}(\lambda^{ex}) \quad (\text{I-27})$$

En esta expresión  $\mathbf{U} = [\mathbf{U}_1, \mathbf{U}_2]$  es la matriz de los dos vectores propios  $\mathbf{U}_i$  de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$ .  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  son los autovalores de  $\mathbf{A}$  correspondientes a los autovectores  $\mathbf{U}_1$  y  $\mathbf{U}_2$  respectivamente, de forma que:

$$\exp(t\mathbf{\Gamma}) = \begin{pmatrix} e^{\gamma_1 t} & 0 \\ 0 & e^{\gamma_2 t} \end{pmatrix} \quad (\text{I-28})$$

$\tilde{\mathbf{b}}(\lambda^{ex})$  es el vector  $2 \times 1$  con los elementos  $\tilde{b}_i(\lambda^{ex}) = b_i / \sum_i b_i$ , donde  $b_i$  es la concentración de la especie  $i^*$  a tiempo cero ( $b_i = x_i(0)$ ). Este vector  $\tilde{\mathbf{b}}(\lambda^{ex})$  depende por tanto de las características de absorción de las diferentes especies en el estado fundamental, así como de las concentraciones iniciales de cada especie en el momento de la excitación, y, por tanto, de las condiciones que afecten a este equilibrio en el estado fundamental, como puede ser el pH, concentración de ligandos, etc.  $\tilde{\mathbf{c}}(\lambda^{em})$  es el vector  $1 \times 2$  de elementos  $\tilde{c}_i(\lambda^{em}) = c_i / \sum_i c_i$  de los factores de emisión normalizados a cada longitud de onda de emisión, con:

---

<sup>∇</sup> La formulación de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$  es específica de cada esquema cinético, ya que representa las ecuaciones diferenciales derivadas del modelo. Por ejemplo, si se tratara de la reacción de transferencia protónica en estado excitado  $1^* + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2^*$ , la matriz  $\mathbf{A}$  de la ecuación I-27 se modificará, de forma que donde aparece  $k_{21}$ , debería encontrarse  $k_{21}[\text{H}^+]$ .

$$c_i(\lambda^{em}) = k_{Fi} \int_{\Delta\lambda^{em}} \rho_i(\lambda^{em}) d\lambda^{em} \quad (I-29)$$

En esta ecuación,  $k_{Fi}$  es la constante cinética de fluorescencia de la especie  $i^*$ ;  $\Delta\lambda^{em}$  es el intervalo de emisión centrado en  $\lambda^{em}$ , que es la longitud de onda donde se monitoriza la señal fluorescente; y  $\rho_i(\lambda^{em})$  es la densidad de emisión de  $i^*$  a la longitud de onda de emisión considerada, y normalizada con el espectro completo de fluorescencia en estado estacionario  $F_i$  de la especie  $i^*$ ;  $\rho_i(\lambda^{em})$  viene dada por (Ameloot et al., 1991):

$$\rho_i(\lambda^{em}) = \frac{F_i(\lambda^{em})}{\int_{\text{banda completa de emisión}} F_i d\lambda^{em}} \quad (I-30)$$

Finalmente,  $\kappa = \sum_{\forall_i} b_i \sum_{\forall_i} c_i$  es una constante de proporcionalidad.

Conviene destacar que el uso de los parámetros normalizados  $\tilde{b}_i(\lambda^{ex})$  y  $\tilde{c}_i(\lambda^{em})$  proporciona la posibilidad de ligar  $\tilde{c}_i$  para todos los decaimientos recogidos a la misma longitud de onda de emisión y los  $\tilde{b}_i$  para todas las curvas de decaimiento obtenidas en las mismas condiciones de excitación.

Además, el empleo de los vectores  $\tilde{\mathbf{b}}$  y  $\tilde{\mathbf{c}}$ , junto con la matriz compartimental  $\mathbf{A}$  y los espectros de emisión ( $F_s(\lambda^{em}, \lambda^{ex})$ ) y excitación en estado estacionario ( $E_s(\lambda^{ex}, \lambda^{em})$ ), permite el cálculo de los espectros asociados a las especies implicadas. Los espectros de emisión (SAEMS) y los espectros de excitación (SAEXS) asociados a la especie  $i$ , vienen dados por:

$$\text{SAEMS}_i(\lambda^{em}, \lambda^{ex}) = \frac{\tilde{c}_i (\mathbf{A}^{-1} \tilde{\mathbf{b}})_i}{\tilde{\mathbf{c}} \mathbf{A}^{-1} \tilde{\mathbf{b}}} F_s(\lambda^{em}, \lambda^{ex}) \quad (I-31)$$

$$\text{SAEXS}_i(\lambda^{ex}, \lambda^{em}) = \frac{(\tilde{\mathbf{c}} \mathbf{A}^{-1})_i \tilde{b}_i}{\tilde{\mathbf{c}} \mathbf{A}^{-1} \tilde{\mathbf{b}}} E_s(\lambda^{ex}, \lambda^{em}) \quad (I-32)$$

Según el modelo cinético planteado y la ecuación I-27, la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, es decir, los decaimientos de fluorescencia, serán funciones biexponenciales, pudiendo expresarse esta ecuación en la forma (con  $t \geq 0$ ):

$$f(\lambda^{em}, \lambda^{ex}, t) = p_1 e^{\gamma_1 t} + p_2 e^{\gamma_2 t} \quad (I-33)$$

Donde  $\gamma_i$  coincide con los autovalores de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$ , y está relacionado con los tiempos de decaimiento  $\tau_i$  ( $i = 1, 2$ ) de acuerdo con:

$$\gamma_i = -1/\tau_i \quad (I-34)$$

vienen dados por:

$$\gamma_{1,2} = \frac{-(X + Y) \pm \sqrt{(X - Y)^2 + 4k_{12}k_{21}}}{2} \quad (I-35)$$

con:

$$\begin{aligned} X &= k_{01} + k_{21} \\ Y &= k_{02} + k_{12} \end{aligned} \quad (I-36)$$

Así, los factores exponenciales  $\gamma_i$ , y consecuentemente los tiempos de decaimiento  $\tau_i$ , dependen únicamente de las constantes cinéticas de los procesos en el estado excitado. Por su parte, los factores pre-exponenciales  $p_i$  dependen de las constantes cinéticas, y de las características de excitación y emisión de cada decaimiento, por tanto, de  $\tilde{b}_i(\lambda^{ex})$  y  $\tilde{c}_i(\lambda^{em})$ :

$$\begin{aligned} p_1 &= \kappa(\tilde{c}_1 \beta_{11} + \tilde{c}_2 \beta_{21}) \\ p_2 &= \kappa(\tilde{c}_1 \beta_{12} + \tilde{c}_2 \beta_{22}) \end{aligned} \quad (I-37)$$

siendo:

$$\begin{aligned}
\beta_{11} &= \frac{[\tilde{b}_1(X + \gamma_2) - \tilde{b}_2 k_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\
\beta_{12} &= -\frac{[\tilde{b}_1(X + \gamma_1) - \tilde{b}_2 k_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\
\beta_{21} &= \frac{[\tilde{b}_2(Y + \gamma_2) - \tilde{b}_1 k_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\
\beta_{22} &= -\frac{[\tilde{b}_2(Y + \gamma_1) - \tilde{b}_1 k_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}
\end{aligned} \tag{I-38}$$

Es importante notar que cuando en la reacción en el estado excitado intervienen otras especies, como un co-reactante, los propios protones en reacciones de transferencia protónica, un aceptor/dador protónico, etc., la forma de la matriz  $\mathbf{A}$  y, consecuentemente, el resto de las ecuaciones se modificará.

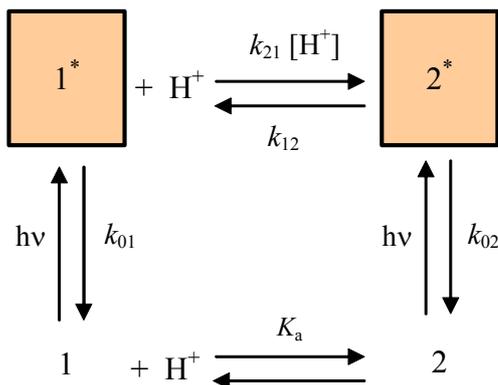
Consideremos ahora una reacción de transferencia protónica en el estado excitado, según el esquema I-9, ya que éste es el tipo de reacciones sobre las que versará esta Memoria, se enunciarán las modificaciones sobre el tratamiento general anterior. Así, la matriz  $\mathbf{A}$  se verá alterada según lo expuesto en la nota de la página 104. Además, si existe equilibrio en el estado fundamental entre las especies 1 y 2, la excitación dependerá de las concentraciones de cada una de las especies en dicho estado, por consiguiente, de su  $pK_a$  y del pH. Por lo tanto, los parámetros de excitación  $\tilde{b}_i$  variarán tanto con la longitud de onda de excitación, como con el pH:  $\tilde{b}_i(\lambda^x, \text{pH})$ . La ecuación I-36, donde se definen  $X$  e  $Y$  será:

$$\begin{aligned}
X &= k_{01} + k_{21}[\text{H}^+] \\
Y &= k_{02} + k_{12}
\end{aligned} \tag{I-39}$$

En esta situación, los tiempos de decaimiento  $\tau_i$  dependerán tanto de las constantes cinéticas como del pH, presentando diferentes perfiles cuando se representan frente al pH. Esta dependencia origina la modificación de la ecuación I-35, donde  $X$  viene dada por la ecuación I-39:

$$\gamma_{1,2} = -1/\tau_{1,2} = \frac{-(X + Y) \pm \sqrt{(X - Y)^2 + 4k_{12}k_{21}[H^+]}}{2} \quad (\text{I-40})$$

Igualmente, los pre-exponenciales  $p_i$  dependerán del pH, a través de las  $\beta_{ij}$  representadas por la ecuación I-38, teniendo en cuenta que donde aparece  $k_{21}$  debe escribirse  $k_{21}[H^+]$ . Asimismo, la dependencia de las  $\beta_{ij}$  con el pH también vendrá dada a través de  $X$ ,  $\tilde{b}_i(\lambda^{ex}, \text{pH})$  y  $\gamma_i$ .



**Esquema I-9:** Esquema cinético bicompartimental para una reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies 1\* y 2\*.

I.5.3.- Comparación entre el análisis global y el análisis global compartimental.

Como ya se ha destacado en anteriores ocasiones, la fluorescencia resuelta en el tiempo es una herramienta muy útil en el estudio de procesos dinámicos en el estado excitado (*O'Connor y Phillips, 1984; Boens, 1991; Lakowicz, 1999*). Para poder identificar el modelo cinético de un proceso en el estado excitado, se obtiene una colección de decaimientos recogidos bajo diferentes condiciones experimentales, construyendo la denominada *superficie de decaimientos de fluorescencia*. Se han propuesto multitud de métodos de análisis con el fin de extraer información relevante, a partir de los datos de fluorescencia con resolución temporal. A través de esta técnica pueden

obtenerse valores de constantes cinéticas de procesos que transcurren en el estado excitado, como pueden ser velocidades de desactivación por fluorescencia, *quenching* y constantes cinéticas de reacciones, tales como formación de excímeros y exciplejos, tautomerizaciones y/o reacciones de transferencia protónica en estado excitado.

Mediante el análisis individual de decaimientos de fluorescencia, se asocia cada uno de ellos a una única función matemática o ley de decaimiento independiente (sección I.3.4), de forma que se obtendrán los parámetros implícitos en esa función. El modelo cinético propuesto para los procesos en el estado excitado se confirmará a partir de la consistencia en los parámetros encontrados con los esperados por el modelo. Este proceso de análisis puede ser adecuado en algunos casos, pero no aprovecha la relación que puede existir entre los diferentes decaimientos.

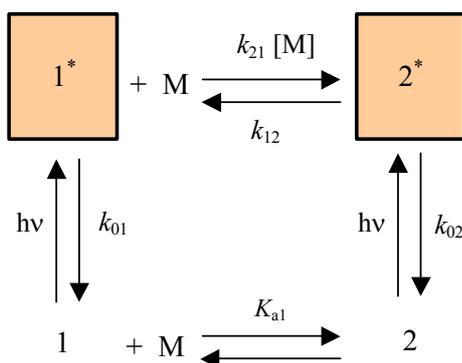
Ya en la década de los 80 se desarrolló el análisis simultáneo o global en el que se relacionan los distintos decaimientos (*Knutson y Beechem, 1983; Boens et al., 1989; Janssens et al., 1990; Beechem et al., 1991*), aprovechando los parámetros comunes que aparecen en ellos (sección I.5.1.4), con lo que la cantidad de información generada es mucho más consistente que la obtenida por medio de análisis individuales. Comparando estos dos tipos de análisis observamos que el global nos permite obtener unos parámetros más exactos y realizar mejor la discriminación entre varios modelos competitivos. En el análisis global, los parámetros de ajuste son normalmente los tiempos de decaimiento y sus correspondientes factores pre-exponenciales. La relación entre estos parámetros y los intrínsecos del modelo cinético en el estado excitado propuesto ha de realizarse *a posteriori*, mediante las ecuaciones derivadas de los modelos. Se trata, por tanto, de un análisis en dos pasos. Este análisis global es, desde hace años y en la actualidad, la herramienta más común en la resolución de esquemas cinéticos en el estado excitado. Ejemplos muy

recientes de este tipo de análisis se pueden encontrar en *Vigil et al. (1998)*; *Dias et al. (2000)*, *Álvarez-Pez et al. (2001)*, etc.

El análisis global compartimental (*Beechem et al., 1985*; *Ameloot et al., 1991, 1992*), permite la determinación directa en un solo paso de las constantes de velocidad de los procesos en el estado excitado y de los parámetros espectrales asociados a las especies en dicho estado. Ya se han mencionado en el apartado anterior diversas aplicaciones en sistemas fotofísicos, tanto en dos estados como en tres.

Una comparación entre análisis global y análisis global compartimental en procesos fotofísicos la realizaron *Meuwis et al. (1995a)* mediante superficies de decaimientos simulados de fluorescencia. Tuvieron en cuenta la diferente precisión y fiabilidad en la obtención de parámetros cinéticos por ambos métodos, para un proceso intermolecular en dos estados. Este sistema se muestra en el esquema I-10, y su principal característica es la dependencia de los tiempos de decaimiento (autovalores de la matriz compartimental) con la concentración del co-reactante M. Este sistema compartimental puede describir paralelamente una reacción de transferencia protónica en el estado excitado si el co-reactante se trata de H<sup>+</sup>. Para este sistema, la matriz compartimental viene dada por:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} -(k_{01} + k_{21}[\text{M}]) & k_{12} \\ k_{21}[\text{M}] & -(k_{02} + k_{12}) \end{pmatrix} \quad (\text{I-41})$$

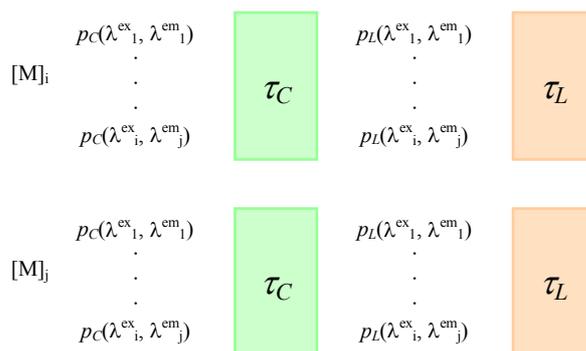


**Esquema I-10:** Esquema cinético bicompartimental para una reacción en el estado excitado reversible en presencia del co-reactante M.

Como se ve en el esquema I-10, si M afecta al equilibrio en el estado fundamental, los parámetros de excitación  $\tilde{b}_i$  dependerán tanto de la longitud de onda de excitación, como de la concentración de M. Teniendo en cuenta esto, además de la dependencia de los tiempos de decaimiento con la concentración de M ya mencionada, el desarrollo teórico es comparable al descrito en la sección anterior.

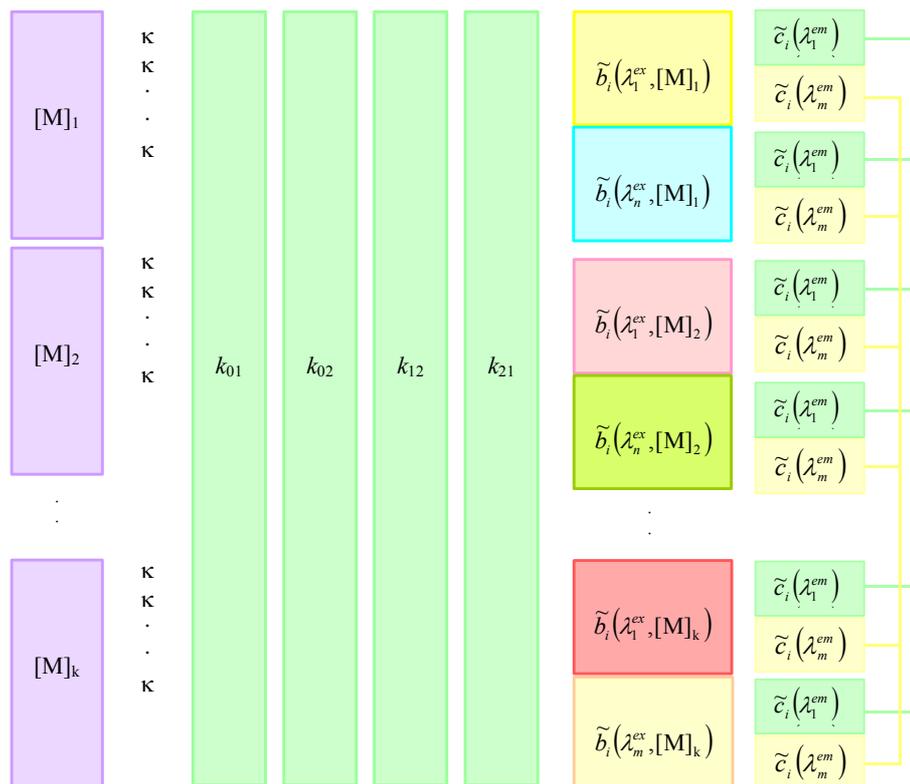
La superficie de decaimientos de fluorescencia que puede obtenerse, supondrá diferentes longitudes de onda de excitación y emisión, así como diferentes concentraciones de co-reactante M.

Mediante análisis global biexponencial los parámetros estimados son los tiempos de decaimiento, corto ( $\tau_C$ ) y largo ( $\tau_L$ ), y sus amplitudes asociadas  $p_{CL}$ . El esquema de ligado de parámetros mediante análisis global en esta situación, se muestra en el esquema I-11. En este esquema los tiempos de vida,  $\tau_{CL}$ , están ligados para cada concentración de M, mientras que los términos pre-exponenciales son parámetros calculados localmente. Sólo los decaimientos que poseen la misma concentración se pueden analizar conjuntamente.



**Esquema I-11:** Esquema de ligado de parámetros en un análisis global sobre la superficie de decaimientos de fluorescencia obtenidos del sistema representado en el esquema I-10.

En contraste, el esquema I-12 muestra las posibilidades de ligado de parámetros en un análisis global compartimental. Las constantes cinéticas vienen ligadas para todos los decaimientos, los parámetros de excitación,  $\tilde{b}_i$ , se ligarán para las mismas condiciones de longitud de onda de excitación y  $[M]$ , mientras que los parámetros de emisión,  $\tilde{c}_i$ , se ligarán entre los decaimientos recogidos a la misma longitud de onda de emisión. Como se observa, el análisis global compartimental permite el análisis simultáneo de la superficie de decaimientos de fluorescencia completa, obteniendo, en un solo paso, los parámetros fundamentales del proceso en el estado excitado.



**Esquema I-12:** Esquema de ligado de parámetros en un análisis global compartimental sobre la superficie de decaimientos de fluorescencia obtenidos del sistema representado en el esquema I-10.

Las conclusiones a las que llegaron *Meuwis et al. (1995a)*, fueron estudiadas separadamente según la clasificación realizada por *Van den Bergh et al. (1994)*, para este tipo de procesos en el estado excitado: Clase A ( $k_{01} < k_{02}$ ), clase B ( $k_{01} > k_{02}$ ), con la subclases B<sub>1</sub> ( $k_{02} + k_{12} > k_{01} k_{02}$ ) y B<sub>2</sub> ( $k_{01} > k_{02} + k_{12} > k_{02}$ ).

De forma general, se demuestra que el análisis global biexponencial proporciona buenos ajustes, según criterios numéricos y gráficos, sin embargo hay que hacer notar que no se obtiene una buena precisión en la determinación del tiempo corto a altas concentraciones de M (unas desviaciones estándar en torno al 20%). Efectivamente, *Janssens et al. (1990)* mostraron que la obtención

por análisis globales de una componente minoritaria de bajo tiempo de decaimiento es muy difícil si únicamente se emplea, al recoger los decaimientos, una sola escala de tiempo/canal en el TAC. Sin embargo, la simulación de una superficie de decaimientos empleando dos calibraciones diferentes del TAC, tampoco mejoró la precisión de los tiempos de vida cortos a altas concentraciones de M, obtenidos mediante análisis globales. Esto es porque cuando los factores pre-exponenciales de los dos tiempos de decaimiento son muy parecidos, la estimación del tiempo de vida corto muestra falta de precisión y exactitud. Sin embargo, y dependiendo de la clase de sistema, la selección de las longitudes de onda de emisión puede proporcionar decaimientos donde se acentúe la diferencia entre los pre-exponenciales, llevando a una mayor precisión en la estimación de los tiempos de decaimiento.

Las constantes cinéticas se obtendrían mediante análisis globales, a través de las representaciones lineales de  $-(\gamma_1 + \gamma_2)$  y  $\gamma_1\gamma_2$  frente a  $[M]$ , por las que se recuperarían  $k_{21}$  y  $k_{02}$  por medio de las pendientes, y  $k_{12}$  y  $k_{01}$  a través de las ordenadas en el origen. Para las diferentes clases y superficies de decaimientos simuladas por *Meuwis et al. (1995a)*, este tipo de representaciones con los tiempos de decaimiento obtenidos dieron bastantes problemas. Para la clase A no se encontraron relaciones lineales, y se obtuvieron en muchos casos valores sin sentido físico para las constantes cinéticas (valores negativos, por ejemplo). En la subclase B<sub>1</sub> tampoco se observaron buenas correlaciones lineales, y solo permiten la obtención más o menos fiable de  $k_{01}$ , mientras que se recuperaron valores negativos de  $k_{12}$ . Sin embargo, al eliminar en estas representaciones los decaimientos de mayor concentración de co-reactante, la relación lineal mejora y proporciona una estimación más precisa y cercana a los valores empleados en las simulaciones, para esta subclase.

En contraste, la aplicación del análisis global compartimental a las diferentes superficies de decaimientos simuladas, proporcionaron valores de las constantes cinéticas bastante precisos y exactos, con respecto a los empleados

en las simulaciones. Esta mayor potencialidad del análisis global compartimental viene originada por la combinación en un único análisis, de todos los decaimientos que componen la superficie, permitiéndose el ligado de las constantes cinéticas a todas las concentraciones de M, aprovechándose así mucho más las relaciones entre los diferentes decaimientos de la superficie.

#### I.5.4.- Análisis de componentes principales (PCA).

El análisis de componentes principales (PCA) requiere ciertos conocimientos de álgebra matricial y métodos estadísticos de interpretación de datos. Es una técnica multivariante para reducir las matrices de datos a su menor dimensionalidad utilizando un espacio matricial ortogonal compuesto por los vectores de los componentes principales. Se trata de identificar el número de factores significativos (componentes principales) y emplear esta información para establecer modelos sobre el sistema. El método de PCA permite simplificar la matriz de datos, reduciendo la dimensionalidad del contenido, mientras que se preserva al máximo el contenido de la información inicial.

El método de PCA puede utilizarse en espectroscopia. En muestras reales, existen normalmente diferentes causas de variaciones en sus espectros: los componentes de las muestras, interacciones entre los constituyentes, variaciones instrumentales como el ruido del detector o modificaciones en la línea base, diferencias debidas a la manipulación de las muestras, etc. Sin embargo, incluso con todas estas variaciones complejas, habrá un número finito de modificaciones espectrales independientes. Afortunadamente, los cambios mayores deberían ser los resultantes de las variaciones en las concentraciones de los constituyentes de las muestras. El cálculo de vectores que den cuenta de estas variaciones espectrales proporcionaría una disminución en la dimensionalidad de los datos, simplificando su tratamiento. El análisis de componentes principales identifica las especies espectralmente diferentes que pueden generar el juego completo de espectros compuestos. Así, la matriz de

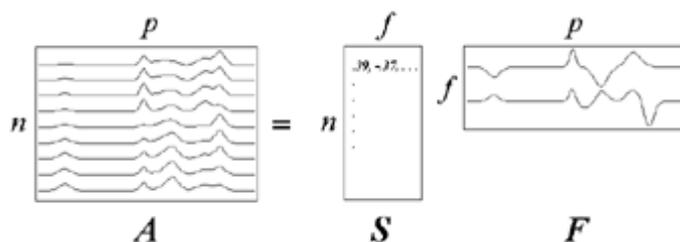
datos se puede describir como una combinación lineal de una serie de vectores que reflejan los perfiles espectrales (autovectores) y un escalar (autovalores) indicando la significancia o peso estadístico de cada vector.

Debido a que el PCA calcula los autovectores basándose en los cambios en los espectros, y no en medidas absolutas, su robustez y precisión resultan mayores que en métodos clásicos de análisis de datos espectroscópicos. No obstante, pueden producirse problemas de colinealidad, esto es, si dos componentes principales de una muestra siempre están presentes en todos los espectros en la misma proporción, entonces el análisis por PCA solo detectará una variación, no dos. Aunque si los constituyentes de las muestras varían independientemente no se presentará este problema.

El PCA es, en la práctica, un proceso de eliminación. En efecto, eliminando iterativamente las variaciones independientes detectadas en la matriz de datos, es posible crear el conjunto de autovectores que representan las variaciones comunes a todos los espectros. Cuando esto ocurre, la matriz de datos  $\mathbf{A}$  puede expresarse en la forma (figura I-26):

$$\mathbf{A} = \mathbf{S}\mathbf{F} + \mathbf{E}_A \quad (\text{I-42})$$

$\mathbf{A}$  es la matriz  $n \times p$  de datos experimentales, donde  $n$  es el número de espectros y  $p$  es el número de puntos de cada espectro (longitudes de onda por ejemplo);  $\mathbf{S}$  es la matriz  $n \times f$  de autovalores, siendo  $f$  el número de componentes principales;  $\mathbf{F}$  es la matriz  $f \times p$  que incluye los autovectores; finalmente,  $\mathbf{E}_A$  es la matriz  $n \times p$  de errores asociados o de “espectros residuales”.



**Figura I-26:** El PCA divide los datos espectrales en los factores principales sobre la variación global (autovectores) y los correspondientes coeficientes de abundancia (autovalores).

Existen varios métodos para llevar a cabo esta factorización, pero que no serán tratados en esta Memoria. *Meloun et al. (2000)* compararon recientemente varios de estos métodos empleados para predecir el número de componentes en datos espectroscópicos. Incluso siguen apareciendo hoy en día nuevos métodos para la factorización y obtención de componentes principales, como el propuesto por *Wang et al. (2003)*.

Los primeros en introducir el PCA en datos espectroscópicos de absorción y fluorescencia fueron *Weber (1961)* y *Ainsworth (1961)*, aunque ha continuado desarrollándose y empleándose en los últimos años, tanto en espectros de absorción UV–visible (*Benjathapanun et al., 1998*) o infrarroja (*Šašić, 2001*), espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia electrónica y de emisión Auger (*Balcerowska y Siuda, 1999*), etc.

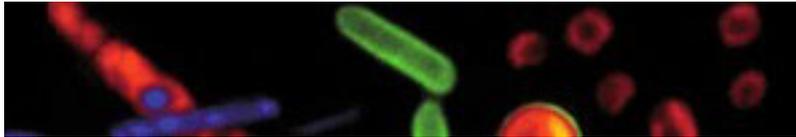
El PCA unido a un método de análisis global por mínimos cuadrados da lugar al denominado análisis global de componentes principales (PCGA), que permite comprobar modelos concretos, como por ejemplo reacciones de equilibrio o cinéticas. Fue introducido inicialmente por *Kankare (1970)*, aunque extendido posteriormente por varios autores. Recientemente se ha empleado en equilibrios ácido–base, en estado fundamental y excitado, por espectroscopia de absorción y fluorescencia (*Al-Soufi et al., 2001*), mecanismos de reacción y constantes cinéticas (*Furusjö y Danielsson, 1998*), etc.



## ***II. MATERIALES Y MÉTODOS***

---

---





En esta sección se describen los instrumentos, técnicas y metodologías utilizadas, así como los reactivos empleados en la elaboración de la parte experimental de esta Memoria.

## II.1.- INSTRUMENTACIÓN.

### II.1.1.- pH-metro.

Las medidas de pH se han realizado con un pH-metro Crison modelo GLP-22, que permite los intervalos de medidas siguientes: pH entre -2 y 16, mV:  $\pm 2000$ , temperatura entre -20 y 150 °C y mol/l:  $10^{-5}$  a  $10^{-1}$  (ppm o g/l). Para calibrarlo se han utilizado tampones estándar de pH 4.00 y 7.02 (casa Crison), con un error de medida de  $\leq 0.01$  para pH,  $\leq 0.5\text{mV}$  y  $\leq 0.3$  °C.

### II.1.2.- Sonicador.

Se ha utilizado un Ultrason Selecta P modelo 513 con generador de 150W que produce ondas sonoras de 40 kHz y posee un temporizador sincronizado con lámpara de señalización.

### II.1.3.- Balanza.

Se ha empleado una Balanza Analítica Electrónica Sartorius modelo A-120 S, provista de sistema de calibración interno y externo. Desviación estándar  $\pm 0.1$  mg y tiempo de respuesta de 3 s.

### II.1.4.- Espectrofotómetro.

Para las medidas de absorbancia y espectros de absorción se ha empleado un espectrofotómetro UV-visible, GBC UV-Cintra 10e. Se trata de un espectrofotómetro de doble haz, con rendija fija a 1.5 nm y fotodiodo detector de silicio, que permite medidas de absorbancia, % transmitancia, y realizar hasta la cuarta derivada de los datos adquiridos. El intervalo de

longitudes de onda de trabajo comprende de 190 a 1200 nm. El sistema y todos los dispositivos que lo componen se controlan exteriormente mediante un ordenador provisto del programa GBC software. Se completa con un equipo de termostatación para los compartimentos de celda, tanto de referencia como de muestra.

#### II.1.5.- Espectrofluorímetro de estado estacionario.

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario se han registrado utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer<sup>TM</sup> LS-55. Se trata de un instrumento de cuarta generación, con control externo desde un ordenador, mediante el software FL Winlab. El instrumento realiza tanto medidas de fluorescencia, como fosforescencia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia, y pueden ser medidas puntuales, espectros de emisión y excitación, espectros sincrónicos, medidas en función del tiempo, etc.

La fuente de luz es una lámpara de descarga de xenón, equivalente a 20 kW por 8 $\mu$ s de duración. Los detectores son, un fotomultiplicador modificado S5 responsable de las medidas hasta alrededor de 650 nm y un fotomultiplicador R928, sensible al rojo, que se puede ajustar, opcionalmente, para medidas sobre los 900 nm. Los monocromadores son del tipo Monk-Gillieson y cubren los siguientes intervalos:

↯ Excitación: 200-800 nm con orden de selección cero.

↯ Emisión: 200-900 nm, teniendo en consideración que el fotomultiplicador estándar no responde adecuadamente por encima de 650 nm.

La sincronización de los espectros es posible con una longitud de onda o diferencia de energía constante. La precisión de las medidas es de  $\pm 0.1$  nm y la reproducibilidad de  $\pm 0.5$  nm. El paso de banda de las rendijas se puede seleccionar entre 2.5-15 nm para la de excitación y 2.5-20 nm para la de emisión con incrementos de 0.1 nm. La velocidad de barrido es también un parámetro controlable, con incrementos de 1 nm, dentro del rango 10 a

1500 nm/min. Asimismo es posible seleccionar filtros para diversas longitudes de onda o atenuador de la transmitancia. La sensibilidad posee una relación señal-ruido de 500:1 r.m.s., usando la banda espectral Raman del agua ultrapura con excitación a 350 nm. El equipo posee un portacélulas estándar, termostatzado mediante circulación de agua y capacidad para cubetas de 10×10 mm. Para la corrección de los espectros, un divisor del haz hace pasar una parte de la intensidad incidente por un fotodiodo de referencia para la corrección de la excitación, mientras que unos archivos proporcionados por el propio fabricante con el *software* corrigen la emisión.

#### II.1.6.- Fluorímetro con resolución temporal y excitación láser.

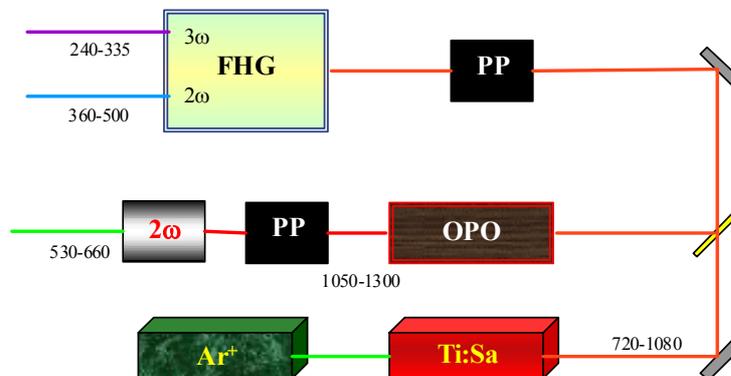
En las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo se empleó un sistema de excitación mediante láser con detección basada en la técnica del contaje de fotones individuales correlacionados en el tiempo (time correlated single photon counting: TCSPC). Describimos a continuación, por un lado, la fuente de excitación láser, y por otro, el sistema completo de TCSPC.

##### II.1.6.1.- *Fuente de excitación láser.*

*Maus et al. (2001)* desarrollaron y pusieron a punto el instrumento empleado en la parte experimental de esta Memoria, y que se expone a continuación.

La fuente de excitación (esquema II-1) consiste en un láser “*mode-locked*” de Titanio:Zafiro (Ti:Sa, modelo Tsunami 3950D, Spectra Physics) bombeado por las líneas del visible de un láser continuo de ión de argón (Ar<sup>+</sup>, modelo Beamlock 2080A-12, Spectra Physics). La fuente láser proporciona un tren de pulsos con una frecuencia de repetición de 82 MHz y una anchura de pulso de menos de 2 ps. La longitud de onda del láser Ti:Sa puede sintonizarse entre 720 y 1080 nm usando dos diferentes juegos ópticos (uno para 720-850 nm y otro para 840-1080 nm), que incluyen dos interferómetros Gires-Tournois

y placas de fotodiodos diferentes. Para evitar la absorción de luz por vapor de agua dentro de la cavidad láser, el interior de esta cavidad sellada se purga con nitrógeno seco. El cuerpo de Ti:Sa se mantiene a temperatura constante con un sistema de refrigeración, consiguiendo una excepcional estabilidad a lo largo del tiempo.



**Esquema II-1:** Esquema de la fuente de excitación láser, donde se indican las longitudes de onda disponibles en nm. Ar<sup>+</sup>: Láser de ión de argón, Ti:Sa: Láser “mode-locked” de titanio:zafiro, OPO: oscilador paramétrico óptico, FHG: generador de armónicos, PP: selector de pulsos, 2ω y 3ω: generadores del segundo y tercer armónico.

El haz láser procedente del Ti:Sa se dirige a un generador de armónicos flexible (FHG), obteniéndose longitudes de onda entre 240 y 500 nm, con un salto entre 335 y 360 nm; también se puede dirigir hacia un oscilador paramétrico óptico (OPO), basado en un cristal de KTiOPO<sub>4</sub>, consiguiendo un intervalo de longitudes de onda entre 1050 y 1300 nm, que pueden doblarse fácilmente, alcanzando longitudes de onda entre 530 y 660 nm. Ambos caminos del haz están equipados con un selector de pulsos que emplea un modulador opto-acústico para ajustar la frecuencia de repetición del tren de pulsos entre 800 kHz y 82 MHz.

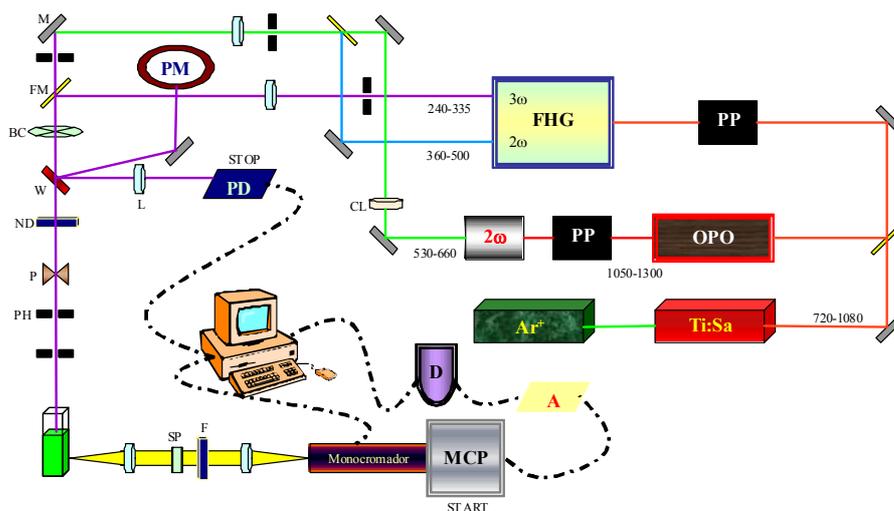
El FHG proporciona el segundo (2ω) y tercer (3ω) armónico de la frecuencia fundamental (ω) procedente del Ti:Sa. El segundo armónico se genera a través de doblaje de la frecuencia con un cristal de Triborato de Litio. El tercer armónico, por su parte, se consigue por interacción de las frecuencias

$\omega$  y  $2\omega$  en un cristal de Borato  $\beta$ -Bárico (BBO). Si se cambia la longitud de onda del haz fundamental, el ángulo de ambos cristales se debe modificar separadamente optimizando las condiciones de solapamiento de fase, así como se debe ajustar el solapamiento espacial y temporal de  $\omega$  y  $2\omega$  en el cristal BBO por medio de una línea de retardo para  $2\omega$ , y un espejo para la difracción del haz de  $\omega$ . Los intervalos de longitudes de onda posibles son 360 – 500 nm para  $2\omega$ , y 240 – 335 nm para  $3\omega$ .

#### II.1.6.2.- Sistema TCSPC.

La fuente láser descrita se utiliza en un sistema TCSPC (Esquema II-2). Inicialmente se optimizan los perfiles de los tres haces descritos (FHG- $2\omega$ , FHG- $3\omega$ , OPO- $2\omega$ ) por medio de lentes cilíndricas (CL) y de enfoque (L) para obtener el haz prácticamente colimado y de pequeño tamaño en la posición de la muestra. Un compensador Berek (BC) y un polarizador Glan-Thomson (P) permiten polarizar la luz excitatriz en cualquier dirección. El divisor del haz (W) separa el 5% de la luz para generar la señal STOP en un fotodiodo de alta velocidad (PD), y una segunda reflexión se dirige a un medidor de potencia (PM) para un control continuo de la potencia del láser durante las medidas. Los compartimentos de muestra son intercambiables, permitiendo diferentes tamaños y posiciones. La emisión de la muestra excitada se recoge y es colimada a través de unas lentes en ángulo recto con respecto a la excitación. La luz emitida pasa a través de unos filtros adecuados (F) y un polarizador laminar (SP) en un ángulo de  $54.7^\circ$  con respecto a la dirección de polarización de la luz excitatriz, para eliminar los efectos de la difusión rotacional de los fluoróforos en los decaimientos de fluorescencia; posteriormente, la luz emitida se focaliza hacia un monocromador (9030DS,  $f/3.2$ , red de difracción holográfica cóncava con 800 líneas/mm, 12 nm/mm de dispersión angular, y un intervalo espectral desde 200 a 1600 nm). Para la detección se empleó un plato de microcanales (MCP). La señal procedente del MCP, si fuera necesario, es amplificada (A) y

retardada (D). Esta señal sirve como pulso START, y está conectado, junto al pulso STOP procedente del PD, a un ordenador módulo de TCSPC con el software SPC 630, que posee integrados los dos módulos de discriminación de fracción constante (CFD o Threshold), el convertidor tiempo–amplitud (TAC) y el convertidor analógico–digital (ADC). Los histogramas de decaimientos de fluorescencia se recogen a lo largo de 4096 canales, con un incremento de tiempo por canal seleccionable desde 813 fs/canal como mínimo.



**Esquema II-2:** Sistema de TCSPC. M: espejo, FM: espejo rotatorio, CL: lentes cilíndricas, L: lentes, PH: obturadores, BC: compensador Berek, W: divisor de haz, ND: filtros de densidad óptica, P: polarizador Glan-Thomson, SP: polarizador laminar, F: filtro, MCP: plato de microcanales, A: preamplificador, D: retardador, PM: medidor de potencia, PD: fotodiodo disparador.

Para obtener el perfil instrumental del pulso, se utilizó una cubeta de 10×10 mm con una disolución acuosa de silica coloidal (LUDOX), encontrándose una función de respuesta instrumental con un ancho de 28 ps. Por tanto, este sistema TCSPC permite medir tiempos de vida comprendidos entre microsegundos hasta 3 ps como mínimo, utilizando análisis de deconvolución.

II.1.7.- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se registraron en un espectrómetro BRUKER AM300, con campo magnético de 300 MHz, provisto de sonda QNP de 5 mm para  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ , un accesorio para RMN de sólidos CP/MAS y un regulador de temperatura.

## II.2.- REACTIVOS.

Los productos químicos empleados en el desarrollo de la parte experimental de esta Memoria han sido los siguientes:

- 2',7'-difluorofluoresceína (Oregon Green 488 ®): Proporcionado por Molecular Probes Europe Inc. La pureza es del 99 %.
- Acetato sódico purísimo. Panreac.
- Ácido acético glacial. Químicamente puro. Suministrado por la casa Panreac.
- Ácido p-hidroxibenzoico de la casa SIGMA.
- Ácido perclórico; procedente de Merck. Disolución acuosa al 70-72% para análisis.
- Agua bidestilada y desionizada con un aparato Millipore (Milli-Q, resistividad: 18 MΩ×cm).
- Fluoresceína: Adquirida de Aldrich. Pureza del 99 %.
- Hidróxido sódico purísimo; procedente de Panreac.
- Perclorato sódico del 99 % de pureza, adquirido de Panreac.

Todos los reactivos se emplearon sin purificación adicional, tras comprobar la ausencia de emisión fluorescente debida a impurezas.

### II.3.- METODOLOGÍA.

#### II.3.1.- Preparación de las disoluciones.

Para las disoluciones acuosas de OG488 se preparó una disolución madre inicial de concentración  $7.874 \times 10^{-4}$  M en el fluoróforo, disolviendo la cantidad necesaria del mismo en 1 ml de KOH 0.1 M y añadiendo agua Milli-Q hasta 10 ml totales. A partir de ésta, se preparó una segunda disolución madre, llevando 6.350 ml de la primera disolución hasta un volumen final de 50 ml. Así, la segunda disolución quedó con una concentración de  $10^{-4}$  M en OG488 y  $1.27 \times 10^{-3}$  M en KOH.

A partir de esta segunda disolución madre de OG488 se tomaron las cantidades necesarias para obtener las concentraciones finales requeridas en las muestras de trabajo. De forma general, y mientras no se especifique lo contrario, la concentración de OG488 en las muestras para la mayoría de las medidas tanto de absorbancia, como fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo fue de  $5 \times 10^{-6}$  M.

Tanto las disoluciones madre como las de trabajo se prepararon en condiciones de oscuridad. Asimismo, fueron almacenadas en oscuridad y a 5°C, siendo desechadas a los quince días tras su preparación.

Para el estudio de absorción del OG488 se controló la fuerza iónica de las muestras añadiendo KCl hasta alcanzar un valor de 0.5. En las medidas de fluorescencia, la fuerza iónica se controló adicionando  $\text{NaClO}_4$ , evitando así el *quenching* por cloruros.

Las muestras en presencia de la disolución reguladora ácido acético/acetato ( $\text{HAc}/\text{Ac}^-$ ), empleadas tanto para medidas de absorción como de fluorescencia, se prepararon de la manera descrita a continuación: A partir de unas disoluciones madre de HAc y NaAc de concentración 2 M, se añade la cantidad necesaria de cada una en la proporción adecuada para alcanzar la concentración total de tampón deseada, y el pH requerido según la ecuación de

Henderson–Hasselbalch (ecuación II-1). En los casos en los que fue necesario ajustar el pH, a un valor más concreto, esto se realizó añadiendo pequeñas cantidades de NaOH o HClO<sub>4</sub> diluidos, antes de enrasar las muestras hasta su volumen final.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log\left(\frac{[\text{Ac}^-]}{[\text{HAc}]}\right) \quad (\text{II-1})$$

### II.3.2.- Procedimientos experimentales.

Todas las medidas, tanto de espectroscopia de absorción como de fluorescencia en estado estacionario, se han realizado a 20°C, termostalizando el portacubetas con los dispositivos adicionales. En el caso de medidas de fluorescencia con resolución temporal, las medidas se realizaron a temperatura ambiente, debido a la propia termostatación de la sala donde estaba ubicado el instrumento.

Previamente a la adquisición de los espectros o decaimientos, las cubetas, limpias y mantenidas en ácido nítrico diluido, se enjuagaron repetidamente con agua destilada y con la disolución a medir.

La medida del pH de las disoluciones se realizó tras la preparación de la misma y después de la determinación espectral, sin encontrarse cambios significativos.

#### II.3.2.1.- *Medidas de absorción.*

Las medidas de absorción se realizaron en el espectrofotómetro GBC Cintra 10e UV-Vis descrito en el apartado II.1.4. Se empleó una velocidad de barrido de 240 nm/min y una rendija de 1.5 nm. El intervalo de longitudes de onda registrado es 350 – 550 nm. Las cubetas utilizadas, tanto para la muestra como para la referencia, son de cuarzo, de la casa Hellma, y sus dimensiones (10×10 mm) proporcionan un paso óptico de 1 cm. Para la cubeta de referencia

se han utilizado disoluciones con los mismos componentes que la disolución de trabajo, y en iguales concentraciones, excepto en el fluoróforo estudiado.

#### II.3.2.2.- *Medidas de fluorescencia en estado estacionario.*

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se registraron en el fluorímetro Perkin-Elmer LS-55 descrito en el punto II.1.5, utilizando una semi-microcubeta de cuarzo, de la casa Starna, de dimensiones internas 10×4 mm; la excitación se realizó por el paso de luz corto, para evitar los problemas de filtro interno. Las longitudes de onda de excitación seleccionadas para los espectros de emisión fueron 420, 440, 460, 480 y 500 nm, mientras que para los espectros de excitación, en general, las longitudes de onda de emisión a las que se obtuvieron éstos fueron 500, 515, 550 y 580 nm, añadiendo también las longitudes de onda de emisión de 450 y 470 nm para obtener los espectros a concentración de ácido muy elevada. El voltaje del detector se seleccionó según la serie de espectros, para conseguir una buena señal, sin llegar a la saturación del detector. La velocidad de barrido se varió entre 200 y 500 nm/min, consiguiéndose así una buena relación señal:ruido, no siendo necesario un “suavizado” posterior de los espectros. La abertura de las rendijas de excitación y emisión se modificó también según la serie de espectros, en el intervalo de 2.5–5 nm para la excitación y 2.5–10 nm para la emisión, llegando a un compromiso entre resolución espectral y señal. Los espectros se corrigieron según lo expuesto en la descripción del instrumento.

#### II.3.2.3.- *Fluorescencia resuelta en el tiempo.*

Las medidas de tiempo resuelto se llevaron a cabo con el instrumento que se describe en el apartado II.1.6. Las cubetas empleadas fueron de cuarzo, de la casa Hellma, de dimensiones 10×10 mm. Los decaimientos de fluorescencia se recogieron en histogramas a lo largo de 4096 canales. El valor de tiempo por canal usualmente empleado fue el de 5.94 ps/canal, abarcando

una escala temporal de 24 ns; con esta escala se recogieron completos todos los decaimientos (el número de cuentas al final del decaimiento es inferior al 0.5% de las cuentas en el máximo). Con objeto de resolver con mayor precisión los tiempos de decaimiento más cortos (*Wenska et al., 1997; Lakowicz, 1999*) se emplearon otras dos escalas, 2.46 ps/canal y 1.22 ps/canal, pudiendo así introducirse en un análisis global simultáneamente los decaimientos recogidos en diferentes escalas. Los histogramas se recogieron hasta conseguir unas 10000 cuentas en el máximo. El iris del instrumento se ajustó hasta detectar no más de 12000 cuentas por segundo en el TAC.

La longitud de onda seleccionada para la excitación de la muestra fue de 420 nm, con la que se excita preferentemente las especies catiónica, neutra y monoaniónica de la 2',7'-difluorofluoresceína. En cuanto a la longitud de onda de emisión, se recogieron decaimientos a 490, 515, 550 y 580 nm en condiciones de pH elevado, 450, 470, 490, 510, 550 y 570 nm en condiciones de pH muy bajo, y a 490, 515, 525, 550, 570 y 600 nm en los casos en los que se empleó tampón HAc/Ac<sup>-</sup>.

Para obtener la función de respuesta instrumental (*irf*), o perfil de la lámpara, se obtuvo el histograma cuando en el compartimento de muestra se coloca una dispersión coloidal de silica (LUDOX) en cubeta de cuarzo, recogándose la luz dispersa con el monocromador situado en 420 nm. A lo largo de la duración de las medidas, se recogieron varios perfiles instrumentales, comprobando así la alta estabilidad del láser con el tiempo.

#### II.3.2.4.- Espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN.

Los espectros de RMN de protón fueron recogidos a temperatura ambiente en el instrumento descrito anteriormente, de 300 MHz de campo magnético, empleando como disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol deuterados. La referencia para la definición de escalas de desplazamientos químicos fue el tetrametilsilano.

### II.3.3.- Tratamiento de datos y métodos de análisis.

El tratamiento y representación de los datos experimentales se ha realizado mediante el programa *Sigma Plot 8.0*.

Los diferentes análisis no lineales por mínimos cuadrados, basados en el algoritmo de Marquardt, se implementaron a través de los programas *Sigma Plot 8.0* y *Mathcad 2000 Professional*. El programa *Origin 6.0 Professional* se empleó para los análisis globales no lineales por mínimos cuadrados.

El análisis de autovectores, análisis de componentes principales, y el análisis global de componentes principales con el modelo de aditividades de absorbancias se ha realizado con el programa SPECFIT/32.

Por último, los análisis de reconvolución y ajustes multiexponenciales individuales y globales, así como los análisis bi- y tri-compartimentales se realizaron empleando el *software* de análisis global TRFA (*Ameloot et al., 1992*). Este *software* utiliza un análisis de reconvolución iterativa, basado en la integral de convolución:

$$F(t) = \int_0^t I(t-t')D(t')dt' \quad (\text{II-2})$$

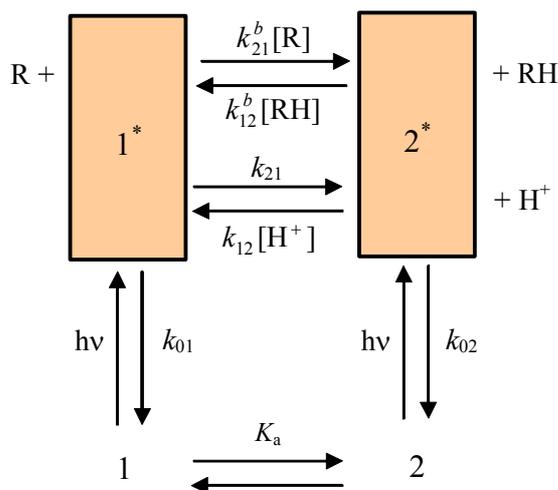
siendo  $F(t)$  el decaimiento experimental,  $I(t)$  es la función de decaimiento supuesta o función impulso-respuesta que representa el decaimiento cuando la muestra se excita con un pulso  $\delta$  infinitamente corto, y  $D(t')$  es el perfil instrumental de la lámpara. Como método de ajuste, se empleó el análisis no lineal por mínimos cuadrados a través del algoritmo de *Marquardt (1963)*.

### II.3.4.- Modelos compartimentales.

En esta sección se describirán las generalidades y teoría de los sistemas compartimentales utilizados en esta Memoria.

II.3.4.1.- Sistema bicompartimental de la reacción ESPT favorecida por las especies de un aceptor/dador protónico.

La introducción de un aceptor/dador protónico en el esquema cinético general de una reacción ESPT supone transformaciones de considerable importancia en las ecuaciones generales. El empleo de este modelo compartimental es muy reciente, y sólo se ha aplicado hasta ahora al sistema fluoresceína/ácido N-acetilaspártico (Crovetto *et al.*, 2004). El esquema cinético general considerado es el que se muestra en el esquema II-3.



**Esquema II-3:** Sistema compartimental para una reacción ESPT en dos estados promovida por las especies de un aceptor/dador protónico.

Se considera un sistema intermolecular, dinámico, lineal e independiente del tiempo, que consiste en dos tipos de especies diferentes, en el estado fundamental, con sus dos correspondientes especies en el estado excitado.

La excitación con radiación electromagnética creará las especies excitadas  $1^*$  y  $2^*$ , las cuales pueden decaer por fluorescencia (F), o por procesos no radiativos (NR). La constante de velocidad para estos procesos de

desactivación viene dada por  $k_{0i} = k_{Fi} + k_{NRi}$ , para la especie  $i^*$ .  $k_{21}$  representa la constante cinética de la disociación unimolecular  $1^* \rightarrow 2^* + H^+$ , mientras que  $k_{12}$  es la constante de segundo orden para la asociación  $2^* + H^+ \rightarrow 1^*$ .  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$  son las constantes cinéticas para la transferencia protónica en el estado excitado mediada por las especies del aceptor/dador protónico.  $k_{21}^b$  es la constante de segundo orden para la reacción  $1^* + R \rightarrow 2^* + RH$ , y  $k_{12}^b$  es la constante de segundo orden para la reacción inversa  $2^* + RH \rightarrow 1^* + R$ . Las formas básica y ácida del aceptor/dador protónico se representan por R y RH respectivamente. Además, tal y como muestra el esquema II-3, las especies R y RH no afectan el equilibrio en estado fundamental de las formas del fluoróforo 1 y 2.

Si el sistema se excita con un pulso  $\delta$  de luz en el tiempo  $t = 0$ , el cual no altera significativamente las concentraciones de las especies en el estado fundamental, la evolución temporal de las concentraciones de las especies excitadas  $1^*$  y  $2^*$  viene expresada por la ecuación diferencial de primer orden:

$$\mathbf{x}(t) = \mathbf{A} \cdot \mathbf{x}(t) \quad \text{con } t \geq 0 \quad (\text{II-3})$$

$\mathbf{x}(t)$  es un vector  $2 \times 1$ , con las concentraciones de las especies del estado excitado  $1^*$  y  $2^*$  en función del tiempo:

$$\begin{pmatrix} x_1(t) \\ x_2(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} [1^*](t) \\ [2^*](t) \end{pmatrix} \quad (\text{II-4})$$

La derivada temporal del vector de las concentraciones en el estado excitado es  $\mathbf{x}(t)$ . Por su parte,  $\mathbf{A}$  es la matriz compartimental  $2 \times 2$ :

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} -(k_{01} + k_{21} + k_{21}^b[R]) & k_{12}[H^+] + k_{12}^b[RH] \\ k_{21} + k_{21}^b[R] & -(k_{02} + k_{12}[H^+] + k_{12}^b[RH]) \end{bmatrix} \quad (\text{II-5})$$

La función impulso–respuesta del decaimiento,  $f(t)$ , depende de la longitud de onda de excitación ( $\lambda^{ex}$ ) y de emisión ( $\lambda^{em}$ ), de la concentración de

protones  $[H^+]$  y de la concentración total de aceptor/dador protónico ( $C^{buff} = [R]+[RH]$ ). Esta función viene dada por (con  $t \geq 0$ ):

$$f(t) = \kappa \tilde{\mathbf{c}} \mathbf{U} \exp(t\mathbf{\Gamma}) \mathbf{U}^{-1} \tilde{\mathbf{b}} \quad (\text{II-6})$$

En esta expresión  $\mathbf{U} = [\mathbf{U}_1, \mathbf{U}_2]$  es la matriz de los dos vectores propios  $\mathbf{U}_i$  de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$ .  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  son los autovalores de  $\mathbf{A}$  correspondientes a los autovectores  $\mathbf{U}_1$  y  $\mathbf{U}_2$  respectivamente, de forma que:

$$\exp(t\mathbf{\Gamma}) = \begin{pmatrix} e^{\gamma_1 t} & 0 \\ 0 & e^{\gamma_2 t} \end{pmatrix} \quad (\text{II-7})$$

$\tilde{\mathbf{b}}$  es el vector  $2 \times 1$  con los elementos  $\tilde{b}_i = b_i / \sum_i b_i$ , donde  $b_i$  es la concentración de la especie  $i^*$  a tiempo cero ( $b_i = x_i(0)$ ). Este vector  $\tilde{\mathbf{b}}$  depende, por tanto, de las características de absorción de las diferentes especies en el estado fundamental, así como de las concentraciones iniciales de cada especie en el momento de la excitación. Así, varía con la longitud de onda de excitación, a través de las características de absorción de cada especie, y con el pH donde la dependencia vendrá dada por la constante de acidez del fluoróforo en estado fundamental  $K_a$ . Los elementos  $\tilde{b}_i$  se calculan a través de la ecuación II-8, donde  $\varepsilon_i$  son los coeficientes de extinción molar de las especies, mientras que  $\alpha_i$  corresponde a la fracción molar de cada especie.

$$\tilde{b}_i = \frac{\varepsilon_i \alpha_i}{\sum_i \varepsilon_i \alpha_i} \quad (\text{II-8})$$

Por su parte,  $\tilde{\mathbf{c}}$  es el vector  $1 \times 2$  de elementos  $\tilde{c}_i(\lambda^{em}) = c_i / \sum_i c_i$  de los factores de emisión normalizados a cada longitud de onda de emisión, con:

$$c_i(\lambda^{em}) = k_{Fi} \int_{\Delta\lambda^{em}} \rho_i(\lambda^{em}) d\lambda^{em} \quad (\text{II-9})$$

En esta expresión,  $k_{Fi}$  es la constante cinética de desactivación por fluorescencia de la especie  $i^*$ ;  $\Delta\lambda^{em}$  es el intervalo de emisión alrededor de  $\lambda^{em}$  donde se

monitoriza la señal fluorescente; y  $\rho_i(\lambda^{em})$  es la densidad de emisión de  $i^*$  a la longitud de onda de emisión considerada, y normalizada con el espectro completo de fluorescencia en estado estacionario  $F_i$  de la especie  $i^*$ ;  $\rho_i(\lambda^{em})$  viene dada por (Ameloot *et al.*, 1991):

$$\rho_i(\lambda^{em}) = \frac{F_i(\lambda^{em})}{\int_{\text{banda completa de emisión}} F_i d\lambda^{em}} \quad (\text{II-10})$$

Finalmente,  $\kappa$  es una constante de proporcionalidad que viene dada por la expresión:

$$\kappa = \sum_{\forall_i} b_i \sum_{\forall_i} c_i \quad (\text{II-11})$$

Como ya se ha mencionado, la variación de  $f(t)$  con la longitud de onda de excitación proviene de la dependencia de  $\tilde{\mathbf{b}}$  con  $\lambda^{ex}$ , y la del decaimiento  $f(t)$  con la longitud de onda de emisión, viene dada por la dependencia del vector de los parámetros de emisión  $\tilde{\mathbf{c}}$ . La influencia de la concentración total del aceptor/dador protónico sobre el decaimiento  $f(t)$  se produce a través de la dependencia de los autovalores  $\gamma_{1,2}$  con [R] y [RH]. El pH afectará a la función impulso-respuesta tanto por la variación de los parámetros de excitación  $\tilde{\mathbf{b}}$  con el pH, como por la influencia de  $[\text{H}^+]$  sobre los autovalores de  $\mathbf{A}$ .

La ecuación II-6 supone una ley biexponencial, por lo que puede escribirse de la forma:

$$f(t) = p_1 e^{\gamma_1 t} + p_2 e^{\gamma_2 t} \quad (\text{II-12})$$

Los autovalores  $\gamma_i$  ( $i = 1, 2$ ) de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$  están relacionados con los tiempos de decaimiento  $\tau_i$  ( $i = 1, 2$ ) según la expresión:

$$\gamma_i = -1/\tau_i \quad (\text{II-13})$$

y vienen dados por:

$$\gamma_i = \frac{a_{11} + a_{22} \pm \sqrt{(a_{22} - a_{11})^2 + 4a_{12}a_{21}}}{2} \quad (\text{II-14})$$

siendo  $a_{ij}$  los elementos de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$  (ecuación II-5).

Así, los factores exponenciales  $\gamma_i$ , y consecuentemente los tiempos de decaimiento  $\tau_i$ , dependen tanto de las constantes cinéticas de los procesos en el estado excitado, como del pH y la concentración total de aceptor/dador protónico. Por su parte, los factores pre-exponenciales  $p_i$  son dependientes de las constantes cinéticas, y las características de excitación y emisión de cada decaimiento, por tanto, de  $\tilde{b}_i$  y  $\tilde{\tau}_i$ :

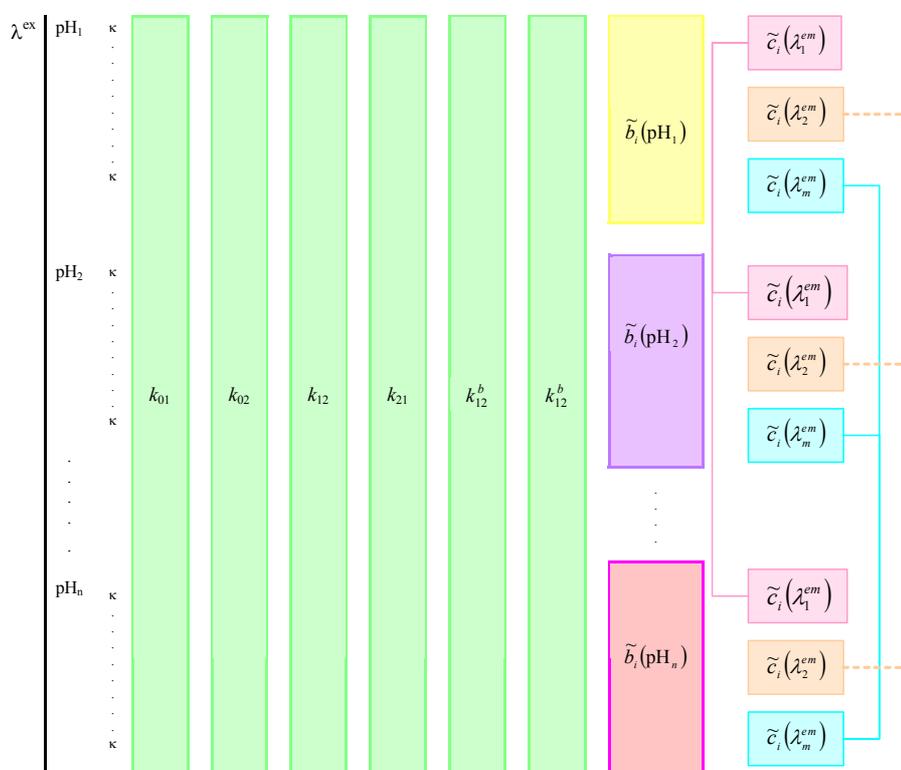
$$\begin{aligned} p_1 &= \kappa(\tilde{\tau}_1\beta_{11} + \tilde{\tau}_2\beta_{21}) \\ p_2 &= \kappa(\tilde{\tau}_1\beta_{12} + \tilde{\tau}_2\beta_{22}) \end{aligned} \quad (\text{II-15})$$

siendo:

$$\begin{aligned} \beta_{11} &= \frac{[\tilde{b}_1(a_{11} + \gamma_2) - \tilde{b}_2a_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\ \beta_{12} &= -\frac{[\tilde{b}_1(a_{11} + \gamma_1) - \tilde{b}_2a_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\ \beta_{21} &= \frac{[\tilde{b}_2(a_{22} + \gamma_2) - \tilde{b}_1a_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\ \beta_{22} &= -\frac{[\tilde{b}_2(a_{22} + \gamma_1) - \tilde{b}_1a_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \end{aligned} \quad (\text{II-16})$$

Para llevar a cabo un análisis global compartimental de una superficie de decaimientos de fluorescencia concreta, los parámetros independientes que debe poseer el decaimiento son el pH, la concentración total de aceptor/dador protónico  $C^{buff}$  y su constante de acidez  $K_a^{buff}$  que rige el equilibrio  $\text{RH} \rightleftharpoons \text{R}$ . Como ya se citó en la *Introducción* (sección I.5.2), el análisis global compartimental es un análisis en un solo paso, que relaciona directamente los decaimientos de fluorescencia con los parámetros intrínsecos en la cinética del proceso en el estado excitado, las  $k_{ij}$ . Siendo  $\kappa$  una constante de

proporcionalidad, el uso de  $\tilde{b}_i$  y  $\tilde{\tau}_i$  normalizados permite aprovechar las relaciones entre decaimientos a la misma longitud de onda de excitación y pH, por un lado, y a la misma longitud de onda de emisión por otro lado. En la implementación del análisis global compartimental, empleando este modelo cinético, se ajustan directamente las constantes  $k_{01}$ ,  $k_{02}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$ , la concentración normalizada a tiempo cero de la especie  $1^*$ ,  $\tilde{b}_1$ , a cada pH y longitud de onda de excitación, y el parámetro de emisión normalizado de la especie  $1^*$ ,  $\tilde{\tau}_1(\lambda^{em})$ . Así, en el esquema II-4 se muestra la organización del ligado de los diferentes parámetros a lo largo de la superficie de decaimientos de fluorescencia completa.



**Esquema II-4:** Esquema de ligado de parámetros ajustables en un análisis global compartimental siguiendo el modelo de ESPT en dos estados excitados promovida por las especies de un aceptor/dador protónico.

Es también interesante especificar que la relación entre los valores de  $pK_a^*$  del estado excitado y las constantes de velocidad de las reacciones en este estado  $k_{21}$  y  $k_{12}$ , viene dada por la ecuación II-17. Igualmente, las constantes cinéticas de las reacciones mediadas por las especies del aceptor/dador protónico se relacionan con el  $pK_a^*$  y el  $pK_a^{buff}$  del aceptor/dador protónico a través de la ley de acción de masas, resultando la ecuación II-18.

$$K_a^* = \frac{k_{21}}{k_{12}} \quad (\text{II-17})$$

$$pK_a^* = \log(k_{21}^b) - \log(k_{12}^b) + pK_a^{buff} \quad (\text{II-18})$$

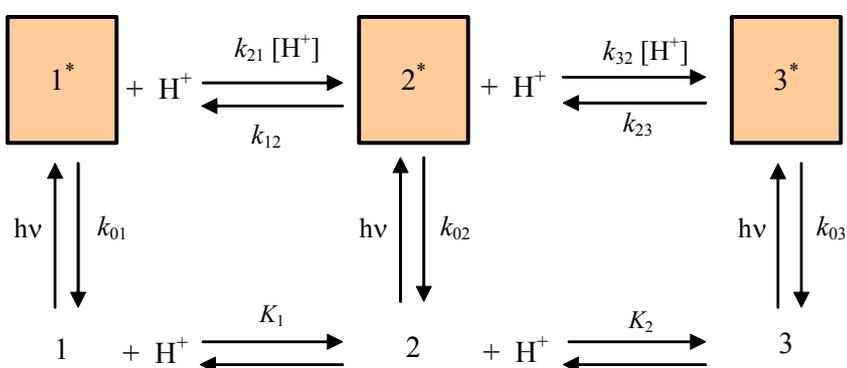
Finalmente, los espectros de emisión y excitación asociados a las especies, SAEMS y SAEXS respectivamente, vienen dados por las ecuaciones generales I-31 y I-32, con estas ecuaciones se calcula el espectro de la contribución fraccional de cada una de las especies a los espectros de emisión,  $F_s(\lambda^{em}, \lambda^{ex})$ , y excitación en estado estacionario,  $E_s(\lambda^{ex}, \lambda^{em})$ .

#### II.3.4.2.- Sistema tricompartimental aplicado a reacciones ESPT consecutivas.

En esta Memoria se ha empleado también un sistema tricompartimental, incluyendo tres especies prototrópicas en el estado excitado. El número de sistemas tricompartimentales, o con tres especies excitadas, resueltos es bastante menos numeroso que el de sistemas con dos especies. Además, como ya se trató en la sección I.4.1, los sistemas con más de dos especies han planteado históricamente mayores complicaciones. Entre los sistemas de reacciones entre tres especies excitadas, ya se trató el trabajo de *Seixas de Melo y Maçanita (1993)*, en el que se plantea el método clásico de resolver el triángulo cinético general. Por otro lado, los sistemas tricompartimentales resueltos se reducen a ciertos casos especiales de polímeros etiquetados con

fluoróforos (*Hermans et al., 1995; Van Stam et al., 1997*), o al caso de la formación del excímero del 1-cianopireno, junto con un excíplejo con el 1,2-dimetilindol (*Khalil et al., 1993*).

El modelo compartimental propuesto se muestra en el esquema II-5. Consiste en un sistema dinámico, lineal e independiente del tiempo (no existen efectos transitorios), que consta de tres especies diferentes en el estado fundamental, 1, 2 y 3, relacionadas a través de las constantes de acidez  $K_1$  y  $K_2$ . Las respectivas especies excitadas son  $1^*$ ,  $2^*$  y  $3^*$ . Se trata de equilibrios consecutivos, con lo cual no existe transformación mutua entre 1 y 3, ni en el estado fundamental ni en el excitado.



**Esquema II-5:** Esquema cinético del modelo compartimental de ESPT en tres estados excitados.

Las especies excitadas podrán decaer por fluorescencia (F) o por procesos no radiativos (NR). Las constantes cinéticas de desactivación vienen dadas por  $k_{0i} = k_{Fi} + k_{NRi}$ , para la especie  $i^*$ . Las disociaciones unimoleculares en el estado excitado,  $2^* \rightarrow 1^* + H^+$  y  $3^* \rightarrow 2^* + H^+$ , vendrán representadas por las constantes cinéticas  $k_{12}$  y  $k_{23}$  respectivamente, y las constantes de velocidad que definen las protonaciones en el estado excitado,  $1^* + H^+ \rightarrow 2^*$  y  $2^* + H^+ \rightarrow 3^*$ , son  $k_{21}$  y  $k_{32}$  respectivamente.

Siguiendo la teoría general del análisis global compartimental, excitando el sistema con un pulso  $\delta$  de luz en el tiempo  $t = 0$ , el cual no altera significativamente las concentraciones de las especies en el estado fundamental, las concentraciones en estado excitado de las especies  $i^*$  vienen dadas por la ecuación diferencial anteriormente descrita (ecuación II-3). En este caso,  $\mathbf{x}(t)$  es un vector  $3 \times 1$ , con las concentraciones de las especies en el estado excitado  $1^*$ ,  $2^*$  y  $3^*$  en función del tiempo:

$$\begin{pmatrix} x_1(t) \\ x_2(t) \\ x_3(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} [1^*](t) \\ [2^*](t) \\ [3^*](t) \end{pmatrix} \quad (\text{II-19})$$

$\mathbf{x}(t)$  representa la primera derivada con respecto al tiempo del vector de las concentraciones en el estado excitado. La matriz compartimental  $3 \times 3$ ,  $\mathbf{A}$ , en este sistema viene dada por:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} -(k_{01} + k_{21}[\text{H}^+]) & k_{12} & 0 \\ k_{21}[\text{H}^+] & -(k_{02} + k_{12} + k_{32}[\text{H}^+]) & k_{23} \\ 0 & k_{32}[\text{H}^+] & -(k_{03} + k_{23}) \end{bmatrix} \quad (\text{II-20})$$

La función impulso – respuesta del decaimiento,  $f(t)$ , depende de la longitud de onda de excitación ( $\lambda^{ex}$ ) y de emisión ( $\lambda^{em}$ ) y de la concentración de protones  $[\text{H}^+]$ . Viene dada por la misma ecuación II-6 del apartado anterior, aunque presentando las modificaciones necesarias para el sistema tricompartmental. Por ejemplo, la matriz  $\mathbf{U}$  está compuesta en este caso por los tres autovectores de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$ . Por tanto:  $\mathbf{U} = [\mathbf{U}_1, \mathbf{U}_2, \mathbf{U}_3]$ . Por otro lado, la ecuación II-7 se transforma en el nuevo modelo en:

$$\exp(t\mathbf{\Gamma}) = \begin{pmatrix} e^{\gamma_1 t} & 0 & 0 \\ 0 & e^{\gamma_2 t} & 0 \\ 0 & 0 & e^{\gamma_3 t} \end{pmatrix} \quad (\text{II-21})$$

En esta ecuación,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$  representan los tres autovalores correspondientes a los autovectores  $\mathbf{U}_1$ ,  $\mathbf{U}_2$  y  $\mathbf{U}_3$  respectivamente.

Los parámetros de excitación normalizados para cada especie,  $\tilde{b}_i = b_i / \sum_i b_i$ , vienen recogidos en el vector  $3 \times 1$   $\tilde{\mathbf{b}}$ . De la misma forma, y según la teoría general,  $b_i$  representa la concentración de cada especie  $i^*$  a tiempo cero ( $b_i = x_i(0)$ ). El vector  $\tilde{\mathbf{b}}$  depende de las características de absorción de las especies a la longitud de onda de excitación y de las concentraciones iniciales de cada especie en el momento de la excitación, por tanto, del pH y las constantes del estado fundamental, y se calcula a través de la misma expresión II-8. Por otra parte, ahora  $\tilde{\mathbf{c}}$  es un vector  $1 \times 3$  de elementos  $\tilde{c}_i(\lambda^{em}) = c_i / \sum_i c_i$  de los factores de emisión normalizados a cada longitud de onda de emisión. En este modelo,  $c_i(\lambda^{em})$  y  $\rho(\lambda^{em})$  son equivalentes a los definidos en la sección anterior, a través de las ecuaciones II-9 y II-10 respectivamente. Igualmente, la constante  $\kappa$  viene dada por la expresión II-11.

En resumen,  $f(t)$  varía con la longitud de onda de excitación, a través de  $\tilde{\mathbf{b}}$ , con la de emisión, a través de la dependencia de  $\tilde{\mathbf{c}}$ , y con el pH. El pH afectará a la función impulso-respuesta por la influencia de los parámetros de excitación  $\tilde{\mathbf{b}}$  con el pH y por la de  $[\text{H}^+]$  sobre los autovalores de  $\mathbf{A}$ .

En un sistema tricompartmental, la función impulso – respuesta vendrá dada por una ley de decaimiento triexponencial, de la forma:

$$f(t) = p_1 e^{\gamma_1 t} + p_2 e^{\gamma_2 t} + p_3 e^{\gamma_3 t} \quad (\text{II-22})$$

Aquí, de la misma forma, los autovalores  $\gamma_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) de la matriz compartimental  $\mathbf{A}$  están relacionados con los tiempos de decaimiento  $\tau_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) según la misma ecuación II-13. Sin embargo, las ecuaciones explícitas de los tiempos de decaimiento/autovalores son harto complejas, aunque suponen la resolución de la ecuación de autovalores:

$$|\mathbf{A} - \gamma \mathbf{I}| = 0 \quad (\text{II-23})$$

En esta ecuación,  $\mathbf{A}$  es la matriz compartimental,  $\mathbf{I}$  es la matriz identidad  $3 \times 3$ , mientras que  $\gamma$  representa los autovalores de la matriz. La expresión II-23 supone una ecuación de tercer grado en  $\gamma$ , con lo que se obtendrán tres autovalores al solucionarla, y por tanto, tres tiempos de decaimiento. Ya que en la matriz  $\mathbf{A}$  aparece la concentración de  $\text{H}^+$ , a cada valor de pH la ecuación II-23 tendrá una forma diferente, y por tanto, soluciones diferentes. De aquí se deriva la dependencia de los tiempos de decaimiento con el pH en este modelo tricompartmental. En esta Memoria se ha utilizado para el cálculo de los autovalores de la matriz compartimental el software *Mathcad 2000 Professional*.

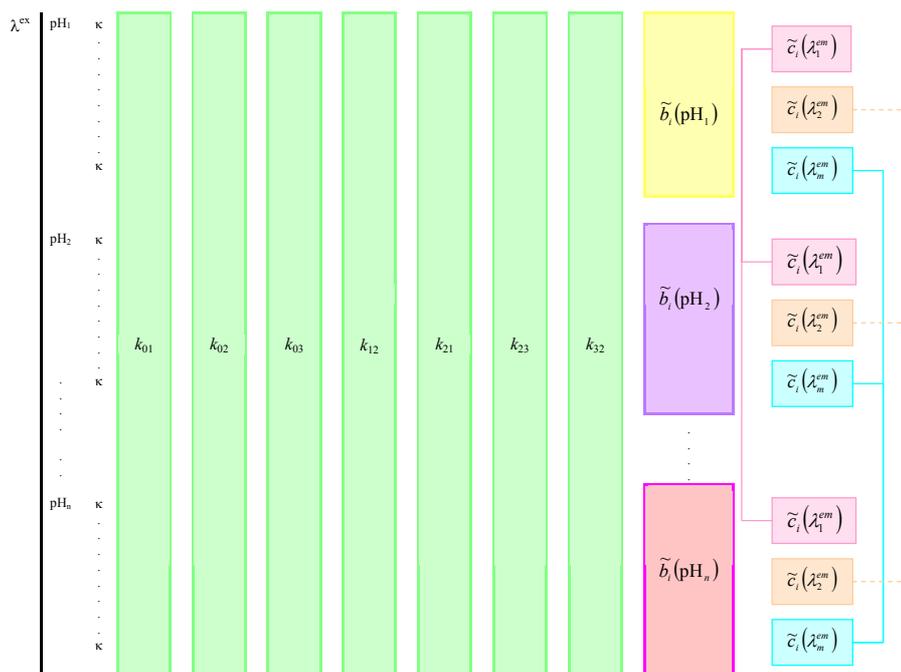
Las ecuaciones explícitas de los pre-exponenciales  $p_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) también son excesivamente complicadas y largas. Para su cálculo se ha derivado una expresión que es consecuencia de igualar las ecuaciones II-6 y II-22. Así, se obtiene, que los pre-exponenciales vienen dados por los elementos diagonales de la multiplicación matricial  $\mathbf{U}^{-1} \tilde{\mathbf{b}} \tilde{\boldsymbol{\tau}} \mathbf{U}$ :

$$p_i = \kappa \left( \mathbf{U}^{-1} \tilde{\mathbf{b}} \tilde{\boldsymbol{\tau}} \mathbf{U} \right)_{ii} \quad (\text{II-24})$$

Del mismo modo, se utilizó el software *Mathcad 2000 Professional* para la realización de las multiplicaciones de matrices y el cálculo de los pre-exponenciales.

Como ya se ha comentado, la realización de un análisis global compartimental de una superficie de decaimientos de fluorescencia completa permite relacionar todos los parámetros ajustables entre sí. Así, el esquema de ligado de parámetros supone ligar todas las constantes cinéticas en todos los decaimientos, relacionar los  $\tilde{b}_i$  a la misma longitud de onda de excitación y pH, y para los decaimientos recogidos a la misma longitud de onda de emisión se ligan las  $\tilde{\tau}_i$ . Así, la implementación del análisis global tricompartmental de

reacciones ESPT consecutivas supone el ajuste de las constantes cinéticas  $k_{01}$ ,  $k_{02}$ ,  $k_{03}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{23}$  y  $k_{32}$ , la concentración normalizada a tiempo cero de las especies  $1^*$  y  $2^*$ ,  $\tilde{b}_1$  y  $\tilde{b}_2$ , a cada pH y longitud de onda de excitación, y el parámetro de emisión normalizado de las especies  $1^*$  y  $2^*$ ,  $\tilde{c}_1(\lambda^{em})$  y  $\tilde{c}_2(\lambda^{em})$ . El esquema II-6 muestra la implementación del ligado de parámetros a lo largo de la superficie de decaimientos.



**Esquema II-6:** Esquema de ligado de parámetros ajustables en un análisis global tricompartmental de ESPT.

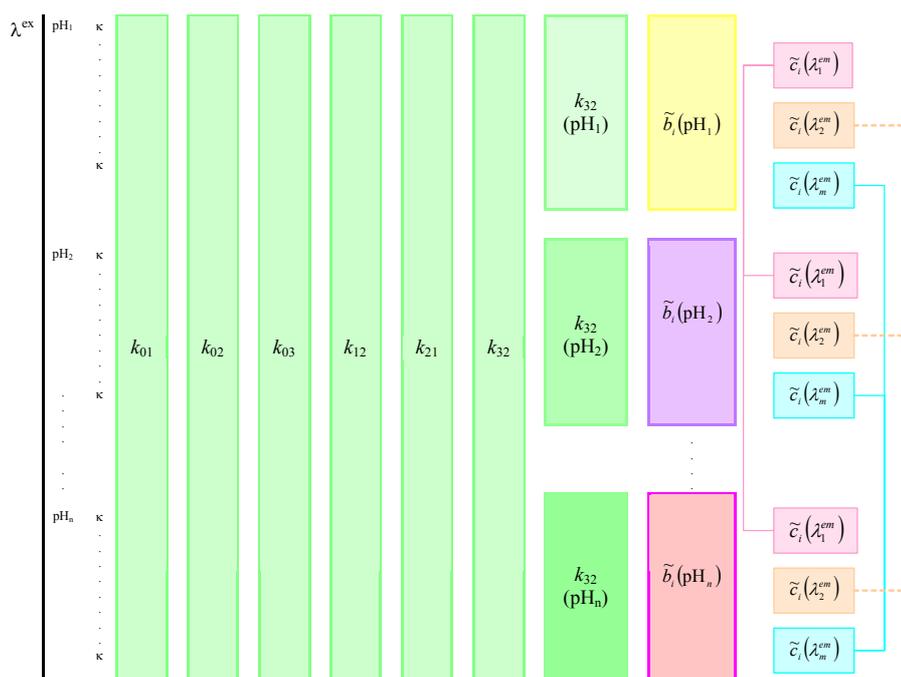
Sin embargo, y debido a que este modelo compartimental no está programado en el software de análisis, hay que realizar algunas modificaciones en el esquema general. En el sistema compartimental disponible en el software, ambas constantes cinéticas,  $k_{23}$  y  $k_{32}$ , están definidas como constantes de primer orden. En cambio, en el modelo propuesto en esta Memoria,  $k_{32}$  viene definida

como constante cinética bimolecular, de segundo orden. Según esto, se hace necesaria la definición de una pseudo-constante cinética de primer orden  $k'_{32}$ , la cual viene dada por la siguiente ecuación:

$$k'_{32} = k_{32}[\text{H}^+] \quad (\text{II-25})$$

$$\log(k'_{32}) = \log(k_{32}) + \log([\text{H}^+]) \quad (\text{II-26})$$

La constante  $k'_{32}$  tendrá un valor diferente para cada concentración de  $\text{H}^+$ . Por tanto, esta constante será equivalente a la  $k_{32}$  del modelo disponible en el software. Así, esta  $k'_{32}$  se puede ligar entre decaimientos recogidos para disoluciones al mismo pH, y la constante real  $k_{32}$  se calculará posteriormente, mediante la representación gráfica de los valores de  $k'_{32}$  recuperados en el análisis frente a  $[\text{H}^+]$ , o bien mediante la representación logarítmica ( $\log(k'_{32})$  vs  $\log[\text{H}^+]$ ). Esta modificación altera el esquema II-6, de manera que el esquema utilizado en esta Memoria para los análisis globales tricompartmentales es el II-7.



**Esquema II-7:** Esquema de ligado de parámetros ajustables en un análisis global tricompartmental de ESPT empleado en esta Memoria debido a necesidades impuestas por el *software* de análisis.

Finalmente, para el cálculo de los espectros de emisión y excitación asociados a las tres especies se emplearon las ecuaciones generales I-31 y I-32.



### ***III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---

---





### III.1.- CARACTERÍSTICAS DE ABSORCIÓN Y EQUILIBRIOS ÁCIDO–BASE DEL OREGON GREEN 488.

Como paso inicial en el estudio de las propiedades fotofísicas del OG488 en disolución acuosa, se realizó la caracterización de su estado fundamental. En este sentido, se han estudiado las constantes que caracterizan los equilibrios ácido–base implicados ( $pK_a$ ), así como los diferentes espectros de absorción, individualizados, de las especies prototrópicas presentes. Adicionalmente, se comprobó la ausencia de reacciones de complejación en el estado fundamental con las especies químicas que componen el tampón, en ocasiones añadido, al sistema en disolución.

La adquisición de estos coeficientes de extinción molar, y las constantes de los equilibrios ácido–base es fundamental para el estudio de las reacciones en el estado excitado, ya que determinan el punto de partida tras la excitación, y por tanto, influyen de manera importante en estos procesos dinámicos en el estado excitado.

Por otra parte, al ser el OG488 una molécula de reciente comercialización, existe muy poca información sobre los datos que la describen. Por ejemplo, como ya se ha mencionado en la sección *Introducción*, en la bibliografía consultada sólo se encuentra descrita una de sus constantes ácido–base ( $pK_3 = 4.8$  por *Sun et al., 1997*). Así, la aportación de las características ácido–base en disolución acuosa, en el estado fundamental, es por sí misma de relevante interés.

#### III.1.1.- Obtención de constantes ácido–base y de espectros de absorción de las especies prototrópicas en disolución acuosa.

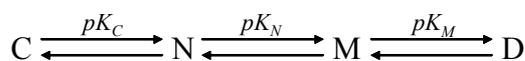
Las leyes que rigen los equilibrios ácido–base y la absorción de las diferentes especies prototrópicas son sobradamente conocidas. Según éstas, los cambios en la absorbancia de una disolución con el pH, cuando existen  $i$  formas

prototrópicas distintas en equilibrio, con diferentes espectros de absorción, vendrán dados por las constantes de los equilibrios ( $pK_a$ ) y los coeficientes de extinción molar de cada especie a una longitud de onda dada. Así, la absorbancia a una determinada longitud de onda y a un cierto valor de pH viene dada por la expresión:

$$A = C_T \left( \sum_i \alpha_i \varepsilon_i \right) d \quad (\text{III-1})$$

en donde  $C_T$  es la concentración total de fluoróforo,  $\alpha_i$  es la fracción molar de la forma prototrópica  $i$ ,  $\varepsilon_i$  el coeficiente de extinción molar de la especie  $i$  y  $d$  es el paso óptico.

Como se mencionó en la *Introducción*, el OG488 presenta los mismos grupos protonables que la fluoresceína. Por lo tanto, en el estudio absorciométrico de los equilibrios ácido-base en el estado fundamental del OG488, se considerarán cuatro diferentes especies prototrópicas: catión (C), neutra (N), monoanión (M) y dianión (D). Así, tres  $pK_a$  están implicados en los equilibrios ácido-base, según el esquema III-1.



**Esquema III-1:** Equilibrios prototrópicos considerados en el tratamiento del estado fundamental de la 2',7'-difluorofluoresceína.

Las fracciones molares de cada especie en función del pH vienen dadas por las expresiones siguientes:

$$\alpha_C = \frac{[H^+]^3}{P} \quad (\text{III-2})$$

$$\alpha_N = \frac{K_C [H^+]^2}{P} \quad (\text{III-3})$$

$$\alpha_M = \frac{K_C K_N [H^+]}{P} \quad (\text{III-4})$$

$$\alpha_D = \frac{K_C K_N K_M}{P} \quad (\text{III-5})$$

en donde  $P = [H^+]^3 + K_C [H^+]^2 + K_C K_N [H^+] + K_C K_N K_M$ .

Sobre esta base, se ha procedido a determinar los tres valores de  $pK_a$  y los coeficientes de extinción molar de cada una de las especies a las diversas longitudes de onda de interés. En este estudio se han utilizado dos procedimientos diferentes: por una parte, se emplearon diferentes ajustes por mínimos cuadrados, mientras que por otra, se utilizó la herramienta matemática conocida como análisis de componentes principales (PCA).

#### III.1.1.1.- Procedimiento 1: Ajustes por mínimos cuadrados.

##### III.1.1.1.1.- Determinación de $\epsilon_D$ .

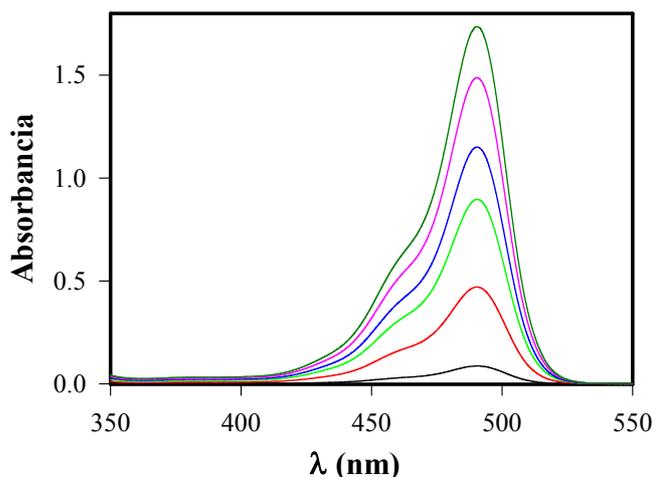
Tomando como referencia el  $pK_M$  proporcionado por *Sun et al. (1997)* cuyo valor es de 4.8, se pueden conseguir disoluciones, a valores de pH suficientemente elevados, en donde exclusivamente existe la especie dianiónica. Así, la ecuación III-1 se convierte en:

$$A = C_T \epsilon_D d \quad (\text{III-6})$$

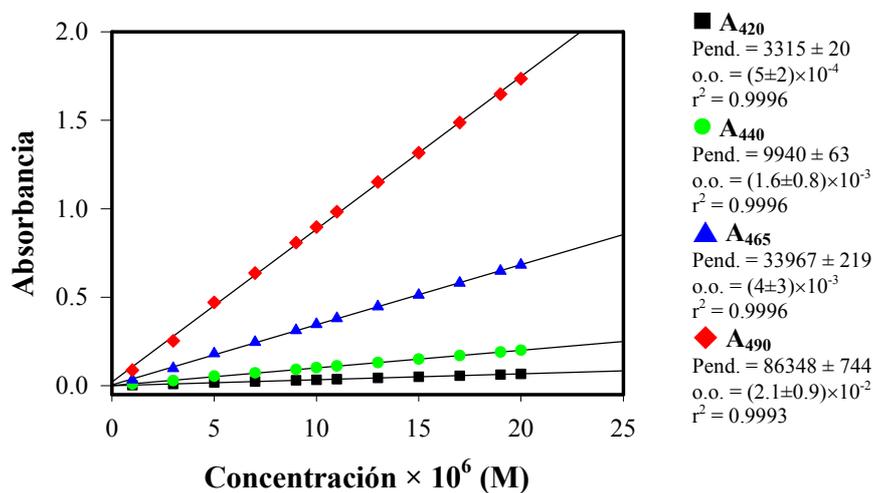
Se recogieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas de OG488 y una concentración constante de KOH de 0.08 M (pH  $\approx$  13), tal y como se describe en la sección *Materiales y Métodos*. Para ello, se prepararon disoluciones con concentraciones crecientes de OG488 en el intervalo entre  $1.0 \times 10^{-6}$  y  $2.0 \times 10^{-5}$  M.

Posteriormente, se realizó un ajuste lineal  $A$  vs  $C_T$  por mínimos cuadrados, para todas las longitudes de onda (en intervalos de 0.5 nm). Al emplearse cubetas de 1 cm de paso óptico, la pendiente de las representaciones proporciona directamente el coeficiente de extinción molar de la especie

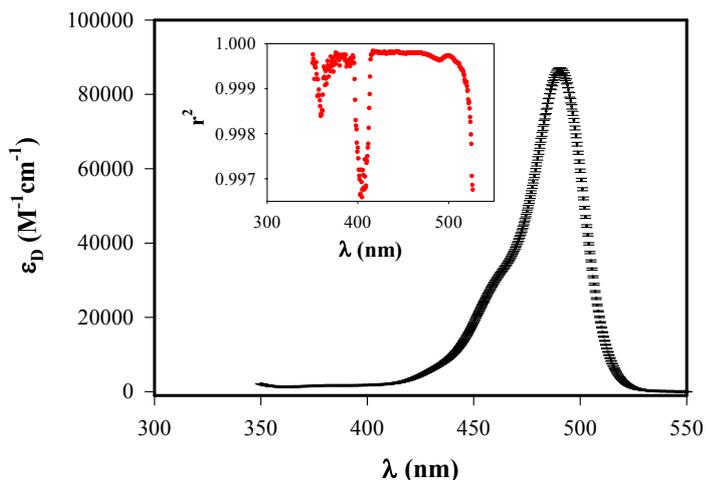
dianiónica  $\varepsilon_D$  a cada longitud de onda determinada. En la figura III-1 se muestran los espectros recogidos, mientras que en la figura III-2 se observan algunos de los ajustes lineales efectuados, junto con sus parámetros estadísticos. Se puede comprobar que la linealidad de la ley de Beer se cumple bien, incluso hasta una concentración de  $2.0 \times 10^{-5}$  M. En la figura III-3 se representan los valores de los coeficientes de extinción molar obtenidos, así como su error asociado, junto al coeficiente de regresión obtenido que se ha mantenido superior a 0.998 a las longitudes de onda de mayor interés. Como se puede observar, a todas las longitudes de onda en las que la absorbancia tiene un valor significativo, el error asociado a la determinación de  $\varepsilon_D$  es muy pequeño (desviaciones estándar relativas inferiores al 1%) y que, de forma consistente, la ordenada en el origen de las rectas obtenidas resulta despreciable. El máximo del espectro de la especie dianiónica se ha encontrado a 490.5 nm, y el coeficiente de extinción molar en esa longitud de onda es de  $86430 \pm 740 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Estos resultados son concordantes con los reportados por la bibliografía. *Sun et al. (1997)* han encontrado un coeficiente de extinción molar para la especie dianiónica de  $82400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 490 nm, mientras que *Haugland (2002)* proporciona un valor de  $87000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a la misma longitud de onda. Adicionalmente, se debe destacar la similitud con la especie dianiónica de la fluoresceína, que presenta un máximo a 490 nm, con un coeficiente de extinción molar que varía ligeramente según la bibliografía consultada: 88000 (*Martin y Lindqvist, 1975*), 78900 (*Diehl, 1989*), 76900 (*Sjöback et al., 1995*), 87700 (*Klonis y Sawyer, 1996*), o  $83600 \pm 700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (*Ballesteros, 1998*). Sin embargo, la comparación entre estos valores y el  $\varepsilon_D$  calculado para la 2',7'-diclorofluoresceína, no es tan relevante, ya que esta última presenta el máximo desplazado hacia el rojo (máximo a 503 nm) y un coeficiente de extinción ( $101000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) de mayor valor, debido al efecto de átomo pesado de los sustituyentes Cl (*Leonhardt et al., 1971*).



**Figura III-1:** Espectros de absorción de disoluciones de OG488 a concentraciones crecientes, con una concentración de KOH 0.08 M.  $[OG488] = 1.0 \times 10^{-6}$  M (—),  $5.0 \times 10^{-6}$  M (—),  $1.0 \times 10^{-5}$  M (—),  $1.3 \times 10^{-5}$  M (—),  $1.7 \times 10^{-5}$  M (—),  $2.0 \times 10^{-5}$  M (—).



**Figura III-2:** Ajustes lineales  $A$  vs  $C_T$  de los espectros recogidos a pH básico, a las longitudes de onda de 420 (■), 440 (●), 465 (▲) y 490 nm (◆). Las líneas representan los ajustes lineales.



**Figura III-3:** Representación de los coeficientes de extinción molar calculados frente a la longitud de onda, para la especie dianiónica del OG488. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida en el ajuste lineal.

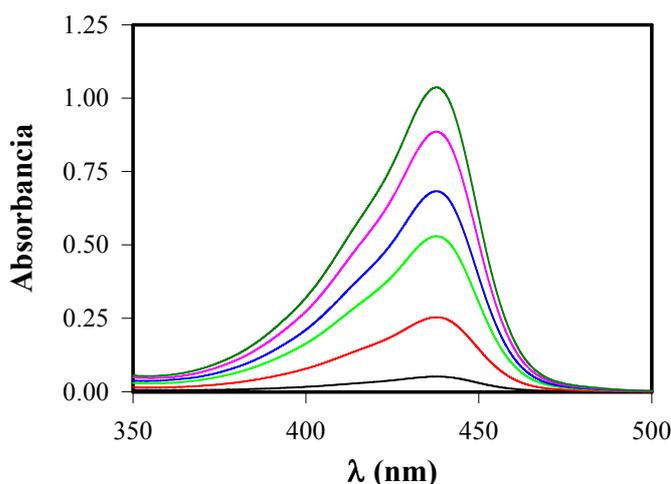
**Figura insertada:** Representación de los coeficientes de regresión  $r^2$  (●) obtenidos en los ajustes a las diferentes longitudes de onda.

#### III.1.1.1.2.- Determinación de $\epsilon_C$ .

De la misma forma que en el apartado anterior, a pH suficientemente ácido, únicamente existe la especie catiónica y la ecuación III-1 se reduce a:

$$A = C_T \epsilon_C d \quad (\text{III-7})$$

Así, se repitió el mismo proceso anterior para la especie catiónica. Se recogieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de OG488 entre  $1.0 \times 10^{-6}$  y  $2.0 \times 10^{-5}$  M y a una concentración constante de HCl de 2 M. Estos espectros se recogen en la figura III-4.



**Figura III-4:** Espectros de absorción de disoluciones de OG488 a concentraciones crecientes, con una concentración de HCl 2 M. [OG488] =  $1.0 \times 10^{-6}$  M (—),  $5.0 \times 10^{-6}$  M (—),  $1.0 \times 10^{-5}$  M (—),  $1.3 \times 10^{-5}$  M (—),  $1.7 \times 10^{-5}$  M (—),  $2.0 \times 10^{-5}$  M (—).

Igualmente, se realizaron los ajustes lineales por mínimos cuadrados de las absorbancias experimentales frente a la concentración, para todas las longitudes de onda (en intervalos de 0.5 nm). La pendiente de estos ajustes proporciona el coeficiente de extinción molar de la especie catiónica. En las figuras III-5 y III-6 se muestran algunos de estos ajustes, así como los resultados de los coeficientes de extinción molar recuperados, junto a su error asociado (la desviación estándar relativa fue, en cualquier caso, menor del 1.5%). La linealidad es muy aceptable hasta una concentración de  $2.0 \times 10^{-5}$  M. Además, se puede observar que las ordenadas en el origen calculadas son estadísticamente iguales a cero, a todas las longitudes de onda. También se muestran los valores de los coeficientes de regresión obtenidos, que son iguales o superiores a 0.999 a las longitudes de onda de interés.

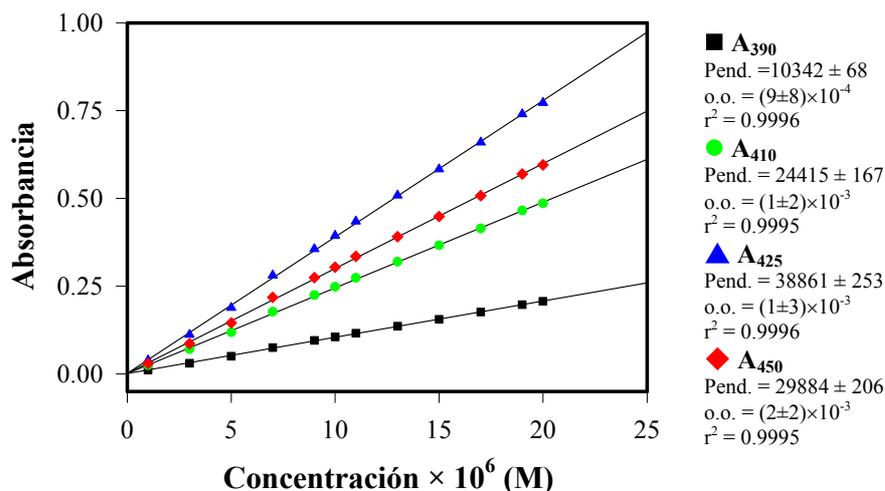


Figura III-5: Ajustes lineales  $A$  vs  $C_T$  de los espectros recogidos a pH muy ácido, a las longitudes de onda de 390 (■), 410 (●), 425 (▲) y 450 nm (◆). Las líneas representan los ajustes lineales.

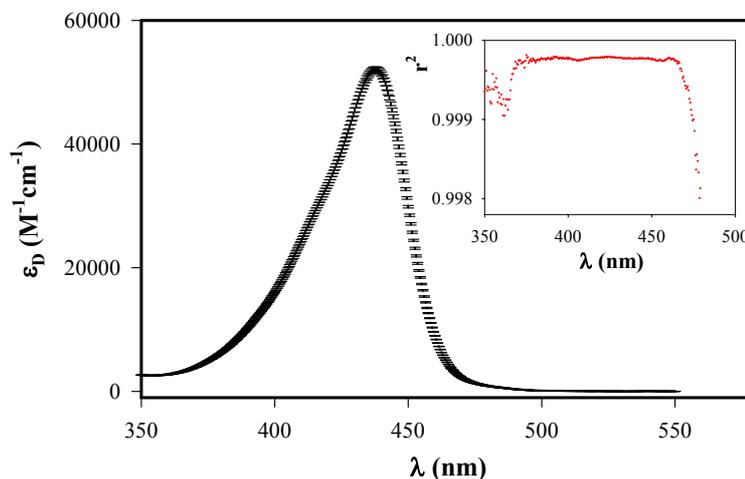


Figura III-6: Representación de los coeficientes de extinción molar calculados frente a la longitud de onda, para la especie catiónica del OG488. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida en el ajuste lineal.

Figura insertada: Representación de los coeficientes de regresión  $r^2$  (●) obtenidos en los ajustes a las diferentes longitudes de onda.

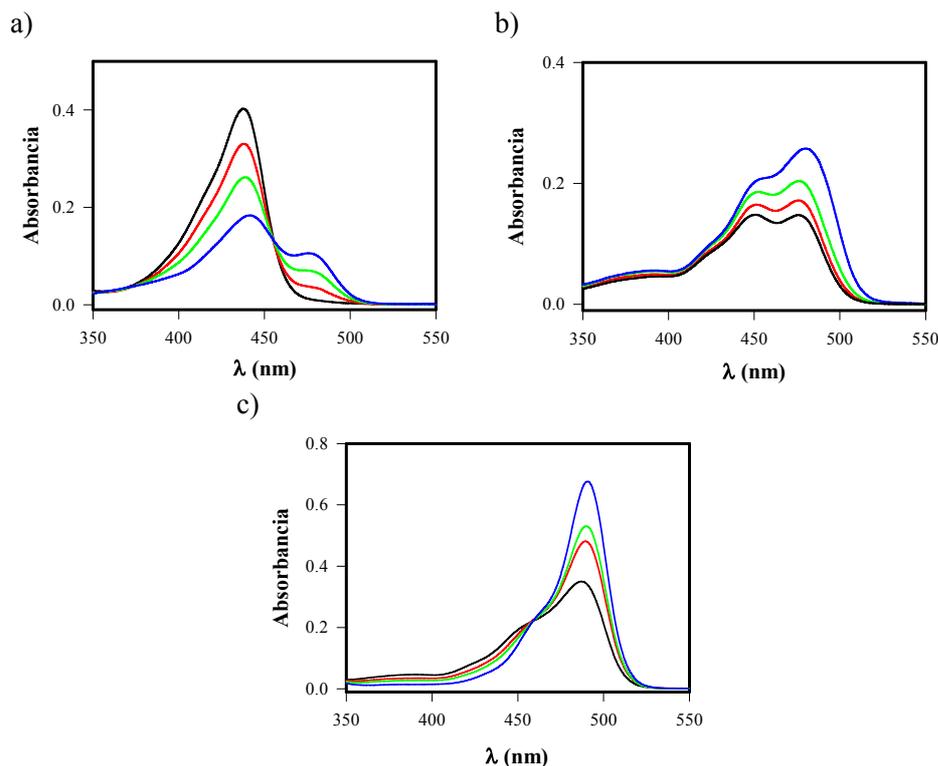
Como se observa en la figura III-6, el espectro de la especie catiónica del OG488 consta de una banda simple con un máximo a 438 nm, en donde el coeficiente de extinción molar es  $52130 \pm 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Al no existir información espectroscópica en la bibliografía sobre esta especie, se comparará

el resultado obtenido en esta Memoria con el correspondiente al catión de la fluoresceína. Según la bibliografía consultada, los valores del coeficiente de extinción molar en el máximo a 437 nm, son de 55000 (*Martin y Lindqvist, 1975*), 49800 (*Diehl, 1989*), 53000 (*Sjöback et al., 1995*), 55000 (*Klonis y Sawyer, 1996*), o  $49200 \pm 800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (*Ballesteros, 1998*).

#### III.1.1.1.3.- Ajuste global de la superficie $A$ vs $\lambda$ vs pH.

Obtención de los primeros valores de  $pK_a$ .

Se recogieron los espectros de disoluciones acuosas de OG488 en un intervalo de pH entre  $-0.12$  y  $12.4$ , con fuerza iónica constante ( $1 \text{ M}$  en KCl). Se realizaron tres series de medidas con diferentes concentraciones de OG488. A concentraciones  $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  y  $7.5 \times 10^{-6} \text{ M}$  se registraron los espectros a 20 valores distintos de pH, mientras que a  $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  se recogieron 12 espectros a distinto pH. Por lo tanto, un total de 52 espectros configuraron una superficie de absorbancia, longitud de onda, pH y concentración de OG488. En la figura III-7, donde se representan algunos espectros de la serie de concentración  $7.5 \times 10^{-6} \text{ M}$  en OG488, se pueden observar con claridad dos puntos isobéuticos, uno entre el espectro de la forma catiónica y otra especie, mientras que el otro se forma entre la especie dianiónica y la especie prototrópica anterior.



**Figura III-7-a):** Espectros de absorción de disoluciones de OG488  $7.5 \times 10^{-6}$  M a los valores de pH de -0.13 (—), 0.55 (—), 1.03 (—) y 1.49 (—).

**Figura III-7-b):** Espectros de absorción de disoluciones de OG488  $7.5 \times 10^{-6}$  M a los valores de pH de 2.53 (—), 3.01 (—), 3.49 (—) y 4.07 (—).

**Figura III-7-c):** Espectros de absorción de disoluciones de OG488  $7.5 \times 10^{-6}$  M a los valores de pH de 4.54 (—), 4.96 (—), 5.17 (—) y 12.42 (—).

Dado que en la bibliografía solo se encuentra el valor del  $pK_M = 4.8$  (Sun *et al.*, 1997) que rige el equilibrio monoanión/dianión, se ha optado por realizar un ajuste global de todas las curvas  $A$  vs pH, al objeto de calcular simultáneamente los valores de las tres constantes. El procedimiento seguido para la realización del ajuste global no lineal por mínimos cuadrados, basado en el algoritmo de Levenberg – Marquardt, se explica a continuación:

Se parte de la ecuación general que proporciona la absorbancia conjunta de las cuatro especies:

$$A = C_T (\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N + \alpha_M \varepsilon_M + \alpha_D \varepsilon_D) d \quad (\text{III-8})$$

en donde  $\alpha_i$  son las fracciones molares de cada especie, que fueron anteriormente definidas en las ecuaciones III-2, III-3, III-4 y III-5. Dividiendo por la concentración total y por el coeficiente de extinción molar de la especie D (ya calculado para cada longitud de onda en la sección anterior) y haciendo  $d = 1$  cm (paso de luz empleado en las medidas experimentales), queda:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_D} = \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_D} \alpha_C + \frac{\varepsilon_N}{\varepsilon_D} \alpha_N + \frac{\varepsilon_M}{\varepsilon_D} \alpha_M + \alpha_D \quad (\text{III-9})$$

Con esta ecuación se pueden ajustar simultáneamente las tres series de medidas a diferentes concentraciones. Para cada longitud de onda los cocientes  $\varepsilon_i/\varepsilon_D$  varían, mientras que las constantes de los equilibrios ácido-base, implícitas en las definiciones de  $\alpha_i$ , son comunes para todas las curvas  $A$  vs pH. Con estas consideraciones, la ecuación finalmente ajustada es la siguiente:

$$\begin{aligned} \frac{A}{C_T \varepsilon_D} = & R_C \frac{10^{-3pH}}{P} + R_N \frac{10^{-2pH-pK_C}}{P} + \\ & + R_M \frac{10^{-pH-pK_C-pK_N}}{P} + \frac{10^{-pK_C-pK_N-pK_M}}{P} \end{aligned} \quad (\text{III-10})$$

en donde  $\frac{A}{C_T \varepsilon_D}$  es la variable dependiente y el pH la variable independiente.

Se ha denotado por  $R_i$  al cociente  $\varepsilon_i/\varepsilon_D$  y  $P$  es el polinomio dado por la ecuación III-11.

$$P = [H^+]^3 + K_C [H^+]^2 + K_C K_N [H^+] + K_C K_N K_M \quad (\text{III-11})$$

Los parámetros del ajuste son los tres  $pK_a$  (que son parámetros ligados y comunes a todas las longitudes de onda) y los valores de  $R_i$  (que son diferentes a cada longitud de onda).

El ajuste global no lineal se llevó a cabo utilizando el programa *Origin 6.0*, empleándose doce longitudes de onda diferentes (430, 440, 445, 450, 460, 465, 475, 485, 490, 495, 500 y 505 nm) y las tres series de datos experimentales

(52 espectros en total). Se ha construido, por tanto, una superficie  $\frac{A}{C_T \epsilon_D}$  vs pH vs  $\lambda$  formada por 624 puntos.

La figura III-8 muestra algunos de estos ajustes y en la tabla VI se recogen los valores de  $pK_a$  recuperados, junto con su error asociado. El proceso de ajuste realizado proporciona una aceptable correlación entre los parámetros obtenidos. Así, el valor de los parámetros de dependencia estuvo siempre por debajo de 0.85. Como es conocido, este dato estadístico es muy importante para descartar efectos de excesiva correlación entre los parámetros recuperados. El coeficiente de regresión de este ajuste simultáneo fue de 0.9986.

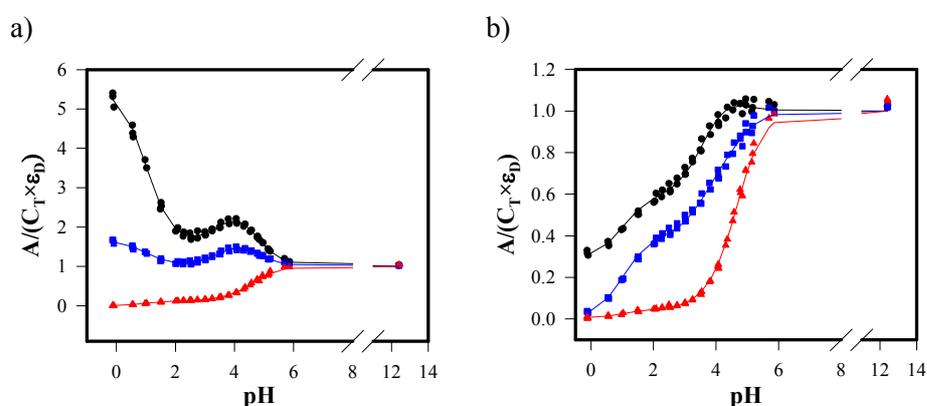


Figura III-8: Ajuste no lineal por mínimos cuadrados de  $A/(C_T \epsilon_D)$  vs pH. Las absorbancias están medidas a las longitudes de onda de: a) 440 (●), 450 (■) y 490 nm (▲). b) 460 (●), 475 (■) y 505 nm (▲).

Tabla VI: Valores de  $pK_a$  recuperados del ajuste global no lineal por mínimos cuadrados de la superficie  $A/(C_T \epsilon_D)$  vs pH.

	Valor	Correlación cruzada	Bibliografía
$pK_C$	$1.01 \pm 0.01$	0.73	--
$pK_N$	$3.57 \pm 0.03$	0.81	--
$pK_M$	$4.71 \pm 0.01$	0.77	4.8 ( <i>Sun et al. 1997</i> )

Aunque el ajuste fue satisfactorio, los valores de  $pK_a$  recuperados no se han considerado definitivos. No obstante, se van a utilizar como punto de

partida en el proceso final de ajuste y obtención de los perfiles espectrales del resto de las especies prototrópicas y de los valores definitivos de las constantes de acidez, que se va a desarrollar a continuación.

III.1.1.1.4.- Obtención de los perfiles espectrales y estimación definitiva de los  $pK_a$ .

Partiendo de los valores de  $pK_a$  recuperados del ajuste global anteriormente expuesto (tabla VI), se realizaron ajustes no lineales por mínimos cuadrados de todas las curvas  $A/C_T$  vs pH (según la ecuación III-12) a todas las longitudes de onda registradas y de forma simultánea para las tres series de datos. Esto implica la utilización de 401 curvas con 52 puntos cada curva.

$$\frac{A(\lambda)}{C_T} = \alpha_C \varepsilon_C(\lambda) + \alpha_N \varepsilon_N(\lambda) + \alpha_M \varepsilon_M(\lambda) + \alpha_D \varepsilon_D(\lambda) \quad \text{(III-12)}$$

En la ecuación se ha supuesto un paso de luz de 1 cm.  $\alpha_i$  son las fracciones molares de las diferentes especies prototrópicas, dadas por las ecuaciones III-2, III-3, III-4 y III-5, que dependen del pH y de los tres valores de  $pK_a$ .  $\varepsilon_i(\lambda)$  son los coeficientes de extinción molar de cada especie a la longitud de onda considerada.

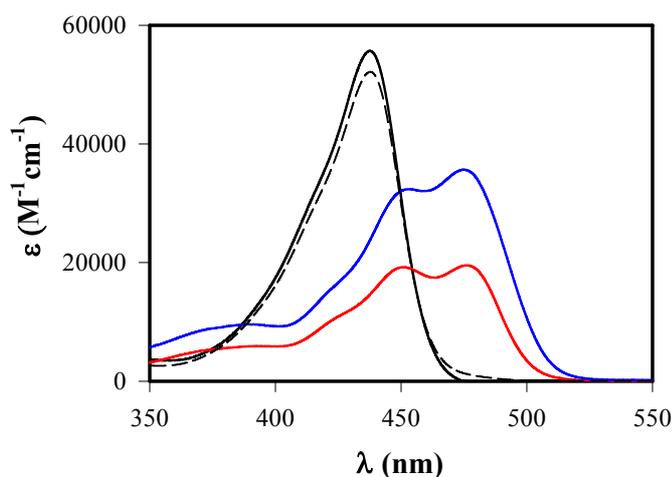
En un primer ajuste, se dejaron como parámetros fijos los valores de  $pK_a$  de la tabla VI, y los de  $\varepsilon_C$  y  $\varepsilon_D$ , y se obtuvieron los espectros de absorción para las especies neutra y monoaniónica. Sin embargo, a las longitudes de onda de mayor absorción de la especie catiónica, la función de ajuste queda subestimada a valores bajos de pH. Esto se puede deber a que los valores de  $\varepsilon_C$  calculados en el apartado III.1.1.2 sean más bajos que los que definen las curvas que aparecen en la figura III-8, probablemente debido a que al pH utilizado en el anterior apartado, aún existe contribución de la especie neutra, por lo cual la suposición realizada en la ecuación III-7 no sería correcta.

Debido a esta circunstancia, se modificó el ajuste simultáneo de las curvas  $A/C_T$  vs pH, según la ecuación III-12, dejando como parámetros fijos los

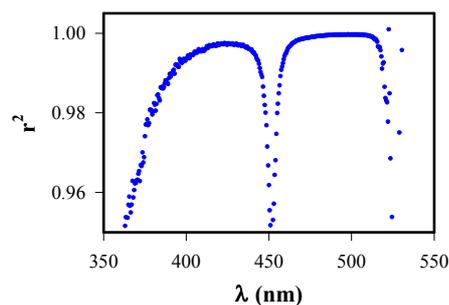
tres valores de  $pK_a$  de la tabla VI, y el valor de  $\varepsilon_D$  a cada longitud de onda calculado en el apartado III.1.1.1 y como parámetros ajustables se utilizaron  $\varepsilon_C$ ,  $\varepsilon_N$  y  $\varepsilon_M$  a cada longitud de onda.

También se calcularon, como medida de la bondad de los ajustes, los coeficientes de regresión  $r^2$  de los ajustes de cada curva, según las expresiones desarrolladas en la sección de *Introducción* (ecuación I-21).

En la figura III-9 se muestran los espectros de absorción, obtenidos a través de estos ajustes, de las especies catiónica, neutra y monoaniónica. También se representa el espectro de absorción de la especie catiónica considerado previamente (procedente de la figura III-6). Se observa como el espectro de la especie catiónica había sido subestimado anteriormente y que poseía cierta contribución de la especie neutra, lo que se refleja en una absorbancia mayor a las longitudes de onda en torno a 475 nm. En la figura III-10 se muestran los coeficientes de regresión  $r^2$  obtenidos en estos ajustes, calculados según la expresión de la ecuación I-21.



**Figura III-9:** Representación de los coeficientes de extinción molar obtenidos mediante ajustes no lineales, frente a la longitud de onda, de las especies catiónica (—), neutra (—) y monoaniónica (—) del OG488. Para su comparación también se muestra el espectro de la especie catiónica calculado en el apartado III.1.1.2 (— —).



**Figura III-10:** Representación de los coeficientes de regresión  $r^2$  (●) calculados para los ajustes no lineales por mínimos cuadrados a cada longitud de onda de absorción.

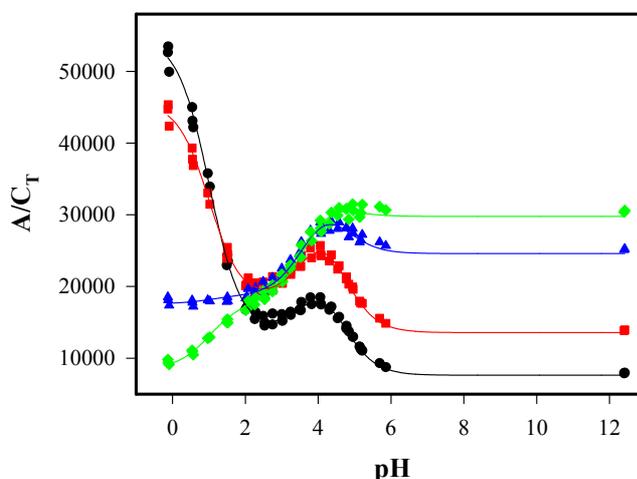
Así, el coeficiente de extinción molar de la especie catiónica en el máximo (437.5 nm) es de  $55680 \pm 530 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Es destacable los perfiles tan similares que presentan las formas neutra y monoaniónica. Ambos presentan dos máximos alrededor de 450 y 475 nm, aunque el de 475 nm es más notable en la especie monoaniónica. Los máximos de la forma neutra, 451.5 y 476 nm, tienen un coeficiente de extinción molar de  $19215$  y  $19530 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  respectivamente, mientras que los del monoanión a esas longitudes de onda son  $32290$  y  $35580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El hecho de que la especie neutra tenga un coeficiente de extinción molar menor se debe a que, en disolución acuosa, esta especie se encuentra parcialmente en su forma lactónica tautomérica y esta forma no absorbe en el visible. No obstante, esto será motivo de discusión en el apartado III.1.2.3.

Finalmente, se han utilizado los espectros de las cuatro especies que se han obtenido mediante el anterior ajuste de los datos experimentales, para realizar otros ajustes simultáneos no lineales por mínimos cuadrados, de varias series de  $A/C_T$  vs pH a diferentes longitudes de onda. Se ha adoptado esta forma de proceder al objeto de alcanzar, mediante un método iterativo, resultados concordantes en los sucesivos ajustes, para los coeficientes de extinción molar y los valores de  $pK_a$ . Así, en este último análisis los valores recuperados de los coeficientes de extinción molar en el apartado anteriormente descrito, fueron

parámetros fijos durante el ajuste y los parámetros ajustables y ligados entre las distintas curvas en el proceso de ajuste fueron los tres valores de  $pK_a$ .

Con esta forma de proceder, se ajustaron globalmente las curvas  $A/C_T$  vs pH para las longitudes de onda siguientes: 400, 410, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 455, 460, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505 y 510 nm, incluyendo las tres series de diferentes concentraciones de OG488. El ajuste global no lineal se llevó a cabo mediante el programa *Origin 6.0*. En total, se emplearon doce curvas de 52 puntos, que conforman una superficie  $A/C_T$  vs pH de 936 puntos.

En la figura III-11 se puede observar la buena concordancia de los valores experimentales de absorbancia a las líneas procedentes del ajuste no lineal por mínimos cuadrados. En la tabla VII se muestran los valores de  $pK_a$  obtenidos junto con su error asociado y el parámetro de correlación cruzada entre los valores de los diferentes parámetros ajustados. Se puede observar que la correlación entre los parámetros es bastante aceptable, quedando en todo caso el valor de los parámetros de correlación cruzada por debajo de 0.2, lo que significa que los parámetros ajustados son totalmente independientes entre sí. El coeficiente de regresión que proporcionó el programa de ajuste fue de 0.9970.



**Figura III-11:** Ajustes no lineales por mínimos cuadrados de  $A/C_T$  vs pH. Las absorbancias están medidas a las longitudes de onda de 435 nm (—), 445 nm (—), 455 nm (—) y 460 nm (—).

**Tabla VII:** Valores de  $pK_a$  recuperados del ajuste global no lineal por mínimos cuadrados de la superficie  $A/C_T$  vs pH.

	<b>Valor</b>	<b>Correlación cruzada</b>	<b>Bibliografía</b>
$pK_C$	$1.016 \pm 0.007$	$3 \times 10^{-5}$	--
$pK_N$	$3.610 \pm 0.010$	0.156	--
$pK_M$	$4.688 \pm 0.004$	0.156	4.8 ( <i>Sun et al., 1997</i> )

Se debe de resaltar que, la repetición del ajuste, manteniendo ahora los valores de  $pK_a$  fijos y dejando flotar los de los coeficientes de extinción molar, no provoca una variación digna de mención en estos últimos, respecto a los obtenidos anteriormente, por lo que se ha dado por finalizado el proceso iterativo. Por lo tanto, se toman como resultado definitivo de este análisis los valores de  $pK_a$  de la Tabla VII y los espectros mostrados en las figuras III-3 y III-9.

Como comentario general sobre los resultados anteriores, se debe de destacar la evidente disminución de los valores de  $pK_a$  con respecto a los correspondientes a la fluoresceína ( $pK_C$  entre 2.1 y 2.25,  $pK_N$  entre 4.23 y 5.1,  $pK_M$  entre 6.31 y 6.44, en donde el intervalo corresponde a los valores extremos encontrados en la bibliografía). Parece claro que la introducción de dos átomos de flúor en la estructura de la molécula, le dan mayor polaridad al sistema aromático conjugado y este aumento de la polaridad, con respecto a la fluoresceína, origina un aumento en los valores de las constantes de acidez de las sucesivas desprotonaciones. Al ser el flúor un sustituyente fuertemente electronegativo, disminuye la densidad de carga electrónica en los grupos desprotonables,  $-\text{COOH}$  y  $-\text{OH}$ , tornándose más ácidos estos grupos. El mismo comportamiento se ha encontrado en otros derivados de la fluoresceína con sustituyentes electronegativos, como es la 2',7'-diclorofluoresceína ( $pK_C = 0.47$ ,  $pK_N = 3.50$  y  $pK_M = 4.95$ , en *Leonhardt et al., 1971*).

III.1.1.2.- *Procedimiento 2: Análisis de componentes principales.*

Como ya se mencionó en la sección de *Introducción*, el análisis de componentes principales (PCA) unido al análisis global (Análisis global de componentes principales o PCGA) es una potente herramienta para la discriminación del número de factores que influyen en un determinado fenómeno.

En el caso que nos ocupa, toda la superficie de los espectros de absorción en función del pH se puede estudiar mediante PCGA. En el procedimiento, que a continuación se explica, se ha empleado el programa SPECFIT/32, tal y como se menciona en la sección de *Materiales y Métodos*.

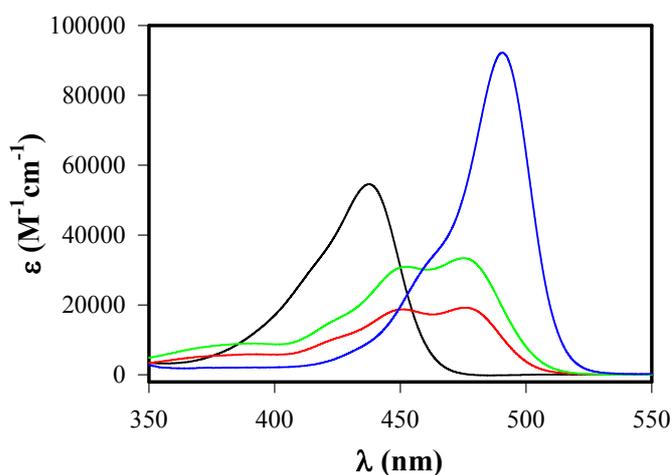
La misma superficie de espectros de absorción usada en el procedimiento anterior se introduce como matriz principal de medidas. Quedan definidos los parámetros  $Nm = 48$  (número de medidas) y  $Nw = 401$  (número de longitudes de onda medidas).

El análisis de autovectores resultó en cuatro componentes seguros, un quinto componente probable (difícil de diferenciar del ruido) y el resto de autovectores son asignables al ruido experimental.

Posteriormente se realizó el análisis libre de ningún modelo pre-estimado, es decir, el análisis de componentes principales. Este análisis llevado a cabo para cuatro componentes consecutivas (A→B→C→D) proporcionó como resultado un perfil de concentraciones frente al pH típico de cuatro especies, con espectros bien definidos. Adicionalmente, se realizó este mismo análisis para cinco especies consecutivas (A→B→C→D→E), debido al quinto posible componente derivado del estudio de autovectores. En contraste con el anterior, este estudio proporcionó un perfil de concentraciones frente al pH inconsistente y espectros con componentes negativas. Por lo tanto, el análisis de componentes principales, junto con el análisis de la superficie  $A/C_T$  vs pH en términos de especies consecutivas (libre de cualquier modelo teórico), mostró

que el comportamiento absorciométrico del sistema se describe muy bien con cuatro especies consecutivas.

Finalmente y de acuerdo a lo obtenido con anterioridad, se realizó un ajuste global de toda la superficie de datos experimentales, al objeto de obtener los valores de  $pK_a$  y los espectros definitivos de absorción de las diversas especies prototrópicas (mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados basado en el algoritmo de Marquardt), empleando el modelo de protonación de cuatro especies (tres constantes implicadas). En este proceso, basado en el análisis de componentes principales, también se utilizó el programa SPECFIT/32. En la tabla VIII y en la figura III-12 se muestran los resultados derivados de este análisis. Los valores de los parámetros de correlación cruzada de los  $pK_a$  fueron menores de 0.3, indicando una buena independencia de los parámetros obtenidos.



**Figura III-12:** Representación de los coeficientes de extinción molar frente a la longitud de onda, de las especies catiónica (—), neutra (—), monoaniónica (—) y dianiónica (—) del OG488, obtenidos mediante análisis de componentes principales.

**Tabla VIII:** Valores de  $pK_a$  recuperados por análisis de componentes principales.

	<i>Valor</i>	<b>Correlación cruzada</b>	<b>Bibliografía</b>
$pK_C$	$1.05 \pm 0.03$	0.10	--
$pK_N$	$3.40 \pm 0.05$	0.13	--
$pK_M$	$4.74 \pm 0.02$	0.28	4.8 ( <i>Sun et al. 1997</i> )

El empleo del análisis de componentes principales, análisis de autovectores, análisis multivariante, análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS), etc. son métodos que se han extendido con rapidez en el ámbito de la química y en concreto de la fotoquímica (*Al-Soufi et al., 2001*). La principal ventaja de la utilización de los autovectores de una matriz de datos experimentales es la posibilidad de separar del ruido experimental, las contribuciones debidas a variables “influyentes” en el sistema, así como decidir y clasificar los factores principales que producen las variaciones en el parámetro del sistema que va a medirse. Además, el hecho de trabajar únicamente con los vectores que producen una variación significativa en el sistema, eliminando el ruido experimental y otros factores no significativos, proporciona un ahorro claro de recursos a la hora de emplear aplicaciones informáticas y/o programar rutinas. Esto aumenta significativamente la rapidez de este tipo de análisis y, además, no necesita el empleo de microprocesadores potentes.

Los resultados obtenidos mediante este método serán discutidos comparativamente con los procedentes del proceso anterior, en el apartado siguiente.

### III.1.2.- Consideraciones adicionales.

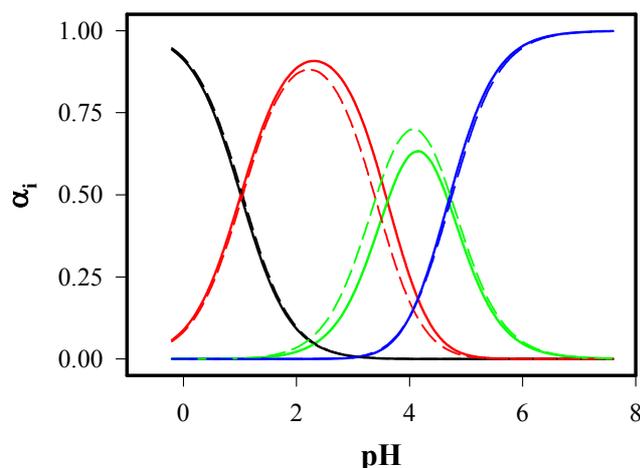
#### III.1.2.1.- *Comparación de procedimientos.*

El hecho de utilizar dos procedimientos de ajuste, basados en diferentes principios, permite demostrar la consistencia de los resultados, además de

detectar posibles correlaciones demasiado altas entre parámetros, o errores sistemáticos en el ajuste.

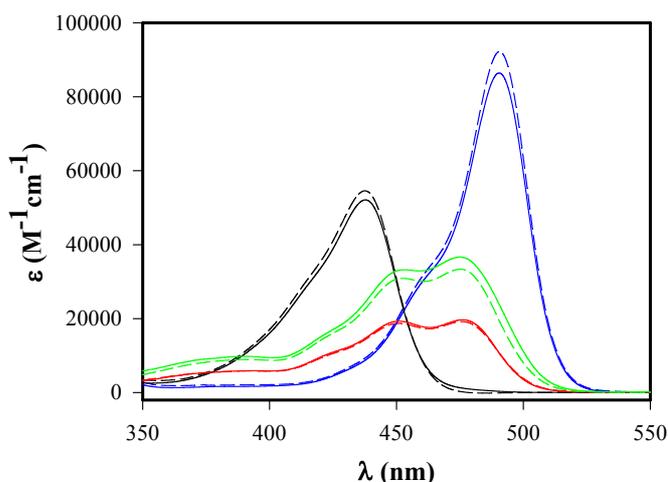
En lo referente a los valores de  $pK_a$ , se puede observar en las tablas VII y VIII que los valores para las tres constantes ácido-base son equivalentes mediante los dos procedimientos. Para  $pK_M$ , los valores de  $4.688 \pm 0.004$  y  $4.74 \pm 0.02$  son bastante próximos y sus errores asociados hacen que los resultados sean prácticamente equivalentes. De forma similar, los resultados obtenidos para  $pK_C$  son equivalentes ( $1.016 \pm 0.007$  y  $1.05 \pm 0.03$ ) y se observa que los valores extremos teniendo en cuenta los errores asociados se solapan. En cambio, los valores de  $pK_N$  están algo más dispersos,  $3.610 \pm 0.010$  y  $3.40 \pm 0.05$ , ya que hay dos décimas de diferencia en unidades de  $pK_a$ , aunque los valores de las constantes ( $2.5 \times 10^{-4}$  y  $4.0 \times 10^{-4}$  respectivamente) son del mismo orden de magnitud.

En la figura III-13 se comparan, además, los gráficos de especiación de las formas prototrópicas según ambos procedimientos. Se puede comprobar que, a grandes rasgos, presentan perfiles equivalentes, aunque, empleando los valores de  $pK_a$  obtenidos con el procedimiento 1, la fracción molar de la especie monoaniónica resulta inferior a la que dictan los valores de  $pK_a$  de la tabla VIII. Las expresiones empleadas para calcular las fracciones molares de cada especie fueron las ecuaciones III-2, III-3, III-4 y III-5.



**Figura III-13:** Representación de las fracciones molares frente al pH, del catión (—), especie neutra (—), monoanión (—) y dianión (—) del OG488, obtenidas mediante análisis no lineal por mínimos cuadrados (líneas continuas) y por PCA (líneas discontinuas).

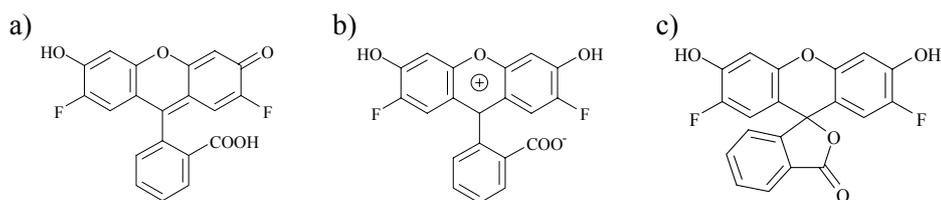
Por otro lado, en la figura III-14 aparece la comparación de los espectros obtenidos para cada especie a través de cada uno de los métodos. Se comprueba que los resultados son análogos entre sí. Esto confirma la consistencia de los resultados y la coherencia de los métodos. La mayor diferencia apreciable se presenta en el espectro de la especie dianiónica. El espectro calculado por la ley de Beer presenta un máximo de  $86430 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a  $490.5 \text{ nm}$ , mientras que el calculado por PCA tiene su máximo igualmente en  $490.5 \text{ nm}$ , con un coeficiente de extinción molar de  $92180 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Es muy probable que la sobre-estimación del espectro del dianión por PCGA sea debido a pequeñas diferencias en la asignación de las concentraciones molares en las disoluciones a pH muy básico.



**Figura III-14:** Representación de los coeficientes de extinción molar frente a la longitud de onda, de las especies catiónica (—), neutra (—), monoaniónica (—) y dianiónica (—) del OG488, obtenidos mediante análisis no lineal por mínimos cuadrados (líneas continuas) y por PCA (líneas discontinuas).

#### III.1.2.2.- Especie neutra.

Como fue expuesto en la *Introducción*, aunque la bibliografía no describe explícitamente el número de formas prototrópicas que se pueden encontrar en disoluciones acuosas de OG488, los grupos con características ácido-base son los mismos que en la fluoresceína (*Sun et al., 1997*), por lo que el tratamiento realizado hasta ahora con cuatro especies prototrópicas resulta bastante lógico. En lo referente a la especie neutra y por analogía con la fluoresceína, se pueden por tanto describir diferentes estructuras tautoméricas: quinoide, zwitteriónica y lactónica (esquema III-2).

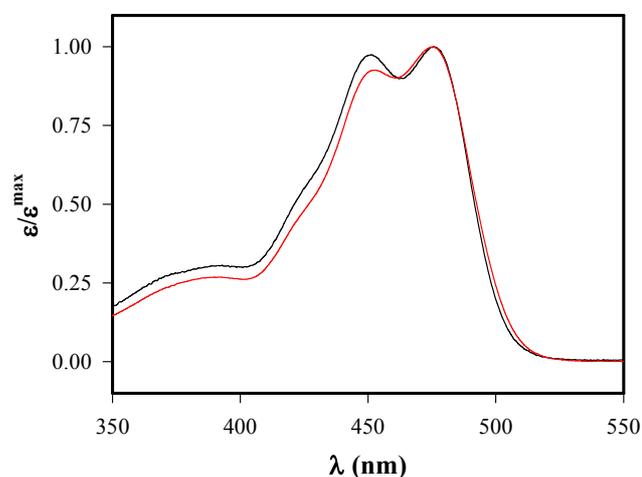


**Esquema III-2:** Estructuras tautoméricas de la especie neutra de la 2',7'-difluorofluoresceína. **a)** Quinoide, **b)** Zwitteriónica y **c)** Lactónica.

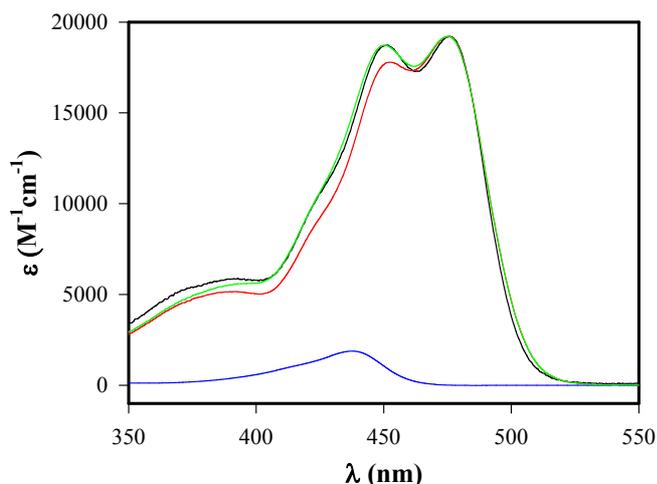
Al igual que sucede con la fluoresceína y al tratarse de estructuras prácticamente equivalentes, las características espectroscópicas de las especies tautoméricas neutras están relacionadas con las de otras especies prototrópicas (*Martin y Lindqvist, 1975*). Debido a que la absorción en el visible es debida al grupo aromático xanténico, las estructuras con la misma composición de este sistema aromático conjugado deben de tener espectros de absorción similares. De acuerdo con el esquema III-4 (página 184), la especie quinoide tendrá una emisión similar a la del monoanión, mientras que la especie zwitteriónica tiene una configuración del sistema aromático más cercana al catión. Sin embargo, en la especie lactónica, la pérdida de la conjugación en el sistema aromático, provoca que la absorción de radiación para subir de nivel electrónico sea fundamentalmente en la zona ultravioleta y que no aparezca absorción en el visible. Estas mismas consideraciones fueron empleadas por *Martin y Lindqvist (1975)* para descomponer los espectros de absorción de la fluoresceína y asignar las contribuciones de las diferentes formas prototrópicas y tautoméricas. El estudio se realizó ayudándose de los espectros de absorción de un compuesto modelo, el HPF (6-hidroxi-9-fenil-fluoron), que es similar a la fluoresceína pero sin el grupo  $-\text{COOH}$  en el anillo bencénico, con lo que se impide una de las protonaciones y también la formación de la modificación lactónica.

Ya se comentado el gran parecido entre los espectros asociados a las especies neutra y monoaniónica. En la figura III-15 se muestran los espectros normalizados de ambas formas. Se observa que el espectro de la forma neutra tiene un mayor coeficiente de extinción molar en el intervalo de longitudes de onda donde la especie catiónica presenta su máximo (430–450 nm). En cambio, en la zona del espectro donde la especie catiónica no absorbe (480–500 nm), los perfiles del monoanión y la forma neutra coinciden. Por tanto, a las longitudes de onda entre 480 y 500 nm, el espectro de la forma neutra se compone únicamente de la contribución del espectro de la forma quinoide equivalente al monoanión, si bien, la absorbancia de la forma neutra es menor, debido a la

presencia de moléculas en forma lactónica que disminuyen la concentración absorbente de la especie neutra. Así, en este intervalo de longitudes de onda se puede calcular el porcentaje de especie neutra que se encuentra en forma quinoide (espectro equivalente al monoanión), que resultó del 57.6 %. Por otro lado, cuando del espectro de la forma neutra se resta la contribución calculada del monoanión, el espectro resultante posee un perfil equivalente al catión, aunque de mucha menor intensidad. La normalización del espectro resultante con el del catión, proporciona el porcentaje de especie neutra correspondiente al perfil espectral del catión. Éste ha resultado de un 3.4 %, lo que indica la cantidad de forma zwitteriónica en la especie neutra.



**Figura III-15:** Perfiles espectrales de absorción normalizados de las especies (—) neutra y (—) monoaniónica.

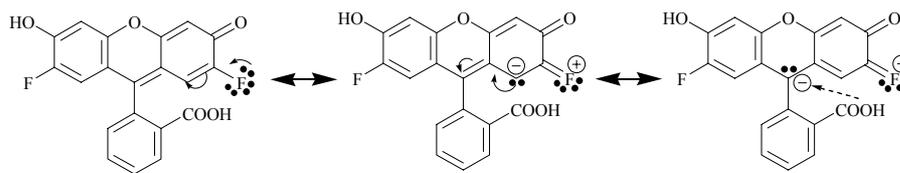


**Figura III-16:** Contribuciones de los perfiles espectrales del monoanión (57.6 %,  $\color{red}{\text{---}}$ ) y del catión (3.4 %,  $\color{blue}{\text{---}}$ ) calculadas para el espectro de la forma neutra. El espectro suma de ambas contribuciones ( $\color{green}{\text{---}}$ ) coincide muy bien con el experimental ( $\color{black}{\text{---}}$ ).

En la figura III-16 se muestra la descomposición espectral en las dos contribuciones correspondientes a las especies monoaniónica y catiónica. Los resultados mencionados anteriormente indican que el resto de la contribución espectral (un 39 %) se debe a la forma tautomérica lactónica incolora. Esta alta contribución de la modificación lactónica es la que provoca que la absorbancia global de las especies neutras en el visible sea menor que en las demás formas, al igual que sucede con la fluoresceína (*Martin y Lindqvist, 1975*). La descomposición espectral de las especies de la fluoresceína que realizaron *Martin y Lindqvist (1975)* para la especie neutra de la fluoresceína proporciona un 62.5% de forma lactona, 25% de zwitterión y 12.5% de especie quinoide. Posteriormente, *Mchedlov-Petrosyan y Mayorga (1992)* establecieron una contribución del zwitterión de fluoresceína del 22%. En los resultados obtenidos en esta Memoria, se observa que la forma lactónica es también considerable en el OG488. Sin embargo, mientras que en la fluoresceína la segunda forma más importante es la zwitteriónica, en el derivado bifluorado la contribución absorbente en el visible mayoritaria es la quinoide. Esto se refleja en diferencias

apreciables en los perfiles espectrales de la especie neutra, mientras que el resto de las formas prototrópicas de la fluoresceína y el OG488 poseen espectros muy similares. El espectro de la forma neutra de la fluoresceína obtenido por *Martin y Lindqvist (1975)*, *Sjöback et al. (1995)*, *Ballesteros (1998)* o *Crovetto (2003)* presenta principalmente un máximo centrado alrededor de 435 nm. En cambio, para el derivado bifluorado se observan de forma evidente dos máximos, siendo su espectro muy similar al del monoanión. La contribución a 475 nm, correspondiente a la forma quinoide, es poco detectable en la fluoresceína. *Sjöback et al. (1995)* y *Ballesteros (1998)* consideran una pequeña contribución, aunque para este último autor es una contribución poco significativa debido a un error asociado bastante grande. Para *Martin y Lindqvist (1975)*, la contribución a 475 nm es más bien un hombro en lugar de otra banda y, como ya se ha mencionado, cuantifican la contribución de la forma quinoide. No obstante, hay que tener en cuenta que estos autores asignan el espectro de absorción de disoluciones a pH alrededor de 3 a la forma neutra, sin realizar una descomposición espectral efectiva. Por lo tanto y según la descomposición espectral realizada para el OG488, se observan diferencias notables en el comportamiento de las formas neutras de ambos fluoróforos.

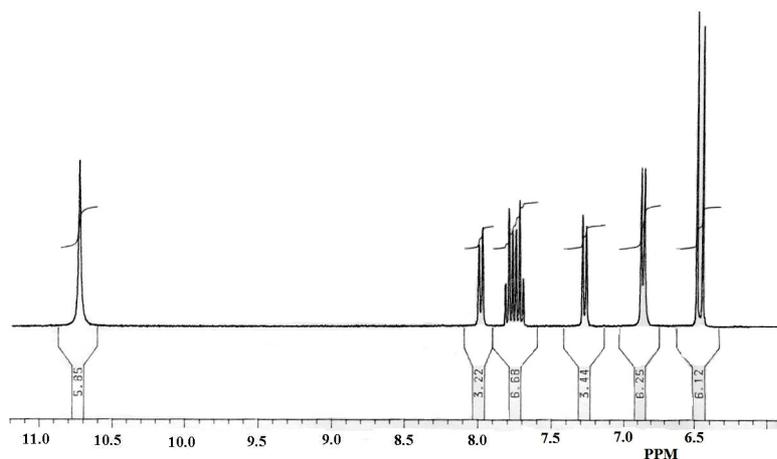
Así, la fluoración en las posiciones 2' y 7' produce una alteración muy significativa en las proporciones de los diferentes tautómeros neutros en disolución acuosa. La principal característica es que las formas zwitteriónica y lactónica están más impedidas en el OG488 que en la fluoresceína. Esto puede justificarse por el efecto mesómero +M de los átomos de flúor en posiciones 2' y 7'. Los electrones no conjugados de los átomos de flúor pueden cederse al sistema de electrones conjugados, según el esquema III-3. En base a este efecto +M, aparece un exceso de carga negativa sobre el carbono donde se forma el anillo lactónico con lo que el ataque del oxígeno a este centro está más impedido que en la fluoresceína. Igualmente, este efecto +M desestabiliza la forma zwitteriónica, con lo que se justifica su porcentaje tan bajo en OG488.



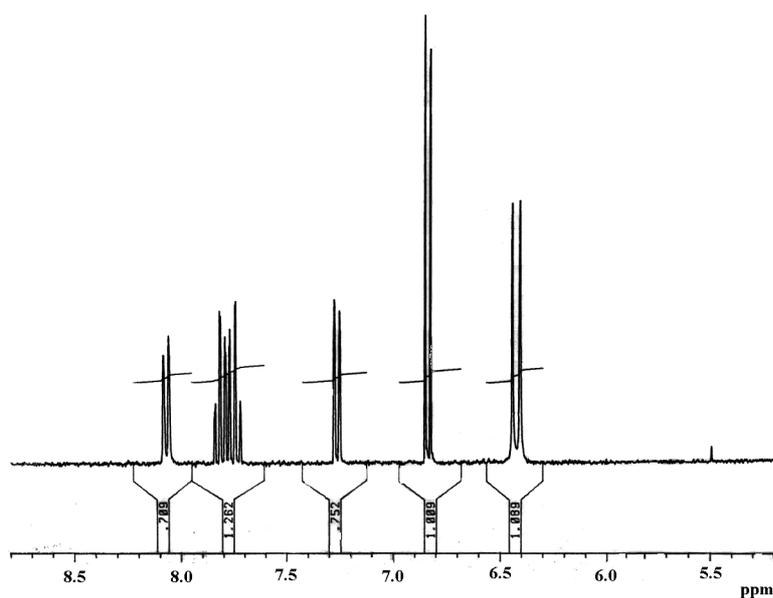
**Esquema III-3:** Efecto mesómero +M del flúor en la 2',7'-difluorofluoresceína.

#### III.1.2.2.1.- Espectros de $^1\text{H}$ -RMN.

Con objeto de alcanzar una mejor descripción de la estructura de la especie neutra y confirmar la existencia de los tres tautómeros considerados, se recogieron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, empleando dimetilsulfóxido y metanol deuterados como disolventes. El dimetilsulfóxido es un disolvente polar, pero sin protones intercambiables por lo que su señal debe de corresponder a la especie neutra exclusivamente, aunque al tener cierto carácter aceptor protónico puede encontrarse contribución del monoanión. El metanol, en cambio, produce intercambio protónico con la molécula, anulando las señales de los grupos con protones intercambiables. Así, los resultados obtenidos pueden dar alguna información sobre las características estructurales de los tautómeros neutros de la 2',7'-difluorofluoresceína. Además, para su comparación cualitativa, se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la fluoresceína y del ácido p-hidroxibenzoico, en dimetilsulfóxido deuterado.



**Figura III-17:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN a 300 MHz de OG488 en dimetilsulfóxido deuterado.



**Figura III-18:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN a 300 MHz de OG488 en metanol deuterado.

En las figuras III-17 y III-18 se muestran los espectros de RMN de protón del OG488 en dimetilsulfóxido deuterado y en metanol deuterado respectivamente. Los resultados de estos espectros aparecen en las tablas IX y

X, donde se recogen los desplazamientos químicos para las señales asignadas, su multiplicidad, intensidad y las constantes de acoplamiento.

**Tabla IX:** Señales del espectro de  $^1\text{H-RMN}^\bullet$  del OG488 en DMSO deuterado.

<i>Desplazamiento (<math>\delta</math>)<sup>ⓐ</sup></i>	<i>Multiplicidad</i>	<i>Constantes de acoplamiento (J)</i>	<i>Intensidad</i>	<i>Número de H asignados</i>
10.73	Singlete	--	5.85	≈ 2 H
7.98	Doblete	7.4 Hz	3.22	1 H
7.79	Triplete	7.0 Hz	6.68	1 H
7.72	Triplete	7.3 Hz		1 H
7.28	Doblete	7.5 Hz	3.44	1 H
6.86	Doblete	7.5 Hz	6.25	2 H
6.46	Doblete	11.3 Hz	6.12	2 H

<sup>ⓐ</sup> Frecuencia del campo electromagnético: 300 MHz.  
<sup>ⓑ</sup> Expresado en ppm.

**Tabla X:** Señales del espectro de  $^1\text{H-RMN}^\bullet$  del OG488 en metanol deuterado.

<i>Desplazamiento (<math>\delta</math>)<sup>ⓐ</sup></i>	<i>Multiplicidad</i>	<i>Constantes de acoplamiento (J)</i>	<i>Intensidad</i>	<i>Número de H asignados</i>
8.07	Doblete	7.6 Hz	0.709	1 H
7.82	Triplete	7.4 Hz	1.262	≈ 2 H
7.75	Triplete	7.2 Hz		1 H
7.27	Doblete	7.3 Hz	0.752	1 H
6.84	Doblete	7.5 Hz	1.009	≈ 2 H
6.43	Doblete	11.1 Hz	1.089	≈ 2 H

<sup>ⓐ</sup> Frecuencia del campo electromagnético: 300 MHz.  
<sup>ⓑ</sup> Expresado en ppm.

Con los datos de las tablas IX y X, así como de su comparación con la tabla II, se puede comprobar la excelente concordancia entre las señales obtenidas en ambos disolventes, con respecto a la bibliografía. Se debe resaltar que, en metanol la intensidad de las señales no describe totalmente el número de protones asignables, lo que presumiblemente es debido a la posibilidad del intercambio protónico.

En lo que se refiere a la relación con la estructura de las formas neutras, se pueden discutir varias consideraciones, utilizando principalmente el espectro en dimetilsulfóxido, ya que prácticamente ambos resultan equivalentes. La

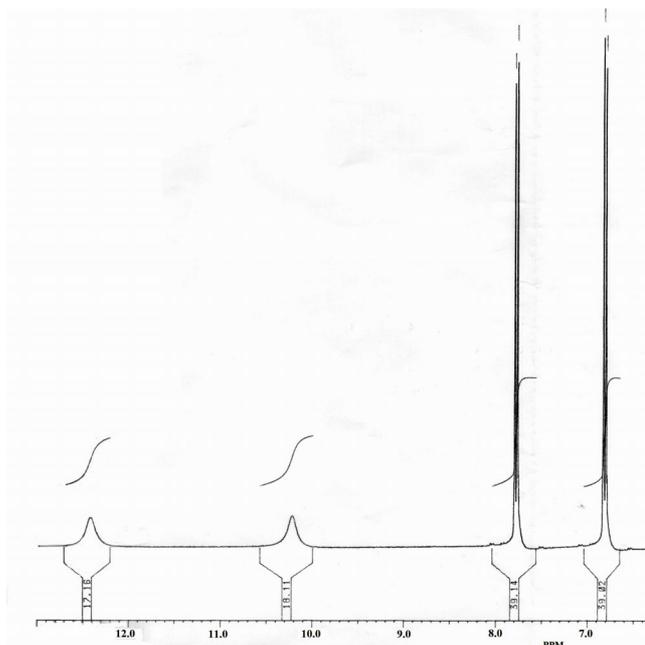
característica fundamental que permite la asignación de estructuras es la presencia de una única señal de intensidad prácticamente doble con un desplazamiento de 10.73 ppm, esto prácticamente asegura que las estructuras preferentes serán la lactónica y/o zwitteriónica. De acuerdo con las estructuras que aparecen en el esquema III-2, tanto la forma lactónica como la zwitteriónica presentarían esta característica: en ambas estructuras, aparecen dos protones en grupos hidroxilo equivalentes, lo que provocaría una única señal de intensidad doble, no acoplada y a campos muy bajos, tal y como se observa en los espectros experimentales obtenidos. No obstante, ya que el metanol es un disolvente que sí produce intercambio protónico, en este disolvente la señal correspondiente a los grupos -OH desaparece, pero las demás características siguen cumpliéndose. Sin embargo, sin otro tipo de apoyo, no se puede diferenciar cualitativamente entre zwitterión y forma lactónica, aunque si ya en un disolvente como es el agua la especie lactónica es muy abundante, en disolventes orgánicos, la especie principal también puede seguir tratándose de este tautómero.

Otra característica interesante son los valores del resto de las constantes de acoplamiento. Todas ellas se encuentran entre 7 y 7.6 Hz, correspondientes a acoplamientos vecinales H-H en anillos aromáticos (*Allinger et al., 1971; Willard et al., 1988*). La señal a 6.46 ppm (6.43 ppm en metanol) resulta una excepción, ya que su constante de acoplamiento es de 11.3 Hz. Esto se debe a que esta constante corresponde a un acoplamiento de tres enlaces  $^3J$  entre  $^1\text{H}$  y  $^{19}\text{F}$  (*Willard et al., 1988*), con lo que se puede confirmar que la mencionada señal corresponde a los dos protones del anillo xanténico anexos a los sustituyentes F.

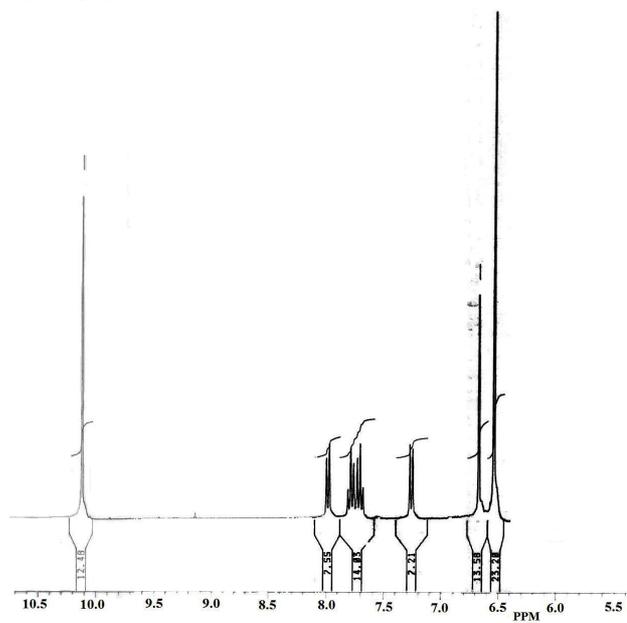
Las señales a 7.28, 7.72, 7.79 y 7.98 ppm se corresponden, por el desdoblamiento, las constantes de acoplamiento y la intensidad, a los protones del anillo bencénico no conjugado. En las dos señales tripletes (7.72 y 7.79 ppm) se puede observar además (sobre todo en los espectros en metanol), un

desdoblamiento adicional, con una constante de entre 0.8–1 Hz, valores típicos que corresponden a un acoplamiento a larga distancia entre los propios protones del anillo (Willard *et al.*, 1988).

Según todo lo anterior, ¿se podrá descartar definitivamente la contribución de una especie quinoide? La estructura neutra quinoide tendría una serie de características que la diferenciarían del resto. La más importante sería la presencia de dos señales de intensidad unidad a campos muy bajos, una correspondiente al grupo –OH y otra al –COOH. Para comprobar este punto se obtuvo el espectro de RMN de protón en dimetilsulfóxido del ácido p-hidroxibenzoico, el cual presenta en un anillo aromático ambos grupos (figura III-19). Efectivamente en este compuesto aparecen dos señales de protones muy desapantallados. Una a desplazamiento 10.3 ppm, para el –OH, y otra a 12.45 ppm, del –COOH. No obstante, aunque en la 2',7'-difluorofluoresceína no se obtiene una señal alrededor de 12 ppm, la señal a 10.73 ppm presenta una intensidad significativamente más baja de la que correspondería a dos protones. Concretamente, la señal a 10.73 ppm presenta una intensidad correspondiente a unos 1.8 H. Por tanto, parece confirmarse una ligera aportación de la especie quinoide, que no aparece debido probablemente a la falta de sensibilidad del instrumento y que se refleja en una intensidad algo menor de 2 de la señal de los grupos hidroxilo. Este mismo efecto se produce en la fluoresceína en dimetilsulfóxido (figura III-20), donde la señal de los grupos –OH es de 1.75 H y por lo tanto mayor que la señal correspondiente a un único protón, aunque sin llegar a dos.



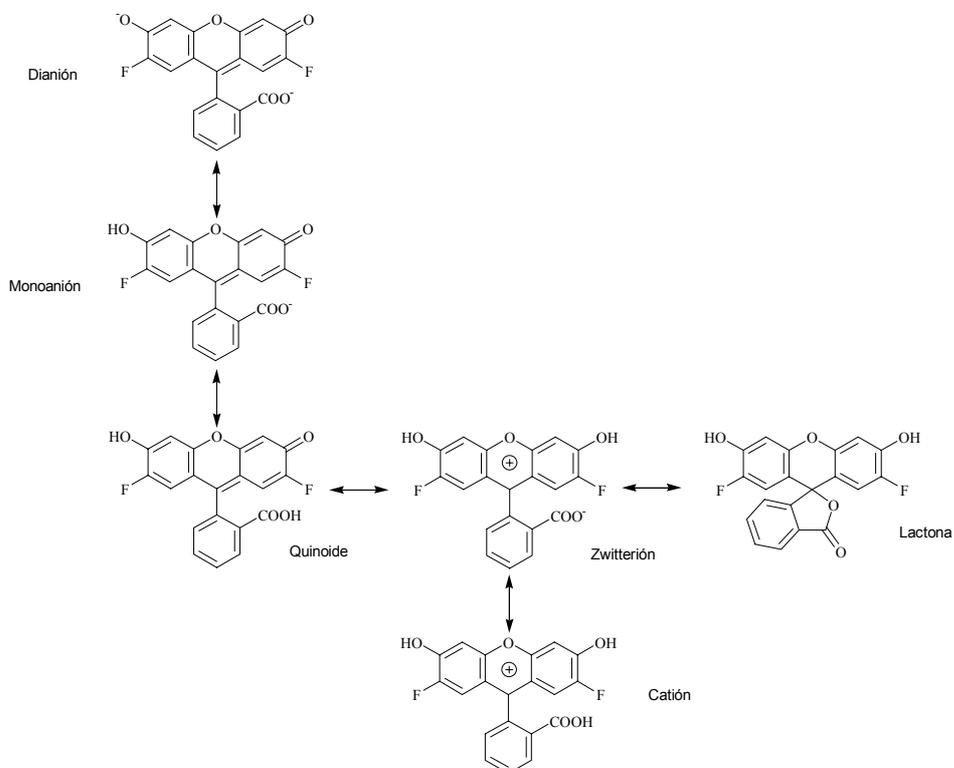
**Figura III-19:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN a 300 MHz de ácido p-hidroxibenzoico en dimetilsulfóxido deuterado.



**Figura III-20:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN a 300 MHz de fluoresceína en dimetilsulfóxido deuterado.

III.1.2.3.- Equilibrios ácido-base del OG488.

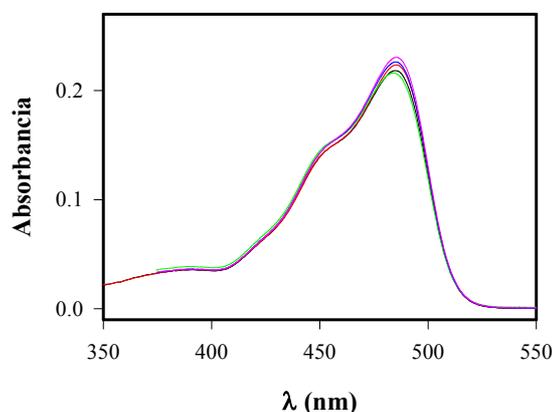
Se ha desarrollado el estudio absorciométrico y de los equilibrios ácido-base de la 2',7'-difluorofluoresceína, considerando la teoría general del equilibrio y la ley de Beer con cuatro especies prototrópicas absorbentes implicadas. Además, por consideraciones estructurales, por analogía con la fluoresceína (*Martin y Lindqvist, 1975*) y por los resultados de los espectros de absorción y  $^1\text{H-RMN}$ , se han establecido tres tautómeros para la especie eléctricamente neutra. Por lo tanto y a modo de resumen, en el esquema III-4 se muestran las estructuras de las formas prototrópicas y los equilibrios ácido-base que, según los resultados de esta Memoria, presenta el OG488 en disolución acuosa.



**Esquema III-4:** Formas prototrópicas y equilibrios ácido-base del OG488 en disolución acuosa.

## III.1.2.4.- Influencia de la fuerza iónica.

Se obtuvieron espectros de absorción a diferentes valores fijos de pH incrementando la fuerza iónica. Como puede observarse en la figura III-21, los efectos del aumento de concentración salina no son demasiado críticos y solo se observan pequeños desplazamientos, que se corresponden a ligeras variaciones en los valores de  $pK_a$  (aparentes). En concreto, en la figura III-21 se muestran los espectros de absorción a pH 4.5, controlado por una baja concentración (5 mM) de tampón ácido acético/acetato (HAc/Ac<sup>-</sup>), a diferentes valores de fuerza iónica proporcionada por perclorato potásico. Las pequeñas diferencias se pueden considerar poco significativas, lo que permite desestimar, en lo sucesivo, efectos notables de fuerza iónica.



**Figura III-21:** Espectros de absorción de disoluciones de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M a pH 4.5 en tampón HAc/Ac<sup>-</sup> 5 mM y fuerza iónica (—) 0.01, (—) 0.03, (—) 0.05, (—) 0.07 y (—) 0.10.

La comparación con el compuesto base, la fluoresceína, de nuevo nos lleva a un comportamiento análogo. *Yguerabide et al. (1994)*, *Sjöback et al. (1995)*, *Ballesteros (1998)*, y *Crovetto (2003)* ya comentaron la presencia de únicamente pequeñas diferencias en los espectros de absorción con la fuerza iónica. Las constantes de equilibrio ácido-base calculadas por *Ballesteros (1998)* y *Crovetto (2003)* no presentaron diferencias significativas a diferentes

concentraciones salinas, de tampón de fosfatos (Ballesteros, 1998), ni con la adición de perclorato (Crovetto, 2003).

III.1.2.5.- Ausencia de complejación con las especies del tampón HAc/Ac<sup>-</sup>.

Con objeto de estudiar las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado de las formas prototrópicas del OG488 promovidas por las especies de la disolución reguladora HAc/Ac<sup>-</sup>, es importante que no haya reacciones de complejación en el estado fundamental entre las especies del tampón y las del fluoróforo. De esta forma, el equilibrio en el estado fundamental del OG488 queda determinado exclusivamente por el pH de la disolución y las especies excitadas por la radiación luminosa son directamente las especies prototrópicas originales del fluoróforo.

En las figuras III-22, III-23 y III-24 se muestran los espectros de absorción de disoluciones de OG488 a pH 2.93, 4.3 y 9 respectivamente, con concentraciones crecientes de tampón HAc/Ac<sup>-</sup>. Tal y como se concluyó en el apartado anterior, las ligeras variaciones observadas son debidas únicamente al aumento de la fuerza iónica y se puede descartar la formación de complejos entre las especies del tampón y las formas prototrópicas del OG488.

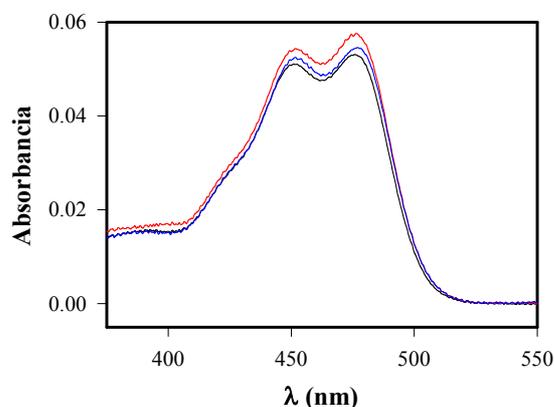
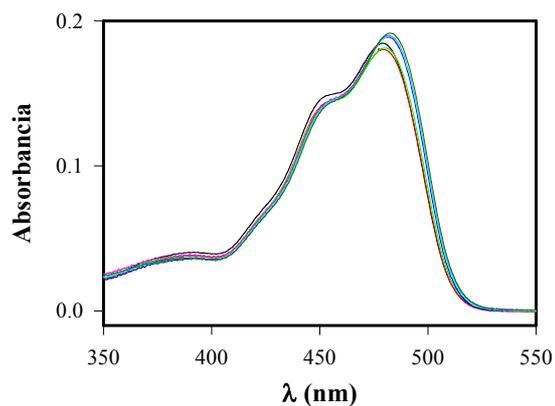
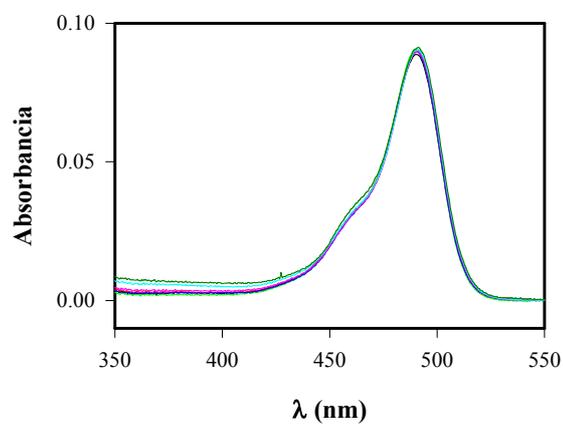


Figura III-22: Espectros de absorción de disoluciones acuosas de OG488  $2.5 \times 10^{-6}$  M a pH 2.93 en ausencia (—) y presencia de tampón HAc/Ac<sup>-</sup> 0.5 (—) y 1 M (—).



**Figura III-23:** Espectros de absorción de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M a pH 4.30 en tampón HAc/Ac<sup>-</sup> de concentraciones (—)  $1 \times 10^{-3}$ , (—)  $3 \times 10^{-2}$ , (—) 0.2, (—) 0.4, (—) 0.8, (—) 1.0 y (—) 1.5 M.



**Figura III-24:** Espectros de absorción de disoluciones acuosas de OG488  $1 \times 10^{-6}$  M a pH 9 en tampón HAc/Ac<sup>-</sup> de concentraciones (—)  $1 \times 10^{-3}$ , (—)  $1 \times 10^{-2}$ , (—) 0.10, (—) 0.25, (—) 0.75, (—) 1.00 y (—) 1.25 M.

### III.2.- ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN ESTADO EXCITADO DEL OG488 MEDIANTE FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO.

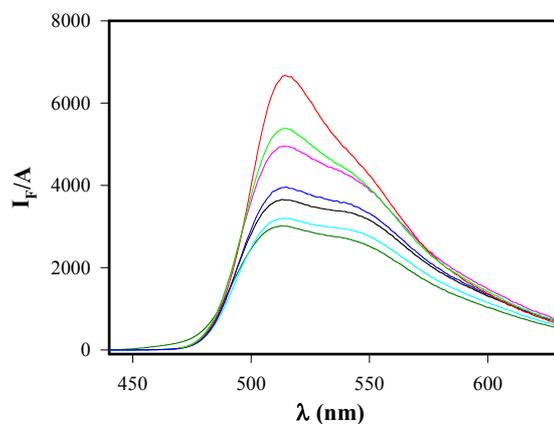
#### III.2.1.- Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario.

Usualmente, las reacciones de intercambio protónico en estado excitado se detectan comparando las gráficas de absorbancia vs pH, con las de intensidad de fluorescencia vs pH. Las transiciones inducidas por el pH que aparecen en las representaciones de absorción son debidas a las reacciones de intercambio protónico en el estado fundamental y suceden en regiones de pH dictadas por el  $pK_a$  del estado fundamental. Las transiciones inducidas por el pH que aparecen en las gráficas de intensidad de fluorescencia frente al pH son debidas tanto a las reacciones en el estado fundamental como a las que ocurren en el estado excitado. Si los valores del  $pK_a^*$  en el estado excitado difieren de los correspondientes valores en el estado fundamental y si las reacciones de transferencia protónica son lo suficientemente rápidas como para ocurrir durante el tiempo de vida del estado excitado, entonces las gráficas de intensidad de fluorescencia vs pH mostrarán las transiciones inducidas por el pH en el estado excitado, en adición a las transiciones en el estado fundamental observadas en las representaciones de absorbancia vs pH.

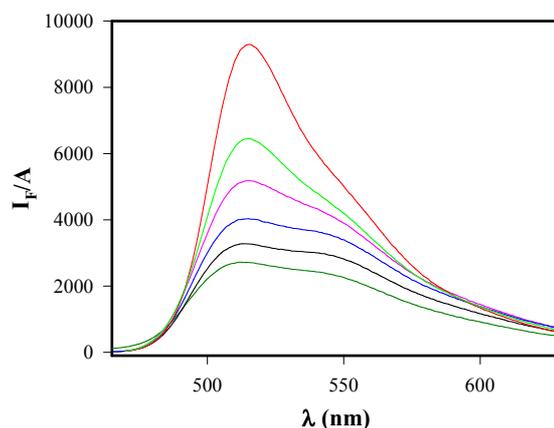
En un primer paso, se tratarán las características de fluorescencia en estado estacionario de las disoluciones de OG488 cuando sus especies catiónica, neutra y monoaniónica se ven implicadas. Posteriormente, se abordarán las características fluorescentes de la forma dianiónica.

En las figuras III-25 y III-26 se muestran los espectros de emisión en estado estacionario, normalizados por la absorbancia, correspondientes a disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M a diferentes concentraciones de ácido perclórico entre  $2$  y  $10^{-5}$  M. Los espectros se han registrado excitando las

muestras a las distintas longitudes de onda convenientes en cada caso, para el fin que se persigue.



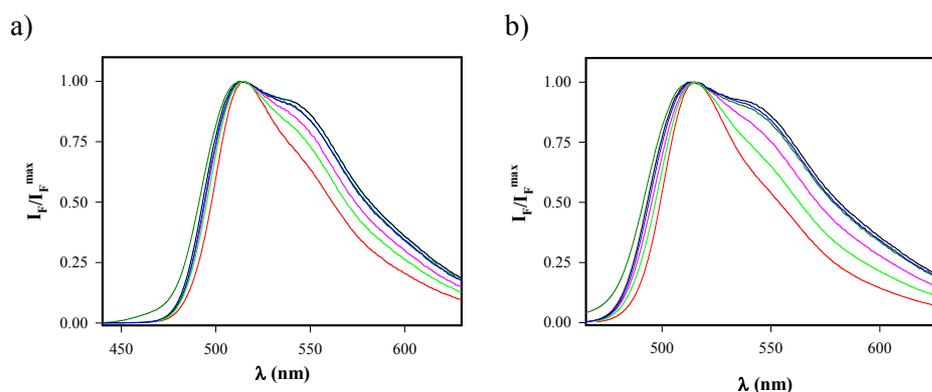
**Figura III-25:** Espectros de emisión, normalizados por la absorbancia, registrados con excitación a 424 nm, de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M a pH 4.68 (—), 4.10 (—), 3.44 (—), 2.12 (—), 1.26 (—), 0.72 (—) y  $[\text{HClO}_4] = 2$  M (—).



**Figura III-26:** Espectros de emisión, normalizados por la absorbancia, registrados con excitación a 460 nm, de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M a pH 4.68 (—), 4.10 (—), 3.44 (—), 2.12 (—), 1.26 (—) y  $[\text{HClO}_4] = 2$  M (—).

Así, en la figura III-25 la longitud de onda de excitación fue de 424 nm, la correspondiente a una excitación preferente de la forma catiónica del OG, mientras que en la figura III-26 la longitud de onda de excitación fue de 460 nm, excitando así preferentemente las formas neutras y aniónicas frente al

cación. Como se puede observar, la forma del espectro varía con el pH y solo se mantiene inalterada en las disoluciones cuyo pH es inferior a 3, aunque varía el cociente  $I_F/A$ . Esto se comprueba en la figura III-27 donde se muestran los espectros recogidos en las figuras anteriores normalizados a 1. Dado que el valor del  $pK_a$  del estado fundamental para el equilibrio catión – forma neutra, es de 1.02, los espectros recogidos cuando se aumenta la concentración de ácido con excitación a 424 nm, deberían mostrar un creciente predominio de la banda correspondiente al catión. Sin embargo, la figura III-27 muestra que el perfil espectral no varía excepto en la emisión a  $[H^+] = 2 \text{ M}$  en donde se observa una pequeña contribución a 460 nm.



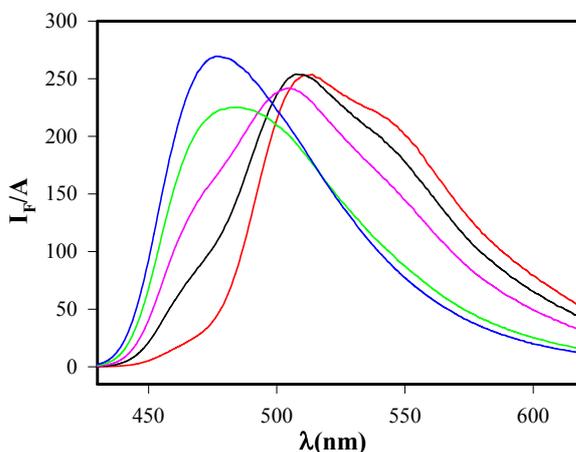
**Figura III-27:** Espectros normalizados de emisión con excitación a **a)** 424 nm y **b)** 460 nm, de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  a pH 4.68 (—), 4.10 (—), 3.44 (—), 2.12 (—), 1.26 (—), 0.72 (—) y  $[\text{HClO}_4] = 2 \text{ M}$  (—).

Anteriores estudios realizados por *Rozwadowski (1961)* con disoluciones acuosas de fluoresceína mostraron que la forma de los espectros de emisión comienza a cambiar a valores de pH inferiores a los que correspondería, si se mantuviese aproximadamente el mismo valor en los  $pK_a$  de los estados fundamental y excitado. Posteriormente, *Shah et al. (1983, 1984)* y *Shah y Pant (1985)* analizaron la reacción de transferencia protónica en el estado excitado, y el comportamiento del catión de la fluoresceína como un superácido. En sus estudios encontraron, en un intervalo de concentraciones de

ácido (perclórico y sulfúrico) entre 3 y 1 M, que el catión de la fluoresceína sufre una reacción de transferencia protónica en el estado excitado cuyo  $pK_a^*$  es inferior al  $pK_a$  del estado fundamental. En esta zona ácida, hallaron dos bandas de emisión, una con máximo a 480 nm que asignaron al catión, y otra con máximo centrado en 515 nm asignada a la especie neutra. Al mismo tiempo, los espectros de absorción en este margen de pH permanecieron invariables (*Shah et al., 1983*). Adicionalmente, existen otros muchos ejemplos en los que se evidencia la formación de superácidos en el estado excitado. De entre todos, el más conocido, es el equilibrio  $\alpha$ -naftol/naftolato (*Laws y Brand, 1979; Lakowicz y Balter, 1982; Beechem et al., 1985*).

Estos antecedentes bibliográficos y la observación de la contribución espectral a  $[H^+] = 2$  M anteriormente comentada, ha motivado que, en otra serie de experimentos, se hayan recogido los espectros de emisión, a  $\lambda^{ex} = 424$  nm, de disoluciones de OG488 en ácido perclórico a concentraciones entre 3 y 10 M. En la figura III-28 se muestran los mencionados espectros. A  $[H^+] = 9.5$  M, el espectro de emisión consiste en una banda simple con máximo a 480 nm. Conforme se disminuye la concentración de protones esta banda va desapareciendo rápidamente, convirtiéndose en la banda, con máximo a 513 nm y hombro a 550 nm, anteriormente observada cuando la concentración de ácido perclórico fue inferior a 2 M. Es de resaltar que, en todo el intervalo de concentración protónica entre 2 y 10 M, los espectros de absorción no varían significativamente, aunque en los correspondientes al intervalo de  $[H^+]$  entre 8 y 10 M se observa un ligero desplazamiento hacia el azul. Este desplazamiento se puede justificar teniendo en cuenta la contribución que aporta a la absorción, el pequeño porcentaje de especie neutra (con máximos de absorción a 450 y 476 nm) existente en el estado fundamental a concentraciones protónicas menores de 8 M. Con estas consideraciones y si se asigna la banda de emisión centrada en 480 nm a la especie catiónica, es evidente que los cambios en los espectros de emisión con la concentración de ácido no son simultáneos con las

variaciones observadas en sus correspondientes espectros de absorción. Por lo tanto, se puede concluir que existe una reacción de transferencia protónica en el estado excitado, análoga a la que ocurre con fluoresceína, debido a que la especie catiónica excitada del OG488 se comporta como un superácido, con un  $pK_a^*$  menor que el correspondiente al estado fundamental.



**Figura III-28:** Espectros de emisión, normalizados por la absorbancia, obtenidos con excitación a 424 nm, de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M a concentraciones de  $HClO_4$  de 3 M (—), 5 M (—), 6 M (—), 8 M (—) y 9.5 M (—).

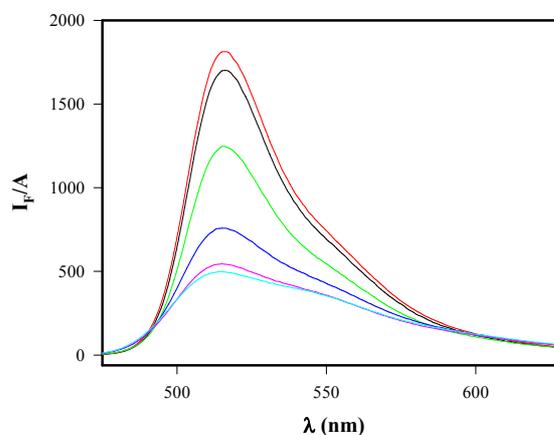
Para corroborar esta aseveración y desechar la presencia de reacciones de otro tipo debidas a la alta  $[H^+]$ , se recogieron los espectros de absorción correspondientes a las mismas muestras anteriores, justo tras su preparación y habiendo transcurrido cierto tiempo, encontrando una coincidencia total entre ambos espectros de absorción, tanto en lo que se refiere a su forma, como en el valor de sus absorbancias.

Como se ha mencionado anteriormente, en la figura III-27 se puede observar que los perfiles de los espectros de emisión se mantienen inalterados en las disoluciones cuyo pH está comprendido entre 0.72 y 2.12, sin embargo, como se observa en las figuras III-25 y III-26, el valor de la relación  $I_f/A$  aumenta progresivamente con el incremento del pH. Dado que el cromóforo

emisor es el mismo en la forma neutra y en la monoaniónica, es de esperar que el perfil del espectro de fluorescencia sea también el mismo y que el aumento de la relación  $I_F/A$  con el incremento del pH sea debido únicamente al predominio del monoanión en el estado fundamental (o excitado) al aumentar éste. Así, la forma monoaniónica parece caracterizada por una eficiencia de fluorescencia superior a la de la forma neutra. Debido a la similitud de los perfiles espectrales y a las pequeñas diferencias entre las relaciones  $I_F/A$ , es difícil, de la observación meramente cualitativa, dilucidar si entre ambas formas prototrópicas se establece una reacción de intercambio protónico en el estado excitado, por lo que esta discusión se deberá de posponer hasta que se realice el análisis cuantitativo de los resultados de fluorescencia en estado estacionario (epígrafe III.2.2), o cuando se presenten y discutan los datos de evolución temporal de fluorescencia (epígrafes III.3 y III.4). No obstante, el minucioso examen de las curvas entre una concentración 2 M de  $\text{HClO}_4$  y pH 3.44 de las figuras III-25 y III-26, indica la aparición de una mayor relación  $I_F/A$  a un pH inferior al que correspondería si el estado excitado tuviese igual  $pK_N$  que el estado fundamental.

En la figura III-29 se muestran los espectros de emisión de disoluciones acuosas de OG488 a pH entre 3.92 y 12. En esta zona de pH la contribución de especie dianiónica comienza a hacerse notable. Así, se observa en la figura III-29 que, a valores de pH superiores a 3, tanto los perfiles de los espectros de emisión como la relación  $I_F/A$  varían considerablemente con el aumento del pH. Sin embargo y a diferencia de lo que se ha descrito en los espectros recogidos a menores valores de pH, los cambios en el perfil e intensidad de los espectros de fluorescencia se presentan a los mismos valores de pH que los que ocurren en el perfil y la absorbancia de los espectros de absorción. Estos cambios paralelos en ambos tipos de espectros indican la ausencia de reacción de transferencia protónica en el estado excitado. Sin embargo y como se ha indicado en el párrafo anterior, es difícil dilucidar si se establece o no, una reacción de

intercambio protónico entre ambas formas prototrópicas en el estado excitado, sin efectuar el análisis cuantitativo de los resultados de fluorescencia en estado estacionario, o sin recoger datos de evolución temporal de fluorescencia.



**Figura III-29:** Espectros de emisión, normalizados por la absorbancia, obtenidos con excitación a 424 nm, de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M a pH de 3.92 (—), 4.15 (—), 4.60 (—), 5.46 (—), 6.96 (—) y 12 (—).

### III.2.2.- Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia frente al pH.

Para la obtención de una expresión matemática que relacione la intensidad de fluorescencia con el pH, se debe de plantear un modelo de reacción basado en las discusiones previas y, a partir de las suposiciones necesarias para que este modelo se cumpla, se deriva la ecuación buscada. Posteriormente se ajustará la ecuación resultante a los datos experimentales.

En el sistema estudiado en esta Memoria se ha encontrado que el OG488 se comporta como un superácido en el estado excitado, de forma que su  $pK_a^*$  es considerablemente menor que el  $pK_a$  del estado fundamental. Por esta razón y a la vista de los datos experimentales mostrados en el epígrafe anterior, no es posible la obtención de datos de intensidad de fluorescencia en estado estacionario, que permitan construir una curva de  $I_F$  vs pH que presente el perfil sigmoidal completo, en la cual se observe a valores bajos de pH, constancia en

la intensidad de fluorescencia debida a la forma catiónica y cómo esta intensidad disminuye suavemente al disminuir la concentración protónica, con el concomitante aumento de la concentración de la especie neutra en el estado excitado. La razón por la que no es posible la construcción de la curva completa es que no puede conseguirse un aumento indefinido de la  $[H^+]^{\vee}$ , de modo que no se podrá alcanzar la zona en donde la concentración de catión excitado permanezca constante. Por estos motivos, no se puede calcular con datos experimentales de intensidad de fluorescencia, el valor del  $pK_a^*$  en el estado excitado y el mencionado cálculo se deberá de posponer a la sección en donde, proponiendo un modelo cinético adecuado, se efectúe el tratamiento cuantitativo de los datos experimentales de fluorescencia resuelta en el tiempo.

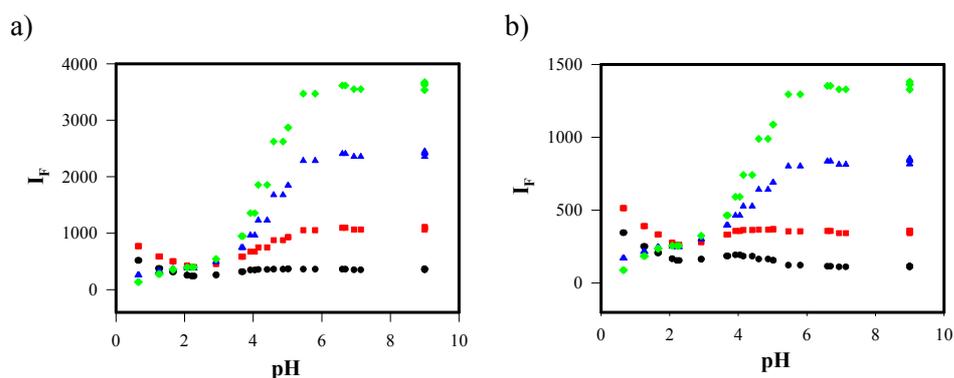
En base a la discusión cualitativa que se ha efectuado en el epígrafe anterior, se pasará a continuación al análisis de las curvas de intensidad de fluorescencia obtenidas a valores altos de pH. La finalidad de tal forma de actuar es la posibilidad existente de poder simplificar el modelo empleado en el análisis cuantitativo de las curvas  $I_F$  vs pH que se desea realizar, ya que de la observación de la figura III-29, parece deducirse que no ocurre ninguna reacción de intercambio protónico en el estado excitado entre las formas monoaniónica y dianiónica del OG488 en disolución acuosa. Si esta suposición resultase cierta, es indudable que el modelo aplicable al equilibrio restante, entre la forma neutra y el monoanión, resultaría simplificado.

Así, en la figura III-30 se representan las intensidades de fluorescencia a 515 nm y 550 nm obtenidas con diversas longitudes de onda de excitación. En concreto, se ha escogido la longitud de onda de 480 nm, en donde el dianión posee mayor coeficiente de extinción molar que las otras especies protonadas; 460 nm, que es el punto isobéptico de las formas monoaniónica y dianiónica; y dos longitudes de onda a las que el monoanión y la forma neutra se excitan

---

<sup>∨</sup> No pueden prepararse disoluciones acuosas de  $HClO_4$  con concentraciones superiores a 11 M, que es la molaridad aproximada del ácido perclórico comercial al 70 %.

preferentemente respecto al dianión (420 y 440 nm). La emisión se recogió a la longitud de onda que corresponde a los máximos de emisión (515 nm), y en el hombro que presenta la emisión de las especies monoaniónica y neutra (550 nm). Con estas condiciones experimentales se consigue una amplia serie de curvas. En algunas de estas la fluorescencia detectada corresponde preferentemente a la forma dianiónica, mientras que en otras, la señal recogida corresponde a las formas monoaniónica y neutra, fundamentalmente. Así, el ajuste conjunto de todas ellas, permitirá alcanzar con mayor fiabilidad los valores de los parámetros deseados.



**Figura III-30:** Variación de la intensidad de fluorescencia con el pH en disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M. Las longitudes de onda de excitación fueron 420 (●), 440 (■), 460 (▲) y 480 nm (◆), y la emisión se recogió a **a)** 515 nm y **b)** 550 nm.

Ahora, se deben de realizar distintas suposiciones sobre si se producen o no, las reacciones de intercambio protónico en el estado excitado entre las diferentes especies prototrópicas del OG488 y derivar las distintas expresiones aplicables a los modelos que se hayan adoptado. Las expresiones deducidas dependerán, también, de las consideraciones adicionales que se realicen para simplificar y facilitar el análisis.

Así, se han obtenido diversas expresiones teóricas para la emisión de fluorescencia bajo las condiciones experimentales impuestas. En todas ellas, se ha considerado que todas las especies catiónicas excitadas se convierten en especies neutras, dado el comportamiento del catión como un superácido.

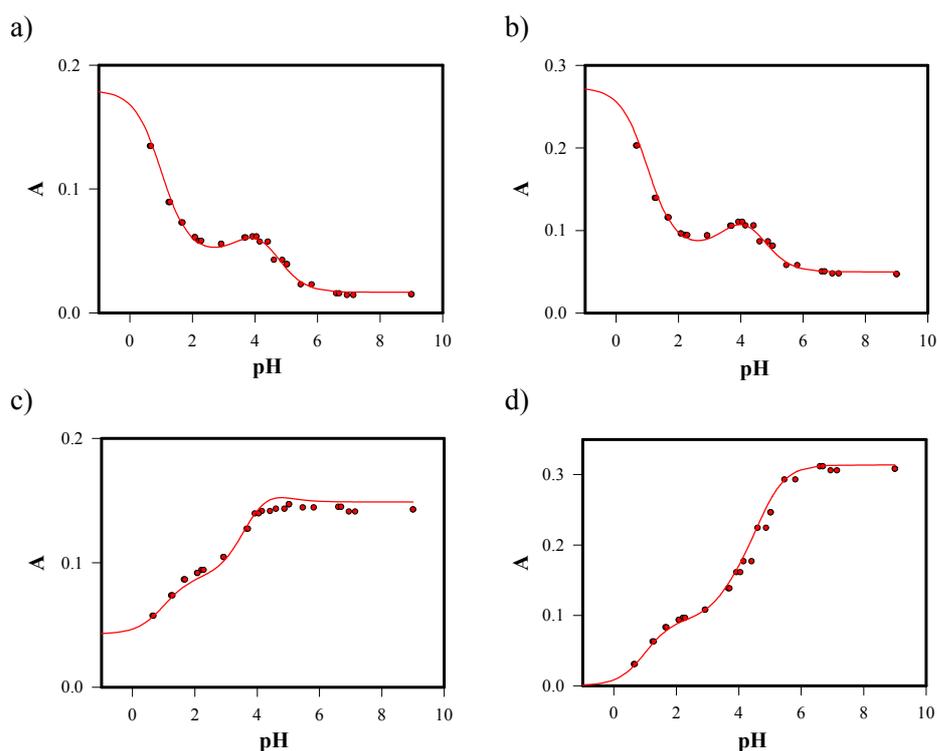
Eventualmente, se ha incluido (o no) la suposición de que todas las formas neutras presentes se convierten rápidamente en monoaniones excitados. Incluyendo esta suposición, la emisión sucede exclusivamente desde las formas monoaniónicas y dianiónicas excitadas del OG488, mientras que, en ausencia de la anterior suposición, en la emisión interviene también la forma neutra excitada. Las ecuaciones derivadas de los modelos adoptados, se ajustaron globalmente a los datos experimentales, aplicando el método de mínimos cuadrados a un algoritmo no lineal basado en el de *Marquardt (1963)*, utilizando el software *Origin 6.0 Professional*. En los ajustes globales realizados, se analizaron simultáneamente todas las curvas  $I_F$  vs pH obtenidas con excitación a 420, 440, 460 y 480 nm, y emisión a 515 y 550 nm.

En la primera serie de ajustes se supuso la emisión de dos únicas especies, de modo que todas las especies catiónicas y neutras excitadas se convierten rápidamente en monoanión excitado. La expresión derivada para este caso es muy sencilla y se obtiene a partir de las leyes del equilibrio, de la absorción y de la emisión:

$$I_F = \kappa[\phi_M(\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N + \alpha_M \varepsilon_M) + \phi_D \alpha_D \varepsilon_D] \quad (\text{III-13})$$

En esta ecuación,  $\alpha_i$  representa la fracción molar de la especie  $i$  en el estado fundamental, que depende del pH y de los  $pK_a$  del estado fundamental;  $\varepsilon_i$  es el coeficiente de extinción molar de la especie  $i$  a cada longitud de onda de excitación, por lo que el producto  $\alpha_i \varepsilon_i$  está relacionado con la cantidad de especie  $i$  excitada;  $\phi_M$  y  $\phi_D$  representan las eficiencias relativas de fluorescencia de las especies M y D a cada longitud de onda de emisión. Se debe de suponer que estas eficiencias de fluorescencia no varían con el pH.  $\phi_M$  y  $\phi_D$  incluyen constantes instrumentales. Durante el proceso de análisis los valores de  $\alpha_i$  y  $\varepsilon_i$  se mantuvieron fijos a los valores calculados en la sección III.1.1.1, mientras que  $\phi_M$  y  $\phi_D$  fueron parámetros ajustables.

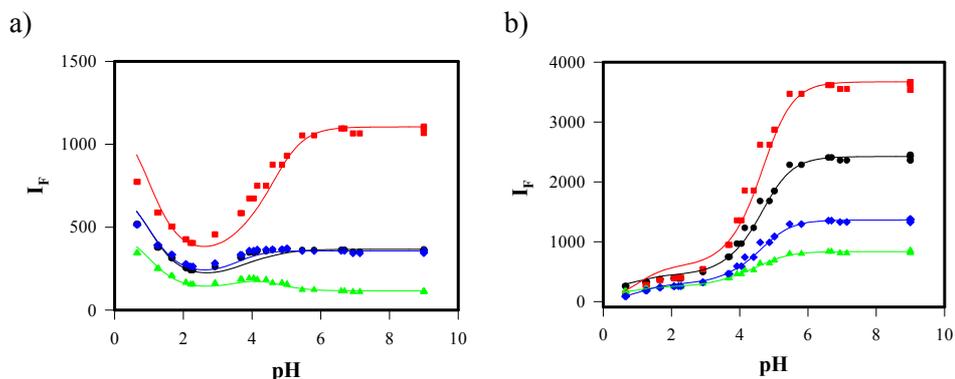
Previamente, para comprobar que los valores de  $\alpha_i$  y  $\varepsilon_i$  empleados en el análisis describen adecuadamente el sistema, se simularon los valores de absorbancia y se compararon con las absorbancias experimentales de las disoluciones utilizadas en los análisis posteriores. En las simulaciones, los valores de  $pK_a$  utilizados fueron: 1.02 para el equilibrio  $C \rightleftharpoons N$ , 3.61 para el  $N \rightleftharpoons M$  y 4.69 para el  $M \rightleftharpoons D$ . En la figura III-31 se muestran las simulaciones y los valores experimentales. La concordancia entre las curvas teóricas y los valores experimentales es muy buena.



**Figura III-31:** Absorbancias experimentales (●) y calculadas (líneas de trazo) a través de los parámetros obtenidos en la sección III.1.1.1, de disoluciones de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M. **a)** 420 nm, **b)** 440 nm, **c)** 460 nm y **d)** 480 nm.

Una vez realizada esta comprobación, se procedió al ajuste de la ecuación III-13 con los datos de fluorescencia en estado estacionario. En la

figura III-32 se muestran los resultados del ajuste simultáneo de todas las curvas<sup>∇</sup>.



**Figura III-32:** Ajuste de la ecuación III-13 con las curvas experimentales  $I_F$  vs pH de la figura III-30. **a)**  $\lambda^{ex} = 420$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—), y  $\lambda^{ex} = 440$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—). **b)**  $\lambda^{ex} = 460$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—), y  $\lambda^{ex} = 480$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—).

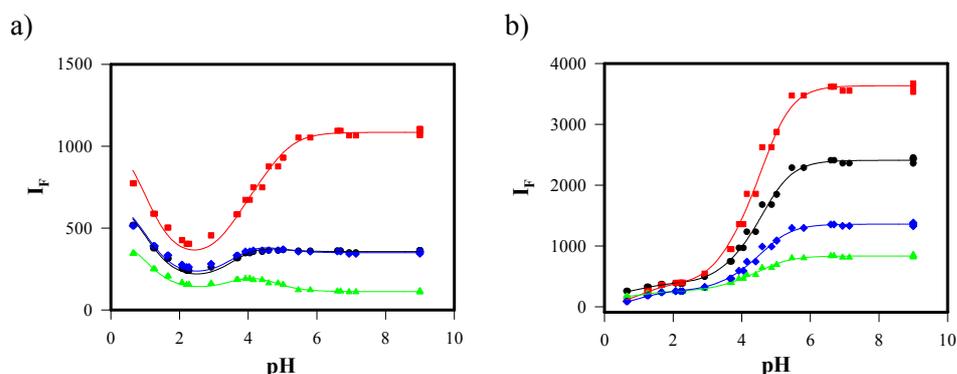
Se observa que el modelo no se ajusta perfectamente a los datos experimentales y que parece insuficiente para explicar estos resultados, sobre todo en el intervalo de pH comprendido entre 1 y 5, por lo tanto, parece necesario considerar la existencia de tres especies emisivas en el estado excitado, a saber: neutra, monoaniónica y dianiónica. Como suposición adicional, se impone la ausencia de interconversiones entre estas especies excitadas. No obstante, se sigue suponiendo la rápida transformación en el estado excitado de la especie catiónica hacia la neutra (por su carácter de superácido). La ecuación derivada de este modelo es la siguiente:

$$I_F = \kappa[\phi_N(\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N) + \phi_M \alpha_M \varepsilon_M + \phi_D \alpha_D \varepsilon_D] \quad (III-14)$$

En esta ecuación las variables tienen el significado ya comentado en la ecuación III-13. Durante el proceso de ajuste,  $\alpha_i$  y  $\varepsilon_i$  se mantuvieron fijos a los valores conocidos, para cada curva  $I_F$  vs pH y a cada longitud de onda de excitación, mientras que  $\phi_i$  fueron parámetros ajustables localmente.

<sup>∇</sup> El valor del coeficiente de regresión,  $r^2$ , fue de 0.9939.

En la figura III-33 se muestran los resultados. Las curvas de trazo continuo se han obtenido con la ecuación III-14 y los parámetros recuperados en el ajuste simultáneo de los datos experimentales<sup>∇</sup>. Como se puede observar, las curvas se ajustan adecuadamente por encima de pH 4, mientras que el ajuste es peor por debajo de este pH. De acuerdo con estas gráficas, se puede establecer que los datos de fluorescencia en estado estacionario son concordantes con el  $pK_M$  de 4.74 obtenido anteriormente con los valores de absorbancia. Este hecho refleja que, la suposición efectuada de que no hay reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre el monoanión y dianión, es acertada. Sin embargo, a valores de pH entre 2 y 4 el modelo no se ajusta a los datos experimentales, lo que parece indicar que el valor de  $pK_N$  utilizado no es el correcto.

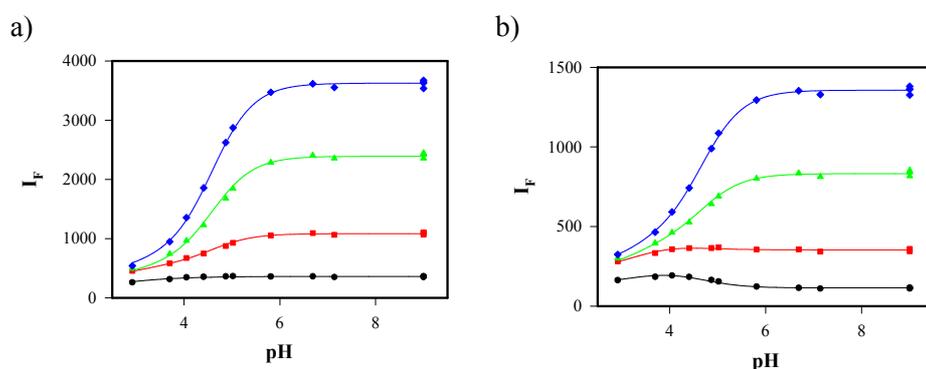


**Figura III-33:** Ajuste de la ecuación III-14 con las curvas experimentales  $I_F$  vs pH. **a)**  $\lambda^{ex} = 420$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—), y  $\lambda^{ex} = 440$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—). **b)**  $\lambda^{ex} = 460$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—), y  $\lambda^{ex} = 480$  nm y  $\lambda^{em} = 515$  (—) y 550 nm (—).

Ante estos resultados, se ha realizado un ajuste de la ecuación III-14 con los datos experimentales de fluorescencia en estado estacionario, dejando los valores de  $pK_a$  del estado fundamental como parámetros ajustables. Se obtuvieron valores para el  $pK_N$  y  $pK_M$  de  $3.24 \pm 0.16$  y  $4.69 \pm 0.03$ ,

<sup>∇</sup> El valor del coeficiente de regresión,  $r^2$  fue de 0.9970.

respectivamente. Estos ajustes se realizaron a un pH por encima de 3 para que la contribución del catión a la absorbancia fuera despreciable. Las curvas obtenidas en estos ajustes se muestran en la figura III-34<sup>∇</sup>. Según los valores de  $pK_a$  recuperados del análisis, se puede concluir que el  $pK_M$ , correspondiente al equilibrio monoanión – dianión, obtenido con los datos de fluorescencia en estado estacionario, 4.69, es similar al obtenido cuando se utilizan los valores experimentales de absorbancia, 4.69 y 4.74 en esta Memoria (epígrafes III.1.1.1 y III.1.1.2 respectivamente) y 4.8 en bibliografía (*Sun et al., 1997*). Por el contrario, con los valores experimentales de fluorescencia se obtiene un  $pK_N$  diferente al calculado por absorción del estado fundamental. Esta variación del  $pK_N$  parece indicar la presencia de reacciones de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies neutra y monoaniónica. Por lo tanto, se puede concluir que la expresión aplicada resulta adecuada para describir el comportamiento del sistema en lo que se refiere a que no ocurre la reacción de transferencia protónica en el estado excitado, entre el monoanión y dianión de OG488.



**Figura III-34:** Ajuste de la ecuación III-14 con las curvas experimentales  $I_F$  vs pH de la figura III-30, dejando los  $pK_N$  y  $pK_M$  como parámetros ajustables. Se muestran las series para las longitudes de onda de excitación de 420 (—), 440 (—), 460 (—) y 480 nm (—) a las longitudes de onda de emisión de a) 515 y b) 550 nm.

<sup>∇</sup> El valor de coeficiente de regresión,  $r^2$ , fue de 0.9993.

Una vez conocidas las características de los extremos ácido y básico de la valoración fluorimétrica vs pH, así como la evidencia de que hay una reacción rápida de transferencia protónica en el estado excitado entre las formas neutra y monoaniónica, se va a proceder al análisis de datos experimentales obtenidos en el intervalo de valores de pH (entre 1 y 5.5), que es en donde se ha observado la transición entre las formas neutra y monoaniónica, al objeto de recuperar con la mayor fiabilidad posible el valor del  $pK_N^*$ . Para ello, se preparó una nueva serie de disoluciones a la misma concentración de OG488 cuyo pH se mantuvo en este intervalo de interés. Se recogieron los valores de la intensidad de fluorescencia a  $\lambda^{em} = 515$  y 550 nm, obtenidos también a las mismas longitudes de onda de excitación que la serie anterior, por las mismas razones que ya se argumentaron.

Suponiendo que se produce de forma efectiva la reacción de intercambio protónico en el estado excitado entre las formas neutra y monoaniónica del OG488, se ha obtenido una expresión que relaciona la intensidad de fluorescencia con el pH, realizando las siguientes suposiciones adicionales, derivadas de los análisis previamente realizados: 1) todas las especies catiónicas existentes en el sistema en el estado fundamental, se convierten en especies neutras al ser excitadas; 2) no se produce la reacción de intercambio protónico en el estado excitado entre el monoanión y el dianión; 3) la reacción en el estado excitado entre el monoanión y la especie neutra es lo suficientemente rápida como para que las concentraciones de cada especie en el estado excitado cumplan las leyes del equilibrio, es decir, estén descritas por su  $pK_a^*$ . Con estas premisas y a través de las leyes de la absorción, de la emisión y del equilibrio, se puede deducir la expresión empleada en los ajustes. Para ello, se considera que se parte de una cierta concentración de especies excitadas, que depende de la longitud de onda de excitación (a través de los coeficientes de extinción molar,  $\epsilon_i$ ) y del pH (según los valores de  $pK_a$  del estado fundamental). Así, la cantidad total de especies excitadas vendrá dada por:

$$[C^*] + [N^*] + [M^*] + [D^*] = \kappa(\varepsilon_C \alpha_C + \varepsilon_N \alpha_N + \varepsilon_M \alpha_M + \varepsilon_D \alpha_D) \quad (\text{III-15})$$

Sin embargo, tras la reconversión de  $C^*$  en  $N^*$ , y la reacción en estado excitado entre  $N^*$  y  $M^*$ , las concentraciones de estas especies emisivas se deben reajustar. Por otra parte, al no existir reacción de transferencia protónica con la especie dianiónica, la cantidad de  $D^*$  que se desactiva por emisión fluorescente es la misma que se excitó inicialmente. Así, puede decirse que:

$$\begin{aligned} [N^*]_{\text{eq}} + [M^*]_{\text{eq}} &= \kappa(\varepsilon_C \alpha_C + \varepsilon_N \alpha_N + \varepsilon_M \alpha_M) \\ [D^*] &= \kappa \varepsilon_D \alpha_D \end{aligned} \quad (\text{III-16})$$

Adicionalmente,  $[N^*]_{\text{eq}}$  y  $[M^*]_{\text{eq}}$  vendrán relacionadas con el  $pK_N^*$  según la ecuación de equilibrio:

$$pK_N^* = \text{pH} - \log\left(\frac{[M^*]_{\text{eq}}}{[N^*]_{\text{eq}}}\right) \quad (\text{III-17})$$

Por otro lado, la intensidad de fluorescencia relativa será proporcional a las concentraciones en el estado excitado estacionario de cada una de las especies emisivas:

$$I_F = \phi_N [N^*]_{\text{eq}} + \phi_M [M^*]_{\text{eq}} + \phi_D [D^*] \quad (\text{III-18})$$

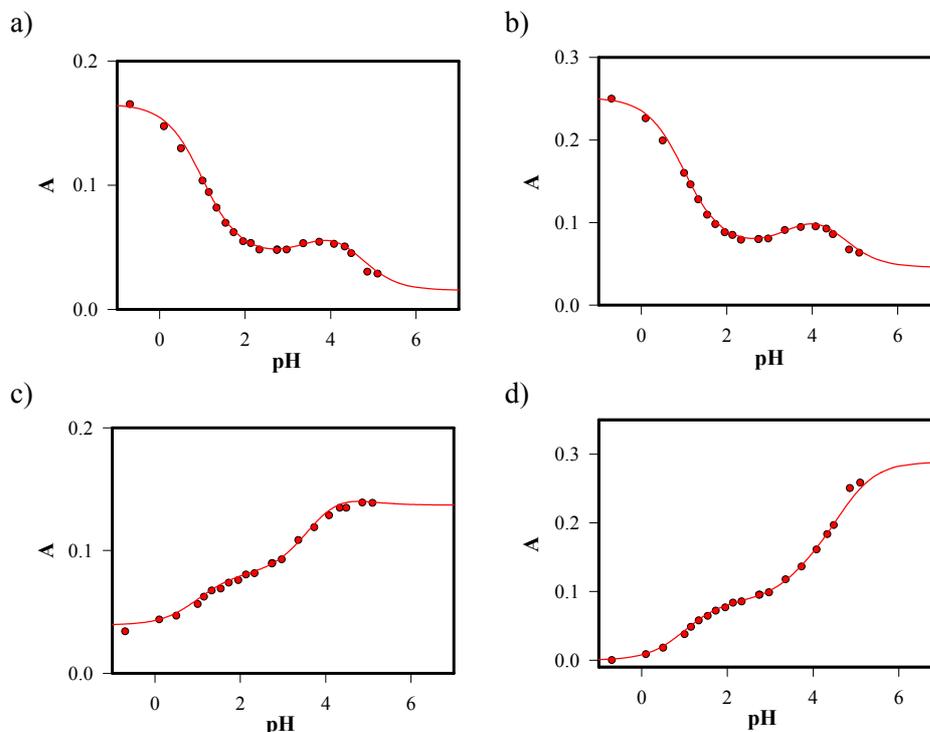
Hay que notar que, de forma similar que en las ecuaciones precedentes III-13 y III-14,  $\phi_i$  no son directamente los rendimientos cuánticos de las especies al incluir factores instrumentales, pero están relacionados con las eficiencias relativas de fluorescencia.

Sustituyendo las ecuaciones III-16 y III-17 en la ecuación III-18 y reordenando adecuadamente, se obtiene la ecuación empleada en el ajuste con los datos experimentales de fluorescencia en estado estacionario:

$$\begin{aligned} I_F &= (\varepsilon_C \alpha_C + \varepsilon_N \alpha_N + \varepsilon_M \alpha_M) \left[ \frac{\phi_N}{1 + 10^{\text{pH} - pK_N^*}} + \frac{\phi_M}{1 + 10^{pK_N^* - \text{pH}}} \right] + \\ &+ \phi_D \varepsilon_D \alpha_D \end{aligned} \quad (\text{III-19})$$

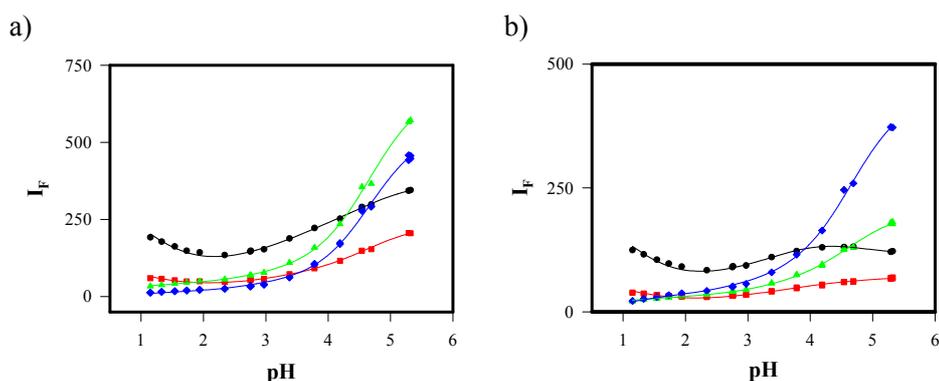
En el ajuste de la ecuación III-19 a los datos experimentales,  $\varepsilon_i$  fueron valores conocidos y fijos para cada longitud de onda de excitación (según los valores recuperados en la sección de absorción);  $\alpha_i$  también fueron valores conocidos para cada pH (dependientes de los  $pK_a$  del estado fundamental);  $pK_N^*$  fue un parámetro ligado globalmente en el proceso de ajuste simultáneo, mientras que los  $\phi_i$  fueron parámetros de ajuste locales.

Previamente y de forma análoga a los ajustes anteriores, se simularon las absorbancias calculadas para cada longitud de onda de excitación y se compararon con los valores de absorbancia experimental de esta nueva serie de disoluciones, al objeto de comprobar la validez de los valores de  $\varepsilon_i$  y  $\alpha_i$  empleados en los análisis. La figura III-35 muestra la buena concordancia entre las curvas  $A$  vs pH calculadas y los valores experimentales.



**Figura III-35:** Absorbancias experimentales (●) y calculadas (líneas de trazo) a través de los parámetros obtenidos en la sección III.1.1.1, de disoluciones de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M. a) 420 nm, b) 440 nm, c) 460 nm y d) 480 nm.

Una vez realizada esta comprobación, se procedió al ajuste de los datos de fluorescencia en estado estacionario. En la figura III-36 se muestran los valores experimentales  $I_F$  vs pH, y las curvas resultantes de aplicar a la ecuación III-19 los parámetros recuperados en el ajuste global<sup>∇</sup>. Se puede observar que la concordancia entre las curvas calculadas y los datos experimentales es muy buena. El valor del  $pK_N^*$  recuperado en el análisis fue de  $2.67 \pm 0.06$ .



**Figura III-36:** Ajuste de la ecuación III-19 con las curvas experimentales  $I_F$  vs pH. Las longitudes de onda de excitación son 420 (●), 440 (■), 460 (▲) y 480 nm (◆), y las longitudes de onda de emisión son **a)** 515 nm y **b)** 550 nm.

En resumen, se ha demostrado cualitativamente el comportamiento como superácido de la especie catiónica excitada del OG488. Asimismo, se ha establecido el comportamiento como fluoróforo independiente del dianión del OG488, y se ha comprobado que los datos de fluorescencia en estado estacionario reflejan el  $pK_M$  del estado fundamental, en torno a 4.7. Finalmente, se ha cuantificado el valor de  $pK_N^*$  del estado excitado en 2.67, suponiendo que la reacción de transferencia protónica en el estado excitado  $N^* \rightleftharpoons M^* + H^+$  es lo suficientemente rápida como para que las concentraciones en estado estacionario de  $N^*$  y  $M^*$  reflejen el valor del  $pK_N^*$ .

<sup>∇</sup> El valor del coeficiente de regresión,  $r^2$ , fue de 0.9983.

III.2.3.- Influencia de un aceptor/dador protónico en la intensidad de fluorescencia del sistema monoanión/dianión.

Hasta ahora, los resultados experimentales obtenidos han mostrado que no existe reacción de transferencia protónica, en el estado excitado, entre el monoanión y dianión del OG488 en disolución acuosa. Seguidamente, se exponen los experimentos que conducen a demostrar la existencia de la mencionada reacción cuando en el medio está presente un aceptor/dador protónico adecuado a una concentración suficientemente alta. Ya en la sección de *Introducción* se indicó que la presencia de un aceptor/dador protónico apropiado promueve reacciones de transferencia protónica durante el tiempo de vida del estado excitado de algunos fluoróforos.

Del examen previo de posibles sistemas aceptores/dadores, se ha escogido como más idóneo el tampón (la disolución reguladora) constituido por ácido acético/acetato sódico, porque ni el anión acetato, ni el ácido acético, forman complejos con el OG488 en el estado fundamental. Consecuentemente, no se perturba el espectro de absorción del fluoróforo con la adición del tampón. En la sección III.1.2.5, en las figuras III-22, III-23 y III-24 ya se estableció que los espectros de absorción de OG488, recogidos a diferentes concentraciones crecientes de tampón acetato a un pH fijo, no modifican esencialmente la forma y absorbancia de los espectros. Además, las leves discrepancias observadas se asignaron a efectos de la fuerza iónica, lo que se puede comprobar de la coincidencia con los espectros de la figura III-21 (sección III.1.2.4), en donde se han representado los correspondientes a disoluciones acuosas de OG488 con diferentes concentraciones crecientes de perclorato sódico.

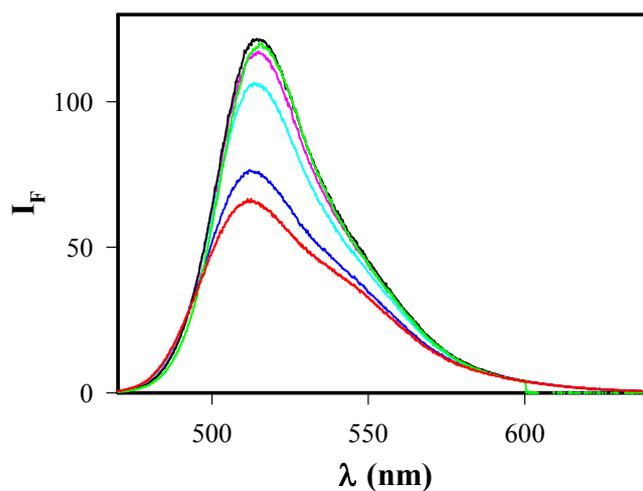
En adición, el  $pK_a$  del ácido acético es de 4.756 (*Lide, 2003*), por lo que resulta muy favorable para el estudio de la mencionada reacción de transferencia protónica, dado que el  $pK_a$  del equilibrio entre monoanión y dianión del OG488, en el estado fundamental, es de 4.74. Estas características, permiten que se pueda variar el pH de las disoluciones experimentales con

relativa amplitud y conseguir así que predomine la excitación del monoanión o del dianión, según convenga para la mejor interpretación y discusión de los resultados.

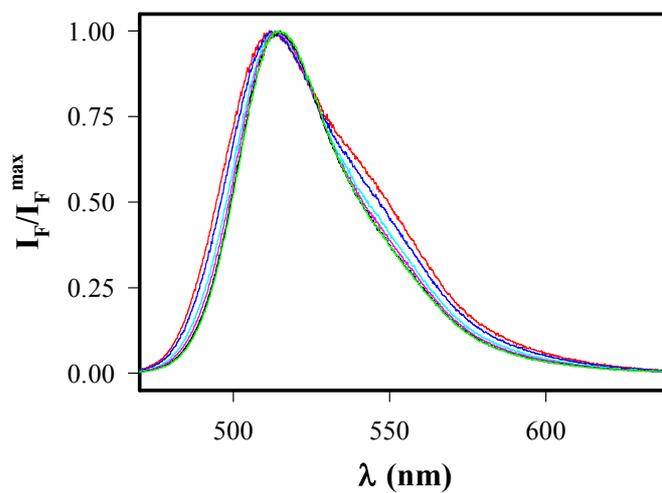
La reacción de transferencia protónica en el estado excitado, mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico, entre el monoanión y dianión del OG488 en disolución acuosa, se evidencia de la simple observación de la figura III-37, que muestra los espectros de emisión, registrados con excitación a 420 nm, de disoluciones acuosas de OG488, a diferentes concentraciones crecientes de tampón acetato y a un pH constante de 4.3. A la longitud de onda de excitación utilizada, la absorbancia del monoanión es mayor que la del dianión. Asimismo, al pH del experimento, la relación monoanión/dianión en el estado fundamental, es mayor de uno. Por lo tanto, estas condiciones experimentales permiten la excitación preferente del monoanión. Los resultados muestran que, el aumento de la concentración del tampón acetato, provoca un pronunciado aumento de la intensidad de emisión en el máximo a 515 nm. Dado que este máximo (y el perfil completo del espectro) está dominado por la emisión del dianión, estos resultados indican que el aumento en la concentración de tampón aumenta la concentración de moléculas de dianión excitado al pH del experimento. Como también se puede observar en la figura III-37, hay una disminución en la intensidad del hombro, característico del monoanión, que se encuentra centrado alrededor de 550 nm. Esta concomitante disminución en la emisión del monoanión es de esperar, si el aumento de la emisión del dianión es debido a la conversión del monoanión excitado en dianión excitado. En la figura III-38 se muestran, para su mejor observación, algunos de los espectros de emisión normalizados, incluyendo los recogidos para las disoluciones con menor y mayor concentración de tampón. En el espectro de emisión del monoanión aparece un hombro en la región de 550 nm, que es el que desaparece paulatinamente en la figura III-37 con la adición de tampón. Se han realizado dos experimentos adicionales similares al anterior,

pero con valores de pH 4.0 y 4.6. Los resultados obtenidos fueron cualitativamente iguales. En la figura III-39 se observan los aumentos en la intensidad de fluorescencia relativa, medida a 515 nm, con el incremento en la concentración total de las especies del tampón, para los tres valores de pH estudiados. Por claridad, las intensidades se han normalizado al valor alcanzado a la mayor concentración de aceptor/dador protónico empleada.

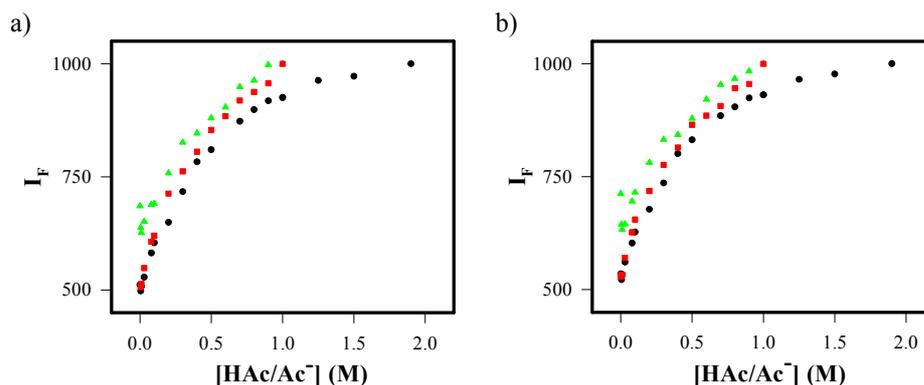
Los efectos descritos en el párrafo precedente son consecuentes con la aparición de una reacción en el estado excitado, mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico. Así, la excitación preferente del monoanión produce una concentración alta de esta especie en el estado excitado. Si la reacción de transferencia protónica en el estado excitado es lo suficientemente rápida como para suceder en el tiempo de vida del estado excitado, a la concentración prefijada de aceptor/dador protónico, las concentraciones de las dos especies en el estado excitado tienden a redistribuirse según la relación dictada por la constante del equilibrio monoanión–dianión en el estado excitado. Si este  $pK_a^*$  es inferior, similar, o ligeramente superior al del estado fundamental, la excitación preferente del monoanión provoca la transformación de esta especie excitada en dianión excitado, lo cual se refleja en el aumento observado del espectro de fluorescencia, que está dominado por la emisión del dianión. Solo en el caso de que el  $pK_a^*$  del equilibrio considerado fuese suficientemente superior al del estado fundamental, no se observaría ningún efecto o, incluso, un *quenching* de fluorescencia. La conversión del monoanión excitado en dianión excitado no sucede en presencia de baja concentración de tampón debido a que las constantes cinéticas de tal reacción son menores que las constantes radiativas, por lo que las especies excitadas se desactivan antes de que se produzca la reacción.



**Figura III-37:** Espectros de emisión con excitación a 420 nm, de disoluciones acuosas de OG488  $2.5 \times 10^{-6}$  M a pH 4.3, en presencia de una concentración total de tampón HAc/Ac<sup>-</sup> de (red)  $5 \times 10^{-3}$ , (blue)  $8 \times 10^{-2}$ , (cyan) 0.5, (magenta) 0.8, (black) 1.0 y (green) 1.5 M.



**Figura III-38:** Espectros normalizados de la figura III-37.



**Figura III-39:** Variación de la intensidad de fluorescencia recogida a 515 nm con el incremento en la concentración total de tampón HAc/Ac<sup>-</sup> a los valores de pH de 4.0 (▲), 4.3 (●) y 4.6 (■). **a)**  $\lambda^{ex} = 420$  y **b)**  $\lambda^{ex} = 435$  nm.

Los efectos de la presencia del aceptor/dador protónico escogido, a pH 4.3, comienzan a evidenciarse a una concentración 5 mM y parece que saturan cuando la concentración es 1 M.

Aunque los experimentos consignados demuestran convincentemente que se produce una reacción de transferencia protónica entre el monoanión y el dianión del OG488 en el estado excitado, no permiten la evaluación del  $pK_a^*$ . Para esto, se deben de realizar otra serie de experimentos que se detallan en la siguiente sección.

### III.2.3.1.- Cálculo del $pK_a^*$ de la reacción monoanión/dianión, mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico.

Se han recogido los espectros de fluorescencia, a diferentes longitudes de onda de excitación, de disoluciones acuosas de OG488 en presencia de tampón de acetato 1 M, a distintos valores de pH comprendidos en el intervalo entre 3.5 y 8. Las mencionadas condiciones experimentales se han escogido sobre la base de los anteriores experimentos descritos. Así y según la figura III-37, los efectos del tampón sobre la intensidad de fluorescencia saturan a la concentración 1 M. Por otra parte, el margen de pH resulta muy adecuado, ya que el  $pK_a^*$  del equilibrio entre las especies neutra  $\rightleftharpoons$  monoanión es 2.67, por lo

que, a pH 4, prácticamente todas las formas neutras excitadas relajarán rápidamente a monoaniones excitados. Además, la presencia del aceptor/dador protónico, también favorecerá esta transposición. Esta particularidad permite simplificar el modelo aplicable a solo dos estados excitados, lo que, a su vez, simplifica la ecuación que se deriva del modelo. Bajo todas estas condiciones, la intensidad de fluorescencia no depende de la especie protónica que ha sido excitada preferentemente, ya que durante el tiempo de vida de los estados excitados, las concentraciones de las diferentes especies protónicas se deben de reajustar a los valores dictados por el  $pK_a^*$ , borrando todos los efectos debidos a la excitación preferente de alguna de las especies y originando una emisión acoplada de las dos especies excitadas, en donde el predominio de cada una de ellas a cada pH, resulta impuesto por el  $pK_a^*$ .

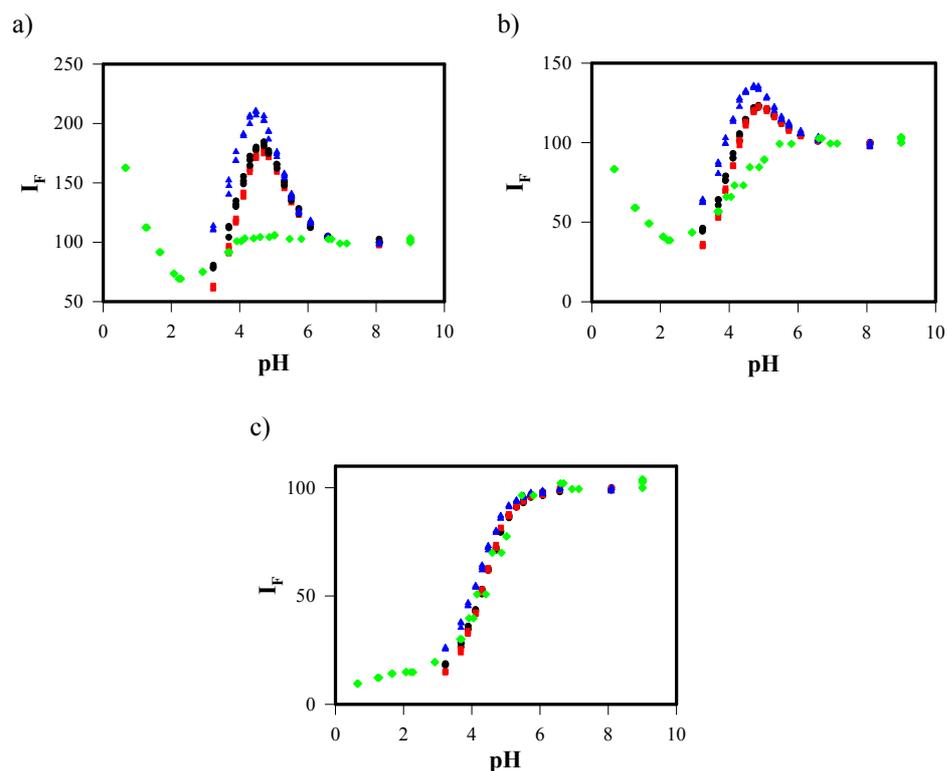
Con el modelo supuesto, se puede escribir que la intensidad de fluorescencia se relaciona con el pH y el  $pK_a^*$ , mediante la expresión (Yguerabide et al., 1994):

$$I_F = \frac{A\phi_M}{1 + 10^{(pH - pK_M^*)}} + \frac{A\phi_D}{1 + 10^{(pK_M^* - pH)}} \quad \text{(III-20)}$$

en donde  $A$  es la absorbancia a la longitud de onda de la excitación y  $pK_M^*$  es la constante para la reacción de intercambio protónico en el estado excitado  $M^* \rightleftharpoons D^* + H^+$ .  $\phi_M$  y  $\phi_D$  son parámetros relacionados con las eficiencias relativas de fluorescencia del monoanión y dianión a la longitud de onda de emisión, aunque incluyen ciertas contribuciones instrumentales. El proceso de obtención de esta ecuación es similar al de la ecuación III-19, suponiendo, en este caso, la condición de equilibrio para las especies  $M^*$  y  $D^*$ .

Para determinar si la intensidad de fluorescencia experimental vs pH, se puede explicar por el modelo de la ecuación anterior, se han recogido los valores experimentales de la intensidad de fluorescencia, de disoluciones de OG488  $2.5 \times 10^{-6}$  M y tampón acetato 1 M, a diferentes valores de pH comprendidos en el intervalo entre 3.5 y 8. Las longitudes de onda de excitación

fueron 420, 440 y 460 nm, y las de emisión fueron 500, 515 y 550 nm. Los datos experimentales de  $I_F$  vs pH para algunos pares de  $\lambda^{ex}$  y  $\lambda^{em}$  se han representado en la figura III-40. En esta figura también se incluyen los datos obtenidos en ausencia de tampón y con las restantes condiciones experimentales iguales, al objeto de su comparación. Para ello, todas las series se han normalizado a un valor de 100 unidades para la disolución a pH más básico.



**Figura III-40:** Representación de la intensidad de fluorescencia frente al pH, de disoluciones de OG488  $2.5 \times 10^{-6}$  M en presencia de tampón HAc/Ac<sup>-</sup> 1 M, recogiendo la emisión a 500 (●), 515 (■) y 550 nm (▲). Para su comparación se muestra la correspondiente serie en ausencia de tampón con emisión a 515 nm (◆). **a)**  $\lambda^{ex} = 420$ , **b)**  $\lambda^{ex} = 440$  y **c)**  $\lambda^{ex} = 460$  nm. Para su comparación, los datos se han normalizado a un valor de 100 para la disolución de pH más básico.

A continuación, se comprobó la adecuación del modelo propuesto a los datos experimentales mediante ajustes globales no lineales por mínimos

cuadrados. En un primer ajuste global, tanto los valores de intensidad de fluorescencia como los de absorbancia considerados fueron los experimentales. En un posterior análisis global, se emplearon los datos experimentales de  $I_F$ , mientras que la absorbancia fue calculada a través de los parámetros obtenidos en esta Memoria.

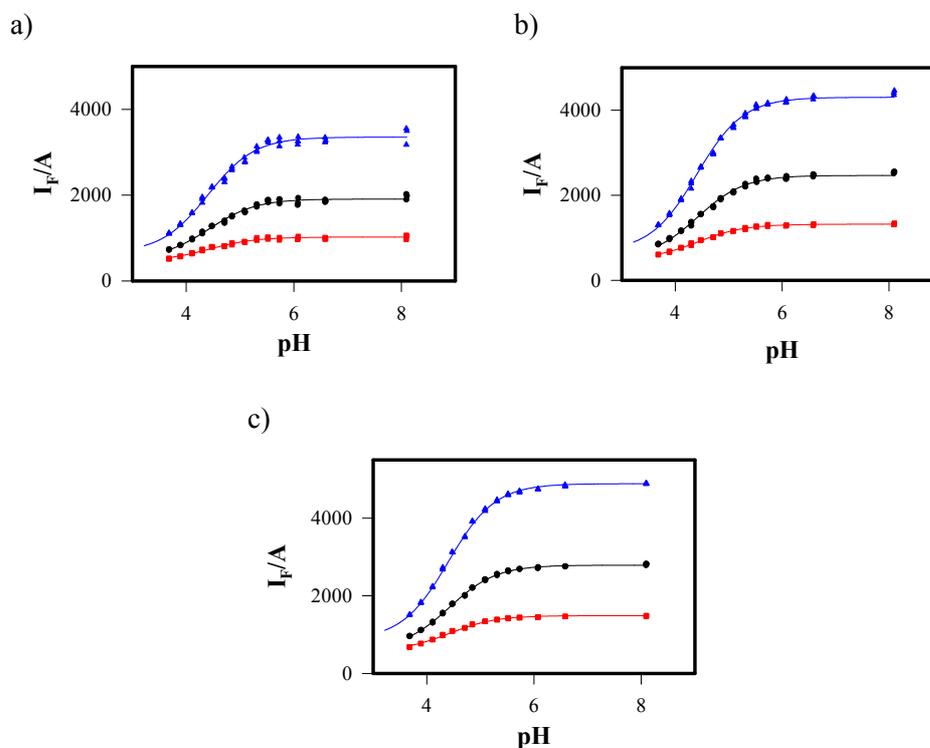
Para la primera serie de ajustes, la ecuación III-20 fue ligeramente modificada, pasando la absorbancia experimental al primer miembro, de forma que la variable dependiente fue el cociente  $I_F/A$ , donde  $I_F$  fueron las intensidades de la figura III-40, y  $A$  las absorbancias experimentales de las disoluciones a las distintas longitudes de onda de excitación. Así, la ecuación III-21 se ajustó a los datos experimentales de forma simultánea (global), mediante un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados.

$$\frac{I_F}{A} = \frac{\phi_M}{1 + 10^{(pH - pK_M^*)}} + \frac{\phi_D}{1 + 10^{(pK_M^* - pH)}} \quad \text{(III-21)}$$

En el citado ajuste se consideraron como parámetros ajustables locales los valores de  $\phi_M$  y  $\phi_D$ , mientras que el valor de  $pK_M^*$  fue un parámetro de ajuste ligado en todas las curvas  $I_F/A$  vs pH. El valor obtenido para  $pK_M^*$  fue de  $4.42 \pm 0.01^\vee$ . El parámetro de correlación cruzada del  $pK_M^*$  fue de 0.824, que está dentro de los límites aceptables, indicando la ausencia de correlación en el valor recuperado de  $pK_M^*$ . En la figura III-41 se muestran las representaciones derivadas de estos ajustes globales y en la tabla XI se indican los valores medios de los cocientes  $\phi_D/\phi_M$  de los valores de  $\phi_i$  recuperados en el análisis a cada longitud de onda emisión. Este cociente proporciona el valor relativo de las eficiencias de fluorescencia de las dos especies, eliminándose las contribuciones instrumentales a los parámetros ajustados. El cociente  $\phi_D/\phi_M$  se puede considerar de cierto interés fotofísico para el empleo de este fluoróforo.

<sup>∨</sup> El coeficiente de regresión global,  $r^2$ , fue de 0.9985.

La aplicación de la anterior metodología a los datos de fluorescencia en estado estacionario, ha permitido calcular el valor del  $pK_M^*$ . Como se puede comprobar, el valor del  $pK_M^*$  es ligeramente inferior al  $pK_M$  del estado fundamental.



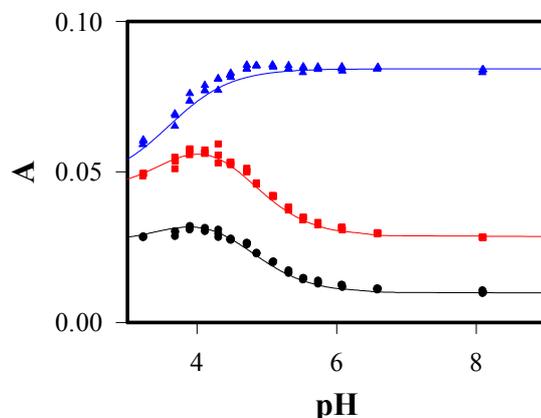
**Figura III-41:** Ajuste de la ecuación III-21 con los datos experimentales de  $I_F/A$  en presencia de tampón HAc/Ac<sup>-</sup> 1 M. Se muestran las curvas a las longitudes de onda de excitación **a)** 420, **b)** 440 y **c)** 460 nm, a las longitudes de onda de emisión de 500 (●), 515 (■) y 550 nm (▲).

**Tabla XI:** Valores promedio de la relación  $\phi_D/\phi_M$ , recuperados en el ajuste mediante análisis global de la ecuación III-21 usando los datos experimentales de  $I_F/A$ .

$\lambda^{em}$	500 nm	515 nm	550 nm
$\phi_D/\phi_M$	4.322	5.228	2.509

También se ha realizado el ajuste de la ecuación III-20 a los datos experimentales de  $I_F$ , empleando los valores de absorbancia calculados mediante los valores de  $pK_a$  del estado fundamental y los coeficientes de

extinción molar. Inicialmente se comprobó que la absorbancia calculada es coincidente con la experimental. En la figura III-42 se muestra la buena coincidencia entre ambos valores.



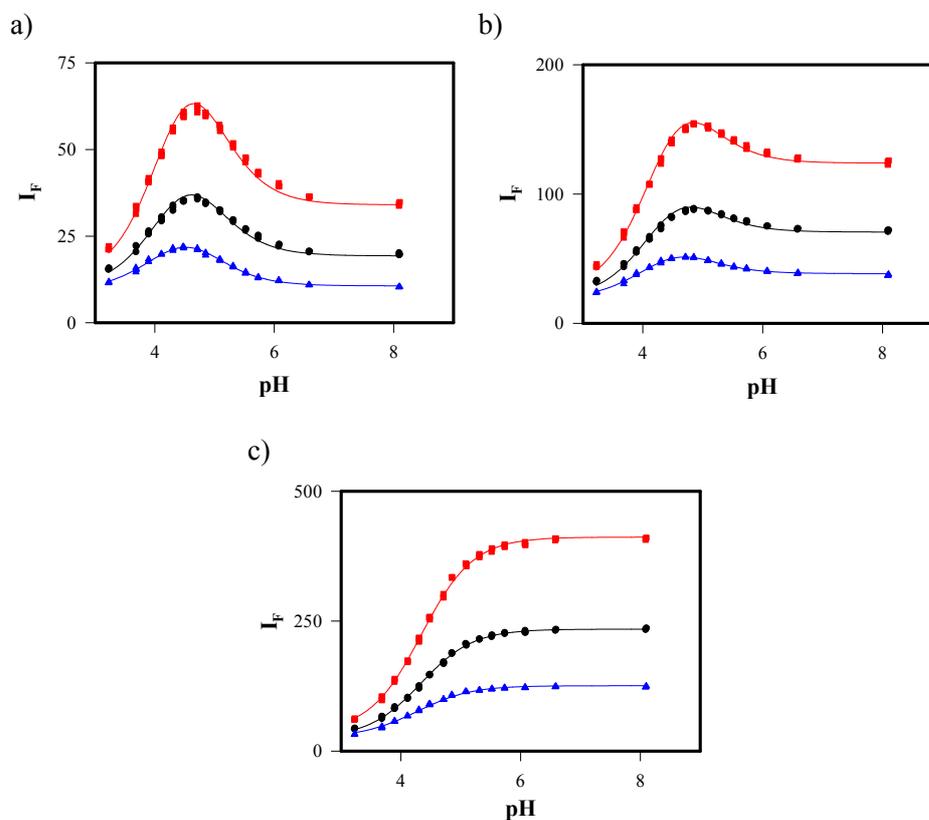
**Figura III-42:** Absorbancia experimental (símbolos) y calculada (líneas continuas) a través de los  $pK_a$  y coeficientes de absorptividad molar de la sección III.1.1.1, para disoluciones de OG488  $2.5 \times 10^{-6}$  M en presencia de HAc/Ac<sup>-</sup> 1 M. Las absorbancias representadas corresponden a las longitudes de onda de excitación en las medidas de fluorescencia, que son (●) 420 nm, (■) 440 nm y (▲) 460 nm.

El ajuste global de las curvas  $I_F$  vs pH, empleando la absorbancia calculada, proporcionó un  $pK_M^*$  de  $4.33 \pm 0.01$ , con una dependencia dentro de los valores permisibles (0.803). En la figura III-43 se representan los datos experimentales de intensidad de fluorescencia en estado estacionario, junto con las curvas calculadas con los parámetros recuperados en el ajuste<sup>∇</sup>. En la tabla XII se indican los valores medios obtenidos para los cocientes de las eficiencias relativas de las especies M y D,  $\phi_D/\phi_M$ . Como se puede comprobar, los resultados obtenidos con los dos procedimientos de ajuste empleados, son muy similares en lo que se refiere al  $pK_M$ . Asimismo, los valores de los cocientes entre las eficiencias de fluorescencia también son bastante similares, aunque ligeramente superiores en el segundo ajuste.

<sup>∇</sup> El coeficiente de regresión global fue de 0.9995.

**Tabla XII:** Relaciones  $\phi_D/\phi_M$  medias recuperadas en el análisis global de la ecuación III-20 con los datos experimentales de  $I_F$  vs pH y los valores teóricos de absorbancia.

$\lambda^{em}$	500 nm	515 nm	550 nm
$\phi_D/\phi_M$	5.226	7.067	2.967



**Figura III-43:** Ajuste de la ecuación III-20 con los valores experimentales de  $I_F$  vs pH en presencia de tampón HAC/Ac<sup>-</sup> 1 M, y valores de absorbancia calculados con los resultados de la sección III.1.1.1. Se muestran las curvas a las longitudes de onda de emisión de 500 (●), 515 (■) y 550 nm (▲), a las longitudes de onda de excitación de a) 420, b) 440 y c) 460 nm.

Los excelentes parámetros estadísticos que acompañan a los ajustes efectuados demuestran que el modelo utilizado permite explicar convincentemente los datos experimentales. Por lo tanto, se puede concluir que se produce una reacción de transferencia protónica en el estado excitado, entre el monoanión y el dianión del OG488, lo suficientemente rápida como para que

ocurra durante el tiempo de vida de los estados excitados de las especies implicadas, cuando en el medio se encuentra una concentración apropiada de un aceptor/dador protónico adecuado.

### III.3.- SISTEMA BICOMPARTIMENTAL $M^* \rightleftharpoons D^*$ EN PRESENCIA DE $HAc/Ac^-$ COMO ACEPTOR/DADOR PROTÓNICO. FLUORIMETRÍA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL.

En la sección de *Introducción* ya se mencionó la importancia de la fluorimetría con resolución temporal, y en concreto de la técnica TCSPC, para resolver cinéticas de procesos en el estado excitado. Asimismo, la reciente aplicación del análisis global compartimental a los procesos fotofísicos, ha resultado una herramienta de inestimable ayuda en la resolución de estos procesos, en lo que se refiere al cálculo de sus constantes cinéticas y de las características espectrales de las especies implicadas (*Beechem et al., 1985; Andersson et al., 1991; Khalil et al., 1991; Boens et al., 1996, 2000*).

Por otra parte y como se ha establecido en las secciones anteriores, en el intervalo de valores de pH en donde coexisten en equilibrio (en el estado fundamental) las especies monoaniónica y dianiónica del OG488, se puede promover la reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las mencionadas especies, mediante la adición de un aceptor/dador protónico adecuado. Por el contrario, la citada reacción no tiene lugar en ausencia del mencionado aceptor/dador. Al objeto de aprovechar con ventaja estas características, se comenzará el estudio cinético de las reacciones en el estado excitado entre las diversas especies prototrópicas del OG488 en disolución acuosa, en el intervalo de pH en donde coexisten las formas monoanión y dianión, en el estado fundamental y en el excitado. En determinadas condiciones la especie neutra también se verá incluida, aunque esto se describirá más adelante. Se realizará así el estudio de un proceso de transferencia protónica en estado excitado mediado por las especies de un aceptor/dador protónico mediante análisis global compartimental. Este modelo se basa en el descrito en la sección II.3.4.1 de *Materiales y Métodos*, donde se describe la teoría general y ecuaciones generales que se aplicarán.

### III.3.1.- Identificabilidad del sistema compartimental.

Las reacciones de transferencia protónica promovidas por la presencia de un aceptor/dador protónico adecuado, han sido analizadas muy recientemente en términos de compartimentos, bajo el entorno del análisis global compartimental. El único de estos sistemas resuelto hasta ahora ha sido el de fluoresceína en presencia de ácido N-acetilaspártico (Crovetto 2003; Crovetto et al., 2004). Además, el estudio de identificabilidad de este sistema compartimental ha sido desarrollado para su uso en esta Memoria y remitido recientemente para su publicación (Boens et al., 2004).

Una característica muy importante en el ámbito del análisis global compartimental es la posibilidad de asignar un único conjunto de valores a los parámetros cinéticos y espectroscópicos, a partir de los decaimientos adquiridos para ello. Esto se denomina *identificabilidad*. Se designa *sistema globalmente identificable* al sistema en el que se tienen decaimientos suficientes para asignar un único valor a cada uno de los parámetros. Si existen varios conjuntos de soluciones, el sistema se denomina *localmente identificable*. El sistema compartimental será *no identificable* cuando no se logre obtener una solución de los parámetros. El problema de la identificabilidad estructural es tratar de obtener todos los parámetros de un sistema compartimental a través de medidas **libres de error**. Es evidente que esta situación no es real, sin embargo, los estudios de identificabilidad son clave a la hora de diseñar los experimentos y programar las superficies de decaimientos de fluorescencia para ser introducidas en un análisis global compartimental.

Como ejemplos de análisis de identificabilidad en sistemas fotofísicos, destacaremos los siguientes:

◆ El trabajo de Ameloot et al. (1991) donde se muestra para un proceso intermolecular en dos estados excitados que dos conjuntos diferentes de valores para las constantes cinéticas pueden satisfacer igualmente los datos experimentales.

◆ Para un proceso intermolecular irreversible en dos estados excitados, aunque se conozca una de las constantes (la reacción en estado excitado del producto hacia el reactivo es nula), esto no ayuda a conocer de forma única el resto de las constantes cinéticas (*Boens et al., 1996*).

◆ Para un proceso intramolecular en dos estados excitados, *Van Dommelen et al. (1993)* demostraron que únicamente pueden obtenerse ciertas combinaciones de las constantes cinéticas empleando un *quencher* con diferentes eficacias de *quenching* para ambas especies excitadas, y al menos emplear tres concentraciones diferentes del amortiguador. Además, demostraron que solo es posible obtener los límites de los valores de las constantes.

◆ Un estudio anterior de identificabilidad en un modelo de tres especies es el de *Kowalczyk et al. (1995)* quienes investigaron un proceso intermolecular en dos estados en presencia de una impureza fluorescente. Para este sistema, al igual que para el sistema reversible en dos estados, es necesario obtener decaimientos en ausencia de co-reactante, para asignar un valor inequívoco a las constantes cinéticas.

◆ *Boens y Kowalczyk (1996)* realizaron el estudio de identificabilidad de un proceso intermolecular competitivo en tres estados excitados (la especie  $1^*$  reacciona en el estado excitado con dos reactantes diferentes, X e Y). Demostraron que para este sistema pueden obtenerse valores únicos para todas las constantes cinéticas implicadas, a través de decaimientos con dos concentraciones diferentes del co-reactante X y otras dos concentraciones del co-reactante Y. Es destacable que no son necesarios decaimientos en ausencia de los co-reactantes para asignar valores unívocos a las constantes cinéticas. Sin embargo, para los parámetros espectrales, relacionados con los factores pre-exponenciales y tiempos de decaimiento, los métodos numéricos para intentar resolver esta situación son insuficientes en este caso.

En esta Memoria se ha desarrollado el estudio de identificabilidad estructural para el sistema de reacción ESPT promovida por las especies de un aceptor/dador protónico. Este estudio ha sido publicado recientemente (*Boens et al., 2004*).

El modelo teórico y ecuaciones del sistema compartimental considerado es el que se desarrolló en la sección II.3.4.1 de *Materiales y Métodos*. Sin embargo, en este estudio se ha considerado despreciable la reacción de reprotonación en el estado excitado a través del disolvente ( $k_{12}[\text{H}^+] = 0$ ). Esta condición es asumible siempre, cuando la concentración protónica sea lo suficientemente baja como para que se cumpla, o bien porque esta asociación realmente presente una cinética muy lenta. En estas condiciones hay que notar que en ausencia de aceptor/dador protónico, los tiempos de decaimiento de fluorescencia son invariables con el pH. Estos tiempos, de acuerdo con el esquema I-9 y aplicando la condición  $k_{12}[\text{H}^+] = 0$  a la ecuación I-40, vienen dados por:

$$\tau_1 = 1/(k_{01} + k_{21}) \quad (\text{III-22})$$

$$\tau_2 = 1/k_{02} \quad (\text{III-23})$$

En cambio, cuando el aceptor/dador protónico está presente, los tiempos de decaimiento se hacen función del pH y de la concentración de las especies del aceptor/dador ( $[\text{R}]$  y  $[\text{RH}]$ ), según la ecuación II-14. Directamente, por tanto, estos tiempos de decaimiento dependen del pH, la concentración total del aceptor/dador protónico ( $C^{\text{buff}}$ ) y de su constante de acidez ( $K_a^{\text{buff}}$ ). Los demás parámetros del sistema compartimental se encuentran también en la sección II.3.4.1 (siempre con la modificación de  $k_{12} = 0$ ).

En el desarrollo que sigue a continuación para el estudio de identificabilidad, en lugar de las expresiones de  $\gamma_i$  (ecuación II-14) que son no lineales, se utilizarán las funciones simétricas  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  dadas por:

$$\sigma_1 = \gamma_1 + \gamma_2 = -(k_{01} + k_{21} + k_{21}^b[R]) - (k_{02} + k_{12}^b[RH]) \quad (III-24)$$

$$\sigma_2 = \gamma_1\gamma_2 = k_{02}(k_{01} + k_{21} + k_{21}^b[R]) + k_{01}k_{12}^b[RH] \quad (III-25)$$

Si las ecuaciones III-24 y III-25 se ponen en función de la concentración de  $H^+$ , la concentración total de aceptor/dador  $C^{buff}$  y la constante  $K_a^{buff}$ , quedan:

$$\sigma_1 = -(k_{01} + k_{21} + k_{02}) - C^{buff} \frac{k_{21}^b K_a^{buff} + k_{12}^b [H^+]}{K_a^{buff} + [H^+]} \quad (III-26)$$

$$\sigma_2 = k_{02}(k_{01} + k_{21}) + C^{buff} \frac{k_{02}k_{21}^b K_a^{buff} + k_{01}k_{12}^b [H^+]}{K_a^{buff} + [H^+]} \quad (III-27)$$

Por tanto, a cada  $C^{buff}$  y  $[H^+]$ ,  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  tendrán un valor diferente. A partir de este momento, se denominará  $\sigma_{1ki}$  y  $\sigma_{2ki}$  a las funciones  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  respectivamente a la concentración de tampón  $C_k^{buff}$  y a la concentración de protones  $[H^+]_i$ .

A continuación, se describirán las condiciones necesarias para conseguir obtener valores únicos de las constantes cinéticas. Para ello, es imprescindible la obtención de un decaimiento en **ausencia de aceptor/dador protónico**. Este decaimiento debe ser biexponencial, de forma que de él se pueda obtener la suma  $k_{01} + k_{21} + k_{02}$  a través de la ecuación III-28<sup>∇</sup>.

$$k_{01} + k_{21} + k_{02} = \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} \quad (III-28)$$

Una vez se conoce  $k_{01} + k_{21} + k_{02}$ , pueden obtenerse valores únicos para las constantes  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$  a través de decaimientos a dos valores diferentes de pH ( $[H^+]_1$  y  $[H^+]_2$ ) a una única concentración de tampón ( $C_k^{buff}$ ). Con estos dos

---

<sup>∇</sup> La ecuación III-28 únicamente es válida para un decaimiento biexponencial en ausencia de aceptor/dador protónico.

valores de pH se calculan con la ecuación III-26 las funciones  $\sigma_{1k1}$  y  $\sigma_{1k2}$ . Así, pueden obtenerse  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$  a partir de las ecuaciones siguientes:

$$k_{21}^b = \frac{1}{C_k^{buff} K_a^{buff} ([H^+]_1 - [H^+]_2)} \left\{ \sigma_{1k1} [H^+]_2 (K_a^{buff} + [H^+]_1) - \sigma_{1k2} [H^+]_1 (K_a^{buff} + [H^+]_2) - K_a^{buff} ([H^+]_1 - [H^+]_2) (k_{01} + k_{21} + k_{02}) \right\} \quad (III-29)$$

$$k_{12}^b = \frac{1}{C_k^{buff} ([H^+]_1 - [H^+]_2)} \left\{ -\sigma_{1k1} (K_a^{buff} + [H^+]_1) - \sigma_{1k2} (K_a^{buff} + [H^+]_2) - ([H^+]_1 - [H^+]_2) (k_{01} + k_{21} + k_{02}) \right\} \quad (III-30)$$

Estrictamente, las concentraciones de tampón a los dos valores de pH no tienen que ser necesariamente idénticas. De hecho, pueden obtenerse igualmente  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$  a través de  $\sigma_{1k1}$  (con  $[H^+]_1$  y  $C_k^{buff}$ ) y de  $\sigma_{1l2}$  (con  $[H^+]_2$  y  $C_l^{buff}$ ). No obstante, las ecuaciones III-29 y III-30 se modificarían a otras bastante más complejas. Sin embargo, si se dispone de dos decaimientos a un único pH ( $[H^+]_1$ ) y dos concentraciones diferentes de aceptor/dador ( $C_k^{buff}$  y  $C_l^{buff}$ ), de forma que se obtengan las funciones  $\sigma_{1k1}$  y  $\sigma_{1l1}$ , estas condiciones no conducen a soluciones de  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$ . Por tanto son necesarios y suficientes dos valores de pH para obtener estas dos constantes cinéticas.

Con el conocimiento previo de  $k_{01} + k_{21} + k_{02}$ , y la obtención de  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$ , pueden calcularse posteriormente las constantes  $k_{01}$ ,  $k_{21}$  y  $k_{02}$ . Éstas se pueden determinar por medio de tres decaimientos y las ecuaciones III-26 y III-27, cumpliendo alguna de las siguientes condiciones:

↪ Con dos diferentes valores de pH y dos concentraciones de tampón. Así, se utilizarían las funciones independientes  $\sigma_{2k1}$ ,  $\sigma_{2k2}$  y  $\sigma_{2l2}$  (o equivalentemente  $\sigma_{2l1}$ ).

↪ Con tres diferentes valores de pH y dos concentraciones de aceptor/dador protónico. Pueden utilizarse, por ejemplo,  $\sigma_{2k1}$ ,  $\sigma_{2k2}$  y  $\sigma_{2l3}$ .

↳ Pueden emplearse dos diferentes valores de pH y tres concentraciones de tampón ( $C_k^{buff}$ ,  $C_l^{buff}$  y  $C_m^{buff}$ ). Se pueden obtener las constantes a través de  $\sigma_{2k1}$ ,  $\sigma_{2l2}$  y  $\sigma_{2m2}$ .

↳ Por último, pueden utilizarse tres decaimientos obtenidos a tres diferentes valores de pH y tres concentraciones de tampón.

Hasta aquí se ha demostrado que el sistema, a nivel de constantes cinéticas es identificable, a través de decaimientos a dos valores de pH y dos diferentes concentraciones totales de tampón, además de un decaimiento en ausencia de aceptor/dador protónico que aporte, como información *a priori* la suma  $k_{01} + k_{21} + k_{02}$ . No obstante, a continuación se analizarán las condiciones para alcanzar identificabilidad empleando una única concentración de aceptor/dador. Para ello será necesaria una mayor cantidad de información *a priori*. Por ejemplo, si la única información disponible es  $k_{02}$ , que se obtiene de un decaimiento monoexponencial a un pH muy alto (tanto en presencia como en ausencia de tampón), el uso de decaimientos a dos valores de pH ( $[H^+]_1$  y  $[H^+]_2$ ) y una única concentración de tampón ( $C_k^{buff}$ ), hace que las constantes  $k_{01}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$  no se puedan determinar mediante  $\sigma_{1k1}$ ,  $\sigma_{1k2}$ ,  $\sigma_{2k1}$  y  $\sigma_{2k2}$ . En cambio si son conocidas tanto  $k_{02}$  como la suma  $k_{01} + k_{21}$ , el sistema puede ser identificable, en términos de constantes cinéticas, en las condiciones anteriores, de dos valores de pH y una concentración de tampón, ya que utilizando  $\sigma_{1k1}$ ,  $\sigma_{1k2}$  y  $\sigma_{2k1}$  (o  $\sigma_{2k2}$ ) pueden obtenerse  $k_{01}$  (o  $k_{21}$ ),  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$ . Esta situación es fácilmente alcanzable, ya que un decaimiento en ausencia de aceptor/dador protónico presentará una ley de decaimiento biexponencial, en la que los dos tiempos de decaimiento vendrán dados respectivamente por  $1/k_{02}$  y  $1/(k_{01} + k_{21})$ . Por tanto, si los dos tiempos de decaimiento quedan bien definidos, y la asignación de cada uno de ellos se puede realizar sin ambigüedad

a  $1/k_{02}$  y  $1/(k_{01} + k_{21})$ , esto se puede utilizar como información *a priori* para las posteriores determinaciones de constantes. Igual que el caso anterior, si la información de la que se dispone es  $k_{01}$  y  $k_{02}$ , las otras tres constantes se pueden calcular, con valores únicos, con decaimientos a dos valores de pH y una única concentración de tampón. En cambio, si la información previa son los valores de  $k_{02}$  y  $k_{21}$ , las restantes constantes,  $k_{01}$ ,  $k_{21}^b$  y  $k_{12}^b$ , vendrán dadas por ecuaciones cuadráticas, con lo que se obtendrían dos posibles valores para cada constate. No obstante, esto se puede resolver si alguna de las soluciones tomase valores negativos, y por tanto, se descartaría este resultado.

Una vez que se han desarrollado las condiciones para conseguir identificabilidad a nivel de las constantes cinéticas, se describirán a continuación las condiciones para lograr determinar los parámetros espectrales  $\tilde{b}_1$  y  $\tilde{\tau}_2$  (los parámetros  $\tilde{b}_2$  y  $\tilde{\tau}_1$  quedarían determinados al estar normalizados). La relación de los parámetros espectrales, las constantes cinéticas, los tiempos de decaimiento (o  $\gamma_i = -1/\tau_i$ ) y los pre-exponenciales  $p_i$ , viene dada por los parámetros de Markov:

$$m_0 = \sum_{i=1}^2 p_i = \kappa \tilde{\mathbf{c}} \tilde{\mathbf{b}} \quad (\text{III-31})$$

$$m_1 = \sum_{i=1}^2 p_i \gamma_i = \kappa \tilde{\mathbf{c}} \mathbf{A} \tilde{\mathbf{b}} \quad (\text{III-32})$$

Desarrollando estas expresiones, los parámetros de Markov toman la forma que se muestra a continuación:

$$m_0 = \sum_{i=1}^2 p_i = \kappa (\tilde{b}_1 + \tilde{\tau}_2 - 2\tilde{b}_1 \tilde{\tau}_2) \quad (\text{III-33})$$

$$m_1 = \sum_{i=1}^2 p_i \gamma_i = \kappa \left\{ \tilde{b}_1 \left[ \tilde{\tau}_2 (k_{01} + k_{02} + 2k_{21} + 2k_{21}^b [\text{R}] + 2k_{12}^b [\text{RH}]) - \right. \right. \quad (\text{III-34}) \\ \left. \left. - k_{01} - k_{21} - k_{21}^b [\text{R}] - k_{12}^b [\text{RH}] \right] - \tilde{\tau}_2 (k_{02} + 2k_{12}^b [\text{RH}]) + k_{12}^b [\text{RH}] \right\}$$

La eliminación del factor de escala  $\kappa$  entre las ecuaciones III-33 y III-34 conduce a la ecuación III-35.

$$\begin{aligned} & \tilde{b}_1 \left\{ \left[ m_0 (k_{21} + k_{21}^b [R] + k_{12}^b [RH]) + P + Q \right] \tilde{\tau}_2 - P - m_0 k_{12}^b [RH] \right\} \\ & - \tilde{\tau}_2 \left( Q + m_0 k_{12}^b [RH] \right) + m_0 k_{12}^b [RH] = 0 \end{aligned} \quad (III-35)$$

En la que:

$$P = m_1 + m_0 (k_{01} + k_{21} + k_{21}^b [R]) \quad (III-36)$$

$$Q = m_1 + m_0 (k_{02} + k_{12}^b [RH]) \quad (III-37)$$

La ecuación III-35 se puede escribir en función de las variables experimentales independientes,  $[H^+]$  y  $C^{buff}$ .

$$\begin{aligned} & - \tilde{b}_1 \tilde{\tau}_2 \left\{ m_1 + m_0 (k_{01} + 2k_{21} + k_{02}) + 2m_0 C^{buff} \frac{k_{21}^b K_a^{buff} + k_{12}^b [H^+]}{K_a^{buff} + [H^+]} \right\} + \\ & + \tilde{b}_1 \left\{ m_1 + m_0 (k_{01} + k_{21}) + \frac{m_0 C^{buff} (k_{21}^b K_a^{buff} + k_{12}^b [H^+])}{K_a^{buff} + [H^+]} \right\} + \\ & + \tilde{\tau}_2 \left\{ m_1 + m_0 k_{02} + \frac{2m_0 C^{buff} k_{12}^b [H^+]}{K_a^{buff} + [H^+]} \right\} = \frac{m_0 C^{buff} k_{12}^b [H^+]}{K_a^{buff} + [H^+]} \end{aligned} \quad (III-38)$$

Ésta es una ecuación no homogénea con dos incógnitas,  $\tilde{b}_1$  y  $\tilde{\tau}_2$ . Por tanto, para resolver el sistema, se necesita otra ecuación análoga con las mismas incógnitas. Para ello, se deben obtener dos decaimientos al mismo pH y misma longitud de onda de excitación (de modo que  $\tilde{b}_1$  no varía) y recogiendo la emisión a la misma longitud de onda (con lo que  $\tilde{\tau}_2$  será el mismo), pero a diferentes concentraciones totales de tampón ( $C^{buff}$ ). Así, con cada decaimiento se tendrá una ecuación III-38 diferente, pero con las mismas incógnitas,  $\tilde{b}_1$  y  $\tilde{\tau}_2$ . La solución al sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas conduce a dos posibles soluciones para  $\tilde{b}_1$  y  $\tilde{\tau}_2$ . No obstante, la condición de que ambas incógnitas estén normalizadas a 1 ( $0 \leq \tilde{b}_1, \tilde{\tau}_2 \leq 1$ ) puede llevar a descartar una de las soluciones. Hay que notar que la ecuación III-38 también es válida

cuando el decaimiento se recoge a una concentración de aceptor/dador nula ( $C^{buff} = 0$ ), por tanto el sistema en  $\tilde{b}_1$  y  $\tilde{\tau}_2$  podría resolverse con dos decaimientos en presencia y ausencia de tampón, al mismo pH,  $\lambda^{em}$  y  $\lambda^{ex}$ .

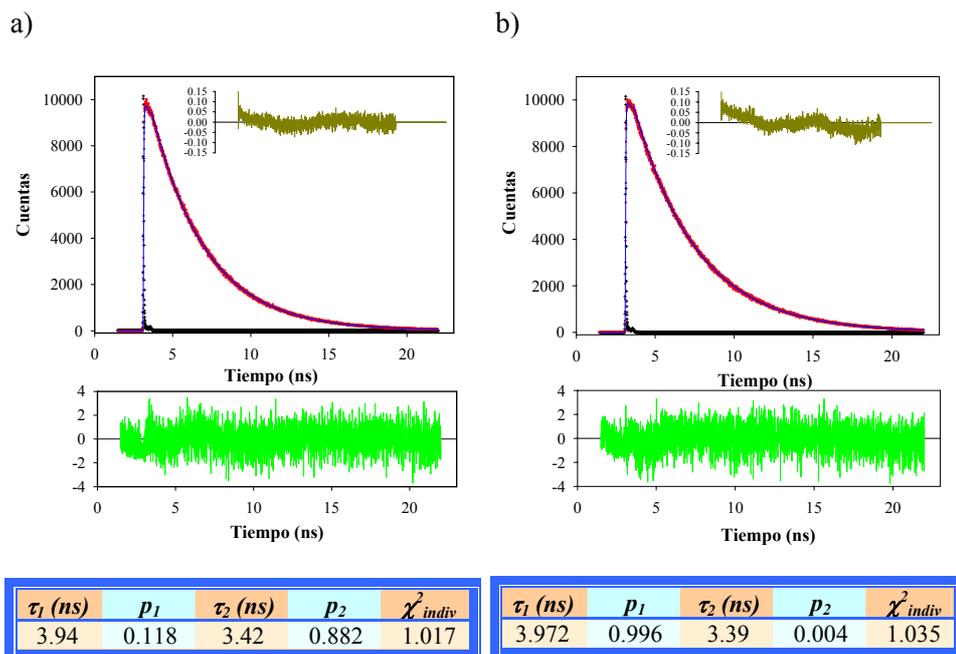
En resumen, la identificabilidad global del sistema puede asegurarse siempre en términos de  $k_{ij}$ ,  $\tilde{\mathbf{b}}$  y  $\tilde{\boldsymbol{\tau}}$ , a través de decaimientos de fluorescencia a dos valores de pH y tres concentraciones de tampón, una de ellas nula. Hay que tener en cuenta que los decaimientos a las tres  $C^{buff}$  correspondientes a cada pH tendrán que estar recogidos bajo las mismas condiciones de  $\lambda^{em}$  y  $\lambda^{ex}$ , para asegurar la determinación de  $\tilde{\mathbf{b}}$  y  $\tilde{\boldsymbol{\tau}}$ . Puede conseguirse identificabilidad global con tan solo una  $C^{buff}$  no nula si se dispone de información adicional *a priori*, como puede ser el conocimiento previo de  $k_{02}$  y  $k_{01} + k_{21}$  simultáneamente.

### III.3.2.- Análisis global bi-exponencial del sistema en ausencia de HAc/Ac<sup>-</sup>.

Se recogieron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M, a diferentes valores de pH entre 4 y 9, en ausencia de aceptor/dador protónico. La longitud de onda de excitación fue de 420 nm, que excita fundamentalmente la especie monoaniónica. Las longitudes de onda de emisión fueron, 490, 515, 550 y 580 nm en donde emiten tanto el monoanión como el dianión, aunque la eficiencia relativa de fluorescencia es mucho mayor para la especie dianiónica, excepto a las longitudes de onda extremas en donde la emisión del monoanión es comparable a la del dianión. Con estas condiciones experimentales, los decaimientos de fluorescencia recogidos reflejarán de forma satisfactoria los parámetros espectrales característicos de ambas especies. Los decaimientos se obtuvieron mediante la técnica TCSPC, con unas 10000 cuentas en el máximo, con el instrumento y metodología descritos en la sección *Materiales y Métodos*.

Como ley general de decaimiento se utilizó una función multiexponencial. Así, se ajustaron globalmente los decaimientos de fluorescencia recogidos para una misma disolución, al mismo valor de pH, a todas las diferentes longitudes de onda de emisión. Los análisis se realizaron mediante métodos de reconvolución iterativa basados en el algoritmo de Marquardt y se llevaron a cabo ligando como parámetros comunes los tiempos de decaimiento de la función ensayada, mientras que los factores pre-exponenciales fueron parámetros independientes en cada decaimiento (esquema I-13).

La figura III-44 muestra algunos de los decaimientos obtenidos, las funciones biexponenciales que corresponden a los ajustes globales, así como las representaciones de los residuales y de las funciones de autocorrelación. La característica más destacable fue la aparición de dos tiempos de vida, ambos con valores independientes del pH y con pre-exponenciales positivos dependientes del pH y de  $\lambda^{em}$ . Estas características se corresponden claramente con la desactivación de dos fluoróforos diferentes, cuyas concentraciones en el estado fundamental están relacionadas con el valor del  $pK_a$  y del pH.



**Figura III-44:** Decaimientos de fluorescencia ajustados mediante análisis global de disoluciones de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M en ausencia de tampón. **a)** pH = 4.79,  $\lambda^{ex} = 420$  nm,  $\lambda^{em} = 580$  nm. **b)** pH = 5.13,  $\lambda^{ex} = 420$  nm,  $\lambda^{em} = 515$  nm. En la figura se muestran el perfil instrumental de la fuente de excitación (●), el decaimiento experimental (●), la función de ajuste por reconvolución iterativa (—), los residuales (—) y la función de autocorrelación (—).

En la tabla XIII se indican los valores de los tiempos de vida y factores pre-exponenciales recuperados, para cada valor de pH, a cada longitud de onda de emisión, junto a los parámetros estadísticos de los ajustes. Como se puede observar, los valores de  $\chi^2$  están todos entre 1.026 y 1.105, lo que indica que los ajustes fueron muy aceptables.

**Tabla XIII:** Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M en ausencia de un aceptor/dador protónico.

pH	$\lambda^{em}$	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$p_1$	$p_2$	$\chi^2$
8.95	490 nm	$4.077 \pm 0.002$	--	1	--	1.091
	515 nm			1	--	
	550 nm			1	--	
	580 nm			1	--	
6.92	490 nm	$4.076 \pm 0.008$	$3.33 \pm 0.72$	0.9932	0.0068	1.105
	515 nm			1	--	
	550 nm			0.9954	0.0046	
	580 nm			0.9692	0.0308	
5.13	490 nm	$3.972 \pm 0.002$	$3.39 \pm 0.03$	0.5649	0.4351	1.075
	515 nm			0.9960	0.0040	
	550 nm			0.6757	0.3243	
	580 nm			0.4404	0.5596	
4.79	490 nm	$3.94 \pm 0.02$	$3.42 \pm 0.02$	0.2046	0.7954	1.026
	515 nm			0.8316	0.1684	
	550 nm			0.3505	0.6495	
	580 nm			0.1180	0.8820	
3.64	490 nm	$3.88 \pm 0.02$	$3.311 \pm 0.001$	--	1	1.048
	515 nm			0.4835	0.5165	
	550 nm			0.1366	0.8634	
	580 nm			--	1	

Cuando la reacción en el estado excitado es tan lenta que no acontece durante el tiempo de vida del estado excitado de las especies involucradas, tal y como se ha discutido que sucede en ausencia del aceptor/dador protónico (sección III.2.2), la teoría general del decaimiento de ambas especies indica que  $M^*$  y  $D^*$  no están acoplados y deben de decaer independientemente uno del otro.

En este caso,

$$I(t) = p_1 e^{-k_M t} + p_2 e^{-k_D t} \quad (\text{III-39})$$

Esta ecuación indica que  $I(t)$  es bi-exponencial con tiempos de vida  $\tau_M$  y  $\tau_D$  ( $\tau_M = 1/k_{0M}$  y  $\tau_D = 1/k_{0D}$ ). Estos tiempos de vida son independientes del pH y corresponden, respectivamente, a los tiempos de vida de  $M^*$  y  $D^*$  en ausencia de cualquier proceso en el estado excitado. Los coeficientes pre-exponenciales  $p_1$  y  $p_2$  dependen del pH y están determinados esencialmente por los coeficientes de extinción a  $\lambda^{ex}$ , por las eficiencias relativas de fluorescencia a  $\lambda^{em}$  y por las concentraciones de M y D en el estado fundamental. A  $\text{pH} \gg pK_a$ , la concentración de M es insignificante,  $p_1$  es cero y la función  $I(t)$  es monoexponencial con un tiempo de vida  $\tau_D = 1/k_{0D}$ . Es decir, el tiempo de vida a pH alto es el tiempo de vida del dianión excitado. A valores de pH comparables al  $pK_a$ , ambos pre-exponenciales son finitos y positivos, y sus valores dependen del pH y del  $pK_a$  del estado fundamental, así como de  $\lambda^{ex}$  y  $\lambda^{em}$ .

La tabla XIII muestra los valores experimentales de  $\tau_M$  y  $\tau_D$  para diferentes valores de pH en disoluciones sin dador/aceptor protónico. Dentro del error experimental,  $\tau_M$  y  $\tau_D$ , son independientes del pH en el margen entre 5 y 9, tal y como se espera en ausencia de reacciones en estado excitado, si bien se puede diferenciar una ligera disminución en el tiempo de decaimiento largo, sobre todo por debajo de pH 5. Los valores medios en este intervalo para ambos tiempos de vida son  $3.36 \pm 0.05$  y  $4.04 \pm 0.06$  ns. En el intervalo de pH entre 7 y 9,  $I(t)$  es prácticamente monoexponencial con  $\tau$  alrededor de 4.07 ns. Estos valores de pH son considerablemente mayores que el  $pK_a$  (4.69), por lo que la concentración de monoanión es despreciable y el único tiempo de vida que caracteriza al decaimiento de fluorescencia corresponde al tiempo de vida del dianión. Además, la concentración de protones a estos valores de pH es muy baja y aunque la constante de velocidad de la reacción bimolecular de protonación en estado excitado fuera del orden de magnitud de la constante de

difusión, la velocidad de tal reacción no podría competir con la de desactivación del estado excitado, por lo que el tiempo de vida característico del decaimiento de fluorescencia pertenece sin ambigüedad al tiempo de vida del dianión ( $\tau_D = 4.04 \pm 0.06$  ns).

El tiempo de vida menor, recuperado en los ajustes biexponenciales con los decaimientos a valores más bajos de pH, debe de corresponder al tiempo de vida del monoanión del OG488, o al valor inverso de la suma de la constante de desactivación radiativa del monoanión y de la constante de velocidad de la reacción monomolecular de desprotonación en el estado excitado.

Llegados a este punto, es conveniente analizar la suposición de que pueda ocurrir una desprotonación unimolecular en el estado excitado (por la cual se formaría  $D^*$  a partir de  $M^*$ ), sin que tenga lugar la reprotonación bimolecular ( $D^* + H^+ \rightarrow M^*$ ), debido a que la concentración protónica del medio resulta insuficiente para que la reacción bimolecular pueda competir con la desactivación del estado excitado. Esta situación provoca un comportamiento muy similar a la de dos fluoróforos independientes, en lo que se refiere a los tiempos de decaimiento, ya que estos serían constantes con el pH. El valor de  $\tau_1$  sería igual a  $k_{0D}^{-1}$  y el tiempo de decaimiento corto correspondería a  $(k_{0M} + k_{DM})^{-1}$ . Los valores de los pre-exponenciales tampoco permiten diferenciar entre ambas situaciones. En efecto, si existiese una desprotonación de la especie  $M^*$  en el estado excitado, el decaimiento obtenido con excitación única del monoanión y emisión únicamente del dianión, debería reflejar el incremento en la emisión de fluorescencia que supondría la formación del dianión en el estado excitado, lo que originaría un pre-exponencial negativo asociado al tiempo de decaimiento corto. No obstante, si el solapamiento espectral es muy alto y el valor de la constante de desprotonación no es muy alto, la ausencia de pre-exponenciales negativos, tal y como sucede en la tabla XIII, no es argumento suficiente para discriminar una de las situaciones. Por

tanto, no existen pruebas suficientes para afirmar la ausencia de reacción de desprotonación en estado excitado. Así, el tiempo de decaimiento corto puede corresponder al tiempo de vida de la especie monoaniónica,  $\tau_M = 3.36 \pm 0.05$  ns, o bien a la inversa de la suma ( $k_{0M} + k_{DM}$ ).

### III.3.3.- Análisis global compartimental del sistema $M^* \rightleftharpoons D^*$ en presencia de HAc/Ac<sup>-</sup> de concentración 1M.

#### III.3.3.1.- *Superficie de decaimientos de fluorescencia.*

Se recogieron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de OG488 ( $5 \times 10^{-6}$  M) en presencia de tampón HAc/Ac<sup>-</sup>, de concentración 1 M, que actúa como aceptor/dador protónico en la reacción en estado excitado  $M^* + Ac^- \rightleftharpoons D^* + HAc$ . Los decaimientos se recogieron con disoluciones a diferentes valores de pH entre 3 y 9, variando las proporciones de las especies del tampón. La longitud de onda de excitación fue de 420 nm, que excita fundamentalmente a la especie monoaniónica. Las longitudes de onda de emisión fueron 490, 515, 525, 550, 570 y 600 nm en donde emiten tanto el monoanión como el dianión, aunque la eficiencia relativa de fluorescencia es mucho mayor para la especie dianiónica, excepto a 490 y 600 nm. Los decaimientos se obtuvieron mediante la técnica TCSPC, recogiendo unas 10000 cuentas en el máximo, con el instrumento y metodología descritos en la sección *Materiales y Métodos*. Además, con objeto de tener en cuenta la influencia de las diferentes intensidades de emisión de cada disolución a cada longitud de onda y efectuar las correcciones pertinentes en los valores de los pre-exponenciales recuperados, se recogió el número de cuentas totales que llegan al detector durante un mismo intervalo de tiempo (5 minutos), y en las mismas condiciones ópticas del instrumento. Este número de cuentas totales está relacionado con la intensidad de fluorescencia en estado estacionario  $F_s(\lambda^{ex}, \lambda^{em})$  y se utilizará para calcular los espectros de emisión asociados a las

especies (SAEMS) según la ecuación general I-31, en cada uno de los ajustes con la metodología global compartimental.

En un primer estadio se analizarán estos decaimientos mediante análisis global, ajustando los datos experimentales con funciones multiexponenciales, al objeto de obtener los tiempos de decaimiento y los pre-exponenciales asociados. En un segundo paso, se analizará un esquema cinético en dos estados excitados, mediante análisis global compartimental, utilizando el modelo bicompartimental desarrollado recientemente, en colaboración con el Prof. Boens, por nuestro grupo de investigación (*Crovetto et al., 2004*). Con esta metodología se obtendrán las constantes cinéticas correspondientes a los procesos en el estado excitado y los parámetros espectrales asociados. Se debe de destacar que este sistema bicompartimental en presencia de un aceptor/dador protónico es uno de los primeros sistemas estudiados bajo estas condiciones<sup>∇</sup>. Debido al alto grado de solapamiento espectral de las especies involucradas en la reacción, tanto en lo que se refiere a la excitación como a la emisión, resulta un sistema muy complejo, por lo que se hacen necesarias potentes herramientas de análisis, como es el análisis global compartimental.

#### III.3.3.2.- *Análisis global multiexponencial.*

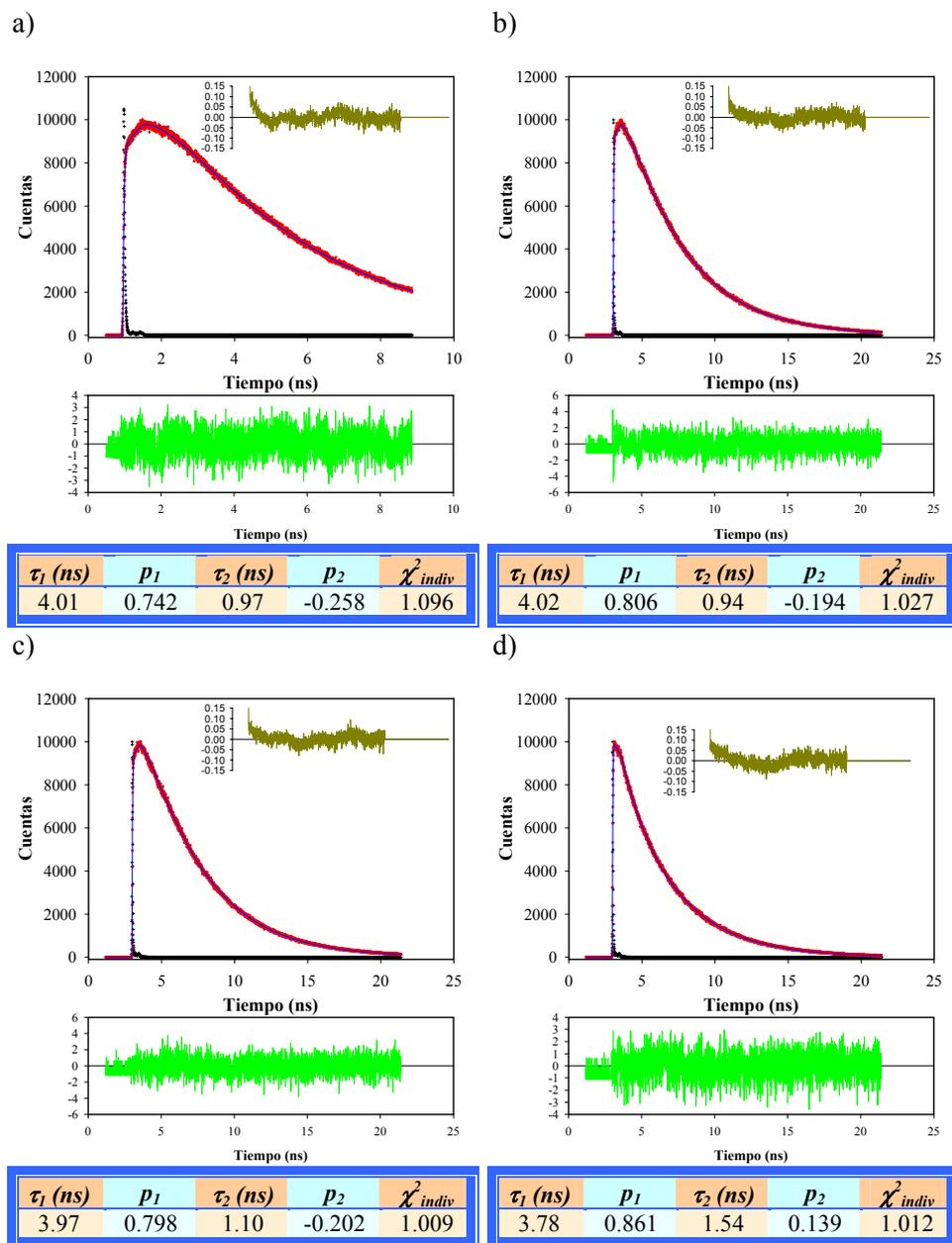
Como ley general de decaimiento se utilizó una función multiexponencial. Así, se ajustaron globalmente los decaimientos de fluorescencia recogidos para una misma disolución (mismo valor de pH), a las diferentes longitudes de onda de emisión. Los análisis se realizaron mediante métodos de reconvolución iterativa basados en el algoritmo de Marquardt, y se llevaron a cabo ligando como parámetros comunes los diferentes tiempos de

---

<sup>∇</sup> Anteriormente se aplicó este modelo bicompartimental a la fluoresceína, con el ácido N-acetilaspártico como aceptor/dador protónico (*Crovetto et al., 2004*).

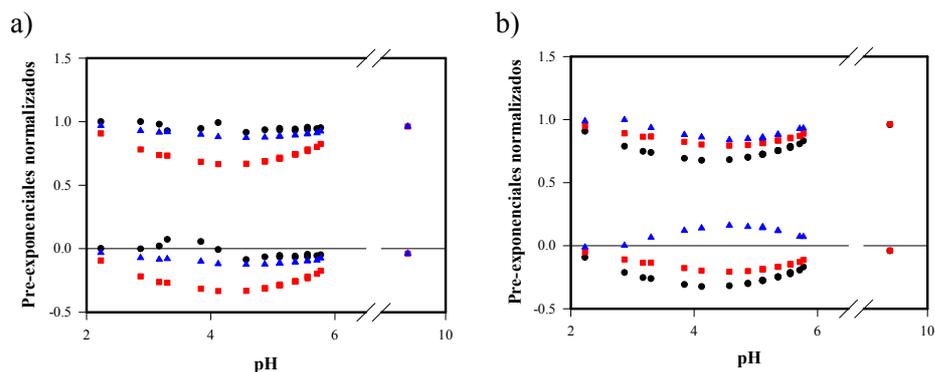
decaimiento de la función ensayada, mientras que los factores pre-exponenciales fueron parámetros independientes (esquema I-11).

En los ajustes globales, se han empleado simultáneamente decaimientos obtenidos a varias escalas tiempo/canal (véase *Materiales y Métodos*, sección II.3.2.3), una escala larga (5.94 ps/canal) y otra más corta (2.46 ps/canal), esto proporciona una mejor y más fiable estimación de los tiempos de decaimiento cortos (*Janssens et al., 1990; Wenska et al., 1997*). La figura III-45 muestra algunos de los decaimientos obtenidos, los correspondientes ajustes globales biexponenciales y sus resultados, así como las representaciones de sus residuales y funciones de autocorrelación correspondientes. Como se puede observar, los residuales y funciones de autocorrelación están distribuidos uniformemente alrededor del valor cero, lo cual, junto a los valores de  $\chi^2$  obtenidos, indica que los ajustes han sido excelentes.



**Figura III-45:** Decaimientos de fluorescencia ajustados mediante análisis global de disoluciones de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M en tampón 1 M. **a)** pH = 5.36,  $\lambda^{ex}$  = 420 nm,  $\lambda^{em}$  = 515 nm. **b)** pH = 5.71,  $\lambda^{ex}$  = 420 nm,  $\lambda^{em}$  = 525 nm. **c)** pH = 4.87,  $\lambda^{ex}$  = 420 nm,  $\lambda^{em}$  = 550 nm. **d)** pH = 4.12,  $\lambda^{ex}$  = 420 nm,  $\lambda^{em}$  = 600 nm. Se muestran el perfil instrumental del láser (●), el decaimiento experimental (●), la función de ajuste por reconvolución iterativa (—), los residuales (—) y la función de autocorrelación (—).

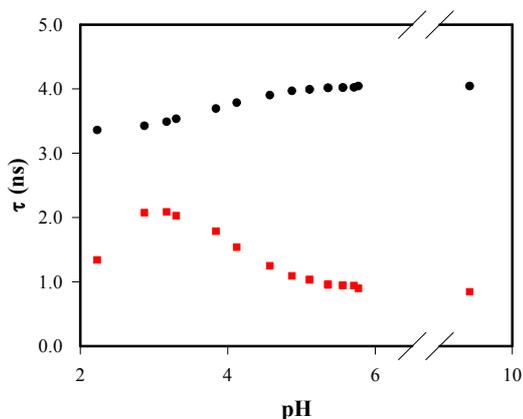
Las características más destacables fueron la aparición de dos tiempos de decaimiento, ambos con valores dependientes del pH, y que los pre-exponenciales asociados al tiempo más corto son negativos para todas las longitudes de onda de emisión estudiadas, excepto para 600 nm. Estos rasgos fundamentales se corresponden claramente con un proceso en el estado excitado, mediante el cual aparece una especie más fluorescente a partir de otra menos fluorescente que es excitada preferentemente. La singularidad en el pre-exponencial recuperado a 600 nm es debida a que, a esa longitud de onda de emisión, el monoanión tiene un rendimiento de fluorescencia mayor que el dianión, por lo que la conversión  $M^* \rightarrow D^*$  supone una pérdida de fluorescencia y el pre-exponencial asociado a ese decaimiento resulta positivo. Sin embargo, a las demás longitudes de onda de emisión, como la especie dianiónica es mucho más fluorescente que la monoaniónica (que fue la excitada preferentemente) y esta diferencia se hace más notable a las longitudes de onda cercanas al máximo de emisión del dianión, el tiempo de vida corto tiene mayor abundancia a la longitud de onda de 515 nm. Conforme la  $\lambda^{em}$  aumenta, los pre-exponenciales tienden a ser menos abundantes y llegan a ser positivos a 600 nm. La figura III-46 muestra las tendencias de estos factores pre-exponenciales, normalizados a cada longitud de onda de emisión, frente al pH.



**Figura III-46:** Representación frente al pH de los pre-exponenciales normalizados obtenidos en los análisis globales biexponenciales de decaimientos de fluorescencia de disoluciones de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M en presencia de tampón acetato 1 M. **a)**  $\lambda^{em} = 490$  nm (●), 515 nm (■), 570 nm (▲); **b)**  $\lambda^{em} = 525$  nm (●), 550 nm (■), 600 nm (▲).  $\lambda^{ex} = 420$  nm.

En la figura III-47 se representan los tiempos de decaimiento recuperados en el ajuste. En esta gráfica se pueden observar las tendencias de ambos tiempos de vida con el valor del pH. Así, a valores muy altos de pH, los decaimientos tienden a ser monoexponenciales, con un tiempo límite de 4.032 ns. Este tiempo se puede asignar al tiempo de vida de la especie dianiónica, ya que a este pH, el dianión es la única forma iónica existente. Además, a estos valores de pH, tanto la concentración de HAc, como la de  $H^+$ , resultan insuficientes para producir la reprotonación en el estado excitado ( $D^* + HAc \rightarrow M^* + Ac^-$  o  $D^* + H^+ \rightarrow M^*$ ). Finalmente, cabe también resaltar que en la ecuación derivada del modelo teórico en dos estados excitados, el tiempo de vida largo tiende hacia el valor del tiempo de vida de la especie básica (en este caso la dianiónica), con el incremento en el pH. Por todas estas razones, se puede establecer sin ambigüedad que, el dianión del OG488 (que es la única especie existente a pH elevado), se excitará a cualquier longitud de onda dentro del margen de su espectro de absorción y se desactivará por emisión de fluorescencia y por los procesos no radiativos correspondientes, emitiendo su radiación característica a cualquier longitud de onda en el margen de su espectro

de emisión. Por lo tanto, el valor límite del tiempo de vida largo, corresponde al de la desactivación radiativa del dianión.



**Figura III-47:** Representación de los tiempos de decaimiento largo (●) y corto (■), obtenidos mediante análisis globales biexponenciales de decaimientos de fluorescencia de disoluciones de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M en presencia de tampón acetato 1 M.

En lo que se refiere al tiempo de decaimiento corto, su simple presencia con un pre-exponencial asociado, que resulta negativo a ciertas longitudes de onda y valores de pH, es indicativo de la progresión de una reacción de transferencia protónica en el estado excitado. La presencia de este tiempo de decaimiento se puede justificar mediante el siguiente razonamiento. En las condiciones experimentales adecuadas, durante el transcurso inicial de la reacción (un corto periodo de tiempo), se debe de reajustar la relación entre las concentraciones de las dos especies excitadas inicialmente, al valor dictado por el  $pK_a^*$  y el pH del medio. Seguidamente, ambas especies deben de decaer de forma acoplada. Así, el valor del tiempo de vida corto se puede considerar, en una primera aproximación, como una medida del tiempo necesario para que la relación entre las concentraciones de las dos especies excitadas se reajusten al valor impuesto por el  $pK_a^*$ , en las distintas disoluciones con diferentes valores de pH. Sin embargo, esta aproximación no es estrictamente cierta, ya que su valor puntual depende de muchas variables experimentales. Utilizando la

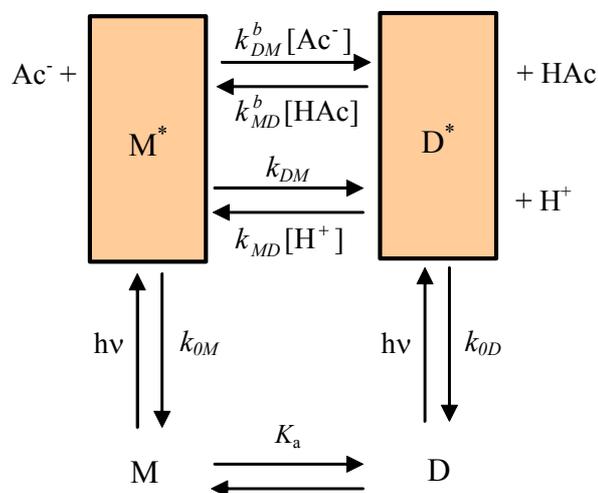
gráfica de la figura III-47 y analizando la tendencia de sus valores con el aumento del pH, se puede alcanzar su estricto significado, sobre la base del esquema cinético que describe la reacción propuesta (esquema III-5). Así, el valor límite al que tiende el tiempo corto del decaimiento a valores altos de pH, es la suma de las constantes de velocidad,  $k_{0M} + k_{DM} + k_{DM}^b C^{buff}$ , en donde  $C^{buff}$  es la concentración total del aceptor/dador protónico (1 M, en el caso estudiado).

### III.3.3.3.- Análisis global bicompartimental.

Los decaimientos de fluorescencia de las disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M, en presencia de tampón HAc/NaAc a concentración 1 M, también se analizaron mediante el método de análisis global compartimental.

Tanto por espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario, en donde parecen diferenciarse únicamente dos perfiles espectrales en el intervalo de pH que se considera, como por las conclusiones alcanzadas en la sección anterior, el proceso en el estado excitado en presencia de ácido acético y acetato sódico parece corresponder a un modelo de reacción en dos estados, como el que se muestra en el esquema II-3. En este modelo, las especies  $1^*$  y  $2^*$  son, respectivamente, las especies monoaniónica (ácida) y dianiónica (básica) del OG488; mientras que las formas prototrópicas del tampón, HR y R, son las formas HAc (ácida) y  $Ac^-$  (básica), respectivamente. Así, el esquema general II-3 aplicado al caso que ocupa este apartado se transforma en el esquema III-5. En los diferentes ajustes globales compartimentales realizados, los parámetros libres son los descritos en el esquema general. Los parámetros ajustables se ligaron entre los diferentes decaimientos de la superficie siguiendo el esquema II-4. La bondad de los ajustes se comprobó a través del valor de  $\chi^2$  (ecuación I-19) como indicador numérico. Como indicadores gráficos, además de la

adecuación visual de la función de ajuste al decaimiento, se utilizaron la representación de los residuales y la función de autocorrelación.



**Esquema III-5:** Modelo compartimental de reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies monoaniónica (M) y dianiónica (D) del OG488, promovida por el sistema tampón HAc/Ac<sup>-</sup>.

Se debe de resaltar que, en los espectros de fluorescencia en estado estacionario, parecen diferenciarse solo dos perfiles espectrales diferentes en este intervalo de pH. Sin embargo, a valores de pH inferiores a 5, la forma neutra coexiste con el dianión y monoanión. No obstante, debido a la igualdad en el grupo cromóforo de la especie neutra quinoide (que es la mayoritaria en disolución acuosa) y la monoaniónica, ambas especies pueden considerarse como un único compartimento excitado. Además, a causa del valor del  $pK_a^*$  (calculado por fluorimetría en estado estacionario para este equilibrio), a estos valores de pH tiene lugar una rápida transformación entre ambas formas prototrópicas, lo que permite asignar un único compartimento a las dos especies excitadas.

No obstante, en una primera serie de ajustes, y para evitar la excesiva distorsión que pudiera aportar la presencia de la especie neutra en el modelo bicompartimental, en la superficie de decaimientos introducida en el análisis global compartimental se incluyeron únicamente los registrados a valores de pH superiores a 4.87. En esta zona, la concentración de especie neutra en estado fundamental es despreciable y la superficie de decaimientos de fluorescencia abarca solo el comportamiento de dos especies excitadas, monoanión y dianión. Las longitudes de onda de emisión seleccionadas fueron 515, 525, 550, 570 y 600 nm. Como se indicó anteriormente, se introdujeron los decaimientos de fluorescencia recogidos en las dos diferentes escalas temporales (5.94 ps/canal y 2.46 ps/canal<sup>∇</sup>).

Dado que por fluorimetría en estado estacionario y con resolución temporal, se ha demostrado que, en ausencia de tampón, no tiene lugar la reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies  $M^*$  y  $D^*$ , en un primer ajuste se mantuvieron fijas las constantes  $k_{DM}$  y  $k_{MD}$  a un valor nulo durante el proceso de análisis. Así, se realizó un análisis global compartimental con 38 decaimientos, 30 de los cuales correspondieron a seis valores de pH a las cinco diferentes  $\lambda^{em}$  en la escala de 5.94 ps/canal, mientras que los 8 decaimientos restantes fueron de cuatro muestras a pH diferente (5.36 – 5.77) y dos  $\lambda^{em}$  en la escala de 2.46 ps/canal. El análisis proporcionó un valor de  $\chi^2$  global de 1.082, mientras que los valores del  $\chi^2$  individual de los decaimientos estuvieron en el intervalo entre 0.972 y 1.234. Los valores de las constantes cinéticas y de los parámetros espectrales se muestran en las tablas XIV y XV.

---

<sup>∇</sup> Los decaimientos recogidos en la escala de tiempo de 2.46 ps/canal fueron los de disoluciones con pH entre 5.36 y 5.77, y a las longitudes de onda de emisión de 515 y 525 nm.

**Tabla XIV:** Constantes cinéticas recuperadas del análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488, con pH por encima de 4.87, en presencia de tampón 1 M.

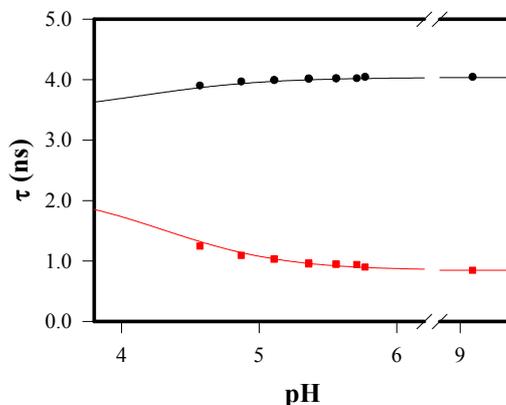
$k_{0M}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.91 \pm 0.02) \times 10^8$	$\tau_M = 3.44 \pm 0.02$ ns
$k_{0D}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.48 \pm 0.01) \times 10^8$	$\tau_D = 4.03 \pm 0.02$ ns
$k_{MD}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0 <sup>ⓐ</sup>	--
$k_{DM}$ (s <sup>-1</sup> )	0 <sup>ⓐ</sup>	
$k_{MD}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(2.08 \pm 0.09) \times 10^8$	$pK_M^* = 4.13 \pm 0.02$ <sup>ⓑ</sup>
$k_{DM}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(8.90 \pm 0.03) \times 10^8$	
<sup>ⓐ</sup> Mantenida fija a cero durante el proceso de ajuste. <sup>ⓑ</sup> El $pK_M^*$ se calculó mediante la ecuación II-18.		

**Tabla XV:** Parámetros de excitación y de emisión obtenidos en el análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488, con pH por encima de 4.87, en presencia de tampón 1 M.

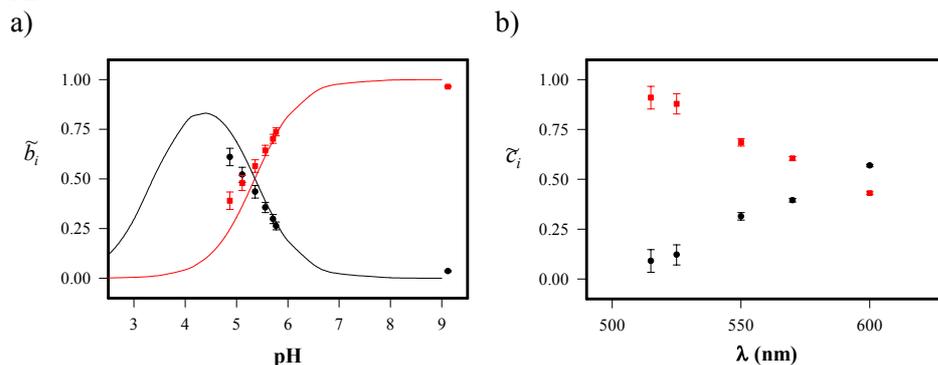
pH	$\tilde{b}_M$	$\lambda^{em}$ (nm)	$\tilde{c}_M$
9.12	$0.035 \pm 0.003$	515	$0.090 \pm 0.057$
5.77	$0.263 \pm 0.020$	525	$0.121 \pm 0.051$
5.71	$0.298 \pm 0.023$	550	$0.314 \pm 0.019$
5.56	$0.356 \pm 0.026$	570	$0.395 \pm 0.009$
5.36	$0.435 \pm 0.032$	600	$0.569 \pm 0.006$
5.11	$0.521 \pm 0.038$		
4.87	$0.610 \pm 0.044$		

En la figura III-48 se comparan los tiempos de decaimiento recuperados en los análisis globales (figura III-47) con los calculados aplicando los valores de las constantes de velocidad de la tabla XIV a las ecuaciones generales del modelo II-13 y II-14. En la figura III-49-a) se muestran los valores recuperados para los parámetros espectrales de excitación  $\tilde{b}_i$ , junto con los valores teóricos calculados a través de la ecuación II-8 utilizando los valores de  $\varepsilon_i$  y  $pK_M$  obtenidos en la sección del estudio de las características absorciométricas y del

estado fundamental (sección III.1). Asimismo, en la figura III-49-b) se representan los valores de los parámetros espectrales de emisión  $\tilde{\tau}_i$  de cada especie.



**Figura III-48:** Representación frente al pH de los tiempos de decaimiento largo (●) y corto (■) obtenidos mediante análisis global, y los tiempos de decaimiento (— y —) calculados a través de la ecuación II-14 y los valores de constantes cinéticas de la tabla XIV.



**Figura III-49:** Representación de **a)** los parámetros de excitación y **b)** los parámetros de emisión de las especies D (■) y M (●) de la Tabla XV. Se representa también los valores teóricos de los parámetros de excitación (— y —) calculados a través de la ecuación II-8 empleando los resultados obtenidos en esta Memoria para el estado fundamental.

Se observa que los tiempos de vida calculados a través de las constantes cinéticas recuperadas se ajustan bastante bien a los obtenidos mediante análisis global. En adición, los parámetros de excitación son bastante concordantes con los teóricos y la tendencia que siguen los de emisión es la esperada. En efecto, a

las longitudes de onda comprendidas entre 515 y 570 nm el dianión es la especie de mayor rendimiento cuántico, mientras que a 600 nm el monoanión tiene mayor eficiencia, como se observa en el hombro que tiene el espectro en estado estacionario.

Hay que notar que el  $pK_M^*$  obtenido a través de las constantes cinéticas  $k_{MD}^b$  y  $k_{DM}^b$ , que se muestra en la tabla XIV, resulta algo más bajo que el calculado mediante los datos de fluorescencia en estado estacionario (4.33), aunque no representa una disminución excesivamente significativa.

Aunque la total ausencia de ESPT debida a los  $H^+$  ( $k_{MD} = k_{DM} = 0$ ) describa suficientemente bien al sistema, se ha realizado un análisis posterior considerando la posibilidad de que estas constantes tuvieran valores competitivos en el proceso en el estado excitado. Sin embargo, estos ajustes no mejoraron la descripción del sistema, ya que los resultados adolecieron de incertidumbres excesivamente altas. El error asociado a las constantes cinéticas  $k_{DM}$  y  $k_{MD}^b$  fue extremadamente grande (más del 75 %) y  $k_{MD}$  resultó incluso totalmente indeterminada. También fueron muy importantes los errores asociados a los parámetros  $\tilde{b}_i$  y  $\tilde{c}_i$ , estos resultados no se muestran al no suponer un aporte de consideración.

Teniendo en cuenta las consideraciones efectuadas en la sección anterior, en lo que se refiere a la posibilidad de considerar que las especies excitadas neutra y monoaniónica pueden actuar como un único compartimento, debido a la identidad de sus grupos cromóforos y a que tiene lugar una rápida transformación entre ambas especies a valores moderadamente bajos de pH, se ha efectuado otro análisis sobre la base de esta suposición. En este caso, se amplió la superficie de decaimientos de fluorescencia incluyendo valores de pH más bajos a los considerados anteriormente. En concreto, el intervalo de pH estudiado fue entre 3.3 y 9. En este intervalo de valores de pH se pueden encontrar las tres especies mencionadas, neutra, monoaniónica y dianiónica.

La superficie de decaimientos de fluorescencia estuvo compuesta por un total de 55 decaimientos, recogidos a 11 valores de pH, una longitud de onda de excitación (420 nm) y cinco longitudes de onda de emisión, a saber, 515, 525, 550, 570 y 600 nm. La configuración del TAC fue de 5.94 ps/canal. Además, también se incluyeron los 8 decaimientos en la escala de 2.46 ps/canal, recogidos a 4 valores de pH, con la misma longitud de onda de excitación y dos longitudes de onda de emisión, 515 y 525 nm.

De forma análoga a lo citado anteriormente, se consideró inicialmente la ausencia de reacciones de transferencia protónica entre las especies  $N^*/M^*$  y  $D^*$  mediadas por el protón. Así, se mantuvieron constantes y fijas a un valor nulo, tanto  $k_{MD}$  como  $k_{DM}$ . El proceso de ajuste global bicompartimental según el modelo proporcionó un valor de  $\chi^2$  global de 1.096, quedando todos los decaimientos con un valor de  $\chi^2$  individual entre 0.984 y 1.258. Se debe de notar que los decaimientos correspondientes a las disoluciones con valores más bajos de pH no se ajustan de forma correcta. Esto es consistente con la posible contribución de la especie neutra, más notable conforme disminuye el pH. Adicionalmente, estos valores relativamente grandes en la  $[H^+]$  pueden hacer que la velocidad de reprotonación  $k_{MD}[H^+]$  sea notable, con lo que la condición de  $k_{MD} = 0$  no sería válida.

La posibilidad de que la desprotonación del compartimento  $N^*/M^*$ , siguiendo una cinética de primer orden, hacia la especie  $D^*$ , tenga una contribución considerable, se tuvo en cuenta en un ajuste posterior. De forma que se realizó el ajuste global bicompartimental de toda la superficie de decaimientos de fluorescencia descrita anteriormente, manteniendo  $k_{MD} = 0$ , pero dejando libre como parámetro ajustable la constante cinética  $k_{DM}$ . Los resultados que se obtuvieron son bastante satisfactorios. El valor de  $\chi^2$  global fue de 1.085 (con valores de  $\chi^2$  individuales entre 0.979 y 1.245). Los demás parámetros indicativos de la bondad del ajuste, como son el análisis visual de la función de ajuste, los residuales y la función de autocorrelación también son

bastante buenos en todos los casos. Los resultados de las constantes cinéticas, parámetros de excitación y de emisión se muestran en las tablas XVI y XVII.

**Tabla XVI:** Constantes cinéticas recuperadas del análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488, con pH por encima de 3.3, en presencia de tampón 1 M.

$k_{0M}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.91 \pm 0.03) \times 10^8$	$\tau_M = 3.44 \pm 0.04$ ns
$k_{0D}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.48 \pm 0.01) \times 10^8$	$\tau_D = 4.03 \pm 0.02$ ns
$k_{MD}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0 <sup>•</sup>	--
$k_{DM}$ (s <sup>-1</sup> )	$(3 \pm 1) \times 10^7$	--
$k_{MD}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(1.95 \pm 0.13) \times 10^8$	$pK_M^* = 4.11 \pm 0.03$ <sup>•</sup>
$k_{DM}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(8.71 \pm 0.13) \times 10^8$	
<sup>•</sup> Mantenido fija a cero durante el proceso de ajuste. <sup>•</sup> Calculado con la ecuación II-18.		

**Tabla XVII:** Parámetros de excitación y de emisión obtenidos en el análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488, con pH por encima de 3.3, en presencia de tampón 1 M.

pH	$\tilde{b}_M$	$\lambda^{em}$ (nm)	$\tilde{c}_M$
9.12	$0.048 \pm 0.003$	515	$0.224 \pm 0.028$
5.77	$0.329 \pm 0.022$	525	$0.237 \pm 0.027$
5.71	$0.373 \pm 0.025$	550	$0.357 \pm 0.013$
5.56	$0.445 \pm 0.029$	570	$0.414 \pm 0.007$
5.36	$0.542 \pm 0.035$	600	$0.550 \pm 0.003$
5.11	$0.643 \pm 0.043$		
4.87	$0.746 \pm 0.050$		
4.57	$0.839 \pm 0.056$		
4.12	$0.957 \pm 0.062$		
3.84	$0.982 \pm 0.064$		
3.30	$0.978 \pm 0.063$		

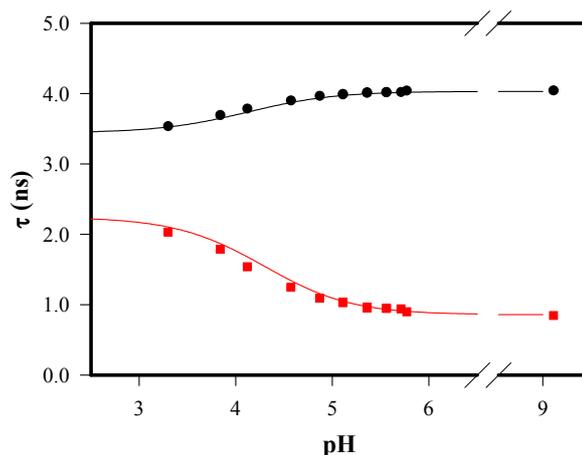
Se debe destacar que, de nuevo, el  $pK_M^*$  calculado a través de la ecuación II-18 es algo más bajo que el obtenido mediante fluorimetría en estado

estacionario. Si se acepta este valor de 4.11 como válido, mediante la aplicación de la ecuación II-17 se puede calcular el valor teórico de  $k_{MD}$  a partir de  $k_{DM}$ . Esta operación proporciona un valor de  $3.7 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para la constante cinética de reprotonación. Sin embargo, este valor resulta más alto que la constante calculada para cualquier otro proceso controlado por difusión, en similares condiciones experimentales (que presentaría valores típicos alrededor de  $5\text{--}8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Rice, 1985; Lima et al., 1998; Genosar et al., 2000), por lo que se debe de considerar como inaceptable.

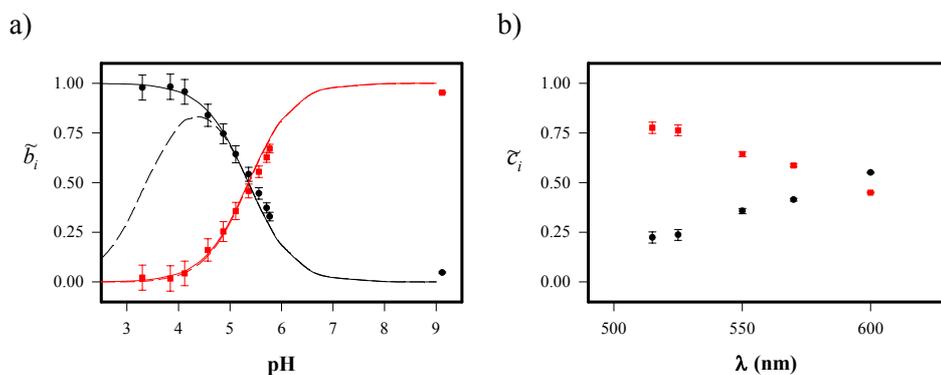
En la figura III-50 se muestran los tiempos de decaimiento calculados a través de la ecuación II-14 empleando los valores de las constantes de la tabla XVI, comparándolos con los tiempos de decaimiento recuperados mediante análisis globales. Los parámetros de excitación  $\tilde{b}_i$  recuperados, y los valores teóricos correspondientes se muestran en la figura III-51-a). A este respecto, es necesario notar la influencia de la especie neutra. Así, para el cálculo de los valores teóricos, y ya que se consideran  $N^*$  y  $M^*$  miembros del mismo compartimento, se ha utilizado la ecuación III-40 para el parámetro de excitación  $\tilde{b}_M$ .

$$\tilde{b}_M = \frac{\varepsilon_N \alpha_N + \varepsilon_M \alpha_M}{\varepsilon_N \alpha_N + \varepsilon_M \alpha_M + \varepsilon_D \alpha_D} \quad (\text{III-40})$$

En esta ecuación,  $\varepsilon_i$  representa el coeficiente de absorptividad molar de la especie  $i$  (neutra N, monoanión M y dianión D) a la longitud de onda de excitación,  $\alpha_i$  la fracción molar de la especie  $i$  en estado fundamental al pH de cada disolución. El parámetro de excitación del primer compartimento,  $\tilde{b}_M$ , así calculado, incluye tanto la excitación de especie neutra ( $\varepsilon_N \alpha_N$ ) como la de monoanión ( $\varepsilon_M \alpha_M$ ). Asimismo, en la figura III-51-b) se muestran los valores de los parámetros de emisión  $\zeta_i$  de cada compartimento.



**Figura III-50:** Representación frente al pH de los tiempos de decaimiento largo (●) y corto (■) obtenidos mediante análisis global, y tiempos de decaimiento (— y —) calculados a través de la ecuación II-14 empleando los valores de constantes cinéticas de la tabla XVI.



**Figura III-51:** Representación de **a)** los parámetros de excitación y **b)** emisión de las especies D (●) y M (●) de la Tabla XVII. Se representa también los valores teóricos de los parámetros de excitación calculados a través de las ecuaciones III-40 (— y —) y II-8 (— y —) con los resultados obtenidos en esta Memoria para el estado fundamental.

Los tiempos de vida calculados a través de las constantes cinéticas se ajustan bastante bien a los obtenidos mediante análisis global. También, los parámetros de excitación concuerdan de manera aceptable con los teóricos, y los valores de las  $\zeta_i$  muestran una tendencia conforme a los espectros de emisión de cada especie.

Es interesante, por otra parte, la pequeña incertidumbre que se encuentra tanto para las constantes cinéticas, como para los parámetros de excitación y emisión.

Para comprobar la posible influencia de la reprotonación mediada por  $H^+$ , se repitió el proceso de ajuste global bicompartimental, según el modelo tratado, dejando también la constante cinética  $k_{MD}$  como parámetro ajustable. Sin embargo, este análisis tampoco ofreció resultados satisfactorios. Se obtuvieron mayores incertidumbres en las constantes cinéticas, valores incoherentes en los parámetros de emisión (como por ejemplo,  $\tau_M^{515nm} = 0$ ) y tendencias en los valores de  $\tilde{b}_i$  en desacuerdo con los teóricos. Estas carencias son fundamentalmente debidas a la imposibilidad de obtener identificabilidad global en el sistema, con decaimientos recogidos a una sola concentración de tampón. No obstante, el ajuste cuyos resultados se muestran en las tablas XVI y XVII, y en las figuras III-50 y III-51 es bastante adecuado y describe al sistema con una precisión aceptable.

#### III.3.4.- Análisis global compartimental del sistema $M^* \rightleftharpoons D^*$ . Superficie de decaimientos de fluorescencia en presencia y ausencia de tampón.

Como ha sido determinado en la sección III.3.3, y como se desprende de la teoría general, en el sistema bicompartimental en presencia de un aceptor/dador protónico se ha añadido una variable extra, como es la concentración total de las especies de tampón  $C^{buff}$ , debido a que tanto las concentraciones de RH como de R influyen en los tiempos de decaimiento y pre-exponenciales, pero ambas están relacionadas entre sí a través de la ecuación de Henderson – Hasselbach, y dependen del pH, de  $C^{buff}$  y de su  $pK_a$ . Por esta razón, y para intentar conseguir alcanzar un sistema compartimental identificable, se ha ampliado la superficie de decaimientos de fluorescencia introducida en el análisis global bicompartimental en presencia de las especies

de un aceptor/dador protónico, con los decaimientos adquiridos en ausencia de tampón.

La superficie de decaimientos de fluorescencia que se analizará en este apartado, mediante el análisis global compartimental, es simplemente la unificación de las dos superficies tratadas en las secciones III.3.2 y III.3.3. De esta forma se juntan, en un mismo análisis, los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M recogidos en ausencia de tampón HAC/Ac<sup>-</sup> (a diferentes valores de pH entre 4 y 9, con excitación a 420 nm y emisiones a 490, 515, 550 y 580 nm) y los decaimientos de disoluciones de OG488 en presencia de HAC/Ac<sup>-</sup> 1 M (con excitación a 420 nm y emisiones a 490, 515, 525, 550, 570 y 600 nm). Además, se han añadido los decaimientos ya indicados en la sección III.3.3, con una configuración del TAC de 2.46 ps/canal.

Es muy importante destacar que, en las condiciones propuestas para este análisis global compartimental, se cumplen las premisas que permiten alcanzar la identificabilidad global para el sistema, según el apartado III.3.1 (en condiciones tales en las que pueda considerarse despreciable la reprotonación en el estado excitado,  $k_{MD}[\text{H}^+] \approx 0$ ). Aunque se ha empleado solamente una concentración de tampón, junto a los decaimientos en ausencia del mismo, la posibilidad de disponer de forma separada de los valores de  $k_{0D}$ , en decaimientos a pH muy básico, y de  $k_{0M} + k_{DM}$  en decaimientos biexponenciales en ausencia de HAC/Ac<sup>-</sup>, permite llegar a valores únicos en términos de constantes cinéticas  $k_{ij}$ , según ya se ha mencionado en el apartado III.3.1. Por otro lado, las condiciones de identificabilidad para  $\tilde{\mathbf{b}}$  y  $\tilde{\mathbf{c}}$  no se alcanzan estrictamente ya que los decaimientos en ausencia de tampón no se encuentran al mismo pH que los decaimientos con aceptor/dador protónico. Sin embargo, los valores teóricos de  $\tilde{\mathbf{b}}$  son accesibles a través de los resultados obtenidos en la sección III.1 con las ecuaciones II-8 y/o III-40.

Consecuentemente, si los valores de  $\tilde{b}$  son conocidos, los de  $\tau$  quedarán determinados, y tendrán valores únicos.

La inclusión simultánea de decaimientos en presencia y en ausencia del aceptor/dador protónico, cumpliendo así las condiciones para la identificabilidad del sistema, en un análisis global compartimental aplicado a este modelo cinético de ESPT bicompartimental mediado por la presencia de un aceptor/dador protónico, es una de las novedades y aportaciones de esta Memoria. Esto es debido a que el estudio de la identificabilidad de tales sistemas ha sido realizado muy recientemente (*Boens et al., 2004*), y el único estudio hasta ahora publicado (*Crovetto et al., 2004*) en donde se analiza un sistema similar, no cumple con todas las condiciones para la determinación única de los parámetros del sistema. No obstante, se debe de resaltar que la concordancia entre el modelo teórico y el conjunto de resultados experimentales obtenidos por absorción, fluorimetría en estado estacionario y análisis global compartimental de los decaimientos de fluorescencia, fue muy aceptable.

De manera análoga a como se procedió anteriormente, en una primera serie de ajustes se analizaron globalmente sólo los decaimientos de las disoluciones de pH mayor de 5. Con esto se asegura que la forma neutra no alterará apreciablemente el modelo en dos estados. Así, inicialmente se analizaron 47 decaimientos de fluorescencia: 30 de ellos corresponden a seis disoluciones con diferente valor de pH, con tampón  $HAc/Ac^-$  1 M, a las longitudes de onda de emisión de 515, 525, 550, 570 y 600 nm y con una ventana temporal de 24 ns (5.94 ps/canal); 8 decaimientos corresponden a cuatro disoluciones de diferentes valores de pH en presencia del aceptor/dador protónico a concentración 1 M, a las longitudes de onda de emisión de 515 y 525 nm y con una ventana temporal de 10 ns (2.46 ps/canal); los 9 decaimientos restantes fueron recogidos a tres valores diferentes de pH con disoluciones del colorante en ausencia de aceptor/dador protónico, a las longitudes de onda de

emisión de 515, 550 y 580 nm y con una configuración del TAC de 5.94 ps/canal.

El mejor ajuste del modelo a los datos experimentales proporcionó un valor de  $\chi^2$  global de 1.101, mientras que los valores individuales de  $\chi^2$  estuvieron entre 0.968 y 1.299. El resto de criterios estadísticos del ajuste, como es la representación de los residuales, la función de autocorrelación y la función de ajuste, también fueron aceptables para cada decaimiento. En este análisis se ajustaron las seis constantes cinéticas implicadas en el esquema general, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla XVIII. Por su parte, los valores de  $\tilde{b}_i$  y  $\tau_i$  se muestran en la tabla XIX. El cálculo de los tiempos de decaimiento a través de las constantes de la tabla XVIII y la ecuación II-14 muestra buena concordancia con los tiempos de decaimiento obtenidos en los análisis globales. Los valores de  $\tilde{b}_i$  y  $\tau_i$  también son concordantes con los esperados según las teorías fundamentales de absorción y fluorescencia en estado estacionario. Adicionalmente, se realizaron varios ajustes manteniendo  $k_{MD} = k_{DM} = 0$ , o bien únicamente  $k_{MD} = 0$ . En cualquier caso, los resultados de estos análisis no diferían demasiado del expuesto anteriormente.

**Tabla XVIII:** Constantes cinéticas recuperadas del análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488 con pH por encima de 4.87, tanto en presencia como ausencia de tampón.

$k_{DM}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.94 \pm 0.02) \times 10^8$	$\tau_M = 3.40 \pm 0.02$ ns
$k_{0D}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.47 \pm 0.01) \times 10^8$	$\tau_D = 4.05 \pm 0.02$ ns
$k_{MD}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(5.1 \pm 1.5) \times 10^{11}$	$pK_M^* = 4.42 \pm 0.13^{\bullet}$
$k_{DM}$ (s <sup>-1</sup> )	$(1.94 \pm 0.25) \times 10^7$	
$k_{MD}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(2.11 \pm 0.10) \times 10^8$	$pK_M^* = 4.14 \pm 0.02^{\ominus}$
$k_{DM}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(8.69 \pm 0.04) \times 10^8$	
$\bullet$ Calculado aplicando la ecuación II-17. $\ominus$ Calculado aplicando la ecuación II-18.		

**Tabla XIX:** Parámetros de excitación y de emisión obtenidos en el análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488 con pH por encima de 4.87, tanto en presencia como ausencia de tampón.

pH	$\tilde{b}_M$	$\lambda^{em}$ (nm)	$\tilde{c}_M$
9.12	$0.032 \pm 0.002$	515	$0.254 \pm 0.016$
8.95	$(0.2 \pm 4.7) \times 10^{-3}$	525	$0.269 \pm 0.015$
6.92	$(0.2 \pm 3.7) \times 10^{-3}$	550	$0.375 \pm 0.007$
5.77	$0.352 \pm 0.016$	570	$0.425 \pm 0.004$
5.71	$0.401 \pm 0.018$	580	$0.479 \pm 0.003$
5.56	$0.482 \pm 0.022$	600	$0.546 \pm 0.003$
5.36	$0.591 \pm 0.027$		
5.13	$0.709 \pm 0.027$		
5.11	$0.707 \pm 0.031$		
4.87	$0.826 \pm 0.036$		

No obstante, el mejor ajuste de todos los realizados y por tanto el que mejores resultados ha proporcionado en lo que se refiere a la descripción del sistema compartimental, se obtuvo al analizar la superficie de decaimientos de fluorescencia de todas las disoluciones, en presencia y ausencia de ácido acético y acetato sódico, en el intervalo de pH entre 3.3 y 9. Como ya se comentó, en esta situación, la especie neutra forma un único compartimento con la especie monoaniónica, debido a la igualdad de los grupos cromóforos de ambas especies.

Con estas condiciones experimentales, el número total de decaimientos incluidos simultáneamente en el ajuste global compartimental fue de 70. De estos decaimientos, 50 fueron recogidos con diez disoluciones a diferente valor de pH, con tampón  $HAc/Ac^-$  1 M, a las longitudes de onda de emisión de 515, 525, 550, 570 y 600 nm y con una configuración de 5.94 ps/canal en el TAC. 8 decaimientos se registraron a partir de cuatro disoluciones con diferentes valores de pH y concentración 1 M en aceptor/dador protónico, a las longitudes

de onda de emisión de 515 y 525 nm y con el TAC ajustado a una resolución de 2.46 ps/canal. Los 12 decaimientos restantes correspondieron a cuatro disoluciones de colorante de diferentes valores de pH, en ausencia de aceptor/dador protónico, a las longitudes de onda de emisión de 515, 550 y 580 nm y con una ventana temporal de 24 ns (resolución del TAC de 5.94 ps/canal).

En las tablas XX y XXI se muestran los resultados de las constantes cinéticas  $k_{ij}$  y de los parámetros espectrales, de excitación  $\tilde{b}_i$  y de emisión  $\tilde{\tau}_i$ , respectivamente, recuperados mediante el ajuste global compartimental llevado a cabo.

**Tabla XX:** Constantes cinéticas recuperadas del análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488 con pH por encima de 3.3, tanto en presencia como en ausencia de tampón.

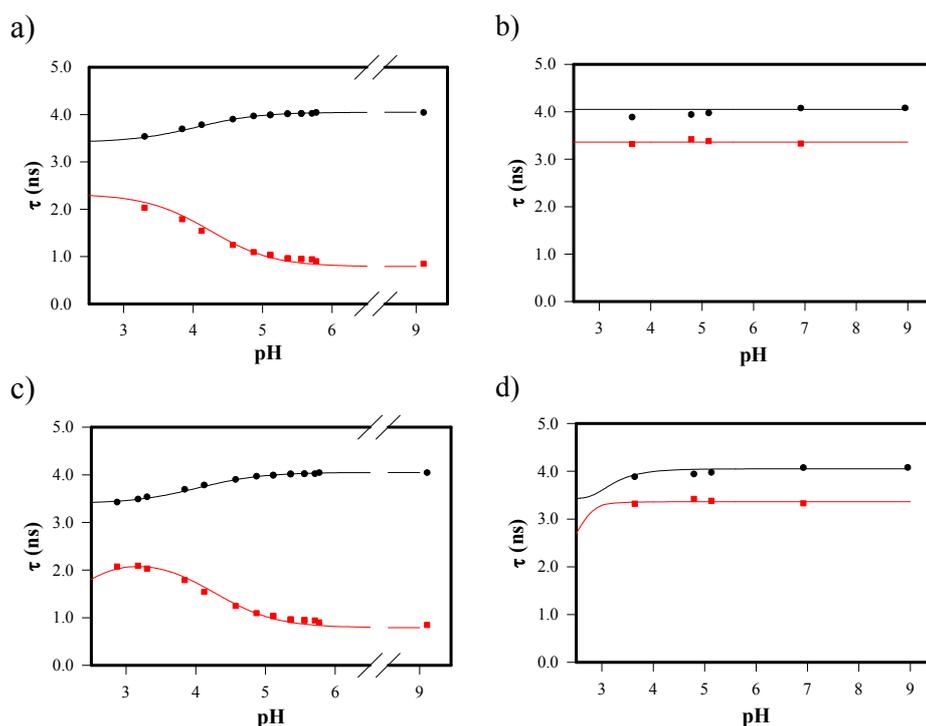
$k_{0M}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.94 \pm 0.01) \times 10^8$	$\tau_M = 3.40 \pm 0.01$ ns
$k_{0D}$ (s <sup>-1</sup> )	$(2.47 \pm 0.01) \times 10^8$	$\tau_D = 4.05 \pm 0.02$ ns
$k_{MD}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0 <sup>❶</sup>	$k_{MD} = 3.7 \times 10^{10}$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> <sup>❷</sup>
$k_{DM}$ (s <sup>-1</sup> )	$(3.57 \pm 0.15) \times 10^6$	
$k_{MD}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(1.79 \pm 0.01) \times 10^8$	$pK_M^* = 4.022 \pm 0.003$ <sup>❸</sup>
$k_{DM}^b$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$(9.70 \pm 0.02) \times 10^8$	
<sup>❶</sup> Mantenido fija a cero durante el proceso de ajuste. <sup>❷</sup> Calculada con la constante cinética $k_{DM} = 3.57 \times 10^6$ y $pK_M^* = 4.022$ , mediante la ecuación II-17. <sup>❸</sup> Calculado mediante la ecuación II-18.		

**Tabla XXI:** Parámetros de excitación y de emisión obtenidos en el análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de OG488 con pH por encima de 3.3, tanto en presencia como ausencia de tampón.

pH	$\tilde{b}_M$	$\lambda^{em}$ (nm)	$\tilde{c}_M$
9.12	$0.032 \pm 0.001$	515	$0.179 \pm 0.003$
8.95	0 <sup>•</sup>	525	$0.194 \pm 0.003$
6.92	0 <sup>•</sup>	550	$0.336 \pm 0.001$
5.77	$0.291 \pm 0.002$	570	$0.402 \pm 0.001$
5.71	$0.332 \pm 0.002$	580	$0.523 \pm 0.003$
5.56	$0.399 \pm 0.002$	600	$0.558 \pm 0.001$
5.36	$0.487 \pm 0.003$	<sup>•</sup> Mantenidos fijos durante el proceso de análisis.	
5.13	$0.600 \pm 0.003$		
5.11	$0.579 \pm 0.003$		
4.87	$0.672 \pm 0.003$		
4.79	$0.845 \pm 0.003$		
4.57	$0.755 \pm 0.004$		
4.12	$0.880 \pm 0.004$		
3.84	$0.930 \pm 0.003$		
3.64	$1.000 \pm 0.003$		
3.3	$0.998 \pm 0.002$		

Con las constantes cinéticas de la tabla XX se calcularon los tiempos de decaimiento, en función del pH y de la concentración total de aceptor/dador protónico. Estos tiempos se compararon con los tiempos de decaimiento recuperados a través de los análisis globales biexponenciales correspondientes (secciones III.3.2, para decaimientos en ausencia de aceptor/dador protónico, y III.3.3 para decaimientos con concentración 1 M de  $HAc/Ac^-$ ). La excelente concordancia entre los tiempos de decaimiento calculados y los recuperados mediante los ajustes biexponenciales para ambos casos se puede observar en la figura III-52-a) y III-52-b). Además, se ha incluido el cálculo de los tiempos de decaimiento considerando  $k_{MD}$  como no nula. Esto se muestra en las figuras III-

52-c) y III-52-d) para presencia y ausencia de tampón. Se puede comprobar que incluso los tiempos de decaimiento calculados coinciden con los procedentes de los análisis biexponenciales por debajo de pH 3.3. Se observa en estas figuras que la disminución en el tiempo de decaimiento corto por debajo de pH 3, en presencia de tampón, se predice según las constantes cinéticas recuperadas. Igualmente, la sensible disminución del tiempo de vida largo de los análisis biexponenciales, para los decaimientos en ausencia de tampón, se observa también en el calculado.

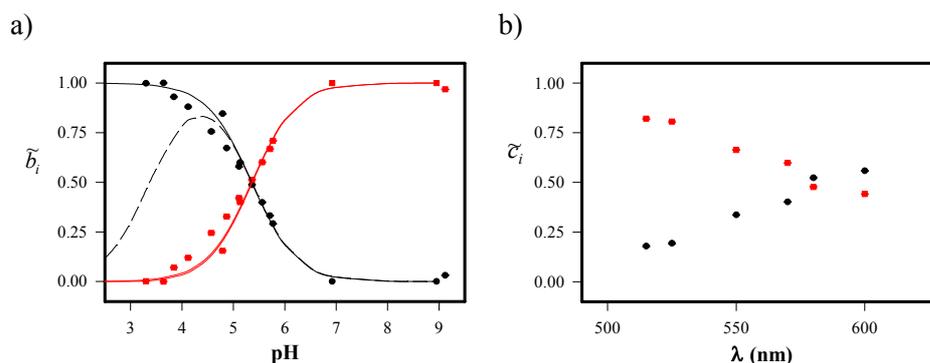


**Figura III-52:** Representaciones de los tiempos de decaimiento frente al pH obtenidos mediante análisis globales biexponenciales (símbolos) en presencia de tampón acetato 1 M (**a** y **c**), y en ausencia del mismo (**b** y **d**), y tiempos de decaimiento calculados (líneas) a través de la ecuación II-14 empleando los valores de las constantes cinéticas de la tabla XX, con  $k_{MD}$  nula (**a** y **b**) y con  $k_{MD} = 3.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (**c** y **d**).

Por otra parte, se representaron los valores de los parámetros de excitación frente al pH y se compararon con los valores de  $\tilde{b}_i$  calculados según

la ecuación III-40 (que tiene en cuenta el comportamiento de las especies neutra y monoaniónica como un solo compartimento). Los valores de  $\varepsilon_i$  y los  $pK_a$  del estado fundamental utilizados para calcular la curva fueron los obtenidos en el estudio absorciométrico del estado fundamental del OG488 (sección III.1.1.1). Esta representación se muestra en la figura III-53-a). Se puede observar la excelente concordancia entre los valores recuperados del análisis compartimental y los calculados a través de los datos de absorción.

En lo que se refiere a la tendencia de los valores de  $\tilde{\tau}_i$ , en la figura III-53-b) se observa que se corresponde con las eficiencias relativas de cada especie a las longitudes de onda estudiadas. En efecto, la especie dianiónica presenta una mayor eficiencia a 515 y 525 nm. Esta mayor eficiencia se hace menos notable a mayores longitudes de onda, debido al hombro que presenta el espectro de emisión del monoanión. Aun así, la eficiencia del dianión sigue siendo superior, hasta llegar a los 600 nm, donde el monoanión presenta una mayor emisión, lo que también concuerda con el valor de  $\tilde{\tau}_i$  obtenido a esta longitud de onda.



**Figura III-53:** Representación de **a)** los parámetros de excitación y **b)** emisión de las especies D (■) y M (●) de la Tabla XXI. Se muestran también los valores teóricos de los parámetros de excitación (— y - - -) calculados con la ecuación general II-8 (discontinuas) o la III-40 (contínuas) empleando los resultados del estado fundamental obtenidos en la presente Memoria.

Los parámetros espectrales de excitación  $\tilde{b}_i$  recuperados en el análisis pueden ofrecer información cuantitativa acerca del estado fundamental.

Definiendo los valores de  $\tilde{b}_i$  únicamente para las especies M y D, sin considerar la aportación de la especie neutra, la ecuación general II-8 se puede escribir para cada una de las especies M y D como:

$$\tilde{b}_M = \frac{\varepsilon_M \alpha_M}{\varepsilon_M \alpha_M + \varepsilon_D \alpha_D} \quad (\text{III-41})$$

$$\tilde{b}_D = \frac{\varepsilon_D \alpha_D}{\varepsilon_M \alpha_M + \varepsilon_D \alpha_D} \quad (\text{III-42})$$

Si se considera el equilibrio ácido-base en estado fundamental entre las dos especies, puede escribirse:

$$\tilde{b}_M = \frac{\varepsilon_M [\text{H}^+]}{\varepsilon_M [\text{H}^+] + \varepsilon_D K_M} \quad (\text{III-43})$$

$$\tilde{b}_D = \frac{\varepsilon_D K_M}{\varepsilon_M [\text{H}^+] + \varepsilon_D K_M} \quad (\text{III-44})$$

Definiendo el coeficiente de extinción molar relativo,  $\varepsilon_R$ , como  $\varepsilon_M/\varepsilon_D$ , la relación entre los parámetros  $\tilde{b}_i$  queda:

$$\frac{\tilde{b}_D}{\tilde{b}_M} = \frac{K_M}{\varepsilon_R [\text{H}^+]} \quad (\text{III-45})$$

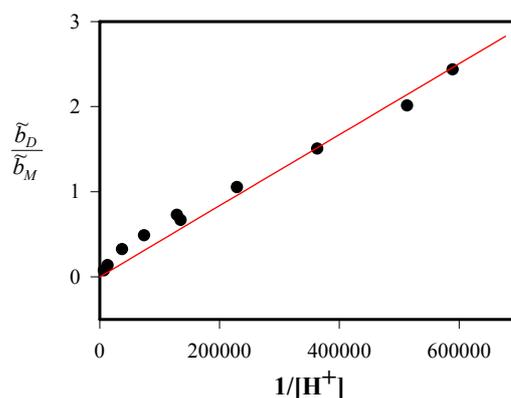
La ecuación III-45 permite calcular la constante de equilibrio entre las especies M y D, una vez conocido el coeficiente de extinción molar.

Se han empleado los valores de  $\tilde{b}_M$  de la tabla XXI (y los correspondientes de  $\tilde{b}_D$ ) para obtener la constante del equilibrio en estado fundamental  $M \rightleftharpoons D$  mediante la aplicación de la ecuación III-45. Para ello es necesario también el empleo de  $\varepsilon_R$  como valor conocido. Según los resultados obtenidos en esta Memoria (sección III.1.1.1), para la longitud de onda de excitación de trabajo, 420 nm,  $\varepsilon_R = 4.519$ . El ajuste lineal por mínimos cuadrados del cociente  $\tilde{b}_D/\tilde{b}_M$  frente a  $1/[\text{H}^+]$  se muestra en la figura III-54 y los resultados se indican en la tabla XXII. En este ajuste se ha empleado una

función lineal de la forma  $f = ax$  que implica una ordenada en el origen nula, tal y como preconiza la ecuación III-45. El valor recuperado del  $pK_M$  es muy cercano a los obtenidos en las secciones III.1.1.1 (4.69) y III.1.1.2 (4.74) de esta Memoria, así como al valor de 4.8 descrito por *Sun et al. (1997)*. Los aceptables parámetros estadísticos del ajuste y el concordante valor del  $pK_M$ , muestran que los parámetros de excitación  $\tilde{b}_i$  reflejan bastante bien el equilibrio en el estado fundamental.

**Tabla XXII:** Ajuste lineal del cociente de los parámetros de excitación frente a  $1/[H^+]$ .

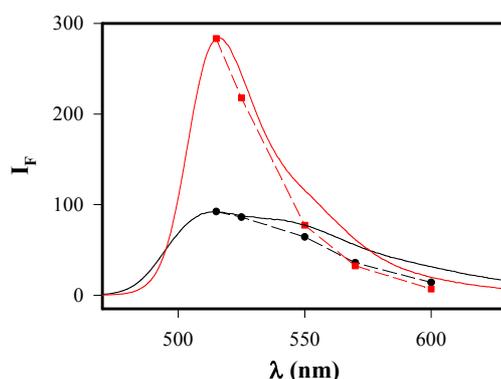
Pendiente	$(4.17 \pm 0.14) \times 10^{-6}$	$p = K_M / \epsilon_R$ <sup>•</sup> $K_M = (1.88 \pm 0.06) \times 10^{-6}$ $pK_M = 4.72 \pm 0.01$
$R^2$	0.997	
<sup>•</sup> Valor utilizado de $\epsilon_R = 4.519$ .		



**Figura III-54:** Ajuste lineal de la ecuación III-45.

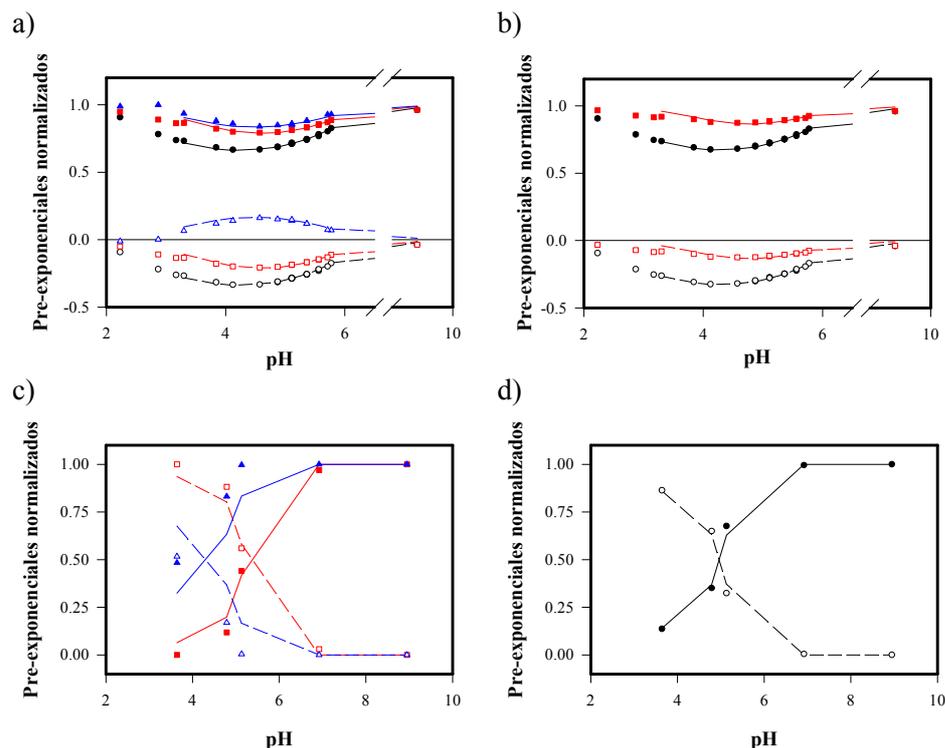
Cuando la ordenada en el origen no se fijó a cero, el proceso de ajuste proporcionó para aquella un valor despreciable y el  $pK_M$  recuperado fue de  $4.76 \pm 0.01$ , lo que resulta prácticamente similar al valor anteriormente discutido.

Los espectros de emisión asociados a las especies (SAEMS) se han calculado mediante la ecuación general I-31. En esta ecuación, se utilizó como intensidad total en estado estacionario de cada disolución,  $F_S(\lambda^{ex}, \lambda^{em})$ , el número de cuentas totales recogidas bajo las mismas condiciones ópticas en un mismo intervalo de tiempo (5 minutos)<sup>∇</sup> y con una ventana temporal de 24 ns (de forma que se recoja el decaimiento completo). En la figura III-55 se muestran los SAEMS calculados para cada especie, en algunas de las disoluciones. Para su comparación se muestran los espectros de emisión normalizados de disoluciones de OG488 a pH 12 (correspondiente al perfil espectral del dianión) y a pH 2 (correspondiente al espectro de emisión de las formas N\*/M\*). Según lo mostrado en la figura III-55, los datos recuperados a través del análisis global compartimental describen de manera excelente las características espectrales del sistema.



**Figura III-55:** SAEMS de la especie D (■) y M (●), en la disolución de OG488 en presencia de tampón a pH 4.36, calculados con la ecuación I-31 empleando los parámetros de las tablas XX y XXI. Para su comparación, se muestran los espectros de emisión, normalizados con los SAEMS al valor de intensidad de fluorescencia en 515 nm, de las especies monoaniónica (—) y dianiónica (—).

<sup>∇</sup> El número de cuentas totales es proporcional a la integral de la curva del decaimiento, por tanto, proporcional a la intensidad de fluorescencia en estado estacionario.



**Figura III-56:** Representación frente al pH de los pre-exponenciales normalizados calculados a través de los resultados (tablas XX y XXI) del análisis global compartimental (líneas), y su comparación con los pre-exponenciales procedentes de los análisis globales biexponenciales (símbolos). Los pre-exponenciales asociados al tiempo de decaimiento largo se representan por líneas continuas y símbolos rellenos, mientras que los asociados al tiempo corto por líneas discontinuas y símbolos huecos. **a)** Decaimientos en presencia de tampón  $HAc/Ac^-$  1 M, con  $\lambda^{ex} = 420\text{nm}$  y  $\lambda^{em} = 515\text{nm}$  ( $\bullet$  y  $\text{—}$ ),  $550\text{nm}$  ( $\blacksquare$  y  $\text{—}$ ) y  $600\text{nm}$  ( $\blacktriangle$  y  $\text{—}$ ). **b)** Decaimientos en presencia de tampón  $HAc/Ac^-$  1 M, con  $\lambda^{ex} = 420\text{nm}$  y  $\lambda^{em} = 525\text{nm}$  ( $\bullet$  y  $\text{—}$ ) y  $570\text{nm}$  ( $\blacksquare$  y  $\text{—}$ ). **c)** Decaimientos en ausencia de tampón, con  $\lambda^{ex} = 420\text{nm}$  y  $\lambda^{em} = 515\text{nm}$  ( $\blacktriangle$  y  $\text{—}$ ) y  $580\text{nm}$  ( $\blacksquare$  y  $\text{—}$ ). **d)** Decaimientos en ausencia de tampón, con  $\lambda^{ex} = 420\text{nm}$  y  $\lambda^{em} = 550\text{nm}$  ( $\bullet$  y  $\text{—}$ ).

Por último, los pre-exponenciales normalizados calculados a partir de los valores de las constantes cinéticas,  $\tilde{b}_i$  y  $\tilde{c}_i$ , se muestran en la figura III-56. El cálculo de estos pre-exponenciales se ha realizado a través de las ecuaciones II-15 y II-16, derivadas del modelo general. En la figura III-56 se puede observar la excelente concordancia entre los pre-exponenciales calculados a

través de los parámetros recuperados del análisis global compartimental y los obtenidos de los ajustes globales biexponenciales, tanto para ausencia de tampón como en presencia de HAc/Ac<sup>-</sup> 1 M.

En resumen y como se ha podido comprobar, los valores de las constantes cinéticas, junto a los parámetros de excitación y emisión, describen de manera excelente el comportamiento del sistema. La adecuación de los valores de  $\tilde{b}_i$  a los calculados mediante espectrometría de absorción se refleja en la concordancia en el  $pK_M$  del estado fundamental obtenido por ambos métodos. Por lo tanto, se puede concluir que las especies neutra y monoaniónica, aún siendo ambas excitadas, se comportan como un compartimento único, ya que los valores de  $\tilde{b}_M$  recuperados del análisis global compartimental representan la suma de las contribuciones de ambas especies. Los SAEMS calculados coinciden con los perfiles espectrales de las dos especies que se detectan en estado estacionario. El espectro de emisión asociado a la especie dianiónica es análogo al espectro de emisión de fluorescencia de las disoluciones de OG488 a pH básico, es decir, del dianión. Además, es prácticamente la imagen especular del espectro de absorción. El SAEMS calculado para la especie monoaniónica es comparable a los espectros de emisión de disoluciones de OG488 a pH 2, donde solo emiten las especies neutra y monoaniónica. Este espectro de emisión se caracteriza por el hombro a 550 nm, que también se observa con claridad en el SAEMS calculado. Por último, la excelente adecuación de los pre-exponenciales normalizados calculados a través de las ecuaciones derivadas del modelo compartimental, a los recuperados mediante los análisis globales, también demuestra la coherencia de los resultados obtenidos con el comportamiento del sistema.

Finalmente se desea resaltar que, debido a la existencia de tres especies excitadas y al alto grado de solapamiento espectral, este sistema es uno de los

más complejos que se ha resuelto hasta la fecha, lo que demuestra el gran potencial de cálculo que posee el análisis global compartimental.

**III.4.- SISTEMA TRICOMPARTIMENTAL  $C^* \rightleftharpoons N^* \rightleftharpoons M^*$ .****III.4.1.- Consideraciones previas.**

Mediante fluorimetría en estado estacionario, se ha demostrado en la sección III.2, que la especie catiónica del OG488 es un fotoácido bastante fuerte, ya que se produce una rápida desprotonación en el estado excitado hacia la especie neutra. Se trata de un fotoácido tan fuerte que su espectro de emisión puro, únicamente se puede detectar a concentraciones de ácido por encima de 9 M. Los estudios sobre fotoácidos y súper-fotoácidos, con rápidas desprotonaciones, es un campo de amplio desarrollo en los últimos años (*Agmon, 1988; Pines et al., 1988; Tolbert y Haubrich, 1990; Solntsev et al., 1999; Clower et al., 2002; Hynes et al., 2002*), en donde se incluyen varios estudios con resolución temporal de femtosegundos (*Kim et al., 1995; Genosar et al., 2000*), y algunas aplicaciones como son los saltos de pH inducidos por láser (*Jankowski y Stefanowcz, 1994; Jankowski et al., 1995*).

Mediante la aplicación del análisis global y el análisis global compartimental se pretende estudiar la desprotonación ultrarrápida de la especie catiónica del OG488 en el estado excitado. Además, la estrecha relación entre las especies neutra y monoaniónica y la coexistencia de ambas formas en el intervalo de pH estudiado, hace necesario considerar este sistema como un modelo de tres especies en el estado excitado y resolverlo mediante la aplicación del análisis global tricompartmental.

Los resultados obtenidos en la sección III.2 por fluorimetría en estado estacionario dieron, por un lado, la ya citada disminución del  $pK_C^*$  respecto al del estado fundamental y el comportamiento de la forma catiónica del OG488 como fotoácido fuerte. Por otra parte, también se logró cuantificar la ligera variación en el  $pK_N^*$  del estado excitado con respecto al del estado fundamental, entre las especies N y M. Para confirmar todos los resultados obtenidos por fluorimetría en estado estacionario y cuantificar los parámetros cinéticos de las

reacciones en el estado excitado, se ha abordado el estudio de la fluorescencia con resolución temporal de las disoluciones acuosas de OG488 que, como es conocido, resulta la única técnica que puede resolver con fiabilidad el problema propuesto.

La superficie experimental de decaimientos de fluorescencia obtenida consta de los decaimientos procedentes de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M en ácido perclórico a concentraciones entre  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M. La longitud de onda de excitación fue de 420 nm, mientras que las longitudes de onda de emisión fueron 450 y 470 nm, donde esencialmente emite la forma catiónica sin interferencias de las demás especies, y 490, 510, 515, 550 y 570 nm, en donde emiten todas las formas prototrópicas implicadas. Además se emplearon dos diferentes configuraciones del TAC. Concretamente se obtuvieron decaimientos en una escala de 5.94 ps/canal y otra de 1.22 ps/canal. Los decaimientos fueron obtenidos mediante la técnica TCSPC, con el instrumento y metodología descritos en la sección *Materiales y Métodos*.

Inicialmente se han analizado estos decaimientos mediante análisis global, ajustándolos a funciones multiexponenciales para obtener los tiempos de decaimiento y pre-exponenciales asociados. Seguidamente, se ha planteado un esquema cinético de los procesos considerados en el estado excitado y se ha aplicado el análisis global tricompartmental, al objeto de obtener las constantes cinéticas correspondientes a los procesos en el estado excitado y los parámetros espectrales asociados. Se debe de resaltar que este sistema tricompartmental es uno de los de mayor complejidad planteado hasta la fecha, debido al alto grado de solapamiento espectral que presentan las tres especies coexistentes, tanto en su excitación como en la emisión.

#### III.4.2.- Análisis globales.

Se analizaron globalmente, planteando leyes de decaimiento multiexponenciales, los decaimientos de fluorescencia recogidos para una

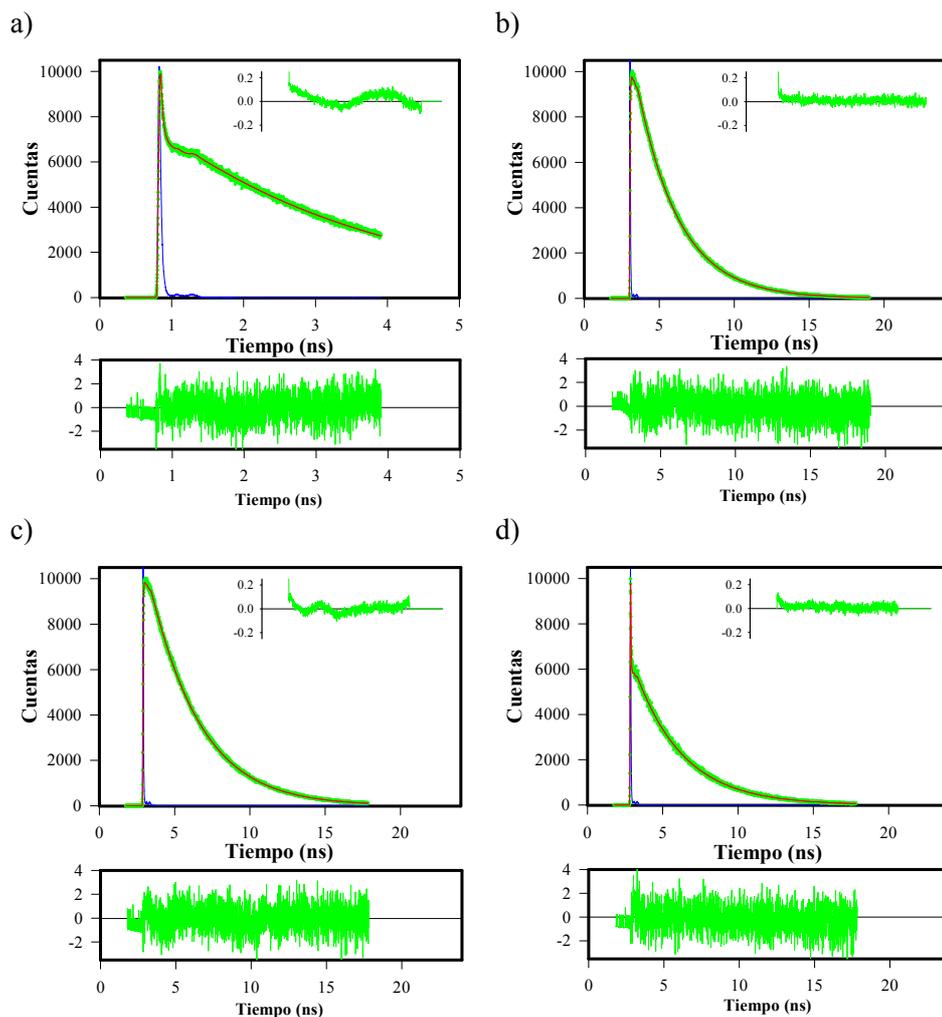
misma disolución, a la misma concentración ácida, a todas las diferentes longitudes de onda de emisión e incluyendo los decaimientos en las diferentes escalas tiempo/canal. Los análisis se realizaron mediante métodos de reconvolución iterativa basados en el algoritmo de Marquardt, y se llevaron a cabo ligando como parámetros comunes los tiempos de decaimiento de la función ensayada, mientras que los factores pre-exponenciales se consideraron como parámetros independientes de cada decaimiento (esquema I-11, aunque incluyendo tres tiempos de decaimiento).

Como característica inicial de los ajustes realizados, se puede destacar la aparición de tiempos de decaimiento muy cortos, que se hacen muy notables a las longitudes de onda de emisión de 450 y 470 nm. La contribución de estas componentes ultrarrápidas es bastante grande a todos los valores de  $[H^+]$ . Por el contrario, a las otras longitudes de onda de emisión, estas contribuciones apenas se detectan, aunque aparecen tiempos de decaimiento con pre-exponenciales asociados negativos, que indican la “aparición” de una nueva especie fluorescente. Como es conocido, estas características implican la existencia de reacciones en el estado excitado, en donde se forma una especie fluorescente a partir de otra especie, inicialmente excitada, que fluoresce con menor eficiencia. Se debe de resaltar que, el empleo simultáneo en los ajustes globales de los decaimientos obtenidos a varias escalas tiempo/canal (véase *Materiales y Métodos*), una escala larga (5.94 ps/canal) y otra más corta (1.22 ps/canal), proporciona una mejor y más fiable estimación de los tiempos de decaimiento cortos (*Wenska et al., 1997; Lakowicz, 1999*).

Otra característica importante de los ajustes efectuados es que los decaimientos tienen carácter triexponencial en la mayor parte de los casos, ya que las leyes de decaimiento biexponenciales, que también fueron ensayadas, resultaron insuficientes, con desajustes claros en la función calculada (valores de  $\chi^2$  muy altos) y tendencias muy marcadas en los residuales y funciones de autocorrelación. De los tres tiempos de decaimiento obtenidos, dos son bastante

cortos, encontrándose entre las unidades del picosegundo y unos 100 ps; mientras que el otro tiempo de decaimiento se encuentra alrededor de los 3 ns. En cierto intervalo de pH no se justifica estadísticamente el uso de una función triexponencial, debido a la gran similitud entre los dos tiempos cortos.

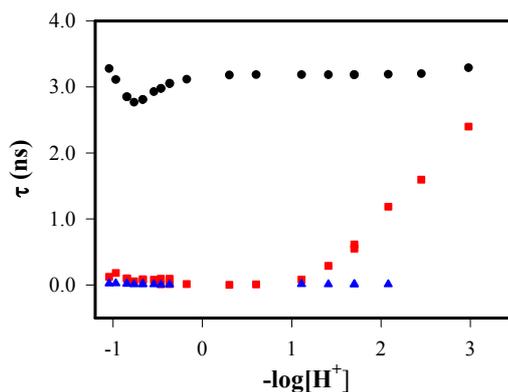
La figura III-57 muestra algunos de los decaimientos obtenidos, así como los resultados de las funciones de sus ajustes globales y las representaciones de los residuales y funciones de autocorrelación. Los valores de  $\chi^2$ , la inspección visual adecuada de la función de ajuste al decaimiento y la distribución al azar de los residuales y funciones de autocorrelación, son indicativos de la bondad de los ajustes.



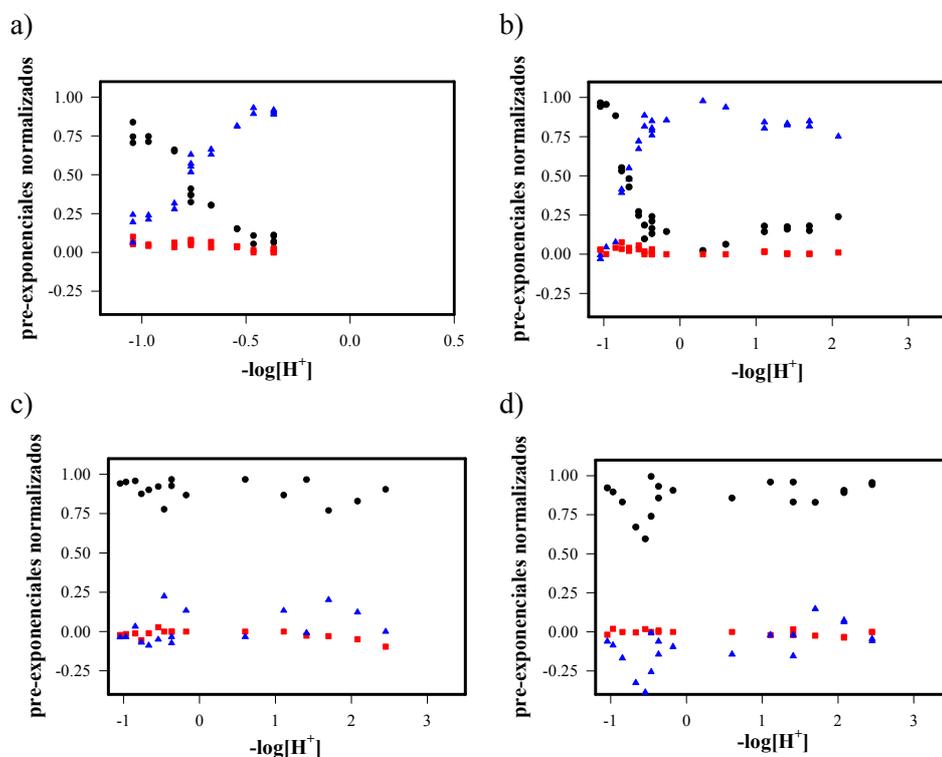
**Figura III-57:** Decaimientos de fluorescencia, de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M, ajustados mediante análisis global a funciones triexponenciales. **a)**  $\lambda^{ex} = 420$  nm,  $\lambda^{em} = 470$  nm,  $[H^+] = 2.3$  M, 1.22 ps/canal;  $\tau_1 = 3.053$  ns,  $p_1 = 0.130$ ,  $\tau_2 = 93.6$  ps,  $p_2 = 0.019$ ,  $\tau_3 = 7.2$  ps,  $p_3 = 0.851$ ,  $\chi^2_{indiv} = 1.062$ . **b)**  $\lambda^{ex} = 420$  nm,  $\lambda^{em} = 550$  nm,  $[H^+] = 5.8$  M, 5.94 ps/canal;  $\tau_1 = 2.766$  ns,  $p_1 = 0.433$ ,  $\tau_2 = 53.7$  ps,  $p_2 = 0.029$ ,  $\tau_3 = 8.0$  ps,  $p_3 = 0.538$ ,  $\chi^2_{indiv} = 1.108$ . **c)**  $\lambda^{ex} = 420$  nm,  $\lambda^{em} = 510$  nm, pH = 1.11, 5.94 ps/canal;  $\tau_1 = 3.185$  ns,  $p_1 = 0.409$ ,  $\tau_2 = 82.5$  ps,  $p_2 = -0.001$ ,  $\tau_3 = 13.2$  ps,  $p_3 = -0.59$ ,  $\chi^2_{indiv} = 1.079$ . **d)**  $\lambda^{ex} = 420$  nm,  $\lambda^{em} = 470$  nm,  $[H^+] = 1.5$  M, 5.94 ps/canal;  $\tau_1 = 3.115$  ns,  $p_1 = 0.144$ ,  $\tau_2 = 14.1$  ps,  $p_2 = 0.856$ ,  $\chi^2_{indiv} = 1.104$ . En la figura se muestran el perfil instrumental de la fuente de excitación (—), el decaimiento experimental (●), la función de ajuste (—), los residuales (—) y la función de autocorrelación (figuras insertadas).

Los ajustes triexponenciales de los decaimientos y las formas de las diferentes funciones de ajuste, a las distintas longitudes de onda de emisión, se pueden justificar de la siguiente forma. Mediante los resultados obtenidos por espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario se ha demostrado que la especie catiónica del OG488 se comporta como un superácido, lo que provoca su rápida desprotonación en el estado excitado. Esta rápida desaparición del catión excitado se refleja en los decaimientos, como un tiempo de vida muy corto cuando la fluorescencia se registra a las longitudes de onda en donde aquel emite (450 y 470 nm), mientras que el tiempo de vida aparece asociado con un pre-exponencial negativo a las longitudes de onda de emisión preferente de la especie neutra. Adicionalmente, también se describió por espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario, la reacción en el estado excitado entre las especies neutra y monoaniónica por lo que, a valores de pH intermedios, también se debe de esperar que la especie neutra excitada se desprotona y se convierta en monoanión excitado.

En las figuras siguientes, y en lo sucesivo, debido a la imposibilidad experimental de medir el pH en las disoluciones muy concentradas de ácido, las representaciones de tiempos de decaimiento, pre-exponenciales, etc., se realizarán frente a  $-\log[H^+]$  en lugar de frente al pH. La figura III-58 muestra la representación de los tiempos de decaimiento obtenidos a cada concentración de  $HClO_4$ , donde se observa la tendencia del tiempo largo, así como los dos tiempos muy cortos, y como por encima de pH 2.5 los decaimientos vuelven a ser biexponenciales con el tiempo corto aumentando. Por otra parte, la figura III-59 muestra los pre-exponenciales normalizados, asociados a los tiempos de decaimiento, recuperados en los análisis globales, a las longitudes de onda de emisión más características del sistema.



**Figura III-58:** Representación de los tiempos de decaimiento frente al pH obtenidos mediante análisis globales triexponenciales de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M con diferentes concentraciones de HClO<sub>4</sub>.



**Figura III-59:** Representación de los pre-exponenciales normalizados, frente a  $-\log([H^+])$ , asociados al tiempo de decaimiento largo (●), intermedio (■) y corto (▲) obtenidos mediante análisis globales triexponenciales de disoluciones acuosas de OG488  $5 \times 10^{-6}$  M. **a)**  $\lambda^{em} = 450$  nm, **b)**  $\lambda^{em} = 470$  nm, **c)**  $\lambda^{em} = 510$  nm, **d)**  $\lambda^{em} = 550$  nm.

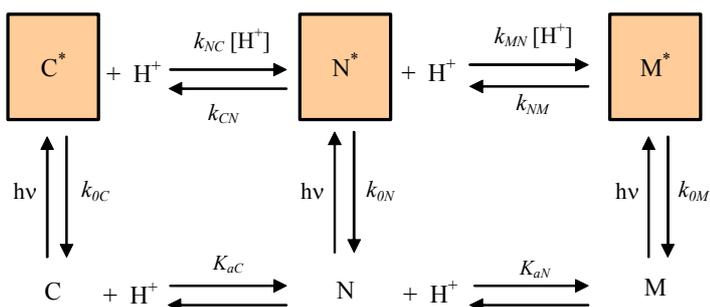
En la figura III-58 se pueden observar ciertas características inusuales en las tendencias que muestran los tiempos de decaimiento, con la concentración de  $H^+$ . Así, y como se muestra en la figura III-59, parece muy notable la alta abundancia del tiempo de vida más corto a las longitudes de onda de emisión de 450 y 470 nm, y que además, aumenta conforme la concentración de  $H^+$  disminuye, hasta prácticamente desaparecer a una concentración 10 M de ácido perclórico. Además, la citada tendencia de este tiempo más corto con el pH no queda bien definida, debido a que la resolución del instrumento, aún siendo de unos pocos picosegundos, no permitió una determinación precisa de este tiempo de vida. Asimismo, la tendencia del tiempo de decaimiento mayor también resulta inusual. Como se observa en la figura III-58, este tiempo va disminuyendo al aumentar la concentración de  $H^+$ , hasta un mínimo alrededor de 5 M. Con un mayor incremento en  $[H^+]$  el tiempo de decaimiento vuelve a aumentar hasta un valor de 3.28 ns. Es importante destacar que, en la zona de mayor concentración protónica, se pueden dar varios procesos en estado excitado, diferentes a simples transferencias protónicas. Estos procesos se han descrito frecuentemente en super-fotoácidos y en medios de alta viscosidad (*Pines et al., 1988; Lima et al., 1998; Solntsev et al., 1999*). Usualmente se deben a efectos transitorios, a la reorganización del disolvente alrededor del ácido excitado (en el orden del picosegundo) y a la recombinación de los protones salientes (que hace que las constantes cinéticas sean dependientes del tiempo). Además, los efectos difusionales también tienen gran importancia, debido a la alta viscosidad que presentan las disoluciones concentradas de ácido perclórico respecto de las más diluidas (*Tolbert y Solntsev, 2002; Yang y Schulman, 2003*). Estos efectos pueden alterar la cinética del sistema de transferencia protónica en el estado excitado, de un fotoácido usual.

Todos los fenómenos mencionados con anterioridad, junto al alto grado de solapamiento espectral y la imposibilidad de obtener espectros de emisión puros de las diferentes especies, hace que el análisis de las reacciones de

transferencia protónica en estado excitado, mediante métodos tradicionales en dos pasos, sea prácticamente inviable. Por ello, se necesitan métodos más potentes para analizar y resolver este tipo de reacciones. Nuevamente, se hace necesario el empleo del análisis global compartimental.

#### III.4.3.- Análisis global tricompartmental.

Debido a la complejidad del sistema, el empleo del análisis global compartimental a esta serie de reacciones de transferencia protónica en el estado excitado, presenta indudables ventajas ya comprobadas con otros sistemas, por lo que, a continuación, se describe la aplicación del modelo teórico general a este sistema concreto y los resultados alcanzados con esta potente metodología. No obstante, se debe de resaltar que el mencionado análisis se ha restringido solamente hasta los resultados obtenidos a  $[\text{HClO}_4] = 3 \text{ M}$ , al objeto de ignorar aquellos efectos que pueden alterar la cinética de transferencia protónica y que, por presentarse a concentraciones ácidas demasiado altas, no se han considerado de interés en los estudios que se persiguen en la presente Memoria. Así, se ha planteado el modelo tricompartmental que se muestra en el esquema III-6. La propuesta de este esquema como punto de partida, se justifica por la aparición de decaimientos de tipo triexponencial y en la evidencia obtenida por absorciometría sobre la existencia de tres especies prototrópicas. El esquema tricompartmental está basado en el esquema general desarrollado en la sección *Materiales y Métodos* (esquema II-5), así como en la teoría general del análisis global tricompartmental.



**Esquema III-6:** Esquema cinético del modelo tricompartmental de reacción de transferencia protónica en estado excitado entre las especies catiónica (C), neutra (N) y monoaniónica (M) del OG488.

En este esquema, M, N y C se corresponden con las especies monoaniónica, neutra y catiónica,  $k_{0i}$  son las constantes de decaimiento (por fluorescencia, y procesos no radiativos) de cada especie  $i$ ,  $k_{CN}$  y  $k_{NM}$  son las constantes de segundo orden de protonación en el estado excitado de las especies neutra y monoaniónica, respectivamente,  $k_{NC}$  y  $k_{MN}$  son las constantes de primer orden de desprotonación en el estado excitado de las mismas especies anteriores. El resto de los parámetros espectrales que intervienen en el modelo compartimental son los parámetros de excitación,  $\tilde{b}_M$  y  $\tilde{b}_N$  ( $\tilde{b}_C$  queda determinado como  $1 - \tilde{b}_N - \tilde{b}_M$ ), que dependerán de la longitud de onda de excitación y del pH (al depender de éste el equilibrio en estado fundamental de las especies); y los parámetros de emisión,  $\tilde{\tau}_M$  y  $\tilde{\tau}_N$  ( $\tilde{\tau}_C$  queda determinado como  $1 - \tilde{\tau}_N - \tilde{\tau}_M$ ), que dependerán de la longitud de onda de emisión. El esquema de ligado de los parámetros se corresponde con el esquema general (esquema II-6). Sin embargo y como ya se indicó en la sección de *Materiales y Métodos*, debido a la indisponibilidad del modelo concreto en el software de análisis, para resolver este sistema se ha modificado el esquema de ligado de parámetros, de forma que el que se ha utilizado es el que se muestra en el esquema II-7. En el esquema general II-5, la especie 1 corresponde con la

especie M del esquema III-6; mientras que la especie 2 se corresponde con la N y la 3 con la C. Con estas premisas, el cálculo de la constante  $k_{CN}$  se puede realizar mediante la representación gráfica de  $\log(k'_{CN})$  vs  $\log[H^+]$ , en donde  $k'_{CN}$  es la constante de pseudo-primer orden definida como  $k'_{CN} = k_{CN}[H^+]$ .

Como ya se mencionó en la sección III.3, para conseguir una buena resolución en un análisis global compartimental, la disponibilidad de información *a priori* puede ser de gran ayuda. Para el sistema propuesto en este apartado, se dispone de cierta información previa, basada en los resultados de absorbancia, equilibrios ácido-base en estado fundamental y espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario. Esta información resultará de gran utilidad a la hora de realizar el análisis global tricompartmental propuesto. Los siguientes puntos recogen esta información *a priori*:

➤ Las especies neutra y monoaniónica no emiten a la longitud de onda de 450 nm. Por tanto, podrán utilizarse como parámetros fijos  $\tilde{\epsilon}_M(450nm) = \tilde{\epsilon}_N(450nm) = 0$ . Además, la emisión de estas especies a 470 nm tampoco es demasiado apreciable, si se compara con la del catión a esa longitud de onda. Esto último puede servir como orientación a la hora de juzgar un buen ajuste.

➤ Se conocen las características de excitación de todo el sistema. En efecto, al haberse calculado los valores de los distintos  $pK_a$  en el estado fundamental y los coeficientes de extinción molar, se pueden calcular los valores de  $\tilde{b}_i$  (ecuación II-8) en todos los casos. Esta información puede emplearse para fijar los parámetros  $\tilde{b}_i$ , o bien, como indicativo de la coherencia entre los resultados recuperados para los parámetros de excitación y los valores teóricos, lo que permite comprobar la adecuación al modelo inicialmente propuesto. Además, en el intervalo de pH que se estudiará, la contribución a la

excitación de la especie monoaniónica será prácticamente nula y la de especie neutra tampoco será muy alta.

➤ Se conocen también, de manera aproximada, los valores de  $pK^*$ , tanto de la reacción  $C^* \rightleftharpoons N^*$ , como de la  $N^* \rightleftharpoons M^*$ . Por la ley de acción de masas, se sabe que los valores de las constantes cinéticas de protonación y desprotonación proporcionan el valor aproximado de la constante de equilibrio, según la ecuación II-17. Por lo tanto, los valores de  $pK^*$  previamente calculados sirven de orientación y se pueden comparar con los valores obtenidos mediante las constantes cinéticas recuperadas del análisis global tricompartmental.

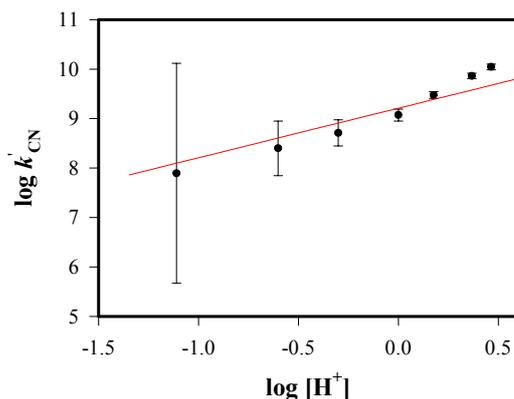
➤ El valor recuperado para la constante de desactivación de la especie monoaniónica, alrededor de  $3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  también será un dato importante para el ajuste global tricompartmental.

Como ya se ha indicado, al objeto de evitar procesos transitorios, efectos difusionales, etc., el análisis global tricompartmental propuesto, se centrará en un intervalo de concentraciones de protones comprendido entre una concentración de ácido perclórico alrededor de 3 M (2.91 M) y un valor de pH = 3. A estas concentraciones protónicas, el medio aún no tiene viscosidades extremadamente altas y se asumirá que el catión seguirá comportándose como un super-fotoácido en ausencia de procesos temporales transitorios. Además, el catión es la especie que va a ser preferentemente excitada, mientras que la excitación directa de las especies neutra y monoaniónica será minoritaria. La información *a priori* expuesta anteriormente se utilizará para fijar aquellos parámetros afectados. La superficie de decaimientos de fluorescencia ajustada estuvo formada por 38 decaimientos experimentales, los cuales fueron recogidos a once concentraciones ácidas diferentes entre 2.91 y  $10^{-3}$  M. Las longitudes de onda de emisión fueron 450, 470, 510, 515 y 550 nm para la configuración del TAC de 5.94 ps/canal y 450 y 470 nm para los decaimientos en la escala de 1.22 ps/canal. Con esta serie de decaimientos se consigue abarcar

la gama de longitudes de onda de emisión más característica del sistema, las dos escalas de tiempos empleadas en el TAC y una serie muy completa de valores de pH.

El mejor ajuste global tricompartmental de esta superficie de decaimientos de fluorescencia proporcionó los resultados que se discuten a continuación. El valor de  $\chi^2$  del ajuste fue de 1.145. Este valor se puede considerar muy aceptable dado el elevado número de decaimientos y parámetros implicados. Los valores de los  $\chi^2$  individuales estuvieron entre 1.009 y 1.289. Además, la inspección visual de la función de ajuste y la distribución al azar de los residuales y funciones de autocorrelación fue muy satisfactoria en todos los casos.

Una prueba adicional de la bondad del ajuste, en este caso, es la buena linealidad encontrada entre los diferentes valores recuperados de  $k'_{CN}$  frente a  $[H^+]$ . Además, la representación de  $\log(k'_{CN})$  frente a  $(-pH)$ , permite obtener la constante cinética  $k_{CN}$ , ya que esta representación proporciona el valor de la constante cinética de reprotonación de la especie neutra. Según el ajuste de la figura III-60,  $k_{CN} = (1.6 \pm 0.3) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor se encuentra dentro de los límites de una reacción controlada por difusión, aunque sensiblemente más bajo. Su cuantía se puede justificar debido a la alta fuerza de la especie catiónica excitada que resulta predominante y no favorece la reacción inversa. Así, la reprotonación pasa de estar controlada por difusión a un control cinético debido a la reacción inversa. En el ajuste, se emplearon los valores recuperados en el análisis global compartimental de la constante de pseudo-primer orden  $k'_{CN}$  a cada concentración protónica (esta constante tendió a cero para las disoluciones con  $[H^+]$  inferior a 0.0776 M) y la pendiente se mantuvo fija a 1, tal como preconiza la ecuación general II-25. De esta forma, la ordenada en el origen proporciona directamente el  $\log(k_{CN})$  ( $9.21 \pm 0.09$ ).



**Figura III-60:** Regresión lineal de los valores de  $\log(k'_{CN})$  frente a  $\log([H^+])$ . La ordenada en el origen permite calcular la constante  $k_{CN}$ .

Los valores recuperados de las constantes cinéticas de los procesos en estado excitado, junto con los valores de  $pK_a^*$  que corresponden a estas constantes, según la ley de acción de masas (ecuación II-17) y los tiempos de vida de las especies prototrópicas, se muestran en la tabla XXIII.

**Tabla XXIII:** Constantes cinéticas recuperadas del análisis global tricompartmental para el sistema  $C^* \rightleftharpoons N^* \rightleftharpoons M^*$ .

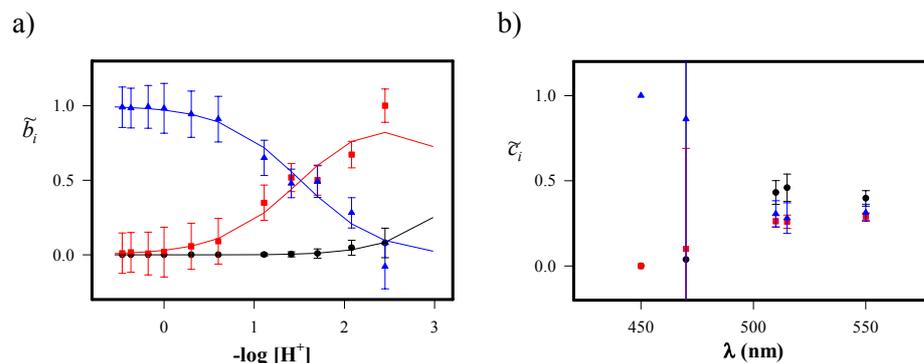
$k_{\theta C}$ ( $s^{-1}$ )	$(4.61 \pm 0.13) \times 10^8$	$\tau_C = 2.17 \pm 0.06$ ns
$k_{\theta N}$ ( $s^{-1}$ )	$(3.14 \pm 0.01) \times 10^8$	$\tau_N = 3.18 \pm 0.01$ ns
$k_{\theta M}$ ( $s^{-1}$ )	$(2.99 \pm 0.40) \times 10^8$	$\tau_M = 3.34 \pm 0.45$ ns
$k_{NM}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$(6.9 \pm 0.7) \times 10^{10}$	$pK_N^* = 2.98 \pm 0.28^{\text{e}}$
$k_{MN}$ ( $s^{-1}$ )	$(7.2 \pm 4.6) \times 10^7$	
$k_{CN}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^9$ <sup>o</sup>	$pK_C^* = -1.60 \pm 0.08^{\text{e}}$
$k_{NC}$ ( $s^{-1}$ )	$(6.4 \pm 0.1) \times 10^{10}$	
<sup>o</sup> Calculada según la regresión lineal de la figura III-60. <sup>e</sup> Calculados mediante la ecuación II-17.		

Los valores de los parámetros espectrales de excitación  $\tilde{b}_i$  y de emisión  $\tilde{\tau}_i$  se representan en la figura III-61, y se recogen en el tabla XXIV. Como puede observarse en la figura III-61-a), la concordancia es muy buena entre los valores de los parámetros de excitación recuperados y los calculados mediante la ecuación general II-8 empleando los resultados de absorciometría de la sección III.1.1.1. Además, las tendencias de los valores de emisión también son las que se derivan de las medidas de fluorescencia en estado estacionario. Los tiempos de decaimiento calculados a través de las ecuaciones generales derivadas del modelo, empleando las constantes cinéticas recuperadas del análisis global tricompartmental, se comparan con los tiempos de decaimiento obtenidos en los análisis globales en la figura III-62.

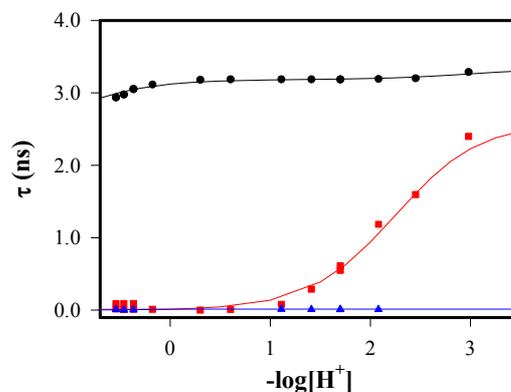
**Tabla XXIV:** Valores de los parámetros de excitación y emisión recuperados en el ajuste global tricompartmental.

[H <sup>+</sup> ] (mol/l)	$\tilde{b}_M$	$\tilde{b}_N$	$\lambda^{em}$ (nm)	$\tilde{\tau}_M$	$\tilde{\tau}_N$
0.00355	0.080 ± 0.099	1.000 ± 0.112	450	0 <sup>•</sup>	0 <sup>•</sup>
0.00832	0.047 ± 0.050	0.672 ± 0.089	470	0.038 ± 5.000	0.098 ± 0.590
0.0200	0.008 ± 0.031	0.501 ± 0.101	510	0.431 ± 0.070	0.263 ± 0.033
0.0389	0.003 ± 0.017	0.518 ± 0.094	515	0.459 ± 0.081	0.260 ± 0.039
0.0776	0.001 ± 0.009	0.349 ± 0.118	550	0.397 ± 0.045	0.290 ± 0.021
0.250	0 <sup>•</sup>	0.091 ± 0.153			
0.499	0 <sup>•</sup>	0.058 ± 0.155			
1.00	0 <sup>•</sup>	0.018 ± 0.167			
1.50	0 <sup>•</sup>	0.008 ± 0.144			
2.33	0 <sup>•</sup>	0.017 ± 0.133			
2.91	0 <sup>•</sup>	0.010 ± 0.136			

<sup>•</sup> Mantenidas fijas durante el proceso de ajuste.



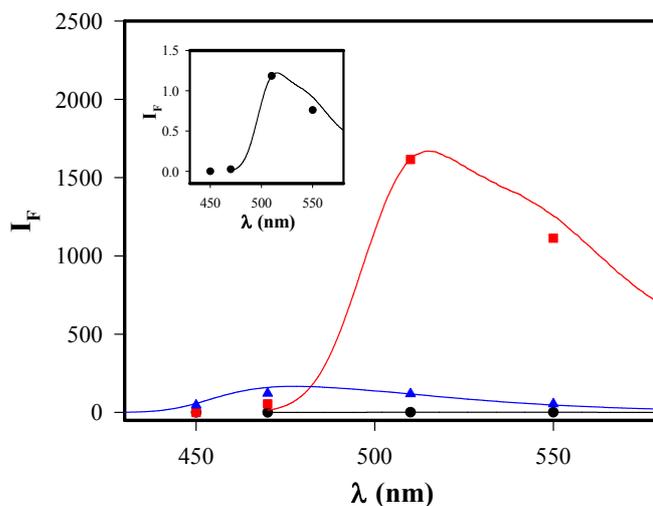
**Figura III-61:** Representación de los valores recuperados en el ajuste global tricompartmental de los parámetros de excitación frente al pH (a) y emisión frente a la longitud de onda de emisión (b) para las especies catiónica ( $\blacktriangle$ ), neutra ( $\blacksquare$ ) y monoaniónica ( $\bullet$ ). Se muestran también los valores calculados para los parámetros de excitación (líneas) a través de las ecuaciones generales empleando los resultados del apartado III.1.1.1.



**Figura III-62:** Representación de los tiempos de decaimiento frente al pH procedentes de los análisis globales (símbolos), comparados con los calculados (líneas) a través del modelo tricompartmental empleando las constantes cinéticas de la tabla XXIII.

En adición, se calcularon los espectros de emisión asociados a las especies (SAEMS), a través de la ecuación general I-31, y los valores recuperados para  $k_{ij}$ ,  $\tilde{b}_i$  y  $\tilde{z}_i$ . Como valor de fluorescencia total en estado estacionario se utilizó el número de cuentas totales recogidas para cada disolución bajo las mismas condiciones ópticas, en un mismo intervalo de tiempo (5 minutos). En la figura III-63 se muestran los SAEMS calculados para cada uno de los compartimentos a una concentración protónica de 2.33 M,

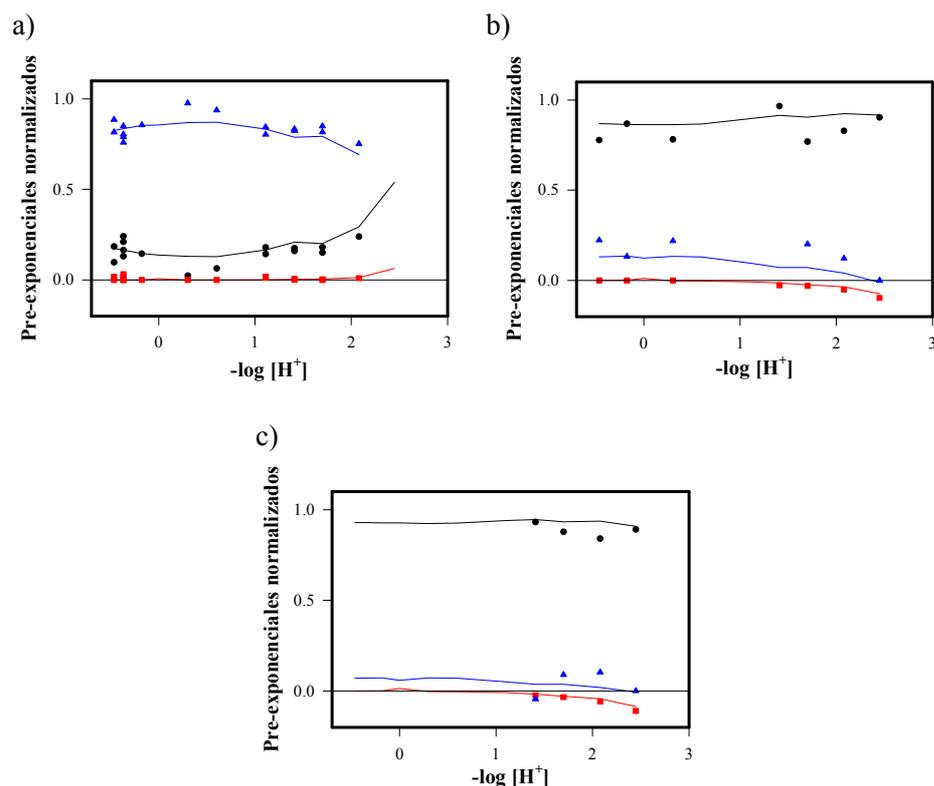
comparándose con los espectros de fluorescencia en estado estacionario asignados a cada especie.



**Figura III-63:** SAEMS de las especies M (●), N (■) y C (▲), calculados para la disolución de OG488 con  $\text{HClO}_4$  2.33 M, según la ecuación I-31 empleando los parámetros de las tablas XXIII y XXIV. Se muestran también los espectros de emisión, normalizados al valor de 510 nm, de las especies monoaniónica/neutra (— y —) y catiónica (—).

**Figura insertada:** Ampliación de la escala para apreciar el SAEMS de la especie monoaniónica.

Por último, los pre-exponenciales asociados, calculados a través de las ecuaciones generales (II-24) empleando los resultados del análisis global tricompartmental, se representan en la figura III-64 junto a los obtenidos en los ajustes globales. Se observa en esta figura la buena concordancia, a las diferentes longitudes de onda, entre ambos tipos de ajuste.



**Figura III-64:** Representación de los pre-exponenciales normalizados frente al pH, para los tres tiempos de decaimiento, largo (—●—), intermedio (—■—) y corto (—▲—), calculados según los resultados del análisis global tricompartmental, con la ecuación II-24 empleando los parámetros de las tablas XXIII y XXIV, a las longitudes de onda de 470 (a), 510 (b) y 515 nm (c). Se muestran también los correspondientes pre-exponenciales normalizados procedentes de los análisis globales asociados a los tiempos de decaimiento largo (●), intermedio (■) y corto (▲).

Por tanto, los resultados del análisis global compartimental describen de manera excelente el comportamiento fotofísico del sistema, tanto en términos de absorción y estado fundamental (valores de  $\tilde{b}_i$ ), fluorescencia en estado estacionario (valores de  $\tilde{c}_i$  y SAEMS), como en cuanto a los tiempos de decaimiento y pre-exponenciales asociados procedentes de análisis globales a cada concentración ácida.

III.4.3.1.- *Estudio de la identificabilidad del sistema tricompartimental.*

Debido a la complejidad del sistema tricompartimental y al elevado número de constantes cinéticas implicadas en el modelo (siete constantes), el estudio de la identificabilidad del sistema compartimental propuesto permite revelar si la solución encontrada es única, o por el contrario, las constantes recuperadas pueden tener ciertas relaciones entre sí.

En este apartado se discutirá el problema de la identificabilidad estructural para el modelo tricompartimental de ESPT, únicamente en términos de las constantes cinéticas. Este estudio también ha sido originalmente desarrollado en esta Memoria, ya que solo se encuentra publicado el estudio de identificabilidad estructural para procesos tricompartimentales competitivos en estado excitado (*Boens y Kowalczyk, 1996*). La identificabilidad estructural, como ya se ha comentado en esta memoria, consiste en la determinación de los parámetros de un sistema compartimental a través de los resultados de decaimientos de fluorescencia en ausencia total de error.

Según el modelo general (esquema II-5), la matriz compartimental viene dada por la ecuación II-20. A través de esta matriz, puede obtenerse la ecuación que determina los autovalores  $\gamma_i$ , que vendrá dada por el siguiente determinante:

$$\begin{vmatrix} -(k_{01} + k_{21}[\text{H}^+]) - \gamma & k_{12} & 0 \\ k_{21}[\text{H}^+] & -(k_{02} + k_{12} + k_{32}[\text{H}^+]) - \gamma & k_{23} \\ 0 & k_{32}[\text{H}^+] & -(k_{03} + k_{23}) - \gamma \end{vmatrix} = 0$$

(III-46)

Desarrollando el determinante, la ecuación a la que se llega es de tercer orden en  $\gamma$ , por lo que se obtienen tres soluciones para  $\gamma$ .

$$\begin{aligned} & \gamma^3 + (k_{01} + k_{21}[\text{H}^+] + S_2 + k_{32}[\text{H}^+] + S_3)\gamma^2 + \\ & + [(k_{01} + k_{21}[\text{H}^+])(S_2 + k_{32}[\text{H}^+]) + (k_{01} + k_{21}[\text{H}^+])S_3 + (S_2 + k_{32}[\text{H}^+])S_3]\gamma + \\ & + (k_{01} + k_{21}[\text{H}^+])(S_2 + k_{32}[\text{H}^+])S_3 - k_{23}k_{32}[\text{H}^+](k_{01} + k_{21}[\text{H}^+] + \gamma) - \\ & - k_{12}k_{21}[\text{H}^+](S_3 + \gamma) = 0 \end{aligned} \quad \text{(III-47)}$$

donde:

$$S_2 = k_{02} + k_{12} \quad \text{(III-48)}$$

$$S_3 = k_{03} + k_{23} \quad \text{(III-49)}$$

Desafortunadamente, las expresiones explícitas para las  $\gamma_i$  son no lineales y bastante complicadas. Así, se trabajará alternativamente con las funciones simétricas definidas por:

$$\sigma_1 = \gamma_1 + \gamma_2 + \gamma_3 \quad \text{(III-50)}$$

$$\sigma_2 = \gamma_1\gamma_2 + \gamma_1\gamma_3 + \gamma_2\gamma_3 \quad \text{(III-51)}$$

$$\sigma_3 = \gamma_1\gamma_2\gamma_3 \quad \text{(III-52)}$$

Desarrollando estas expresiones, en función de las constantes cinéticas y a un valor determinado de concentración protónica  $[\text{H}^+]_r$ , se obtiene:

$$\sigma_{1r} = -A - (k_{21} + k_{32})[\text{H}^+]_r \quad \text{(III-53)}$$

$$\sigma_{2r} = B + C[\text{H}^+]_r + k_{21}k_{32}[\text{H}^+]_r^2 \quad \text{(III-54)}$$

$$\sigma_{3r} = -D - E[\text{H}^+]_r - k_{03}k_{21}k_{32}[\text{H}^+]_r^2 \quad \text{(III-55)}$$

donde:

$$A = k_{01} + S_2 + S_3 \quad \text{(III-56)}$$

$$B = k_{01}S_2 + k_{01}S_3 + S_2S_3 \quad \text{(III-57)}$$

$$C = k_{21}(k_{02} + S_3) + k_{32}(k_{01} + k_{03}) \quad \text{(III-58)}$$

$$D = k_{01}S_2S_3 \quad \text{(III-59)}$$

$$E = k_{02}k_{21}S_3 + k_{01}k_{03}k_{32} \quad \text{(III-60)}$$

Diferentes valores de  $[H^+]$  darán distintas ecuaciones III-53, III-54 y III-55, con lo que empleando dos diferentes concentraciones de protones,  $[H^+]_a$  y  $[H^+]_b$ , de la ecuación III-53, se puede obtener:

$$k_{21} + k_{32} = \frac{\sigma_{1a} - \sigma_{1b}}{[H^+]_b - [H^+]_a} = P_1 \quad (III-61)$$

Y con cuatro diferentes valores de concentración protónica, y las respectivas ecuaciones  $\sigma_{2r}$ , puede obtenerse:

$$k_{21}k_{32} = \frac{1}{[H^+]_c + [H^+]_d - [H^+]_a - [H^+]_b} \times \left[ \frac{\sigma_{2c} - \sigma_{2d}}{[H^+]_c - [H^+]_d} - \frac{\sigma_{2a} - \sigma_{2b}}{[H^+]_a - [H^+]_b} \right] = P_2 \quad (III-62)$$

A través de estas dos ecuaciones, se podrán determinar las constantes de reprotonación, aunque no tienen una única solución, ya que ambas están totalmente correlacionadas, por lo que los dos valores serán intercambiables:

$$k_{21,32} = \frac{P_1 \pm \sqrt{P_1^2 - 4P_2}}{2} \quad (III-63)$$

Así, conociendo el producto  $k_{21}k_{32}$ , a partir de cuatro valores de pH y de las cuatro ecuaciones III-55 respectivas, se puede obtener un valor único para  $k_{03}$ :

$$-k_{03}k_{21}k_{32} = \frac{1}{[H^+]_c + [H^+]_d - [H^+]_a - [H^+]_b} \times \left[ \frac{\sigma_{3c} - \sigma_{3d}}{[H^+]_c - [H^+]_d} - \frac{\sigma_{3a} - \sigma_{3b}}{[H^+]_a - [H^+]_b} \right] = P_3 \quad (III-64)$$

$$k_{03} = -\frac{P_3}{P_2} \quad (III-65)$$

Además, de las ecuaciones III-53, III-54 y III-55, y tras la obtención de  $P_1, P_2$  y  $P_3$ , pueden obtenerse:

$$A = k_{01} + S_2 + S_3 = -\sigma_{1a} - P_1[H^+]_a \quad (\text{III-66})$$

$$B = k_{01}S_2 + k_{01}S_3 + S_2S_3 = \sigma_{2a} - P_2[H^+]_a^2 - \left[ \frac{\sigma_{2a} - \sigma_{2b}}{[H^+]_a - [H^+]_b} - P_2([H^+]_a + [H^+]_b) \right] \cdot [H^+]_a \quad (\text{III-67})$$

$$D = k_{01}S_2S_3 = P_3[H^+]_a^2 - \sigma_{3a} + \left[ \frac{\sigma_{3a} - \sigma_{3b}}{[H^+]_a - [H^+]_b} - P_3([H^+]_a + [H^+]_b) \right] \cdot [H^+]_a \quad (\text{III-68})$$

Ya que  $A, B$  y  $D$  se pueden conocer experimentalmente a través de los tiempos de decaimiento y la concentración experimental de protones, se puede resolver el sistema de tres ecuaciones en las incógnitas  $k_{01}, S_2$  y  $S_3$ . No obstante, el sistema de ecuaciones es no lineal y las tres incógnitas están completamente correlacionadas. Realizando varias sustituciones para despejar  $S_2$ , se alcanza:

$$S_2^3 - AS_2^2 + BS_2 - D = 0 \quad (\text{III-69})$$

Esta ecuación de tercer orden tendrá tres raíces reales y positivas. Estas tres soluciones corresponderán a  $S_2$ , pero también se corresponden con las soluciones de  $k_{01}$  y  $S_3$ . Por tanto, se obtendrán seis diferentes juegos de soluciones todas intercambiables entre sí. Es decir, llamando  $x_1, x_2$  y  $x_3$  a las raíces de la ecuación III-69, los seis conjuntos de soluciones para las incógnitas serán:

- 1)  $k_{01} = x_1; S_2 = x_2; S_3 = x_3$  ( $k_{23} = x_3 - k_{03}$ ).
- 2)  $k_{01} = x_1; S_2 = x_3; S_3 = x_2$  ( $k_{23} = x_2 - k_{03}$ ).
- 3)  $k_{01} = x_2; S_2 = x_1; S_3 = x_3$  ( $k_{23} = x_3 - k_{03}$ ).
- 4)  $k_{01} = x_2; S_2 = x_3; S_3 = x_1$  ( $k_{23} = x_1 - k_{03}$ ).
- 5)  $k_{01} = x_3; S_2 = x_1; S_3 = x_2$  ( $k_{23} = x_2 - k_{03}$ ).
- 6)  $k_{01} = x_3; S_2 = x_2; S_3 = x_1$  ( $k_{23} = x_1 - k_{03}$ ).

Sin embargo, a nivel práctico, se puede obtener un número menor de soluciones con el procedimiento que se describe a continuación. De las ecuaciones III-58 y III-60, no utilizadas hasta ahora, se despeja  $k_{02}$ , obteniendo:

$$k_{02} = \frac{C - k_{32}(k_{01} + k_{03}) - k_{21}S_3}{k_{21}} \quad (\text{III-70})$$

$$k_{02} = \frac{E - k_{01}k_{03}k_{32}}{k_{21}S_3} \quad (\text{III-71})$$

Además,  $C$  y  $E$  también pueden ser conocidas a través de los valores de  $\sigma_i$  a diferentes valores de pH, según:

$$C = \frac{\sigma_{2a} - \sigma_{2b}}{[\text{H}^+]_a - [\text{H}^+]_b} - P_2([\text{H}^+]_a + [\text{H}^+]_b) \quad (\text{III-72})$$

$$E = -\frac{\sigma_{3a} - \sigma_{3b}}{[\text{H}^+]_a - [\text{H}^+]_b} + P_3([\text{H}^+]_a + [\text{H}^+]_b) \quad (\text{III-73})$$

Igualando ahora las expresiones III-70 y III-71 se obtiene una expresión para  $k_{01}$ , en función de  $C$ ,  $E$ ,  $S_3$ ,  $k_{03}$ ,  $k_{21}$  y  $k_{32}$ :

$$k_{01} = \frac{S_3(k_{32}k_{03} + k_{21}S_3 - C) + E}{k_{32}(k_{03} - S_3)} \quad (\text{III-74})$$

Esta expresión proporciona seis valores diferentes para  $k_{01}$ , debido a los tres posibles valores de  $S_3$  (los denominados  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ), y los dos valores intercambiables para  $k_{21}$  y  $k_{32}$  (de la ecuación III-63). Sin embargo, de estas seis soluciones para  $k_{01}$ , tan solo una coincidirá con otro de los valores alternativos de  $k_{01}$ , que también son  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ . Es decir, aquella solución de la ecuación III-74 que coincida con  $x_1$ ,  $x_2$  o  $x_3$  será el valor correcto para  $k_{01}$ . Además esta coincidencia indicaría igualmente cuales son los valores correctos y únicos para  $S_3$ ,  $k_{21}$  y  $k_{32}$ , por lo que también se definirán de manera única  $k_{23}$  ( $= S_3 - k_{03}$ ),  $k_{02}$  (de III-70 o III-71),  $S_2$  (la raíz sobrante de  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ) y por consiguiente también queda definida  $k_{12}$  ( $= S_2 - k_{02}$ ).

Este desarrollo se ilustrará a continuación con los resultados obtenidos para las constantes cinéticas del sistema tricompartmental estudiado en esta Memoria (tabla XXIII). Como son necesarias cuatro concentraciones de protones, se utilizarán:  $[H^+]_a = 2$ ,  $[H^+]_b = 1$ ,  $[H^+]_c = 0.5$  y  $[H^+]_d = 0.05$  M. En la tabla XXV se muestran los tiempos de decaimiento obtenidos para cada concentración protónica ( $-1/\gamma_i$ ), así como los valores para  $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$  y  $\sigma_3$ .

**Tabla XXV:** Tiempos de decaimiento  $\tau$  y funciones  $\sigma$  a las concentraciones protónicas consideradas, con las constantes cinéticas de la tabla XXIII.

	$\tau_1$ (ps)	$\tau_2$ (ps)	$\tau_3$ (ps)	$\sigma_1$ ( $ns^{-1}$ )	$\sigma_2$ ( $ns^{-2}$ )	$\sigma_3$ ( $ns^{-3}$ )
$[H^+]_a = 2$ M	7.23	3115.5	14.78	-206.35	9427.3	-3004.7
$[H^+]_b = 1$ M	14.41	3149.0	15.15	-135.75	4625.4	-1455.2
$[H^+]_c = 0.5$ M	28.68	3166.8	15.32	-100.45	2307.2	-718.58
$[H^+]_d = 0.05$ M	261.7	3186.0	15.49	-68.68	268.08	-77.41

Con estos valores se pueden calcular  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ , según las ecuaciones III-61, III-62 y III-64. Así, se calculará el valor único para  $k_{03}$  por la ecuación III-65:

$$k_{03} = -\frac{P_3}{P_2} = -\frac{-50.8944 \text{ M}^{-2} \text{ ns}^{-3}}{110.4 \text{ M}^{-2} \text{ ns}^{-2}} = 0.461 \text{ ns}^{-1} \quad (\text{III-75})$$

Asimismo, a través de la ecuación III-63 se calcularán los dos posibles valores para  $k_{21}$  y  $k_{32}$ . Como se puede comprobar, las dos soluciones coinciden con los valores reales, aunque en este punto, aún no son asignables a cada una de las constantes cinéticas.

$$k_{21,32} = \frac{P_1 + \sqrt{P_1^2 - 4P_2}}{2} = 69 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1} \quad (\text{III-76})$$

$$k_{21,32} = \frac{P_1 - \sqrt{P_1^2 - 4P_2}}{2} = 1.6 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$$

Ahora, con  $[H^+]_a$  y  $[H^+]_b$ , y las ecuaciones III-66, III-67 y III-68 se calcula  $A$ ,  $B$  y  $D$  y se plantea el sistema de ecuaciones en  $k_{01}$ ,  $S_2$  y  $S_3$ :

$$A = 65.146 \text{ ns}^{-1} = k_{01} + S_2 + S_3 \quad (\text{III-77})$$

$$B = 44.2712 \text{ ns}^{-2} = k_{01}S_2 + k_{01}S_3 + S_2S_3 \quad (\text{III-78})$$

$$D = 7.4397 \text{ ns}^{-3} = k_{01}S_2S_3 \quad (\text{III-79})$$

que se puede resolver por la ecuación III-69. Así, se obtienen tres soluciones: 0.299, 0.386 y 64.461 ns<sup>-1</sup>, pero que aún no son asignables de forma unívoca a  $k_{01}$ ,  $S_2$  o  $S_3$ .

El siguiente paso es calcular  $C$  y  $E$  con las ecuaciones III-72 y III-73. En el ejemplo estudiado se obtienen los valores:  $C = 4470.691 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-2}$  y  $E = 1396.8326 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-3}$ . Utilizando a continuación la ecuación III-74, con los diferentes valores calculados para  $k_{21}$ ,  $k_{32}$  y  $S_3$ , se obtienen seis diferentes resultados para  $k_{01}$ . Estos valores se muestran en la tabla XXVI.

**Tabla XXVI:** Diferentes valores obtenidos para  $k_{01}$  según la ecuación III-74.

$k_{21}$ ( $\text{M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ )	$k_{32}$ ( $\text{M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ )	$S_3$ ( $\text{ns}^{-1}$ )	Ec. III-74	$k_{01}$ ( $\text{ns}^{-1}$ )
69	1.6	0.299	→	256.5
		0.386	→	-2652.4
		64.461	→	<b>0.299</b>
1.6	69	0.299	→	6.24
		0.386	→	-61.13
		64.461	→	62.97

Como puede observarse en la tabla XXVI, solo uno de los posibles valores de  $k_{01}$  coincide con las raíces de la ecuación III-69 (denominadas  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ). Así, el valor de  $k_{01}$  de 0.299 ns<sup>-1</sup> será el correcto, obtenido unívocamente a través del método propuesto, esto implica que los valores correctos para  $k_{21}$ ,  $k_{32}$  y  $S_3$  sean 69 M<sup>-1</sup> ns<sup>-1</sup>, 1.6 M<sup>-1</sup> ns<sup>-1</sup> y 64.461 ns<sup>-1</sup>, respectivamente. Además, como ya se dispone de valores únicos para  $k_{01}$  y  $S_3$ , la tercera raíz de la ecuación III-69 se puede asignar a  $S_2$  (= 0.386 ns<sup>-1</sup>). Por otra parte, el resultado para  $S_3$  permite

calcular  $k_{23}$ , con el valor obtenido previamente de  $k_{03}$  (con la ecuación III-75). Así, se obtiene que  $k_{23} = 64 \text{ ns}^{-1}$ . Seguidamente, se calcula  $k_{02}$  a través de la ecuación III-70:

$$k_{02} = \frac{C - k_{32}(k_{01} + k_{03}) - k_{21}S_3}{k_{21}} = 0.314 \text{ ns}^{-1} \quad (\text{III-80})$$

Finalmente,  $k_{12}$  se determina con este valor de  $k_{02}$  y el de  $S_2$ , a través de la ecuación III-48, obteniéndose que  $k_{12} = 0.072 \text{ ns}^{-1}$ .

De esta forma, se ha logrado comprobar que, a través de las ecuaciones derivadas del modelo tricompartmental, empleando cuatro diferentes concentraciones protónicas se puede obtener la identificabilidad del sistema en lo que se refiere a las constantes cinéticas.

Aunque no se han derivado las expresiones explícitas para obtener valores únicos de las constantes cinéticas, por ser demasiado complejas y poco operativas, se ha planteado un método de resolución general el cual permite la asignación unívoca de valores de las siete constantes cinéticas implicadas. El método de resolución propuesto resulta útil de forma general debido a que existe un sistema de ecuaciones en el que hay un número suficiente de ecuaciones independientes y todas las incógnitas resultan independientes entre sí, sin existir, de manera global, problemas de correlación entre ellas.

## ***IV. CONCLUSIONES***





A continuación se expondrán las conclusiones que se han podido establecer de acuerdo con los resultados experimentales mostrados, la bibliografía consultada y con la discusión que se ha efectuado en esta Memoria.

Por una parte, se han descrito los equilibrios ácido-base en estado fundamental del fluoróforo 2',7'-difluorofluoresceína, a través de medidas absorciométricas. Con respecto a estos estudios se pudo concluir:

❶ Se ha establecido la presencia de cuatro formas prototrópicas, a saber, catión, neutra, monoanión y dianión. Mediante la aplicación de dos metodologías diferentes, ajustes no lineales por mínimos cuadrados y análisis de componentes principales, se han calculado las tres constantes ácido-base implicadas en los equilibrios. Los resultados obtenidos por medio de ajustes no lineales por mínimos cuadrados y por análisis de componenetes principales fueron respectivamente:  $pK_C = 1.016 \pm 0.007 / 1.05 \pm 0.03$ ;  $pK_N = 3.61 \pm 0.01 / 3.40 \pm 0.05$ ;  $pK_M = 4.688 \pm 0.004 / 4.74 \pm 0.02$ . Se encontró que la halogenación del anillo xanténico produce una clara disminución en los valores de  $pK_a$  implicados, con respecto a los que presenta la fluoresceína.

❷ Asimismo, empleando ambas metodologías de análisis, se obtuvieron los perfiles espectrales de absorción de las cuatro especies prototrópicas. Por comparación con la fluoresceína, se encontró que la fluoración en las posiciones 2' y 7' no alteran las características espectroscópicas del anillo xanténico, en la mayoría de las especies.

❸ Mediante la descomposición espectral del perfil de absorción de la especie neutra y a través de medidas de  $^1\text{H-RMN}$ , se establecieron tres estructuras tautoméricas para la forma eléctricamente neutra: una quinoide, otra lactónica y una tercera con carácter zwitteriónico. La descomposición espectral en disolución acuosa ofreció unas proporciones de 3.4 % para la modificación zwitteriónica, 57.6 % para la quinoide y un 39 % para la especie neutra lactónica.

Por otro lado, el comportamiento ácido–base en estado excitado de la 2',7'-difluorofluoresceína se estudió mediante fluorimetría en estado estacionario y con resolución temporal. De los mencionados estudios se obtuvieron las siguientes conclusiones:

④ El análisis de las curvas de intensidad de fluorescencia frente al pH ha demostrado el carácter de “súper-fotoácido” de la especie catiónica de la 2',7'-difluorofluoresceína. La especie neutra también ha mostrado una tendencia a la desprotonación en el estado excitado mayor que en el estado fundamental. El valor recuperado para este  $pK_a^*$ , fue de  $2.67 \pm 0.06$ . En ausencia de un aceptor/dador adecuado, no se produce reacción de intercambio protónico en el estado excitado entre las especies monoaniónica y dianiónica.

⑤ Se ha propuesto un modelo tricompartmental para el estudio de las reacciones de transferencia protónica en estado excitado entre el catión, especie neutra y monoanión de la 2',7'-difluorofluoresceína. Con este modelo, se han obtenido las constantes cinéticas de las reacciones implicadas y los parámetros espectrales asociados, mediante la aplicación del análisis global compartimental. Los resultados han confirmado el carácter fotoácido fuerte de la especie catiónica, obteniéndose una constante de desprotonación en estado excitado de  $6.4 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ , de modo que el  $pK_a^*$  recuperado fue de  $-1.60$ . Las constantes cinéticas obtenidas para la ESPT entre la forma neutra y el monoanión proporcionaron un  $pK_a^*$  de 2.98. Los tiempos de vida de las especies fueron:  $\tau_C = 2.17 \pm 0.06 \text{ ns}$ ,  $\tau_N = 3.18 \pm 0.01 \text{ ns}$  y  $\tau_M = 3.34 \pm 0.45 \text{ ns}$ . También se encontró muy buena concordancia entre los parámetros espectrales asociados y los espectros de emisión calculados para cada una de las especies, con los resultados absorciométricos y de fluorescencia en estado estacionario. En adición, se ha realizado el estudio de identificabilidad estructural para las constantes cinéticas del sistema tricompartmental de ESPT. El estudio muestra que se obtienen valores únicos de todas las constantes cinéticas, con cuatro decaimientos a diferente pH.

También se ha estudiado el efecto de un aceptor/dador protónico, como es el sistema tampón, ácido acético/acetato, sobre los equilibrios ácido–base, así como su capacidad para promover la reacción de transferencia protónica en estado excitado entre las especies monoaniónica y dianiónica de la 2',7'-difluorofluoresceína. Sobre este punto se han establecido las siguientes conclusiones:

⑥ La adición del sistema tampón ácido acético/acetato no tiene efectos significativos sobre los espectros de absorción y las leves alteraciones encontradas han podido asignarse a efectos de fuerza iónica. Por lo tanto, la adición del mencionado tampón no modifica el estado fundamental de la 2',7'-difluorofluoresceína.

⑦ En cambio, la adición de concentraciones crecientes del aceptor/dador protónico origina una mayor contribución de la especie dianiónica en los espectros de emisión. Esto demuestra que las especies del tampón se comportan como aceptor y dador protónicos adecuados, en la transferencia protónica en estado excitado entre las especies monoaniónica y dianiónica de la 2',7'-difluorofluoresceína.

⑧ Para el análisis de la cinética de la ESPT promovida por un aceptor/dador protónico mediante el análisis global compartimental, se realizó previamente el estudio de identificabilidad estructural del sistema compartimental. El citado estudio tiene un doble valor: por un lado, demuestra que todas las constantes cinéticas se pueden obtener sin ambigüedad y, por otro, permite establecer previamente las condiciones óptimas de una superficie de decaimientos de fluorescencia, al objeto de programar los experimentos en condiciones de identificabilidad.

⑨ La cinética de la ESPT entre las especies monoaniónica y dianiónica de la 2',7'-difluorofluoresceína promovida por ácido acético/acetato se estudió empleando el análisis global compartimental. En la superficie de decaimientos de fluorescencia se han incluido decaimientos en presencia y en ausencia del

aceptor/dador protónico, para cumplir las condiciones de identificabilidad de las constantes cinéticas. Así, se han obtenido los tiempos de vida de las especies implicadas ( $\tau_M = 3.40 \pm 0.01$  ns,  $\tau_D = 4.05 \pm 0.02$  ns) y las constantes cinéticas de la reacción, de las que se obtiene un valor de  $pK_a^*$  de 4.02.

⑩ Aunque no se ha trabajado en condiciones de identificabilidad en la recuperación de los parámetros espectrales, la excelente concordancia entre éstos y las características espectrales del sistema, calculadas mediante absorciometría y fluorimetría en estado estacionario, hacen que la descripción del sistema compartimental se pueda considerar completa. A través de los valores de  $\tilde{b}_i$  recuperados se obtuvo el  $pK_a$  del estado fundamental. El valor de 4.72, así calculado, presenta una excelente concordancia con el obtenido mediante medidas de absorción. En adición, los espectros de emisión asociados a los compartimentos, también son concordantes con los espectros de emisión en estado estacionario asignados a cada una de las especies.

## ***V. BIBLIOGRAFÍA***





## A

- 
- Abdel-Shafi, A.A. *Spectrochim. Acta, A*, **57A**, 1819 (2001).
  - Abler, J.K.; Reddy, K.R.; Lee, C.S. *J. Chromatogr. A*, **759**, 139 (1997).
  - Acuña, A.U.; Amat, F.; Catalán, J.; Costela, A.; Figuera, J.M.; Muñoz, J.M. (a) *Chem. Phys. Lett.*, **132**, 567 (1986).
  - Acuña, A.U.; Amat-Guerri, F.; Costela, A.; Douhal, A.; Figuera, J.M.; Florido, F.; Sastre, R. *Chem. Phys. Lett.*, **187**, 98 (1991).
  - Acuña, A.U.; Costela, A.; Muñoz, J.M. (b) *J. Phys. Chem.*, **90**, 2807 (1986).
  - Agarwal, R.; Katare, O.P.; Vyas, S.P. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **22**, 129 (2000).
  - Agmon, N. *J. Chem. Phys.*, **88**, 5639 (1988).
  - Agmon, N.; Pines, E.; Huppert, D. *J. Chem. Phys.*, **88**, 5631 (1988).
  - Ainsworth, S. *J. Phys. Chem.*, **65**, 1968 (1961).
  - Al-Soufi, W.; Novo, M.; Mosquera, M. *Appl. Spectrosc.*, **55**, 630 (2001).
  - Allinger, N.L.; Cava, M.P.; De Jongh, D.C.; Jonson, C.R.; Lebel, N.A.; Stevens, C.L. *Organic Chemistry*. Worth Publishers, Inc., New York (1971).
  - Álvarez-Pez, J.M.; Talavera, E.M.; Afkir, M.; Ballesteros, L.; Bermejo, R. *Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends* (Carmona, P.; Navarro, P.; Hernanz, A., eds.) Kluwer Academic Publishers, Londres (1997).
  - Álvarez-Pez, J.M.; Ballesteros, L.; Talavera, E.; Yguerabide, J. *J. Phys. Chem. A*, **105**, 6320 (2001).
  - Ameloot, M. *Methods Enzymol.*, **210**, 237 (1992).
  - Ameloot, M.; Boens, N.; Andriessen, R.; Van den Bergh, V.; De Schryver, F.C. *J. Phys. Chem.*, **95**, 2041 (1991).
  - Ameloot, M.; Boens, N.; Andriessen, R.; Van den bergh, V.; De Schryver, F.C. *Methods Enzymol.*, **210**, 314 (1992).
  - Ameloot, M.; Hendrickx, H. *Biophys. J.*, **44**, 27 (1983).

- Anderson, D.H. *Compartmental Modeling and Tracer Kinetics* en *Lecture Notes in Biomathematics*, V **50**, Springer-Verlag, Berlín (1983).
  - Andriessen, R.; Boens, N.; Ameloot, M.; De Schryver, F.C. *J. Phys. Chem.*, **95**, 2047 (1991).
  - Arnaut, L.G.; Formosinho, S.J. *J. Phys. Chem.*, **92**, 685 (1988).
  - Arnaut, L.G.; Formosinho, S.J. *J. Photochem. Photobiol., A*, **75**, 1 (1993).
  - Artom, C.; Sarzana, G.; Segré, E. *Arch. Int. Physiol.*, **47**, 245 (1938).
  - Azadnia, A.; Campbell, R.; Sharma, M. *Anal. Biochem.*, **218**, 444 (1994).
- 
- 

## B

---

---

- Badea, M.G.; Brand, L. *Methods Enzymol.*, **61**, 378 (1979).
- Bajzer, V.; Prendergast, F.G. *Methods Enzymol.*, **210**, 201 (1992).
- Balcerowska, G.; Siuda, R. *Appl. Surf. Sci.*, **144-145**, 83 (1999).
- Ballesteros, L. *Tesis Doctoral*, Universidad de Jaén (1998).
- Balón, M.; Muñoz, M.A.; Hidalgo, J.; Carmona, M.C.; Sánchez, M. *J. Photochem.*, **36**, 193 (1987).
- Balón, M.; Hidalgo, J.; Guardado, P.; Muñoz, M.A.; Carmona, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 91 (1993).
- Bard, Y. En *Nonlinear Parameter Estimation*, Academic Press, NewYork, p201 (1974).
- Bardez, E. *Isr. J. Chem.*, **39**, 319 (1999).
- Bardez, E.; Boutin, P.; Valeur, B. *Chem. Phys. Lett.*, **191**, 142 (1992).
- Basañez, G.; Shinnar, A.E.; Zimmerberg, J. *FEBS Letters.*, **532**, 115 (2002).
- Beaven, A.E.; Paynter, K.T. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, **196**, 26 (1999).
- Beck, A.; Lohr, C.; Nett, W.; Deitmer, J.W. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.*, **442**, 263 (2001).
- Becquerel, H. *Acad. Sci. (Paris)*, **122**, 420 (1896).

- 
- Beechem, J.M. *Methods Enzymol.*, **210**, 37 (1992).
  - Beechem, J.M.; Ameloot, M.; Brand, L. *Chem. Phys. Lett.*, **120**, 466 (1985).
  - Beechem, J.M.; Gratton, E.; Ameloot, M.; Knutson, J.R.; Brand, L. *Topics in Fluorescence Spectroscopy Vol.2*, (Lakowicz, J., ed.) Plenum Press, New York (1991).
  - Beechem, J.M.; Knutson, J.R.; Ross, J.B.A.; Turner, B.W.; Brand, L. *Biochemistry*, **22**, 6054 (1983).
  - Benjathapanun, N.; Boyle, W.J.O.; Grattan, K.T.V. *Measurement*, **24**, 1 (1998).
  - Benke, A.R.; Thomson, R.M.; Shaw, L.A. *Am. J. Physiol.*, **114**, 137 (1935).
  - Berg, N.J.; Lee, J.N. *Acousto-Optic Signal Processing*, Marcel Dekker, New York (1983).
  - Berson, A.M.; Finger, P.T.; Sherr, D.L.; Emery, R.; Alfieri, A.A.; Bosworth, J.L. *J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **36**, 861 (1996).
  - Bevington, P.; Robinson, D.K. *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, 2<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, New York (1993).
  - Birch, D.J.S.; Imhof, R.E. *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, **10**, 1044 (1977).
  - Birch, D.J.S.; Imhof, R.E. *Rev. Sci. Instrum.*, **52**, 1026 (1981).
  - Birch, D.J.S.; Hungerford, G.; Imhof, R.E. *Rev. Sci. Instrum.*, **62**, 2405 (1991).
  - Birch, D.J.S.; McLoskey, D.; Sanderson, A.; Suhling, K.; Holmes, A.S. *J. Fluoresc.*, **4**, 91 (1994).
  - Blakeslee, D.; Baines, M.G. *J. Immunol. Methods*, **13**, 305 (1976).
  - Boens, N. *Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis*, (Baeyens, W.R.G.; De Keukeleire, D. y Korkidis, K., eds.) Dekker, New York (1991).
  - Boens, N.; Ameloot, M.; Yamazaki, I.; De Schryver, F.C. *Chem. Phys.*, **121**, 73 (1988).
  - Boens, N.; Ameloot, M.; Hermans, B.; De Schryver, F.C.; Andriessen, R. (a) *J. Phys. Chem.*, **97**, 799 (1993).

- Boens, N.; Andriessen, R.; Ameloot, M.; Van Dommelen, L.; De Schryver, F.C. *J. Phys.Chem.*, **96**, 6331 (1992).
- Boens, N.; Basarić, N.; Novikov, E.; Crovetto, L.; Orte, A.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M. Remitido a *J. Chem. Phys.* (2004).
- Boens, N.; Janssens, L.D.; De Schryver, F.C. *Biophys. Chem.*, **33**, 77 (1989).
- Boens, N.; Kowalczyk, A. *Chem. Phys. Lett.*, **260**, 326 (1996).
- Boens, N.; Kowalczyk, A.; Cielen, E. *J. Phys. Chem.*, **100**, 4879 (1996).
- Boens, N.; Szubiakowski, J.; Novikov, E.; Ameloot, M. *J. Chem. Phys.*, **112**, 8260 (2000).
- Boens, N.; Tamai, N.; Yamazaki, I. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 911 (1990).
- Boens, N.; Van Dommelen, L.; Ameloot, M. (b) *Biophys. Chem.*, **48**, 301 (1993).
- Bollinger L.M.; Thomas, G.E. *Rev. Sci. Instrum.*, **32**, 1044 (1961).
- Boutot, J.P.; Delmotte, J.C.; Miehé, J.A.; Si, B. *Rev. Sci. Instrum.*, **48**, 1405 (1977).
- Bowman, L.E.; Berglund, K.A.; Nocera, D.G. *Rev. Sci. Instrum.*, **64**, 338 (1993).
- Brain, K.L.; Trout, S.J.; Jackson, V.M.; Dass, N.; Cunnane, T.C. *Neuroscience*, **106**, 395 (2001).
- Brand, L.; Laws, W.R. *NATO ASI Ser., Ser. A*, **69**, 319 (1983).
- Bringham, K.L.; Meyrick, B.; Berry, L.C.; Repine, J.E. *J. Al. Physiol.*, **63**, 840 (1987).
- Brochon, J.-C. *Methods Enzymol.*, **240**, 262 (1994).
- Brownell, G.L.; Berman, M.; Robertson, J.S. *Int. J. Al. Rad. Isotopes*, **19**, 249 (1968).
- Buchberger, E.M.; Mollay, B.; Weixelbaumer, W.; Kauffmann, H.F.; Klöpffer, W. *J. Chem. Phys.*, **89**, 635 (1988).

- 
- Bulteau, A.; Moreau, M.; Nizard, C.; Friguet, B. *Free Radical Bio. Med.*, **32**, 1157 (2002).
- 

---

### C

---

- Cai, X.H.; Zhao, Z.F. *Anal. Chim. Acta*, **212**, 43 (1988).
- Campillo, A.J.; Clark, J.H.; Shapiro, S.L.; Winn, K.R. *Springer Ser. Chem. Phys.*, **4**, 319 (1978).
- Candy, B.H. *Rev. Sci. Instrum.*, **56**, 183 (1986).
- Capomacchia, A.C.; Schulman, S.G. *Anal. Chim. Acta*, **59**, 471 (1972).
- Carmeli, I.; Huppert, D.; Tolbert, L.M.; Haubrich, J.E. *Chem. Phys. Lett.*, **260**, 109 (1996).
- Cessna, S.G.; Low, P.S. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10655 (2001).
- Chan, M.S.; Bolton, J.R. *Solar Energ.*, **24**, 561 (1980).
- Chale, M.R.; Jonson, G.D.; Davidson, R.S. *J. Microsc.*, **159**, 254 (1990).
- Chattopadhyay, N. *J. Photochem. Photobiol., A*, **88**, 1 (1995).
- Chattopadhyay, N. *Int. J. Mol. Sci.*, **4**, 460 (2003).
- Chattopadhyay, N.; Chakraborty, T.; Nag, A.; Chowdhury, M. *J. Photochem. Photobiol., A*, **52**, 199 (1990).
- Chattopadhyay, N.; Chowdhury, M. *J. Photochem.*, **38**, 301 (1987).
- Chattopadhyay, N.; Dutta, R.; Chowdhury, M. (a) *J. Photochem. Photobiol. A*, **47**, 249 (1989).
- Chattopadhyay, N.; Samanta, A.; Kundu, T.; Chowdhury, M. (b) *J. Photochem. Photobiol., A*, **48**, 61 (1989).
- Chen, N.; Chrambach, A. *Electrophoresis*, **18**, 1126 (1997).
- Chen, R.F.; Knutson, J.R. *Anal. Biochem.*, **172**, 61 (1988).
- Cheng, Y.; Dovivhi, N.J. *Science*, **242**, 562 (1988).
- Chignell, C.F.; Sik, R.H. *Free Rad. Biol. Med.*, **34**, 1029 (2003).

- Chiu, H.; Chih, T.; Hsian, Y.; Tseng, C.; Wu, M.; Wu, Y. *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 319 (2003).
  - Choi, K.J.; Boczer, B.P.; To, M.R. *Springer Ser. Chem. Phys.*, **38**, 368 (1984).
  - Chou, P.; McMorro, D.; Aartsma, T.J.; Kasha, M. *J. Phys. Chem.*, **88**, 4596 (1984).
  - Clark, J.H.; Shapiro, S.L.; Campillo, A.J.; Winn, K.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 746 (1979).
  - Clower, C.; Solntsev, K.M.; Kowalik, J.; Tolbert, L.M.; Huppert, D. *J. Phys. Chem. A*, **106**, 3114 (2002).
  - Cohen, B.; Huppert, D. *J. Phys. Chem. A*, **105**, 7157 (2001).
  - Cohen, B.; Huppert, D.; Solntsev, K.M.; Tsfadia, Y.; Nachliel, E.; Gutman, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 7539 (2002).
  - Cole L., Orlovich, D.A., Ashford, E.A. *Fungal Genet. Biol.*, **24**, 86 (1998).
  - Confalone, P.N. *J. Heterocycl. Chem.*, **27**, 31 (1990).
  - Conte, J.C.; Martinho, J.M.G. *Chem. Phys. Lett.*, **134**, 350 (1987).
  - Cover, W.E.; Cornelisse, C.J.; Fleuren, G.J. *Cytometry*, **15**, 117 (1994).
  - Crovetto, L. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada (2003).
  - Crovetto, L.; Orte, A.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M. *Luminescence*, **17**, 230 (2002).
  - Crovetto, L.; Orte, A.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M.; Cotlet, M.; Thielemans, J.; De Schryver, F.C.; Boens, N. *J. Phys. Chem. A*, **108**, (2004). En prensa.
  - Cukier, R.I.; Zhu, J. *J. Chem. Phys.*, **110**, 9587 (1999).
- 

## D

---

- Davenport, L.; Knutson, J.R.; Brand, L. *Biochemistry*, **25**, 1186 (1986).
- Daxecker, H.; Raab, M.; Markovic, S.; Karimi, A.; Griesmacher, A.; Mueller, M. *Clin. Chim. Acta.*, **325**, 171 (2002).

- Delmotte, C.; Delmas, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2989 (1999).
  - Demas, J.N.; Crosby, G.A. *J. Phys. Chem.*, **75**, 991 (1971).
  - Denk, W.; Strickler, J.H.; Webb, W.W. *Science*, **248**, 73 (1990).
  - Dias, F.B.; Lima, J.C.; Maçanita, A.L.; Horta, A.; Piérola, I.F. *J. Phys. Chem. A*, **104**, 17 (2000).
  - Dias, A.; Varela, A.P.; Miguel, M.G.; Becker, R.S.; Burrows, H.D.; Maçanita, A.L. *J. Phys. Chem.*, **100**, 17970 (1996).
  - Dias, A.; Varela, A.P.; Miguel, M.G.; Maçanita, A.L.; Becker, R.S. *J. Phys. Chem.*, **96**, 10290 (1992).
  - Diehl, H. *Talanta*, **36**, 413 (1989).
  - Diehl, H.; Horchack-Morris, N. *Talanta*, **34**, 739 (1987).
  - Diehl, H.; Markuszewski, R. *Talanta*, **32**, 159 (1985).
  - Diehl, H.; Markuszewski, R. *Talanta*, **36**, 416 (1989).
  - Diehl, H.; Horchack-Morris, N.; Hefley, A.J.; Munson, L.F.; Markuszewski, R. *Talanta*, **33**, 901 (1986).
  - Dirks, R.W.; Van Gijlswijk, R.P.; Tullis, R.H.; Smit, A.B.; Van Minnen, J.; Van der Ploeg, M.; Raap, A.K. *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 467 (1990).
  - Dolbier, W.R.Jr.; Burkholder, C.; Abboud, K.A.; Loehle, D. *J. Org. Chem.*, **59**, 7688 (1994).
  - Draper, N.R.; Smith, R. En *Alied Regression Analysis*, 2<sup>a</sup> ed., Wiley, NewYork, p153 (1981).
  - Draxler, S.; Liitsch, M.E. *J. Phys. Chem.*, **97**, 11493 (1993).
  - Dreider, J.; Breitmaier, E.B.; Gocke, E.; Apfel, C.M.; Page, M.G. *Mutat. Res.*, **513**, 169 (2002).
  - Dutta, P.; Halder, A.; Mukherjee, S.; Sen, P.; Sen, S.; Bhattacharyya, K. *Langmuir*, **18**, 7867 (2002).
-

**E**

- 
- Eaimtrakan, S.; Prasad, Y.V.; Puthli, S.P.; Yoshikawa, Y.; Shibata, N.; Takada, K. *J. Pharmaceutics*, **250**, 111 (2003).
  - Eaton, D. F. *Tetrahedron*, **43**, 1551 (1987).
  - Ebato, H.; Gentry, C.A.; Herron, J.N.; Muller, W.; Okahata, Y.; Ringsdorf, H.; Suci, P.A. *Anal. Chem.*, **66**, 1683 (1994).
  - Eftink, M.R. *Methods Enzymol.*, **278**, 221 (1997).
  - Eisenfeld, J.; Ford, C.C. *Biophys. J.*, **26**, 73 (1979).
  - Elsaesser, T. En *Femtosecond Chemistry*, (Manz, J.; Woste L. eds.) VCH, Weinheim (1995).
  - Ellouze, C.; Piot, F.; Takahashi, M. *J. Biochem.*, **121**, 521 (1997).
  - Escabi-Perez, J.R.; Fendler, J.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2234 (1978).
- 

**F**

- 
- Fabian, W.M.F.; Schuler, S.; Wolfbeis, O.S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 853 (1996).
  - Fix, A.; Schröder, T.; Wallenstein, R. *Laser Optoelektron.*, **23**, 106 (1991).
  - Fixler, D.; Tirosh, R.; Zinman, T.; Shainberg, A.; Deutsch, M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **300**, 23 (2003).
  - Fontaniella, B.; Márquez, A.; Rodríguez, C.W.; Piñon, D.; Solas, M.T.; Vicente, C.; Legaz, M.E. *Plant Physiol. Bioch.*, **40**, 881 (2002).
  - Forés, M.; Durán, M.; Solà, M. *Chem. Phys.*, **260**, 53 (2000).
  - Forés, M.; Scheiner, S. *Chem. Phys.*, **246**, 65 (1999).
  - Formosinho, S.J.; Arnaut, L.G. *J. Photochem. Photobiol., A*, **75**, 21 (1993).
  - Förster, T. *Z. Elektrochem.*, **54**, 42 (1950).
  - Franco-Obregón, A.; Wang, H.W.; Clapham, D.E. *Biophys. J.*, **79**, 202 (2000).
  - Freeman, B.A.; Rosen, G.M.; Barber, M.J. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6590 (1986).
  - Fujio, M.; McIver, R.T.Jr.; Taft, R.W. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4017 (1981).

- 
- Furusjö, E.; Danielsson, L.G. *Anal. Chim. Acta*, **373**, 83 (1998).
- 

## G

---

- Gafni, A.; Modlin, R.L.; Brand, L. *J. Phys. Chem.*, **80**, 898 (1976).
- Gee, K.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1395 (1999).
- Genosar, L.; Cohen, B.; Huppert, D. *J. Chem. Phys. A*, **104**, 6689 (2000).
- George, L.D.; Ponta, G.M. *Eng. Geol.*, **65**, 159 (2002).
- Ghigginio, K.P.; Skilton, P.F.; Thistlewaite, P.J. *J. Photochem.*, **31**, 113 (1985).
- Giestas, L.; Chang, Y.; Lima, J.C.; Vautier-Giongo, C.; Lopes, A.; Maçanita, A.L.; Quina, F.H. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3263 (2003).
- Gil, S.; Rodríguez, E. *Física Re-creativa*, Pearson Educación, Madrid (2003).
- Godfrey, K. *Compartmental Models and Their Application*. Academic Press, London (1983).
- Goldberg, S.Y.; Pines, E.; Huppert, D. *Chem. Phys. Lett.*, **192**, 77 (1992).
- Gollnick, K.; Schenck, G.O. *Pure Appl. Chem.*, **9**, 507 (1964).
- Gong, B.; Gong, G. *Anal. Chim. Acta*, **394**, 171 (1999).
- Goodnough, M.C.; Oyler, G.; Fishman, P.S.; Johnson, E.A.; Neale, E.A.; Keller, J.E.; Te, W.H.; Clark, M.; Hartz, S.; Adler, M. *FEBS Letters*, **513**, 163 (2002).
- Goudier, I.; Del Rio, M.; Crabbé, L.; Copois, V.; Ychou, M.; Auffray, C.; Martineau, P.; Mechti, N.; Pommier, Y.; Pau, B. *FEBS Letters*, **529**, 232 (2002).
- Grams, Y.Y.; Alaruikka, S.; Lashley, L.; Caussin, J.; Whitehead, L.; Bouwstra, J.A. *European J. Pharm. Sci.*, **18**, 329 (2003).
- Gratama, J.W.; Kraan, J.; Levering, W.; Vanbockstaele, D.R.; Rijkers, G.T.; Vanderschoot, C.E. *Cytometry*, **30**, 109 (1997).
- Grinvald, A.; Steinberg, I.Z. *Anal. Biochem.*, **59**, 583 (1974).
- Grofcsik, A.; Kubinyi, M.; Ruzsinszky, A.; Veszpremi, T.; Jones, W.J. *J. Mol. Struct.*, **555**, 15 (2000).

- Grossweiner, L.I. *Radiat. Res. Rev.*, **2**, 345 (1970).
  - Gryczynski, I.; Malk, H.; Lakowicz, J.R. *Biospectroscopy*, **2**, 9 (1996).
  - Guyot, G.; Arnaud, R.; Lemaire, J. *J. Chim. Phys.*, **72**, 648 (1975).
- 
- 

## H

---

---

- Habenicht, A.; Hjelm, J.; Mukhtar, E.; Bergström, F.; Johansson, L.B.-A. *Chem. Phys. Lett.*, **354**, 367 (2002).
- Hansen, J.E.; Pines, E.; Fleming, G.R. *J. Phys. Chem.*, **96**, 6904 (1992).
- Haugland, R.P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9<sup>th</sup> ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA (2002).
- Hearon, J.Z. *Ann. NY Acad. Sci.*, **108**, 36 (1963).
- Hermans, B.; De Schryver, F.C.; van Stam, J.; Boens, N.; Jerome, R.; Teyssie, P.; Trossaert, G.; Goethals, E.; Schacht, E. *Macromolecules*, **28**, 3380 (1995).
- Hill, J.J.; Royer, C.A. *Methods Enzymol.*, **278**, 390 (1997).
- Houghtan, R.W. *J. Marine Syst.*, **37**, 31 (2002).
- Houston, B.; Peddie, D. *Anal. Biochem.*, **177**, 263 (1989).
- Howorth, J.R.; Ferguson, I.; Wilcox, D. *Proc. SPIE*, **2388**, 356 (1995).
- Htun, M.T. *Chem. Phys. Lett.*, **328**, 437 (2000).
- Htun, T. *J. Fluoresc.*, **13**, 323 (2003).
- Htun, M.T.; Suwaiyan, A.; Baig, A.; Klein, U.K.A. *J. Phys. Chem. A*, **102**, 8230 (1998).
- Htun, M.T.; Suwaiyan, A.; Klein, U.K.A. *Chem. Phys. Lett.*, **243**, 71 (1995).
- Htun, M.T.; Suwaiyan, A.; Klein, U.K.A. *Chem. Phys. Lett.*, **264**, 285 (1997).
- Huang, W.E.; Smith, C.C.; Lerner, D.N.; Thronton, S.F.; Oram, A. *Water Research*, **36**, 1843 (2002).
- Huang, Z.; Olson, N.A.; You, W.; Haugland, R.P. *J. Immunol. Methods*, **149**, 261 (1992).
- Hungerford, G.; Birch, D.J.S. *Meas. Sci. Technol.*, **7**, 121 (1996).

- Huppert, D.; Kolodney, E.; Gutman, M.; Nachliel, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6949 (1982).
  - Hynes, J.T.; Tran-Thi, T.-H.; Granucci, G. *J. Photochem. Photobiol. A*, **154**, 3 (2002).
- 

## I

---

- Il'ichev, Y.V.; Demyashkevich, A. B.; Kuzmin, M. G. *J. Phys. Chem.*, **95**, 3438 (1991).
  - Inoue, K.; Okumura, H.; Higuchi, T.; Oka, H.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. *Clin. Chim. Acta*, **325**, 157 (2002).
  - Ireland, J.F.; Wyatt, P.A.H. *Adv. Phys. Org. Chem.*, **12**, 131 (1976).
- 

## J

---

- Jacobs, D.; Angles, M.L.; Goodman, A.E.; Neilan, B.A. *FEMS Microbiol. Lett.*, **152**, 65 (1997).
- Jacquez, J.A. *Compartmental Analysis in Biology and Medicine*. Elsevier, New York (1972).
- Jang, Y.H.; Hwang, S.; Chung, D.S. *Chem. Lett.*, **12**, 1316 (2001).
- Jankowski, A.; Dobryszycski, P.; Lipiński, J.; Stefanowicz, P. *J. Fluoresc.*, **8**, 103 (1998).
- Jankowski, A.; Stefanowicz, P. *J. Photochem. Photobiol. A*, **84**, 143 (1994).
- Jankowski, A.; Stefanowicz, P.; Dobryszycski, P. *J. Photochem. Photobiol., A*, **69**, 57 (1992).
- Jankowski, A.; Wiczak, W.; Janiak, T. *J. Photochem. Photobiol. A*, **85**, 69 (1995).
- Janssens, L. D.; Boens, N.; Ameloot, M.; De Schryver, F. C. *J. Phys. Chem.*, **94**, 3564 (1990).

- Johnson, M.L.; Correia, J.J.; Halvorson, H.R.; Yphantis, D.A. *Biophys. J.*, **36**, 575 (1981).
  - Johnson, M.L.; Frasier, S.G. *Methods Enzymol.*, **117**, 301 (1985).
- 

## K

---

- Kamiya, H.; Zucker, R.S. *Nature*, **371**, 603 (1994).
- Kankare, J.J. *Anal. Chem.*, **42**, 1322 (1970).
- Karolczak, J.; Komar, D.; Kubicki, J.; Wrózowa, T.; Dobek, K.; Ciesielska, B.; Maciejewski, A. *Chem. Phys. Lett.*, **344**, 154 (2001).
- Kasaian, M.T.; Jacobberger, J.W.; Neet, K.E. *Exp. Cell Res.*, **210**, 77 (1994).
- Kasha, M. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **82**, 2379 (1986).
- Kelly, R.N.; Schulman, S.G. *En Progress in Analytical Luminescence, ASTM STP 1009*, (Eastwood, D.; Cline Love, L.J., eds.) Am. Soc. Testing & Materials, Philadelphia (1988).
- Khalil, M.M.H.; Boens, N.; De Schryver, F.C. *J. Phys. Chem.*, **97**, 3111 (1993).
- Khalil, M.M.H.; Boens, N.; Van der Auweraer, M.; Ameloot, M.; Andriessen, R.; Hofkens, J.; De Schryver, F.C. *J. Phys. Chem.*, **95**, 9375 (1991).
- Kim, S.K.; Bren, J.J.; Willberg, D.M.; Peng, L.W.; Heikal, A.; Syage, J.A.; Zewail, A.H. *J. Phys. Chem.*, **99**, 7421 (1995).
- Kimura, K.; Arata, Y.; Yasuda, T.; Kinoshita, K.Jr.; Nakanishi, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **1104**, 9 (1992).
- Kinoshita, S.; Ohta, H.; Kushida, T. *Rev. Sci. Instrum.*, **52**, 572 (1981).
- Klonis, N.; Sawyer, W.H. *J. Fluoresc.*, **6**, 147 (1996).
- Klöpffer, W. *Adv. Photochem.*, **10**, 311 (1977).
- Knutson, J.R.; Beechem, J.M. *Chem. Phys. Lett.*, **102**, 501 (1983).
- Knutson, J.R.; Beechem, J.M.; Brand, L. *Chem. Phys. Lett.*, **102**, 501 (1983).

- 
- Kowalczyk, A.; Meuwis, K.; Boens, N.; De Schryver, F.C. *J. Phys. Chem.*, **99**, 17349 (1995).
  - Koziolowa, A.; Visser, N.V.; Koziol, J.; Szafran, M.M. *J. Photochem. Photobiol. A*, **93**, 157 (1996).
  - Kubista, M.; Sjöback, R.; Albinsson, B. (a) *Anal. Chem.*, **65**, 994 (1995).
  - Kubista, M.; Sjöback, R.; Nygren, J. (b) *Anal. Chim. Acta*, **302**, 121 (1995).
  - Kvietys, P.R.; Inauen, W.; Bacon, B.R.; Grisham, M.B. *J. Al. Physiol.*, **257**, H1640 (1989).
- 

## L

---

- Laenen, K.; Laubereau, A. *Opt. Lett.*, **19**, 1553 (1994).
- Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1999).
- Lakowicz, J.R.; Balter, A. *Chem. Phys. Lett.*, **92**, 117 (1982).
- Lakowicz, J.R.; Gryczynski, I. *J. Fluoresc.*, **2**, 247 (1992).
- Lakowicz, J.R.; Gryczynski, I.; Danielsen, E. *Chem. Phys. Lett.*, **191**, 47 (1992).
- Lang, V.B.; Langguth, P.; Ottiger, C.; Wunderliallenspach, H.; Rognan, D.; Rothenrutishauser, B.; Perriard, J.C.; Lang, S.; Biber, J.; Merkle, H.P. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 846 (1997).
- Lasser, N.; Feitelson, J. *J. Phys. Chem.*, **77**, 1011 (1973).
- Launikonis, B.S.; Stephenson, D.G. *Cell Biol. Int.*, **26**, 921 (2002).
- Lawrence, M.; Marzzaco, J.C.; Morton, C.; Schwab, C.; Halpern, A.M. *J. Phys. Chem.*, **95**, 10294 (1991).
- Laws, W.R.; Brand, L. *J. Phys. Chem.* **83**, 795 (1979).
- Laws, W.R.; Sutherland, J.C. *Photochem. Photobiol.*, **444**, 434 (1986).
- Lee, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 427 (1989).
- Lee, J.; Griffin, R.D.; Robinson, G.W. *J. Chem. Phys.*, **82**, 4920 (1985).

- Lentz, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33**, 1315 (1994).
  - Leonhardt, H.; Gordon, L.; Livingston, R. *J. Phys. Chem.*, **75**, 245 (1971).
  - Li, F.; Omori, N.; Sato, K.; Jin, G.; Nagano, I.; Manabe, Y.; Shoji, M.; Abe, K. *Brain Res.*, **958**, 83 (2002).
  - Lide, D.R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84<sup>th</sup> Edition*. CRC Press, Inc., Florida (2003).
  - Lima, J.C.; Abreu, I.; Brouillard, R.; Maçanita, A.L. *Chem. Phys. Lett.*, **298**, 189 (1998).
  - Lin, Y.Q.; Brain, K.L.; Bennett, M.R. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **73**, 26 (1998).
  - Linden, S.M.; Neckers, D.C. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1257 (1988).
  - Lindqvist, A.K.; Magnusson, P.K.; Balciuniene, J.; Wadelius, C.; Lindholm, E.; Alarcon-Riquelme, M.E.; Gyllensten, U.B. *Genome Res.*, **6**, 1170 (1996).
  - Loken, M.R.; Hayes, J.W.; Gohlke, J.R.; Brand, L. *Biochemistry*, **11**, 4779 (1972).
  - Lominadze, D.; Dean, W.L. *FEBS Letters*, **517**, 41 (2002).
  - López, R.J.; González, F.; Moreno, F. *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 3268 (1992).
  - Lorite, P.; Aranega, A.E.; Luque, F.; Palomeque, T. *Heredity*, **78**, 578 (1997).
  - Ludescher, R.D. *Spectroscopy*, **5**, 20 (1990).
  - Lytle, F.E.; Dinke, D.M.; Fisher, W.G. *Appl. Spectrosc.*, **47**, 2002 (1993).
  - Lytle, E.; Kelsey, M.S. *Anal. Chem.*, **46**, 855 (1974).
- 

## M

---

- Maçanita, A.L.; Moreira, P.F.Jr.; Lima, J.C.; Quina, F.H.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C. *J. Phys. Chem. A*, **106**, 1248 (2002).
- Makrigiorgos, G.M.; Kassis, A.I.; Mahmood, A.; Bump, E.A.; Savvides, P. *Free Radical Biol. Med.*, **22**, 93 (1997).
- Marquardt, D.W. *J. Soc. Indust. Al. Math.* **11**, 431 (1963).
- Martin, M.; Lindqvist, L. *J. Lumin.*, **10**, 381 (1975).

- 
- Martynov, I.Y.; Demyashkevich, A.B.; Kuzmin, M.G. *Russ. Chem. Rev.*, **46**, 1 (1977).
  - Massad, A.; Huppert, D. *Chem. Phys. Lett.*, **180**, 409 (1991).
  - Matayoshi, E.D.; Sawyer, W.H.; Jovin, T.M. *Biochemistry*, **30**, 3538 (1991).
  - Maus, M.; Rousseau, E.; Cotlet, M.; Schweitzer, G.; Hofkens, J.; Van der Auweraer, M.; De Schryver, F.C. *Rev. Sci. Instrum.*, **72**, 36 (2001).
  - Mchedlov-Petrosyan, N.O.; Kleshchevnikova, V.N. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **90**, 629 (1994).
  - Mchedlov-Petrosyan, N.O.; Mayorga, R.S. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **88**, 3025 (1992).
  - McLoskey, D.; Birch, D.J.S.; Sanderson, A.; Suhling, K.; Welch, E.; Hicks, P.J. *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 2228 (1996).
  - Melo, M.J.; Bernardo, M.A.; Melo, E.C.; Pina, F. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **92**, 957 (1996).
  - Meloun, M.; Čapek, J.; Mikšík, P.; Brereton, R.G. *Anal. Chim. Acta*, **423**, 51 (2000).
  - Mertz, J.; Xu, C.; Webb, W.W. *Opt. Lett.*, **47**, 2532 (1995).
  - Meuwis, K.; Depuydt, G.; Boens, N.; De Schryver, F. C. (a) *Chem. Phys. Lett.*, **246**, 641 (1995).
  - Meuwis, K.; Boens, N.; De Schryver, F.C.; Gallay, J.; Vincent, M. (b) *Biophys. J.*, **68**, 2469 (1995).
  - Meuwis, K.; Boens, N.; Gallay, J.; Vincent, M. *Chem. Phys. Lett.*, **287**, 412 (1998).
  - Miller, D.S.; Barnes, D.M.; Pritchard, J.B. *Amer. J. Physiol.*, **267**, R16 (1994).
  - Miralles, E.; Prat, D.; Compano, R.; Granados, M. *Analyst*, **122**, 553 (1997).
  - Mironczyk, A.; Jankowski, A. *J. Photochem. Photobiol. A*, **153**, 89 (2002).
  - Mishra, A.K. *Mol. Supramol. Photochem.*, **8**, 577 (2001).
  - Montcourrier, P.; Mangeat, P.H.; Valembois, C.; Salazar, G.; Sahuquet, A.; Duperray, C.; Rochefort, H. *J. Cell. Sci.*, **107**, 2381 (1994).

- Moreira, P.F.Jr.; Giestas, L.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C.; Quina, F.H.; Maçanita, A.L.; Lima, J.C. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 4203 (2003).
  - Murao, T.; Yamazaki, I.; Yoshihara, K. *Al. Opt.*, **21**, 2297 (1982).
  - Murchie, A.I.H.; Clegg, R.M.; Kitzing, E.; Duckett, D.R.; Diekmann, S.; Lilley, D.M.J. *Nature*, **341**, 763 (1989).
- 

## N

---

- Nag, K.; Taneva, S.G.; Perezgil, J.; Cruz, A.; Keough, K.M.W. *Biophys. J.*, **72**, 2638 (1997).
  - Neckers, D.C. *J. Photochem. Photobiol. A*, **47**, 1 (1989).
  - Nedergaard, M.; Desai, S.; Pulsinelli, W. *Anal. Biochem.*, **187**, 109 (1990).
  - Nouadje, G.; Simeon, N.; Dedieu, F.; Nertz, M.; Puig, P.; Couderc, F. *J. Chromatogr. A*, **765**, 337 (1997).
- 

## O

---

- O'Connor, D.V.; Phillips, D. *Time-correlated Single Photon Counting*. Academic Press, London (1984).
  - Ohki, E.; Kato, S.; Horie, Y.; Mizukami, T.; Tamai, H.; Yokoyama, H.; Ito, D.; Fukuda, M.; Suzuki, H.; Kurose, I.; Ishii, H. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **20**, A350 (1996).
  - Orte, A.; Crovetto, L.; Bermejo, R.; Talavera, E.M., Álvarez-Pez, J.M. *Luminescence*, **17**, 233 (2002).
- 

## P

---

- Paayee, N.; Mishra, A.K. *Spectrochim. Acta, Part A*, **56A**, 1027 (2000).
- Pardo, A.; Reyman, D.; Martín, E.; Poyato, J.M.L. *J. Lumin.*, **51**, 269 (1992).

- Parthenopoulos, D.A.; McMorrow, D.; Kasha, M. *J. Phys. Chem.*, **95**, 2668 (1991).
  - Pavelavrancic, M.; Pfeifer, E.; Schroder, W.; Vondohren, H.; Kleinkauf, H. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14962 (1994).
  - Petrov, V.; Seifert, F.; Noack, F. *Al. Phys. Lett.*, **65**, 268 (1994).
  - Pina, F.; Melo, M.J.; Bernardo, M.A.; Luis, S.V.; García-España, E. *J. Photochem. Photobiol. A*, **126**, 65 (1999).
  - Pina, F.; Melo, M.J.; Alves, S.; Ballardini, R.; Maestri, M.; Passaniti, P. *New J. Chem.*, **25**, 747 (2001).
  - Pines, E.; Huppert, D. (a) *Chem. Phys. Lett.*, **126**, 88 (1986).
  - Pines, E.; Huppert, D. (b) *J. Chem. Phys.*, **84**, 3576 (1986).
  - Pines, E.; Huppert, D.; Agmon, N. *J. Chem. Phys.*, **88**, 5620 (1988).
  - Pines, E.; Magnes, B.Z.; Lang, M.J.; Fleming, G.R. *Chem. Phys. Lett.*, **281**, 413 (1997).
  - Politi, M.J.; Brandt, O.; Fendler, J.H. *J. Phys. Chem.*, **89**, 2345 (1985).
  - Poltl, R.; Luckenbach, C.; Fimmers, R.; Ritter, H. *Electrophoresis*, **18**, 2871 (1997).
  - Pouget, J.; Mugnier, J.; Valeur, B. *J. Phys. E*, **22**, 855 (1989).
  - Prater, M.R.; Gogal, R.M.; Blaylock, B.L.; Longstreth, J.; Holladay, S.D. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1863 (2002).
  - Purkayastha, P.; Bera, S.Ch.; Chattopadhyay, N. *J. Mol. Liq.*, **88**, 33 (2000).
- 
- 

## R

---

- Regel, R.H.; Ferris, J.M.; Ganf, G.G.; Brookes, J. *Aquat. Toxicol.*, **59**, 209 (2002).
- Ren, Y.; Ridsdale, A.; Coderre, E.; Stys, P.K. *J. Neurosci. Methods*, **102**, 165 (2000).
- Rescigno, A. *Pharm. Res.*, **39**, 471 (1999).

- Rescigno, A *Pharm. Res.*, **44**, 335 (2001).
  - Rescigno, A.; Segre, G. *Drug and Tracer Kinetics*, Blaisdell. Waltham, Massachusetts (1966).
  - Reyes-Lopez, M.; Serrano-Luna, J.J; Negrete-Abascal, E.; León-Sicaros, N.; Guerrero-Barrera, A.L.; de la Garza, M. *Exp. Parasitol.*, **99**, 132 (2001).
  - Reyman, D.; Viñas, M.H.; Camacho, J.J. *J. Photochem. Photobiol. A*, **120**, 85 (1999).
  - Reyman, D.; Viñas, M.H.; Poyato, J.M.L.; Pardo, A. *J. Phys. Chem. A*, **101**, 768 (1997).
  - Rice, S.A.; *Diffusion-Limited Reactions*, Comprehensive Chemical Kinetics, **25**, Elsevier, Amsterdam (1985).
  - Roberts, C.J.; Raymond, C.K.; Yamashiro, C.T.; Stevens, T.H. *Methods Enzymol.*, **194**, 644 (1991).
  - Robertson, A.; Klein, M.E.; Tremont, M.A.; Boller, K.J.; Wallenstein, R. *Opt. Lett.*, **25**, 657 (2000).
  - Royall, J.A.; Ischiropoulos, H. *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 348 (1993).
  - Rozwadowski, M. *Acta Phys. Pol.* **20**, 1005 (1961).
  - Rusinova, E.; Tretyachenko-Ladokhina, V.; Vele, O.E.; Seneor, D.F.; Alexander Ross, J.B. *Anal. Biochem.*, **308**, 18 (2002).
  - Rutherford, E. *Philos. Trans., Royal Soc. Lond.*, **204**, 169 (1904).
  - Rutherford, E.; Soddy, B.A. *Philos. Mag.*, **4**, 370 (1902).
  - Ryan, E.T.; Xiang, T.; Johnston, K.P.; Fox, M.A. *J. Phys. Chem.*, **100**, 9395 (1996).
- 

## S

---

- Safavi, A.; Baezzat, M.R. *Anal. Chim. Acta*, **358**, 121 (1998).
- Safavi, A.; Karimi, M.A. *Talanta*, **57**, 491 (2002).
- Sakurovs, R.; Ghiggino, K.P. *J. Photochem.*, **18**, 1 (1982).

- 
- Samanta, A.; Chattopadhyay, N.; Nath, D.; Kundu, T.; Chowdhury, M. *Chem. Phys. Lett.*, **121**, 507 (1985).
  - Sarkar, M.; Ray, J.G.; Sengupta, P.K. *J. Photochem. Photobiol., A*, **95**, 157 (1996).
  - Sarkar, M.; Sengupta, P.K. *Chem. Phys. Lett.*, **179**, 68 (1991).
  - Šašić, S. *Spectrochim. Acta, A*, **57**, 323 (2001).
  - Schmitt, E.; Lehmann, E.; Metzler, M.; Stoer, H. *Toxicol. Lett.*, **136**, 133 (2002).
  - Schulman, S.G.; Rosenberg, L.S. *J. Phys. Chem.*, **83**, 447 (1979).
  - Schulman, S.G.; Vogt, B.S. *J. Phys. Chem.*, **85**, 2074 (1981).
  - Schulman, S.G.; Winefordner, J.D. *Talanta*, **17**, 607 (1970).
  - Schwartz, B.J.; Peteanu, L.A.; Harris, C.B. *J. Phys. Chem.*, **96**, 3591 (1992).
  - Schweitzer, G; Xu, L.; Craig, B.; De Schryver, F.C. *Opt. Commun.*, **142**, 283 (1997).
  - Seabra, S.H.; Souza, W.; DaMatta, R.A. *Exp. Parasitol.*, **100**, 62 (2002).
  - Seixas de Melo, J.; Maçanita, A.L. *Chem. Phys. Lett.*, **204**, 556 (1993).
  - Sevall, J.S. *Mol. Cell. Probes*, **14**, 249 (2000).
  - Shah, J.; Joshi, N.B.; Pant, D.D. *Indian J. Pure Al. Phys.*, **21**, 677 (1983).
  - Shah, J.; Joshi, N.B.; Pant, D.D. *Curr. Sci.*, **53**, 255 (1984).
  - Shah, J.; Pant, D.D. *Curr. Sci.*, **54**, 1040 (1985).
  - Shaikh, S.; Ruby, A.J.; Williams, G. *Am. J. Ophthalmol.*, **135**, 1 (2003).
  - Sharma, S.; Johnson, R.W.; Desai, T.A. *Al. Surf. Sci.*, **206**, 218 (2003).
  - Sheard, C.W. *J. Al. Phys.*, **19**, 70 (1948).
  - Shiobara, S.; Kamiyama, R.; Tajima, S.; Shizuka, H.; Tobita, S. *J. Photochem. Photobiol. A*, **154**, 53 (2002).
  - Shizuka, H. *Acc. Chem. Res.*, **18**, 141 (1985).
  - Shizuka, H.; Fukushima, M.; Fujii, T.; Kobayashi, T.; Ohtani, H.; Hoshino, M. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **58**, 2107 (1985).

- Shizuka, H.; Ogiwara, T.; Narita, A.; Sumitani, M.; Yoshihara, K. *J. Phys. Chem.*, **90**, 6708 (1986).
- Sikorska, E.; Koziolowa, A. *J. Photochem. Photobiol. A*, **95**, 215 (1996).
- Sims, P.J. *Biochemistry*, **23**, 3248 (1984).
- Singer, V.L.; Jones, L.J.; Yue, S.T.; Haugland, R.P. *Anal. Biochem.*, **249**, 228 (1997).
- Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. *Spectrochim. Acta A*, **51**, L7 (1995).
- Slentz, B.E.; Penner, N.A.; Regnier, F.E. *J. Chromatogr. A.*, **984**, 97 (2003).
- Small, E.W. *Methods Enzymol.*, **210**, 237 (1992).
- Small, E.W.; Libertini, L.J.; Isenberg, I. *Rev. Sci. Instrum.*, **55**, 879 (1984).
- Smith, L.M.; Sanders, J.Z.; Kaiser, R.J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Connell, C.R.; Heiner, C.; Kent, S.B.H.; Hood, L.E. *Nature*, **321**, 674 (1986).
- Solntsev, K.M.; Huppert, D.; Agmon, N. *J. Phys. Chem. A*, **103**, 6984 (1999).
- Solntsev, K.M.; Huppert, D.; Agmon, N.; Tolbert, L.M. *J. Phys. Chem. A*, **104**, 4658 (2000).
- Solntsev, K.M.; Il'ichev, Y.V.; Demyashkevich, A.B.; Kuzmin, M.G. *J. Photochem. Photobiol., A*, **78**, 39 (1994).
- Solntsev, K.M.; Tolbert, L.M.; Cohen, B.; Huppert, D.; Hayashi, Y.; Feldman, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9046 (2002).
- Somanath, P.R.; Gandhi, K.K. *Anim. Reprod. Sci.*, **74**, 195 (2002).
- Song, L.; Hennink, E.J.; Young, T.; Tanke, H.J. *Biophys. J.*, **68**, 2588 (1995).
- Song, L.; Varma, C.A.G.O.; Verhoeven, J.W.; Tanke, H. *Biophys. J.*, **70**, 2959 (1996).
- Spears, K.G.; Cramer, L.E.; Hoffland, L.D. *Rev. Sci. Instrum.*, **49**, 255 (1978).
- Squires, M.S.; Hudson, E.A.; Howells, L.; Stale, S.; Houghton, C.E.; Jones, J.L.; Fox, L.H.; Dickens, M.; Prigent, S. A.; Manson, M. *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 361 (2003).
- Sriram, K.; Benkovic, S.A.; Miller, D.B.; O'Callaghan, J.P. *Neuroscience*, **115**, 1335 (2002).

- Stein, R.A.; Ludescher, R.D.; Dahlberg, P.S.; Fajer, P.G.; Bennett, R.L.; Thomas, D.D. *Biochemistry*, **29**, 10023 (1990).
  - Straume, M. *Methods Enzymol.*, **240**, 89 (1994).
  - Straume, M.; Johnson, M.L. *Methods Enzymol.*, **210**, 87 (1992).
  - Stryer, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5708 (1966).
  - Sugar, I.P.; Zeng, J.; Chong, P.L. *J. Phys. Chem.*, **95**, 7524 (1991).
  - Sujatha, J.; Mishra, A.K. *J. Fluoresc.*, **7**, 169S (1997).
  - Sun, W.; Gee, K.R.; Klaubert, D.H.; Haugland, R.P. *J. Org. Chem.*, **62**, 6469 (1997).
  - Suwaiyan, A.; Al-Adel, F.; Hamdan, A.; Klein, U.K.A. *J. Phys. Chem.*, **94**, 7423 (1990).
- 

## T

---

- Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M.; Ballesteros, L.; Bermejo, R. *Appl. Spectrosc.*, **51**, 401 (1997).
- Talavera, E.M.; Afkir, M.; Salto, R.; Vargas, A.M.; Álvarez-Pez, J.M. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **59**, 9 (2000).
- Talavera, E.M.; Bermejo, R.; Crovetto, L.; Orte, A.; Alvarez-Pez, J.M. *Appl. Spectrosc.*, **57**, 208 (2003).
- Tan, Y.P.; Llano, I.; Hopt, A.; Würriehausen, F.; Neher, E. *J. Neuroscience Methods*, **92**, 123 (1999).
- Tang, C.L.; Rosenberg, W.R.; Ukachi, T.; Lane, R.J.; Cheng, L.K. *Laser Focus World*, **26**, 107 (1990).
- Teorell, T. (a) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **57**, 205 (1937).
- Teorell, T. (b) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **57**, 226 (1937).
- Thomas, D.; Tovey, S.C.; Collins, T.J.; Bootman, M.D.; Berridge, M.J.; Li, P. *Cell Calcium*, **28**, 213 (2000).
- Tolbert, L.M.; Haubrich, J.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 8163 (1990).

- Tolbert, L.M.; Haubrich, J.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10593 (1994).
  - Tolbert, L.M.; Solntsev, K.M. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 19 (2002).
  - Torchinsky, A.; Toder, V.; Savion, S.; Shepshelovich, J. *Diabetologia*, **40**, 635 (1997).
  - Tran-Thi, T.-H.; Gustavsson, T.; Prayer, C.; Pommeret, S.; Hynes, J.T. *Chem. Phys. Lett.*, **329**, 421 (2000).
  - Turko, B.T.; Nairn, J.A.; Sauer, K. *Rev. Sci. Instrum.*, **54**, 118 (1983).
  - Turton, J.A.; Andrews, C.M.; Havard, A.C.; Robinson, S.; York, M.; Williams, T.C.; Gibson, F.M. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1849 (2002).
  - Tutundjian, R.; Mihier, C.; Foll, F.L.; Leboulenger, F. *Mar. Environ. Res.*, **54**, 443 (2002).
- 

## U

---

- Usui, Y.; Enokido, H. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 2741 (1973).
  - Uzhinov, B.M.; Druzhinin, S.I. *Usp. Khim.*, **67**, 140 (1998).
- 

## V

---

- Van den Bergh, V.; Boens, N.; De Schryver, F.C.; Ameloot, M.; Gallay, J.; Kowalczyk, A. *Chem. Phys.*, **166**, 249 (1992).
- Van den Bergh, V.; Boens, N.; De Schryver, F.C.; Ameloot, M.; Steels, P.; Gallay, J.; Vincent, M.; Kowalczyk, A. (a) *Biophys. J.*, **68**, 1110 (1995).
- Van den Bergh, V.; Boens, N.; De Schryver, F.C.; Gallay, J.; Vincent, M. (b) *Photochem. Photobiol.*, **61**, 442 (1995).
- Van den Bergh, V.; Kowalczyk, A.; Boens, N.; De Schryver, F.C. *J. Phys. Chem.*, **98**, 9503 (1994).
- Van den Zegel, M.; Boens, N.; Daems, D.; De Schryver, F.C. *Chem. Phys.*, **101**, 311 (1986).

- 
- Van der Oord, C.J.R.; Gerritsen, H.C.; Rommerts, F.F.G.; Shaw, D.A.; Munro, I.H.; Levine, Y.K. *Appl. Spectrosc.*, **49**, 1469 (1995).
  - Van Dommelen, L.; Boens, N.; Ameloot, M.I; De Schryver, F.C.; Kowalczyk, A. *J. Phys. Chem.*, **97**, 11738 (1993).
  - Van Stam, J.; De Schryver, F.C.; Boens, N.; Hermans, B.; Jerome, R.; Trossaert, G.; Goethals, E.; Schacht, E. *Macromolecules*, **30**, 5582 (1997).
  - Vander Donckt, E. *React. Kinet.*, **5**, 531 (1970).
  - Varela, A.P.; Dias, A.; Miguel, M.G.; Becker, R.S.; Maçanita, A.L. (a) *J. Phys. Chem.*, **99**, 2239 (1995).
  - Varela, A.P.; Miguel, M.G.; Maçanita, A.L.; Burrows, H.D.; Becker, R.S. (b) *J. Phys. Chem.*, **99**, 16093 (1995).
  - Vera, J.C.; Rivas, C.I.; Cortes, P.A.; Carcamo, J.O.; Delgado, J. *Anal. Biochem.*, **174**, 38 (1988).
  - Vergne, I.; Constant, P.; Lanéelle, G. *Anal. Biochem.*, **255**, 127 (1998).
  - Vert, F.T.; Sánchez, I.Z.; Torrent, A.O. *J. Photochem.*, **23**, 355 (1983).
  - Vigil, M.R.; Renamayor, C.S.; Piérola, I.; Lima, J.C.; Melo, E.C.; Maçanita, A.L. *Chem. Phys. Lett.*, **287**, 379 (1998).
  - Visser, A.J.W.G.; Van Hoek, A. *Photochem. Photobiol.*, **33**, 35 (1981).
  - Vogt, B.S.; Schulman, S.G. *Chem. Phys. Lett.*, **95**, 159 (1983).
  - Von Bayer, A. *Chem. Ber.*, **5**, 255 (1871).
- 

## W

---

- Wadsworth, P.; Salmon, E.D. *Methods Enzymol.*, **134**, 519 (1986).
- Wahl, Ph.; Achet, J.C. *Biochem. Biophys. Acta*, **285**, 99 (1972).
- Wang, Z.; Lee, Y.; Fiori, S.; Leung, C.S.; Zhu, Y.S. *Patt. Recog. Lett.*, **24**, 1409 (2003).
- Ware, W.R.; Doemeny, L.J.; Nemzek, T.L. *J. Phys. Chem.*, **77**, 2038 (1973).
- Washbrook, R.; Riley, P.A. *Brit. J. Cancer.*, **75**, 1417 (1997).

- Webb, S.P.; Yeh, S.W.; Philips, L.A.; Tolbert, M.A.; Clark, J.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7286 (1984).
  - Webb, S.P.; Philips, L.A.; Yeh, S.W.; Tolbert, L.M.; Clark, J.H. *J. Phys. Chem.*, **90**, 5154 (1986).
  - Weber, K. *Z. Phys. Chem.*, **B15**, 18 (1931).
  - Weber, D.G. *Nature*, **190**, 27 (1961).
  - Weller, A. *Z. Electrochem.*, **56**, 662 (1952).
  - Weller, A. *Z. Electrochem.*, **58**, 849 (1954).
  - Weller, A. *Naturwiss.*, **42**, 175 (1955).
  - Weller, A. *Z. Physik. Chem.*, **15**, 438 (1958).
  - Weller, A. *Prog. React. Kinet.*, **1**, 189 (1961).
  - Wells, S.; Johnson, I. En *Three-Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Specimens*, pp101-129. Academic Press, London (1994).
  - Wenska, G.; Skalki, B.; Insinska M.; Paszyc, S.; Verrall, R.E. *J. Photochem. Photobiol. A*, **108**, 135 (1997).
  - Wiechmann, M.; Port, H.; Laermer, F.; Frey, W.; Elsaesser, T. *Chem. Phys. Lett.*, **165**, 28 (1990).
  - Willard, H.H.; Merritt, L.L.; Dean, J.A.; Settle, F.A. *Instrumental Methods of Analysis*, 7<sup>a</sup> ed. Wadsworth, Inc., Belmont (1988).
  - Wilson, G.H.; Grolig, F.; Kosegarten, H. *Planta*, **206**, 154 (1998).
  - Wittwer, C.T.; Herrmann, M.G.; Moss, A.A.; Rasmussen, R.P. *Biotechniques*, **22**, 130 (1997).
  - Wu, S.; Dovichi, N.J. *J. Chromatogr.*, **480**, 141 (1989).
- 

## Y

---

- Yagupol'skii, L.M.; Il'chenko, A.Y.; Gandel'sman, L.Z. *Russ. Chem. Rev.*, **52**, 993 (1993).

- Yamazaki, I.; Tamai, N.; Kume, H.; Tsuchiya, H.; Oba, K. *Rev. Sci. Instrum.*, **56**, 1187 (1985).
  - Yang, R.; Schulman, S.G. *J. Fluoresc.*, **11**, 109 (2001).
  - Yang, R.; Schulman, S.G. *J. Fluoresc.*, **13**, 89 (2003).
  - Yguerabide, J. *Methods Enzymol.*, **26**, 498 (1972).
  - Yguerabide, J.; Talavera, E.; Álvarez, J.M.; Afkir, M. *Anal. Biochem.*, **241**, 238 (1996).
  - Yguerabide, J.; Talavera, E.; Alvarez-Pez, J.M.; Quintero, B. *Photochem. Photobiol.*, **60**, 435 (1994).
  - Yguerabide, J.; Yguerabide, E.E. En *Nanosecond Fluorescence Spectroscopy*, Optical Techniques in Biological Research, Bell Telephone Laboratories, **4**, p181 (1984).
  - Yorozu, T.; Hoshino, M.; Imamura, M.; Shizuka, H. *J. Phys. Chem.*, **86**, 4422 (1982).
  - Yu, C.; Xu, S.; Chen, S.; Zhang, M.; Shen, T. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **68**, 73 (2002).
- 
- 

**Z**

---

---

- Zeng, H.H.; Wang, K.M.; Yang, X.H.; Yu, R.Q. *Anal. Chim. Acta*, **287**, 267 (1994).
  - Zhang, J.; Chen, X.; Hu, Z.; Ma, X. *Anal. Chim. Acta*, **471**, 203 (2002).
  - Zhang, Z.; Grattan, K.T.V.; Hu, Y.; Palmer, A.W.; Meggit, B.T. *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 2590 (1996).
  - Zuk, R.F.; Rowley, G.L.; Ullman, E.F. *Clin. Chem.*, **25**, 1554 (1979).
  - Zuker, M.; Szabo, A.G.; Bramall, L.; Krajcarski, D.T.; Selinger, B. *Rev. Sci. Instrum.*, **56**, 14 (1985).
- 
-